

Aus dem Institut für Reproduktionsmedizin
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Kinetische Untersuchungen zur in vitro Kapazitation
und
Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion am Eberspermatozoon**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Erik Olaf Piehler
aus München

Hannover 2005

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Edda Töpfer-Petersen

1. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Edda Töpfer-Petersen
2. Gutachter: Apl.-Prof. Dr. H. Niemann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2005

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (TO 114 / 6-1, 6-2)

Meinen Eltern

A. Einleitung	13
B. Literaturübersicht	15
1 Die männlichen Gameten.....	15
1.1 Aufbau der Zelle	15
1.2 Entwicklung der Keimzellen im Hoden.....	16
1.3 Reifung der Keimzellen im Nebenhoden.....	17
1.4 Das Ejakulat.....	18
1.4.1. Das Seminalplasma.....	18
2 Die weiblichen Gameten.....	19
2.1 Reifung der Eizelle	19
2.2 Die Zona pellucida.....	22
3. Physiologische Veränderungen am Spermium.....	24
3.1 Kapazitation	25
3.2 Akrosomreaktion.....	28
4. Gameteninteraktion.....	29
C. Eigene Untersuchungen	34
1. Versuchskonzeption.....	34
2. Material und Methoden.....	34
2.1 Probanden	34
2.2 Gewinnung des Ejakulates.....	34
2.3 Untersuchung des Ejakulates	35
2.4 Verdünnen und Lagern des Samens.....	35
2.4.1 Verwendete Medien	35
2.4.2 Flüssigkonservierter Samen	36
2.4.3 Tiefgefrierkonservierter Samen	36
2.5 Aufbereitung der Spermien.....	36
2.5.1 Flüssigkonservierter Samen	36
2.5.2 Tiefgefrierkonservierter Samen	37
2.6. Anmerkung zu den Versuchen.....	37
2.6.1. Vorbereitung der Spermienzellsuspension für die Bestimmung des zytosolischen Kalziumionengehaltes	37

Inhaltsverzeichnis

2.6.2. Vorbereitung der Spermienzellsuspension für die Bestimmung der Akrosomreaktion und Tyrosinphosphorylierung	38
2.7 Aufbereitung der Zona pellucida	38
2.7.1 Gewinnung, Entnahme und Aufbereitung der Oozyten.....	38
2.7.2 In-vitro-Reifung der Oozyten	39
2.7.3 Solubilisieren der Zona pellucida	40
2.8 Verwendete Fluoreszenzproben.....	40
2.8.1 Detektion der Membranintegrität mit Propidiumiodid (PI)	40
2.8.2 Detektion des Ca ²⁺ -Influges mit Fluo3-AM	41
2.8.3 Detektion der Akrosomreaktion mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiertem Peanutagglutinin (PNA-FITC)	41
2.8.4 Detektion der Tyrosinphosphorylierung mit Antiphosphotyrosine (Ab-4)	42
2.9 Durchflusszytometrie.....	43
2.9.1 Die technischen Grundlagen	43
2.9.2 Grundeinstellungen des Durchflusszytometers.....	45
2.10 Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie	46
2.11 Kinetik von Prozessen in Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen	47
2.11.1 Messung des intrazellulären Kalziumionengehaltes.....	47
2.11.2 Messung der Akrosomreaktion.....	48
2.11.3 Messung der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen	48
2.12 Einfluss von Zona pellucida Proteinen von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades auf das Spermium	48
2.12.1 Messung der Akrosomreaktion	49
2.12.2 Messung des intrazellulären Kalziumionengehalt	49
2.12.3 Messung der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen.....	49
2.13 Einfluss intakter Zonae pellucidae ungereifter und in vitro gereifter Oozyten auf kryokonservierten Samen: Ein funktioneller Vergleich	49
2.13.1 Induktion der Akrosomreaktion.....	50
2.13.2 Auswertung.....	51
2.13.3 Der intrazelluläre Kalziumionengehalt.....	53
2.13.4 Die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen.....	53
3. Statistische Auswertung.....	54

D. Ergebnisse	55
1. Durchflusszytometrische Untersuchungen von Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen	55
1.1 Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes $[Ca^{2+}]_i$	56
1.2 Veränderungen der Tyrosinphosphorylierung	57
1.3 Veränderungen der spontanen Akrosomreaktion.....	59
2. Der Einfluss von Zona pellucida Protein unterschiedlich lang in vitro gereifter Oozyten auf Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen	60
2.1 Die Induzierbarkeit von Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes.....	61
2.2 Die Induzierbarkeit der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen ..	64
2.3 Die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion	66
3. Der Einfluss von intakter Zona pellucida unterschiedlich lang in vitro gereifter Oozyten auf Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen	70
3.1 Der Einfluss auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion.....	70
3.2 Der Einfluss von intakter Zona pellucida unterschiedlicher Reifungsstadien auf den intrazellulären Kalziumionengehalt	73
3.3 Der Einfluss intakter Zona pellucida von Eizellen unterschiedlichen Reifungsstadiums auf die Tyrosinphosphorylierung	74
E. Diskussion	75
1. Einleitung	75
2. Endogene Veränderungen des Spermatozoons während der Kapazitation.....	76
3. Die Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion.....	80
4. Zusammenhang zwischen der Reifung der Zona pellucida und deren Funktionalität	82
5. Abschlussbetrachtung	85
F. Zusammenfassung	87
G. Summary	89
H. Literaturverzeichnis	91

Inhaltsverzeichnis

J. Anhang	110
1. Rezeptverzeichnis	110
2. Messung des pH-Wertes und der Osmolalität	114
2.1. Messung des pH-Wertes	114
2.2. Messung der Osmolalität	114
3. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse.....	115
3.1 Daten von Spermatozoen während der Inkubation unter kapazitierenden Bedingungen	115
3.2 Daten von Spermatozoen unter dem Einfluss von solubilisierter Zona pellucida unterschiedlichen Reifegrades.....	116
3.3 An intakte Zona pellucida unterschiedlichen Reifegrades gebundene Spermatozoen.....	118
K. Eidesstattliche Erklärung	119
L. Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (zyklisches Adenosinmonophosphat)
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlendioxid
CO ₃ ²⁻	Karbonation
db-cAMP	dibutyryl-cAMP
DNA	desoxyribonucleotide acid (Desoxyribonukleinsäure)
et al.	et alii (und andere)
EDTA	Ethylen-N, N, N, N-Tetraessigsäure
Fa.	Firma
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL-1	Grünfluoreszenz
FL-2	Orangefluoreszenz
FL-3	Rotfluoreszenz
FL-4	Ultraviolettfluoreszenz
Fluo3-AM	4-(6Acetoxymethoxy-2,7-dichloro-3 oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'tetraacetic acidtetrakis(acetoxy-methyl)ester
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GV	Germinalvesikel

Abkürzungsverzeichnis

GVBD	Germinalvesikel Breakdown
H ⁺	Wasserstoffion
HBS	Hepes buffered saline
hCG	human Chorionic Gonadotropin
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'2-ethan
IP3	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kaliumion
kg	Kilogramm
MII	Metaphase II
Mg ²⁺	Magnesiumion
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mod.	modifiziert
N	Stickstoff
n	Anzahl der Messdurchgänge
Na ⁺	Natriumion
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NCSU	North-Carolina-State-University
N-Glykan/glykosidisch	Protein mit Zuckerkette, welche über eine NH ₂ -Gruppe einer Aminosäure mit dieser verknüpft ist
NH ₂ -Gruppe	Aminogruppe
O-Glykan/glykosidisch	Protein mit Zuckerkette, welche über eine OH-Gruppe einer Aminosäure mit dieser verknüpft ist
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
mosm	Milliosmol
p	Probabilität, Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat buffered saline
PC	Personal Computer

pH	pondus Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
PO ₄ ³⁻	Phosphation
PVA	Polyvinylalkohol
PNA	Lectin from Arachis hypogaea (Peanutagglutinin)
px	pixel
®	eingetragenes Warenzeichen
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	scanning electron microscopy
SO ₄ ²⁻	Sulfation
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
Standardabw.	Standardabweichung
SWM	Saccharose Waschmedium
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
Tri	Drei
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
U	Umdrehung
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel
ZP	Zona pellucida

Die Begriffe Spermium, Spermatozoon und Samenzelle werden synonym verwendet.

Materialien

Die Rezepturen der verwendeten Pufferlösungen und Reagenzien sind im Anhang (J) aufgeführt.

A. Einleitung

Die Interaktion der männlichen und weiblichen Gameten ist für die Befruchtung von entscheidender Bedeutung. Vor der Syngamie laufen eine Reihe physiologischer Vorgänge im Spermatozoon ab. Ein Spermatozoon erlangt seine Befruchtungskompetenz erst durch den Kapazitationsvorgang, der es zur Hyperaktivierung und Akrosomreaktion befähigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des zytosolischen Kalziumionengehaltes und die Phosphorylierung von Spermienproteinen geeignete Marker für den Kapazitationsprozess sind. Die genauen Abläufe dieser komplexen Prozesse sind noch nicht vollständig geklärt. Während des Kapazitationsprozesses erhöht sich der zytosolische Kalziumionengehalt und die Menge tyrosinphosphorylierter Proteine im Spermium nimmt zu.

Nur kapazitierte Spermien sind in der Lage, an die Zona pellucida, die die Eizelle umgebende Glykoproteinschicht, zu binden. Diese Bindung induziert am Spermium die Akrosomreaktion, durch welche das Spermatozoon in der Lage ist, die Zona pellucida zu penetrieren. Nach der Penetration lagert es sich an die Eizelle an und die beiden Gameten fusionieren. Nach der Fusion wird die Exozytose der kortikalen Granula induziert und der Inhalt in den perivetillinen Raum freigesetzt. Proteasen und andere Faktoren der kortikalen Granula verändern die Zona pellucida (sogenanntes Zona-Hardening), welche verhindern, dass mehrere Spermien die Zona pellucida durchdringen. Beim Einsatz von in vitro Fertilisationstechniken stellt die Polyspermie auch heute noch ein großes Problem dar. Das verzögerte Zona-Hardening wird als Hauptursache für die Fusion mehrerer männlicher Gameten mit einer Eizelle angenommen. Entweder ist die verlangsamte Verhärtung der Zona pellucida eine Folge einer unvollständigen oder verzögerten Freisetzung der Enzyme der kortikalen Granula, oder die Ursache für die reduzierte Geschwindigkeit ist in der Zona pellucida selbst zu suchen (RATH et al. 2005).

Ob eine Steigerung der Funktionalität der Zona pellucida mit der Reifung der Eizelle in Verbindung gebracht werden kann, muss noch geklärt werden. Die Eizelle reift vor der Befruchtung und beendet die Meiose bis zum MII-Stadium.

Während der Maturation der Eizelle unterliegt die Zona pellucida strukturellen Veränderungen. Die Synthese findet tierartlich verschieden bei höher entwickelten Spezies in den Granulosazellen und in der Eizelle statt.

A. Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten die genauen zeitlichen Abläufe der Kapazitation porciner Spermatozoen durchflusszytometrisch untersucht werden. Weiterhin wurde die Induzierbarkeit von Prozessen am Spermatozoon durch die Zona pellucida in Abhängigkeit des Reifegrades der Oozyte untersucht. Durchflusszytometrisch wurden die Reaktionsabläufe in Gegenwart von Zona pellucida-Glykoproteinen untersucht. Der Einfluss intakter Zonae pellucidae auf die Prozessabläufe der Spermatozoen wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

B. Literaturübersicht

Die Aufgabe von Hoden und Ovar ist es, haploide Gameten zu produzieren. Beim höher entwickelten Säugetier liegt in jeder Zelle ein diploider Chromosomensatz vor, der sich aus den haploiden Chromosomensätzen von Mutter und Vater zusammensetzt. Damit der haploide Chromosomensatz weitergegeben werden kann, muss der diploide halbiert werden. Dieser Vorgang findet während der Meiose statt. Die Meiose unterteilt sich in eine erste und eine zweite Reifeteilung. Zu Beginn der ersten Reifeteilung liegt in allen Zellen der doppelte Chromosomensatz ($4n$) vor. Jedes Chromosom besteht aus zwei identischen Chromatiden. Während der ersten Teilung der Zelle wird der doppelte Satz auf den einfachen ($2n$) reduziert. In der zweiten Teilung werden die beiden Chromatiden eines jeden Chromosoms auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt. Aus Zellen mit haploidem Chromosomensatz mit zwei Chromatiden entstehen Zellen mit Chromosomen, die nur einen DNA-Strang ($1n$) enthalten.

1 Die männlichen Gameten

1.1 Aufbau der Zelle

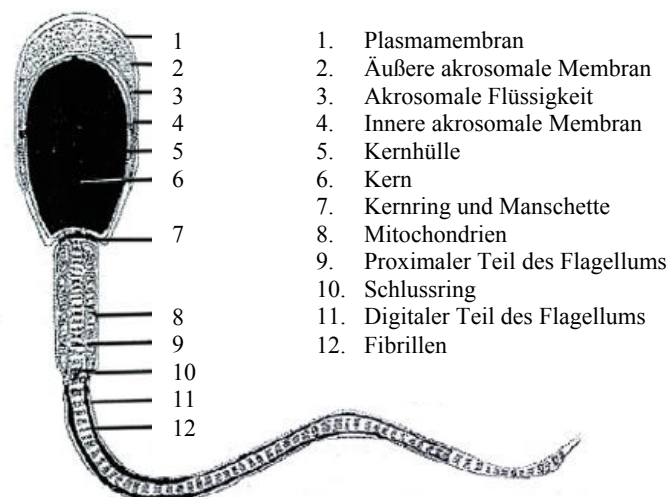


Abb. 1: Schematische Darstellung (Querschnitt) der Ebersamenzelle (nach GADELLA 1994)

B. Literaturübersicht

Ein Spermatozoon besteht aus Kopf, Hals und Schwanz. Der Schwanz wird in Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt. (SETCHELL 1982). Die Gesamtlänge beträgt beim Schwein 50 bis 70 μm . Der Kopf besteht aus einer Kopfkappe, dem Akrosom, welches den Kern in den vorderen zwei Dritteln umschließt. Es ist durch eine innere und eine äußere Membran begrenzt. Der Kern wird wie das Akrosom durch eine innere und äußere Membran umgeben und enthält hochgradig kondensiertes Chromatin.

Spermienkopf und -schwanz werden über eine gelenkige Verbindung, den Spermienhals, zusammengehalten. Als Verbindungsstück gilt die Basalplatte, die sich zwischen der Implantationsgrube des Kerns und dem proximalen Zentriol befindet. Nach der Befruchtung wird das Zentriol des Spermiums zur Zellteilung benötigt, da die Eizelle nur eines besitzt.

Der Schwanz entspringt am proximalen Zentriol als Achsenfaden. Dieser enthält ein geißeltypisches, radiärsymmetrisches Mikrotubulussystem, welches aus neun randständigen Doppelmikrotubuli und zwei zentral angeordneten Mikrotubuli besteht. Dieses System wird von einer fibrinösen Hülle umschlossen. Die dem Mittelstück außen spiralförmig anliegenden Mitochondrien produzieren ATP. Durch den Umbau von ATP zu ADP wird Energie frei, die der Fortbewegung dient.

1.2 Entwicklung der Keimzellen im Hoden

Die Entwicklung der Spermatogonien zu Spermatozoen wird mit dem Eintritt in die Geschlechtsreife fortgesetzt. Durch den hormonellen Einfluss von FSH und Testosteron wird die Spermatogenese induziert. Die Spermatogonien teilen sich mitotisch. Ein Teil der Zellen bleibt als Stammpopulation erhalten, der andere Teil differenziert sich weiter und tritt in die erste Reifeteilung ein. Mit Eintritt in die Meiose werden die Zellen als primäre Spermatozyten bezeichnet. Diese werden nach Abschluss der Teilung zu sekundären Spermatozyten mit haploidem Chromosomensatz. Es folgt die zweite Reifeteilung, in der aus einem sekundären Spermatozyten zwei Spermatiden entstehen (YANAGIMACHI 1994).

Während der Spermiogenese differenzieren die Spermatiden zu Spermatozoen. Diese verläuft in vier Phasen. Zunächst bildet sich aus kleinen Vesikeln des Golgiapparates

durch Verschmelzung die akrosomale Vakuole. Diese haftet der Kernmembran an. Die Zentriolen wandern zum gegenüberliegenden Pol. Das proximale Zentriol legt sich an die Basalplatte des Kernes, dem distalen Zentriol entwächst das Axonema und differenziert später zum Schwanz. In der zweiten Phase flacht die Vakuole ab und dehnt sich tierartlich verschieden über die oberen Teile des Kernes aus. In der dritten Phase verlängert sich die Zelle. Der Kern verdichtet sich zunehmend. Histone werden gegen Protamine ausgetauscht, um den Kern stärker zu kondensieren. Die Mitochondrien ordnen sich um den proximalen Teil der Geißel und bilden das Mittelstück. Abschließend folgt die Phase der Reifung, in der das Zytoplasma mit überschüssigen Zellorganellen abgeschnürt wird. Der Zyklus der Spermatogenese ist tierartlich von unterschiedlicher Dauer (z.B. 34 Tage Schwein, 57 Tage Rind) (SCHNOOR 1989).

1.3 Reifung der Keimzellen im Nebenhoden

Spermien, die den Hoden verlassen, sind zwar in Form und Gestalt nicht von solchen, die ejakuliert wurden, zu unterscheiden, sie sind dennoch nicht in der Lage, die Eizelle zu befruchten. Zellen ohne posttestikuläre Reifung sind immotil. Sie können die Eizelle nicht erkennen und sind nicht in der Lage, die Zona pellucida zu penetrieren. Um die Befruchtungsfähigkeit zu erlangen, bedarf es einiger Reifungsvorgänge, die in Nebenhodenkopf und -körper erfolgen. Während der Maturation im Nebenhoden erlangt das Spermatozoon seine Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung und zur Interaktion mit der Eizelle (KIRCHHOFF und IVELL 1995).

Im Laufe der Passage durch den Nebenhoden werden Strukturen des Kernes und des Schwanzes durch die Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert. Am stärksten ist die Plasmamembran von Veränderungen betroffen. Substanzen, die im Hoden an das Spermium adsorbiert wurden, werden entfernt. Proteine werden enzymatisch durch Proteasen, Glykosidasen oder Glykosyltransferasen verändert. Integrale Proteine werden eingebaut, und periphere Membranproteine werden fester an das Plasmalemm assoziiert. Durch Änderungen an der Lipiddoppelschicht und durch die Umverteilung von Proteinen entsteht eine Domänenstruktur innerhalb der Membran. In die

B. Literaturübersicht

Membran wird Cholesterol eingebaut (SEKI et al. 1992). Dieser Vorgang bewirkt eine Stabilisierung der Membran. Zusätzlich wird dem Spermatozoon eine Proteinhülle aufgelagert, die zum einen Rezeptorproteine und Ionenkanäle maskiert, zum anderen einen Schutz vor Proteolyse bietet.

Die Spermien unterliegen während ihrer Passage durch den Nebenhoden zahlreichen Reifungsvorgängen und haben, wenn sie den Nebenhodenschwanz erreichen, ihre volle Befruchtungspotenz erlangt.

1.4 Das Ejakulat

Unter Ejakulat oder Sperma versteht man ein Gemisch verschiedener Bestandteile, das von männlichen Tieren beim Deckakt abgegeben wird. Es besteht aus Spermatozoen und Seminalplasma. Während der Ejakulation wird den Spermien im männlichen Genitale dieser flüssige Bestandteil zugefügt. Das Verhältnis der Sekretionsprodukte und der Spermien ist abhängig von der Sekretionsleistung, der Größe und der Lagerungskapazität der männlichen Geschlechtsdrüsen (MANN 1954). Das Volumen des Ejakulates beträgt beim Eber etwa 150 bis 250 ml. Ein Ejakulat enthält im Durchschnitt 60 Milliarden ausgereifte Spermatozoen. Es kann zusätzlich unreife, nicht ausdifferenzierte Spermien sowie Epithelzellen, Zytoplasmotropfen und Leukozyten enthalten.

1.4.1. Das Seminalplasma

Das Seminalplasma ist der Bestandteil des Ejakulates, der frei von Spermien ist. Es besteht aus Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, des Hodens, des Nebenhodens sowie der exkretorischen Gänge. Ein Teil der drei letztgenannten Sekrete wird rückresorbiert (MANN und LUTWACK-MANN 1981). Das Seminalplasma besteht zu 98 % aus Wasser (KÖNIG 1990, WEITZE und MÜLLER 1991). Die übrigen 2 % setzen sich hauptsächlich aus Fruktose, Sorbit, Inosit, Lactat, freien Aminosäuren, Lipiden, Prostaglandinen, Polyaminen, Lipiden, Steroidhormonen, Proteinen und Ionen zusammen (MANN und LUTWACK-MANN 1981, SCHÜLKE 1991). Die verschiedenen Ionen wurden von HAFEZ und FRASER

näher untersucht. Sie fanden Ionen wie Na^+ , K^+ , H^+ , Mg^{2+} , Cl^- und Ca^{2+} im Seminalplasma (HAFEZ 1993, FRASER 1995). Je nach Tierart, Rasse, Zuchtsaison und Beanspruchung unterscheidet sich die Zusammensetzung.

Das Seminalplasma besitzt Schutz- und Nährfunktionen. Es dient als Transportmedium und hat eine motilitätssteigernde Wirkung. Seine protektive Wirkung entfaltet es durch eine Proteinschutzhülle, die durch die Anlagerung von Proteinaseinhibitoren und anderen Eiweißen an die Spermatozoenmembran aufgebaut wird und das Spermium vor schädlichen Einflüssen im weiblichen Genitale schützt. Die Proteine der Schutzhülle werden auch als Dekapazitationsfaktoren bezeichnet, da sie die vorzeitige Aktivierung oder Kapazitation des Spermiums verhindern (SHIVAJI et al. 1990). Durch den alkalischen pH-Wert von 7,2 bis 7,8 des Seminalplasmas werden die Spermien zusätzlich vor dem leicht sauren Milieu des weiblichen Geschlechtstraktes geschützt (SETCHELL et al. 1994).

2 Die weiblichen Gameten

Nach der Migration der Urkeimzellen in die fetalen Gonadenanlagen und der dort stattfindenden Differenzierung über Primordialkeimzellen und Oogonien zu primären Oozyten, arretieren diese in der Prophase I der Meiose. Während dieser Ruhephase in der Meiose finden Stoffwechselforgänge statt, die eine bis zu 200fache Vergrößerung der Zellen bewirken (MOOR et al. 1990). Zu diesem Zeitpunkt ist der Kern soweit vergrößert, dass er sich lichtmikroskopisch als Bläschen (Germinalvesikel) darstellt. Das Wachstum befähigt die Eizelle, die Meiose fortzusetzen.

2.1 Reifung der Eizelle

Die Reifung der Eizelle läuft in verschiedenen Phasen ab. Als Maturation der Eizelle wird die Summe aller ablaufenden Prozesse - von der Wiederaufnahme der Meiose (mit Eintritt der Geschlechtsreife) bis zur zweiten Arretierung im Kernstadium der Metaphase II (zweite Ruhephase) - bezeichnet.

Ein bedeutender Bestandteil dieser Vorgänge ist die Kernreifung. Dabei tritt im Fetus der Kern in die Prophase I ein. Er durchläuft die Stadien von Leptotän (Zygotän

B. Literaturübersicht

Pachytän) bis Diplotän, in welchem die Kernteilung einfriert. Die als Diktyotän bezeichnete Ruhephase wird bis zur Induktion der Reifung aufrecht erhalten (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. 1989). In der Wachstumsphase der Prophase I vergrößert sich der Nukleus. Dieser wird dann als Germinalvesikel bezeichnet.

Der Zeitraum von der Auslösung der Kernreifung bis zum Eintreten in die Metaphase I wird als Germinalvesikel Breakdown (GVBD) bezeichnet (MOTLIK und FULKA 1976). Es wurden lichtmikroskopisch sechs Stadien unterschieden.

1. GVI

Zellkern und Nukleolus sind deutlich erkennbar und ring- oder hufeisenförmig um das Kernkörperchen verdichtet.

2. GVII

Zellkern und Nukleolus sind erhalten und im Bereich der Kernmembran sind einige orcein positive Strukturen, Chromozentren, nachzuweisen.

3. GVIII

Zellkern und Nukleolus sind noch intakt. Das Chromatin liegt in Clustern oder fädigen Strukturen vor.

4. GVIV

Der Zellkern ist erhalten und der Nukleolus ist nicht mehr zu erkennen. Das Chromatin ist als unregelmäßiges Netzwerk oder in Form einzelner Bivalente in der Orceinfärbung zu erkennen.

5. Frühe Diakinese

Die Zellkernmembran ist nicht sichtbar. In dem früheren Bereich des Zellkerns befinden sich Bivalente.

6. Späte Diakinese

Die Chromosomen sind kondensiert und können voneinander abgegrenzt werden.

Nach dem GVBD setzt sich die Kernentwicklung fort. Sie bleibt im Stadium der Metaphase erneut stehen. Dabei werden folgende Phasen durchlaufen:

Metaphase I

Der Zellkern existiert nicht mehr und die Chromosomen sind in einem Cluster angeordnet.

Anaphase I

Die Chromosomen befinden sich in der Äquatorialebene. Eine Spindel ist zu erkennen.

Telophase I

Die meiotische Spindel ist deutlich zu sehen. Die homologen Chromosomen bewegen sich zu den gegenüberliegenden Kernpolen.

Metaphase II

Die Chromosomen sind auf zwei Cluster verteilt. Polkörper sind zu finden.

Für die Maturation der Eizelle sind neben der Kernreifung auch strukturelle Veränderungen und die zytoplasmatische Reifung von Bedeutung. Während der in vivo Reifung von porcinen Oozyten konnte gezeigt werden, dass eine Umstrukturierung von Zellen stattfindet. Die Mitochondrien verteilen sich gleichmäßig im Ooplasma; die kortikale Granula verdoppelt sich und ordnet sich unterhalb des Plasmalemmas in einem dünnen Streifen an (BUCCIONE et al. 1990).

Die Entwicklung der primären Oozyten wird in vivo erst durch einen präovulatorischen Gonadotropinimpuls mit Eintritt der Geschlechtsreife fortgesetzt (BUCCIONE et al. 1990). Mit Abschluss der Meiose sind sekundäre Oozyten entstanden. Es gelangen nur wenige Oozyten zur Ovulation. Die meisten atresieren.

Bis zur Aktivierung im Geschlechtszyklus bilden die primären Oozyten mit einem sie einschichtig umgebenden Follikelepithel die Primordialfollikel. Diese entwickeln sich durch die Proliferation des Follikelepithels zu Sekundärfollikeln. Die die Eizelle direkt umgebenden Follikelepithelzellen bilden Fortsätze aus. An der Oozytenoberfläche entstehen Mikrovilli. Zwischen Epithelzellen und Oozyte wird die Zona pellucida gebildet. Mit dem Beginn der Sekretion von Liquor folliculi durch die

B. Literaturübersicht

Follikelzellen wird der Sekundärfollikel zum Tertiärfollikel. Die Eizelle bleibt an einer Stelle über den Cumulus oophorus durch die Corona radiata mit den Follikelepithelzellen verbunden. Der entstandene, mit Follikelflüssigkeit gefüllte Raum, wird als Follikelhöhle bezeichnet. Die Oozyte ist durch Zellfortsätze der inneren Zellschicht der Corona radiata mit dieser vernetzt. Die Kumuluszellen stehen durch Gap junctions miteinander in Verbindung. So wird die Versorgung mit Metaboliten und die Signalübertragung der Eizelle aus der Peripherie gewährleistet (MOTTA et al. 1994). Die zytoplasmatische Reifung tritt mit der Kernreifung in Wechselwirkung (EPPIG 1996).

Neben einer erfolgreich abgelaufenen Kernreifung nehmen weitere Faktoren, wie zum Beispiel eine Umverteilung der kortikalen Granula in einen 4 µm breiten Bereich unterhalb der Plasmamembran, die für einen erfolgreichen Polyspermieblock essentiell ist (DUCIBELLA 1996), Einfluss auf die Befruchtungs- und embryonale Entwicklungskompetenz, sodass die Kernreifung als alleiniges Kriterium zur Beurteilung nicht ausreichend ist.

2.2 Die Zona pellucida

Die Zona pellucida ist die extrazelluläre Matrix, die die Eizelle netzförmig umschließt. Ihr Durchmesser beträgt beim Schwein 100 bis 150 µm. Sie besteht aus drei verschiedenen Glykoproteinen: ZPA, ZPB und ZPC.

Die Maus war die erste Tierart, bei der die Eizelle näher untersucht wurde. Die Bezeichnung der drei Proteine als ZP1 (200 kDa), ZP2 (120 kDa) und ZP3 (83 kDa) erfolgte entsprechend ihrer Mobilität in der SDS-Elektrophorese (BLEIL und WASSARMAN 1980a). Später wurde eine einheitliche, speziesübergreifende Nomenklatur anhand der kodierenden Gene vorgenommen. So wurden ZP1 in ZPB, ZP2 in ZPA und ZP3 in ZPC umbenannt (HARRISON et al. 1993).

Glykoproteine sind Proteine, an die Zuckerketten gebunden sind. Durch zahlreiche Verbindungsformen und -möglichkeiten bieten die Kohlenhydrate eine größere Vielfalt zur Übertragung von Informationen als Aminosäuren. Bei der Verknüpfung zweier Aminosäuren entstehen zwei Möglichkeiten der Verbindung. Verbindet man zwei Zuckermoleküle miteinander, entstehen aufgrund zahlreicher möglicher Bindungsformen (α - oder β -Verknüpfung) bis zu 16 isoforme Strukturen (KOBATA

1992). Bei der Bindung der Zuckermoleküle an die Proteine werden O-Glykosylierung und N-Glykosylierung unterschieden. O-glykosidisch verknüpfte Zucker werden über die Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin an Proteine gebunden. Die N-Glykosylierung erfolgt über die Aminogruppe der Aminosäure Asparagin. Die festgelegten Informationen der Glykokonjugate können durch spezifische Rezeptoren abgelesen werden (GABIUS und GABIUS 1992) und dienen der interzellulären Kommunikation.

Die Proteinbiosynthese der Glykoproteine der Zona pellucida findet abhängig von der Tierart überwiegend in der Oozyte oder in den Granulosazellen statt. Für die Maus konnte nachgewiesen werden, dass der Ort der Synthese auf die Oozyte beschränkt ist (WASSARMAN und KINLOCH 1992, EPIFANO et al. 1995). Bei anderen Tierarten wurden Proteine der Zona pellucida auch in den Granulosazellen gefunden. GROOTENHUIS et al. (1996) verwenden zum immunhistochemischen Nachweis von ZPC Protein in den Granulosazellen murine monoklonale Antikörper und Antisera von Maus und Kaninchen. KÖLLE et al. (1996, 1998) wiesen entwicklungsstufenabhängig verschiedene Zona pellucida Proteine in den Granulosazellen von Sekundärfollikeln nach. Beim Rind konnte während der ganzen Follikelreifung die Beteiligung der Oozyte an der Synthese beobachtet werden. In ersten Untersuchungen wurden beim Schwein vier verschiedene Zona pellucida Proteine erkannt (HEDRIK und WARDRIP 1980, SACCO et al. 1981). Später wurde festgestellt, dass zwei der Proteine durch die Spaltung von Disulfidbrücken aus ZPA entstehen, durch die das Protein in zwei Untereinheiten zerfällt (HEDRIK und WARDRIP 1987). Beim Schwein wird im Stadium des Tertiärfollikels die Zona pellucida nur von den Granulosazellen synthetisiert. Die entsprechenden Transkripte konnten ausschließlich in den Granulosazellen nachgewiesen werden (KÖLLE et al. 1996).

Die Synthese der Zona pellucida beginnt, sobald die Eizelle von Follikelzellen umgeben ist, und endet kurz vor der Ovulation. Das Gewicht der Zona pellucida beim Schwein liegt je nach Reifungsstadium zwischen 15 und 30 ng. Die prozentuale Zusammensetzung der Glykoproteine und die Dicke der Zona pellucida variierten je nach Spezies. Bei Beuteltieren ist die Zona pellucida eher dünn angelegt (1-2 μm), bei anderen Tierarten ist sie deutlich stärker ausgeprägt. Beim Schwein misst sie ca. 16 μm . Die Proteine sind durch nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft. Im elektronenmikroskopischen Bild stellt sich die Zona pellucida als zweischichtiges

B. Literaturübersicht

Gebilde dar. Die äußere Schicht gleicht der Struktur eines Schwammes: Es sind zwischen den langfädigen Glykoproteinen Löcher zu erkennen. Die innere Schicht ähnelt eher einer amorphen Struktur.

WASSARMAN (1999) schreibt der Zona pellucida folgende Funktionen zu: Die Kommunikation zwischen Follikel und Oozyte während der Oogenese wird durch die Zona pellucida vermittelt. Sie reguliert nicht nur die Interaktion zwischen ovulierter Eizelle und Spermium, sondern sie schützt auch die Oozyte, die befruchtete Eizelle und den Embryo während der Entwicklung.

Die Zona pellucida stellt für Spermien eine Barriere dar. Zugleich ist die Zona pellucida am ersten Kontakt von Spermium und Eizelle beteiligt. Durch die Bindung des Spermiums an die Zona pellucida wird die Akrosomreaktion des Spermatozoons induziert. Die im Akrosom enthaltenen Enzyme werden freigesetzt und bewirken eine partielle Lysis der Zona pellucida, wodurch dem Spermium die Penetration ermöglicht wird. Erreicht das Spermatozoon die Oozyte, findet die Verschmelzung der beiden Gameten statt und das väterliche Erbgut gelangt in die Eizelle. Durch die Verschmelzung der beiden Gameten depolarisiert die Eizellmembran (schneller Polyspermieblock) und Kalzium wird aus internen Speichern der Oozyte intrazellulär freigesetzt. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration bewirkt eine Exozytose der corticalen Granula der Oozyte, welche verschiedene Enzyme wie Glykosidasen und Proteasen enthält. Diese freigesetzten Enzyme bewirken an den Glykoproteinen der Zona pellucida Modifikationen, durch die es anderen Spermatozoen nicht mehr möglich ist, an die Zona pellucida zu binden (langsamer Polyspermieblock) und sie zu durchdringen.

3. Physiologische Veränderungen am Spemium

Ein Spermium, das über den Deckakt in das weibliche Genitale gelangt, ist noch nicht befruchtungsfähig. Es ist umgeben vom Seminalplasma, welches Nähr- und Schutzfunktion für die Spermatozoen besitzt. Während der Ejakulation assoziieren an die Spermienoberfläche Proteine des Seminalplasmas, wie beispielsweise Proteinase-Inhibitoren, und vergrößern so die das Spermium umgebende Proteinschicht. Die Proteine werden als Dekapazitationsfaktoren bezeichnet und schützen das Spermatozoon vor ungünstigen Einflüssen im weiblichen Genitale.

Damit ein Spermium seine Befruchtungsfähigkeit erlangt, muss es kapazitieren. Zunächst streift es die Dekapazitationsfaktoren, also die es umgebende schützende Proteinhülle, ab (SHIVAJI et al. 1990). Dieser Vorgang erfolgt in Abhängigkeit von der Spezies entweder in der Zervix oder im Bereich der uterotubalen Verbindung (YANAGIMACHI 1994). Während der Kapazitation findet ein Efflux von Cholesterol aus der Spermienmembran statt. Dafür sind lipidbindende Proteine im umgebenden Millieu notwendig. Durch das Entfernen des Cholesterols erhöht sich die Fluidität des Plasmalemm, und Ionenkanäle werden geöffnet. Dieser Vorgang erfolgt im kaudalen Isthmus des Eileiters des weiblichen Genitale und wird durch die Sekretionsprodukte des Oviduktes (KAWAKAMI et al. 1998) beeinflusst. Durch die Kapazitation wird das Spermium zur Hyperaktivierung und/oder zur Akrosomreaktion befähigt.

Die Akrosomreaktion ist eine durch die Zona pellucida ausgelöste, multiple punktuelle Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran. Hierbei werden die im Akrosom enthaltenen Enzyme in Vesikeln exozytotisch freigesetzt. Diese Enzyme führen zu einer Proteolyse der Zona pellucida und ermöglichen dem hyperaktivierten Spermium die Penetration.

3.1 Kapazitation

AUSTIN und CHANG zeigten 1952 erstmals, dass frisch ejakulierte Spermien nicht in der Lage waren, die Eizelle zu befruchten. Spermien müssen erst physiologische und biochemische Prozesse durchlaufen, um befruchtungsfähig zu werden. Diese Vorgänge werden unter dem Begriff Kapazitation subsumiert. Das Spermium erlangt durch diese Vorgänge die Fähigkeit sich hyperaktiv fortzubewegen und die Akrosomreaktion durchzuführen. HARRISON (1996) versteht unter Kapazitation einen progressiven, kontrollierten Destabilisierungsprozess der Plasmamembran.

Nach dem Entfernen der Proteinschutzhülle aus dem Plasmalemm wird Cholesterol aus der Spermienmembran abgebaut. Für diesen Prozess müssen in der Umgebung in vivo im Eileiter lipidbindende Proteine vorhanden sein, die eine Wiederaufnahme des Cholesterols in die Membran verhindern. Der Efflux von Cholesterol bewirkt eine Veränderung der Eigenschaften der Zellmembran, die als Destabilisierung bezeichnet werden kann. Diese wird durchlässig für Kalziumionen und Hydrogenkarbonationen.

B. Literaturübersicht

Der intrazelluläre Kalziumionengehalt erhöht sich bei der Maus biphasisch. Die erste Phase erfolgt im Zuge des Kapazitationsprozesses, während die zweite die beginnende Akrosomreaktion anzeigt (FRASER 1995). Eine Erhöhung der Kalziumionenkonzentration in zwei Phasen konnte ebenfalls an caninen Spermatozoen beobachtet werden (PETRUNKINA et al. 2003).

Beim Kapazitationsprozess passieren Kalzium- und Hydrogenkarbonationen die Zellmembran und aktivieren die membranständige Adenylatzyklase, die ATP in cAMP umwandelt. Dadurch erhöht sich der zytosolische Gehalt an cAMP, der die Aktivierung der Proteinkinase A (VISCANTI et al. 1997, VISCANTI und KOPF 1998), die ihrerseits die Tyrosinphosphorylierung reguliert, zur Folge hat. TÖPFER-PETERSEN et al. (1996) zeigten die kapazitationsabhängige Tyrosinphosphorylierung bei Eber und Bulle. An caninen Spermatozoen konnte während der Kapazitation eine Tyrosinphosphorylierung der Spermienproteine nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung wird als fortschreitender Prozess über einen Zeitraum von vier Stunden beschrieben (PETRUNKINA et al. 2003).

Die erhöhten intrazellulären Kalzium- und cAMP-Spiegel führen gemeinsam mit der Destabilisierung der Zellmembran zur Hyperaktivierung des Spermatozoons und zum Abschluss der Kapazitation.

KAWAKAMI et al. (1998) konnten in einer Studie zeigen, dass die Kapazitation bei Hundespermatozoen durch Eileiterflüssigkeit induzierbar ist. Durch verschiedene Medien mit Zusätzen wie BSA, Bikarbonat oder Kalzium kann in vitro eine Kapazitation herbeigeführt werden (VISCANTI et al. 1997). HARRISON (1996) berichtete, dass die Kapazitation ein spezifischer, initiierbarer und kontrollierbarer Destabilisierungsprozess ist, bei dem Bikarbonat die entscheidende Rolle spielt.

Sind die Spermatozoen kapazitiert, ist ihre Membran instabil und ihre Lebensdauer verringert (BEDFORD 1970). Es kann davon ausgegangen werden, dass der Prozess der Kapazitation mit der Ovulation synchronisiert sein muss. Der Abschluss des Kapazitationsvorganges ist nicht von der Verweildauer der Spermien im unteren Isthmusabschnitt abhängig sondern in direktem Zusammenhang mit dem Eisprung zu sehen (HUNTER und RODRIGUEZ-MARTINEZ 2004). Die Autoren sehen in der Unterdrückung der Vollendung der Kapazitation die Notwendigkeit ein längeres präovulatorisches Intervall zu überbrücken. Die Kapazitation selbst unterliegt in vivo den Einflüssen und der Kontrolle ovarieller Aktivität, insbesondere dem Einfluss von Progesteron, welches im Graaf'schen Follikel gebildet wird. Der Graaf'sche Follikel

steuert den Abschluss des Kapazitationsprozesses. Somit wird das Aufeinandertreffen der weiblichen und männlichen Gameten nach HUNTER und RODRIGUEZ-MARTINEZ (2004) koordiniert.

Die Vorgänge der Kapazitation sind in ihrer Gesamtheit notwendig, damit das Spermatozoon später die Akrosomreaktion durchführen und sich schließlich mit der Eizelle vereinigen kann.

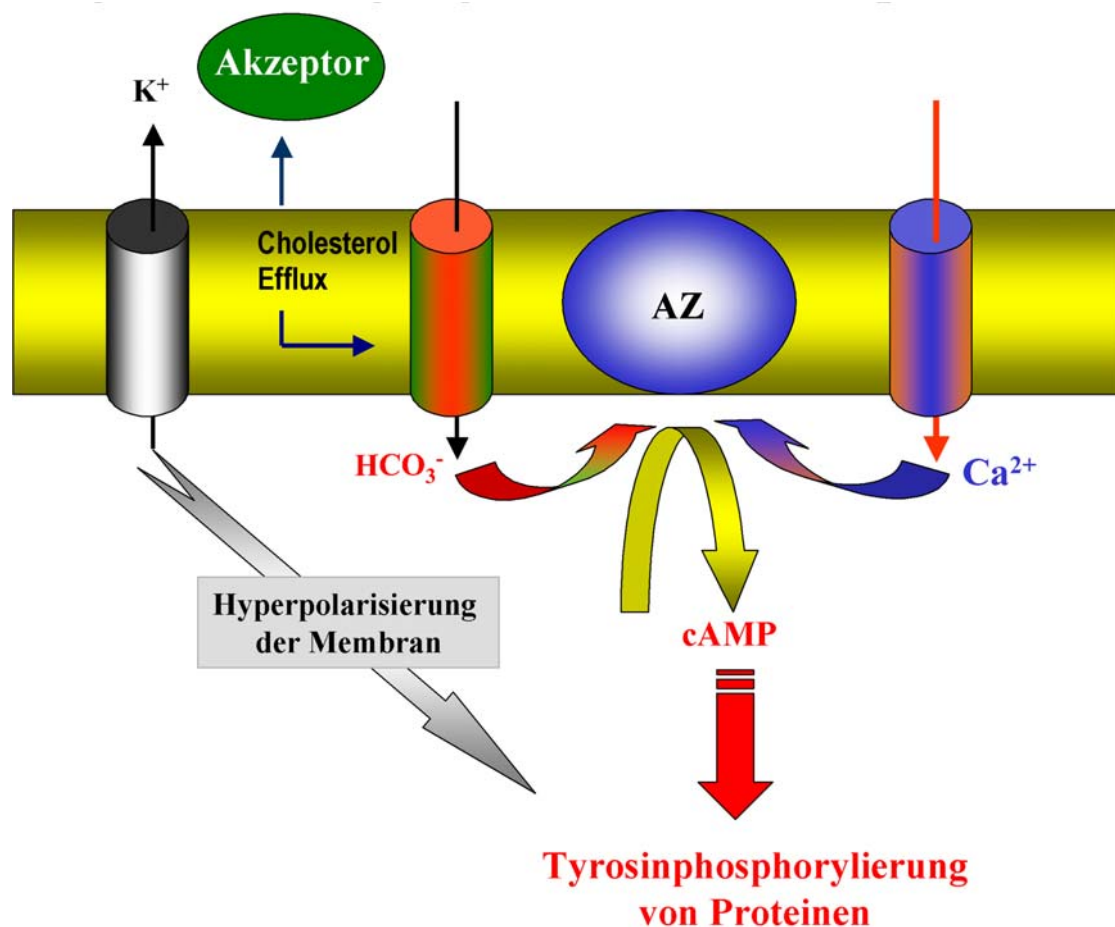


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Signalübertragung während der Kapazitation. Cholesterin wird aus der Membran entfernt. Dieser Vorgang macht die Membran für Ca^{2+} und HCO_3^- permeabel. Die Ionen gelangen in die Zelle und aktivieren die Adenylatzyklase (AZ). Dadurch wird vermehrt cAMP gebildet, welches zusammen mit der Hyperpolarisation der Membran, die durch einen Kaliumionenefflux verursacht wird, zur Tyrosinphosphorylierung führt. (mod. nach TÖPFER-PETERSEN et al. 2003)

3.2 Akrosomreaktion

Das Akrosom stellt einen Enzyme enthaltenden Raum dar, der dem Kern proximal aufliegt, und von einer Membran als Zellorganelle umschlossen wird. Damit ein Spermium mit der Oozyte fusionieren kann, muß es zunächst die Zona pellucida durchdringen. Für die Penetration ist das Freisetzen der akrosomalen Enzyme notwendig, die eine partielle Hydrolyse der Zona pellucida bewirken.

Die induzierte Akrosomreaktion wird von der spontanen Akrosomreaktion unterschieden. Bei der spontanen Akrosomreaktion wird ohne einen Einfluss bestimmter Substanzen auf das Spermium die äußere Membran (spontan) aufgelöst (YANAGIMACHI 1994). Dagegen wird die induzierte Akrosomreaktion durch die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida ausgelöst (FAZELI et al. 1997).

Die Akrosomreaktion läuft als exozytotischer Prozess ab, bei dem lytische Enzyme freigesetzt werden. Während der Reaktion kommt es zu multiplen Punktfusionen mit der äußeren akrosomalen Membran. Kaskadenartig werden verschiedene Signalübertragungssysteme aktiviert. Die Bindung der Zonaproteine an die Rezeptoren der Spermienmembran bewirkt einerseits eine Depolarisation der Membran und andererseits eine Stimulation von G-Proteinen. Kalziumionenkanäle werden geöffnet und Wasserstoffionen werden aus der Zelle transportiert. Der intrazelluläre Kalziumionengehalt wird erhöht. Der pH-Wert des Zytosols wird alkalisiert. Durch G-Proteine steigt die Konzentration der Second Messenger IP3 und Diacylglycerol (DG). DG ist als steuerndes Element an der Phosphorylierungskaskade beteiligt und bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Zusätzlich aktiviert DG die cGMP-ase und cAMP-ase und führt zu einer Erhöhung von zyklischen Nukleotiden im Zytosol (SERRANO und DIAZ-ESPARZA 2001).

IP3 ist vermehrt im Zytosol enthalten. Kalzium wird aus intrazellulären Speichern freigesetzt und bindet an Calmodulin, wodurch verschiedene Proteine phosphoryliert werden. Letztendlich bewirkt der erhöhte intrazelluläre Kalziumionengehalt das Auslösen der Akrosomreaktion. Die Akrosomreaktion ist für die Befruchtung essentiell, da die Zona pellucida ausschließlich von hyperaktiven Spermatozoen penetriert werden kann, wenn zuvor eine partielle Hydrolyse stattgefunden hat.

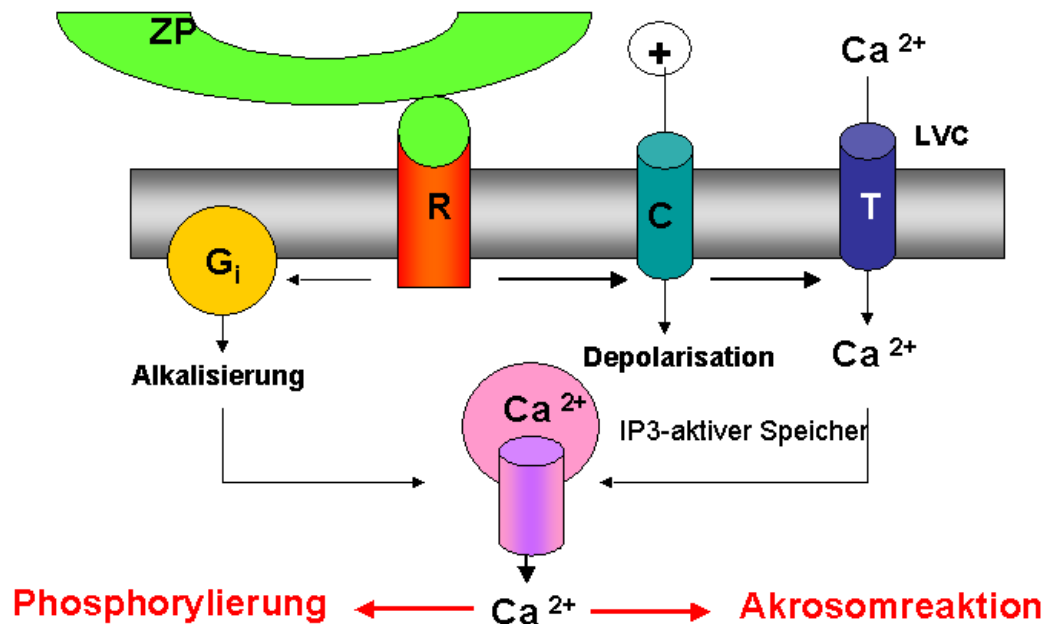


Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung der Zona pellucida-induzierten Akrosomreaktion. Durch die Bindung von Zona pellucida (ZP)-Glykoproteinen an Rezeptoren der Spermienmembran (R) wird ein G-Protein (G_i)-vermittelter Prozess, der zu einer Alkalisierung des Zytosols führt, induziert. Gleichzeitig führt die Bindung über einen Kationkanal (C) zur Depolarisierung der Zellmembran, infolge dessen die Membran für Ca²⁺-Ionen (Kalziumionenkanal: T) durchlässig wird. Ca²⁺-Ionen gelangen in die Zelle. Durch die beiden Vorgänge wird Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Die Erhöhung des zytosolischen Kalziumionenspiegels führt zur Akrosomreaktion und zur Phosphorylierung von Proteinen. (mod. nach FLORMAN, 1999)

4. Gameteninteraktion

Die Gameteninteraktion verläuft nach WASSARMAN (1990) in vier Schritten ab. Die Spermien nehmen zunächst locker, nicht speziesspezifisch Kontakt mit der Zona pellucida auf. Anschließend binden akrosomintakte, kapazitierte Spermatozoen an die Zona pellucida (primäre Bindung). Die Bindung ist ein Kohlenhydrat-vermittelter Vorgang, bei dem lektinähnliche Rezeptoren mit exponierten Oligosacchariden der Zona pellucida interagieren. Durch die Bindung wird in den Spermien die Akrosomreaktion ausgelöst. WASSARMAN bezeichnet die Bindung akrosomreagierter Spermatozoen an die Zona pellucida als sekundäre Bindung. Abschließend

B. Literaturübersicht

folgt die Penetration akrosomreagerter Spermien. Es findet zuerst eine Erkennung statt. Das Spermium bindet mit membranständigen Rezeptoren an die Zona pellucida. Verschiedene Proteine werden für die Bindung von Spermium und Zona pellucida verantwortlich gemacht. Tierartlich unterschiedlich sind verschiedene Zonaproteine für die Gametenerkennung zuständig. Bei Maus und Hamster sind die ZPC sowohl für die Bindung als auch für das Auslösen der Akrosomreaktion verantwortlich, bei Schwein und Kaninchen wird die Bindung über ZPB vermittelt (HEDRICK 1996, PRASAD et al. 1998). Es werden unterschiedliche Strukturen der einzelnen Zonaproteine diskutiert, die für die Bindung zuständig sein sollen. Bei Maus und Schwein sollen hauptsächlich O-glykosidisch gebundene Zucker an der Spermienrezeptoraktivität beteiligt sein (FLORMAN und WASSARMAN 1985, YUREWICZ et al. 1991), andererseits wird die Beteiligung N-glykosidisch gebundener Zucker diskutiert (TÖPFER-PETERSEN et al. 1995, TÖPFER-PETERSEN 1999, NAKANO und YONEZAWA 2001). Untersuchungen zeigten, dass beim Schwein nicht wie zunächst angenommen O-glykosidisch gebundene Zuckerstrukturen für die Rezeptoraktivität verantwortlich gemacht werden können (YUREWICZ et al. 1991), sondern N-glykosidisch gebundene (NOGUCHI und NAKANO 1992). Diese hatten im Gegensatz zu O-glykosidisch gebundenen Zuckerstrukturen in Hemmversuchen einen konzentrationsabhängigen blockierenden Effekt auf die Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an die Zona pellucida.

Seitens der Spermien befinden sich Zona pellucida bindende Proteine in der Spermatozoenmembran. Dabei werden verschiedene Rezeptoren diskutiert. So konnte beim Schwein Zonadhesin identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein transmembranes Protein, dem die Fähigkeit, an die Zuckerstrukturen der Zona pellucida speziesspezifisch binden zu können, zugesprochen wird. Das Protein weist bei den bereits untersuchten Tierarten Gemeinsamkeiten in der Struktur auf. Es wurden vier Domänen gefunden: die MAM-Domäne, die mucin-ähnliche Domäne, die D-Domäne und die EGF-ähnliche Domäne. Das Protein wird im Hoden synthetisiert. Im Nebenhoden werden die mucin-ähnliche Domäne und die MAM-Domäne proteolytisch abgespalten (HARDY und GARBERS 1995). Der D-Domäne wird beim Schwein die Fähigkeit, an die Zona pellucida zu binden, und eine Rolle bei der initialen Erkennung zugeschrieben.

Ein weiterer Rezeptor wurde bei der Maus identifiziert. Die β 1,4-Galactosyltransferase ist ein integrales Membranprotein, welches bei der Maus näher

untersucht wurde. Es bindet spezifisch an N-Acetylglucosamine der Oligosaccharide der murinen Zona pellucida (MILLER et al. 1990). Neben der die Bindung unterstützenden Wirkung ist es an der Aktivierung der G-Proteine der Spermienmembran und somit an der Auslösung der Akrosomreaktion beteiligt. Dem p95, einem weiteren integralen Membranprotein, wird bei der Maus die Beteiligung (zusammen mit β 1,4-Galactosyltransferase) an der Auslösung der Signalkaskade zugeordnet. Das periphere Membranprotein sp54 ist an der primären Bindung O-glykosidischer Zuckerketten von ZPC beteiligt. Das sp17 ist ein niedermolekulares integrales Protein, das über einen Kohlenhydrat-Sulfat-Erkennungsmechanismus an die Zona pellucida bindet (O'RAND et al. 1988; ABDULLAH et al. 1991). Sp17 zeigt eine erhöhte Affinität zu Galaktose.

Eine weitere Bedeutung für die Interaktion zwischen Spermatozoon und Zona pellucida der Eizelle wird den Spermadhäsinen zugesprochen, die bei Hengst, Bulle und Eber nachgewiesen wurden (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998). Spermadhäsine sind Proteine, die beim Eber als Hauptkomponente im Seminalplasma anzutreffen sind und sich durch ihre Kohlenhydratbindungsfähigkeiten auszeichnen. Beim Eber wurden bisher die Spermadhäsine AQN-1, AQN-3, AWN-1, AWN-2, PSP-1 und PSP-2 identifiziert (CALVETE et al. 1996). Die einzelnen Spermadhäsine wurden in Gruppen aufgeteilt, und es sind ihnen verschiedene Aufgaben zugeschrieben worden. Spermadhäsine sollen akrosomstabilisierend sein und als Dekapazitationsfaktoren wirken. Als Zona pellucida bindendes Molekül wurde das Spermadhäsine AWN beschrieben. Von AWN sind zwei Isoformen (AWN-1 und AWN-2) identifiziert worden (SANZ et al. 1992). Die beiden Polypeptidketten sind identisch; AWN-2 besitzt zudem noch einen N-terminalen Acetylrest.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von AWN bei der primären Bindung der Spermatozoen an die Eizelle konnten durch die Untersuchungen von DOSTALOVA et al. (1995) gesichert werden. Dabei wurde eine Bindungsfähigkeit von AWN an solubilisierete, biotinylierte porcine Zona pellucida festgestellt. Das Spermadhäsine AWN scheint in der Lage zu sein die Galaktosestrukturen der Zona pellucida zu erkennen (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005). Nach einer in vivo Insemination konnte AWN in einer elektronenmikroskopischen Darstellung als einziges Spermadhäsine nachgewiesen werden (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1998).

B. Literaturübersicht

Nach Studien von TÖPFER-PETERSEN et al. (1998) weist AWN eine Hauptbindungsdomäne für Galaktose und eine Unterdomäne für Sialsäure und N-Acetylhexosamin auf.

In seinem Syntheseort stellt AWN eine Ausnahme zu den anderen Spermadhäsinen dar, denn es wird bereits in den Tubuli recti des Rete testis des Hodens sowie später in der Samenblase gebildet (SINOWATZ et al. 1995). Zusätzlich konnte AWN im Nebenhodenschwanz und in der Prostata auf molekularbiochemischer und proteinbiochemischer Ebene nachgewiesen werden (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2002). AWN assoziiert während der Nebenhodenpassage über seine Phospholipidbindungsdomäne an die Spermienmembran. Bei ejakulierten Eberspermien konnte ein geringer Gehalt an AWN mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (PETRUNKINA et al. 2000) Selbst an epididymalen Spermien konnte mit Hilfe der Western Blot Analyse AWN nachgewiesen werden (SINOWATZ et al. 1995).

An der sekundären Bindung der Spermatozoen sind Proteine, wie das Glykoprotein PH-20, beteiligt (YUDIN et al. 1999). Bei diesem Protein handelt es sich um eine GPI-verankerte Hyaluronidase, die als PH-20 aber auch als SPAM 1 bekannt ist. PH-20 befindet sich an der Spermienoberfläche und ist an die innere akrosomale Membran gebunden. Es ist eine Hyaluronidase, ein Rezeptor für Hyaluronidase induzierte Signalkaskaden und ein Rezeptor für die Zona pellucida (CHERR et al. 2001). Die Interaktion von PH-20 mit Hyaluronsäure führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumionengehalt (VINES et al. 2001). Es wurde bei verschiedenen Tierarten wie Mensch, Affe und Meerschweinchen nachgewiesen (LIN et al. 1993; PRIMAKOFF et al. 1997). Es wird im Hoden exprimiert und ist an der inneren akrosomalen Membran zu finden. In akrosomintakten Spermien hat es eine Hyaluronidaseaktivität und erleichtert dem Spermium das Durchdringen der Cumuluszellschicht, die sich um die Oozyte befindet. Versuche zeigten, dass sich die Bindung akrosomreagerter Spermien an die Zona pellucida mittels monoklonaler Antikörper gegen PH-20 hemmen lässt. Trotz blockierter Bindungsstellen blieb die Enzymaktivität bestehen. Ebenso ließ sich die Enzymaktivität hemmen, ohne die Bindungsfähigkeit zu beeinträchtigen. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass diese beiden Eigenschaften an unterschiedlichen Stellen im Molekül lokalisiert sind (HUNNICUTT et al. 1996).

Ein weiteres an der sekundären Bindung beteiligtes Protein ist das Proakrosin. Proakrosin wird als Preproakrosin synthetisiert und während der Akrosomreaktion umgewandelt. Gesteuert wird der Prozess durch die Zona pellucida, die einen Anstieg des pH-Wertes bewirkt (TÖPFER-PETERSEN und CECHOVA 1990). Dem Enzym wird eine Bindungsfähigkeit an negativ geladene Sulfatgruppen der Zona pellucida zugeschrieben (JANSEN et al 1995). Die Bindung erfolgt in einer Region, in der ein erhöhter Anteil positivgeladener Aminosäuren vorhanden ist. Des Weiteren besitzt das Glykan eine proteolytische Aktivität und fungiert als Penetrationsenzym. Diese Fähigkeit erlangt das Protein durch einen autolytischen Prozess, bei dem Proakrosin in α -Akrosin umgewandelt wird. Dieses ermöglicht durch langsame Lysis dem Spermium, mit dem Kopf in die Zona pellucida einzudringen. Anschließend wird α -Akrosin in β -Akrosin autolytisch umgewandelt.

Die durch die Akrosomreaktion freigesetzten Enzyme bewirken eine lokale Lysis der Zonaproteine. Hierdurch wird es dem hyperaktiven Spermium ermöglicht, aus eigenem Antrieb die Zona pellucida zu durchdringen. Das Spermium gelangt in den perivitellinen Spalt und lagert sich tangential an das Oolemm an. Im Äquatoralsegment des Spermiums ist die fusiogene Region lokalisiert. Dort befinden sich Proteine, die an der Fusion von Spermium und Eizelle beteiligt sind. Die beiden Plasmalemma verschmelzen miteinander und das Spermium wird in die Eizelle aufgenommen. Die Fusion der beiden Gameten bewirkt das Einleiten des Polyspermielockes.

C. Eigene Untersuchungen

C. Eigene Untersuchungen

1. Versuchskonzeption

In der vorliegenden Arbeit sollen Veränderungen am Spermium bezüglich des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes, des Grades der Tyrosinphosphorylierung und der Akrosomreaktion in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer unter kapazitierenden Bedingungen untersucht werden. Weiterhin soll der Einfluss solubilisierter und intakter Zona pellucida unterschiedlich lang in vitro gereifter Eizellen auf die drei Prozesse untersucht werden. Die Versuche wurden am Institut für Reproduktionsmedizin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

Es wurden die Ejakulate vier verschiedener institutseigener, fertilitätsgeprüfter Eber verwendet. Bei den Ebern handelte es sich um Hybridzuchtungen. Sie zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und waren frei von Anzeichen, die auf eine Beeinträchtigung des Sexualverhaltens oder eine Erkrankung der Geschlechtsorgane hinwiesen.

2.2 Gewinnung des Ejakulates

Die Entnahme des Samens erfolgte in regelmäßigen Abständen von fünf bis sieben Tagen. Als Sprungpartner diente ein Phantom. Das Ejakulat wurde mit der Handmethode gewonnen. Zum Auffangen des Samens diente ein auf 38 °C vorgewärmter Thermobecher, der mit einer Plastiktüte, die im oberen Drittel eine doppelte, heraustrennbare Gazeschicht enthielt, versehen wurde. Die Trennung des Bulbourethraldrüsensekretes vom restlichen Ejakulat erfolgte mit Hilfe der Gaze. Anschließend wurde das Ejakulat innerhalb von fünf bis zehn Minuten unter Verwendung der gesamten Fraktion aufbereitet.

2.3 Untersuchung des Ejakulates

Das Ejakulat wurde hinsichtlich der Erfüllung der Mindestanforderungen (nach KRAUSE 1966) untersucht.

Es wurden Volumen, Farbe, Konsistenz, pH-Wert, etwaige Beimengungen und der Geruch bestimmt. Die Bewegungsaktivität des nativen Samens wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss 1697, Jena) mit einem auf 38 °C vorgewärmten beheizbaren Objektisch (Minitüb GmbH, Landshut) bei 160facher Vergrößerung untersucht. Es erfolgte eine Schätzung des Anteils motiler Spermien, zu denen beim Eber der Anteil ortsbeweglicher und vorwärtsbeweglicher Spermien zählt. Ebenfalls beurteilt wurden bei der mikroskopischen Untersuchung Beimengungen und der Gehalt an agglutinierten Spermatozoen.

Die Dichtebestimmung (mindestens 100 Mio./ml) erfolgte mittels einer Zählkammer nach Thoma (Fa. Glaswarenfabrik Hecht, Sontheim). Hierfür wurden 25 µl Nativsamen in 9,975 ml 10prozentiger Kochsalzlösung verdünnt. Anschließend wurde bei 400facher Vergrößerung ausgezählt.

Von einer in Formolcitrat fixierten Probe wurden bei 1000facher Vergrößerung und Ölimmersion 200 Spermatozoen auf morphologische Abweichungen (morphologisch veränderte Spermien ≤ 45 %, davon maximal 25 % Plasmatropfen und 20 % übrige Abweichungen) untersucht. In den Versuchen wurden ausschließlich Ejakulate verwendet, die den Mindestanforderungen entsprachen (WEITZE 2001, KRAUSE 1966).

2.4 Verdünnen und Lagern des Samens

2.4.1 Verwendete Medien

Alle verwendeten Verdüner und Medien werden im Anhang in ihrer Rezeptur aufgeführt.

C. Eigene Untersuchungen

2.4.2 Flüssigkonservierter Samen

Das Ejakulat wurde mit dem auf 38 °C vorgewärmten Verdünner Androhep versetzt. Die Dichte wurde auf eine Spermienzahl von 30×10^6 Spermatozoen/ml eingestellt. Das verdünnte Ejakulat wurde 1 Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 16,8 °C bis zum darauffolgenden Tag gelagert.

2.4.3 Tiefgefrierkonservierter Samen

Bei Versuchen mit tiefgefrorenem Sperma wurden Nebenhodenschwanzspermien verwendet, die in flüssigem Stickstoff in Pailletten (Minitüb GmbH, Landshut) à 0,25 ml mit je 50 Millionen Nebenhodenspermien gelagert wurden. Das Tiefgefriersperma wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Rath (Institut für Tierzucht, Mariensee) zur Verfügung gestellt.

2.5 Aufbereitung der Spermien

2.5.1 Flüssigkonservierter Samen

Das gelagerte Ejakulat wurde am Tag des Versuches einer Dichtegradientenzentrifugation bei Raumtemperatur unter Verwendung von Percoll[®] (Amersham Bioscience Schweden) (HARRISON et al. 1993) unterzogen. Dadurch wurden die Bestandteile des Verdünners, des Seminalplasmas, Spermatozoen mit Plasmotropfen, und defekte Spermatozoen sowie Spermienagglutinationen im wesentlichen entfernt. Hierfür wurden konisch zulaufende Reagenzgläser mit einem Fassungsvermögen von 10 ml verwendet. Sie wurden mit 2 ml 70prozentiger Percoll-Saline Lösung beschickt, welches mit 4 ml 35prozentiger Percoll-Saline Lösung überschichtet wurde. Anschließend wurden 3 ml flüssigkonservierter Samen darüber geschichtet. Zuerst wurde bei 300 g 10 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde weitere 10 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein Restvolumen von 0,8 ml entfernt. Anschließend wurde das Spermienpellet in diesen 0,8 ml resuspendiert und die Dichte ermittelt. Mit Hilfe der Dichtebestimmung wurde das benötigte Volumen für die weiteren Untersuchungen errechnet.

2.5.2 Tiefgefrierkonservierter Samen

Die Pailletten wurden in 38 °C warmem Wasser über einen Zeitraum von 30 Sekunden aufgetaut und anschließend in 10 ml 38 °C warmem Androhep für einen Zeitraum von 3 Minuten bei 450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml 38 °C warmem Tyrode Medium (modifiziert nach HARRISON et al. 1993) resuspendiert. Das Tyrode Medium wurde zuvor unter CO₂-Begasung auf einen pH-Wert von 7,4 bei 38 °C äquilibriert. In den Untersuchungen, die dem Nachweis eines erhöhten intrazellulären Kalziumionenspiegels dienten, wurde das Pellet nach dem Zentrifugationsvorgang anstelle von Tyrode Medium in HBS gelöst.

2.6. Anmerkung zu den Versuchen

In allen Untersuchungen wurden die Spermatozoen in auf pH 7,4 äquilibriertem Tyrode Medium inkubiert. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (microprocessor pH/ION Meter pMX 3000 WTW GmbH) gemessen. Das Äquilibrieren sowie die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 38 °C unter fünfprozentiger CO₂-Begasung in feuchtigkeitsgesättigter Luft.

2.6.1. Vorbereitung der Spermienzellsuspension für die Bestimmung des zytosolischen Kalziumionengehaltes

In den Untersuchungen, die den intrazellulären Kalziumionengehalt maßen, erfolgte zunächst eine Dichtegradientenzentrifugation mit Saline-Percoll-Lösungen (siehe Anhang). Benutzt wurden 10 ml Glaszentrifugenröhrchen mit konischem Boden. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 0,8 ml verworfen. Nachdem das Spermienpellet resuspendiert worden war, erfolgte unter Lichtausschluss eine Beladung mit 4 µl einer 1mM Fluo3-AM Stammlösung (Fa. Molecular Probes, Netherlands). Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Zellsuspension mit 3,2 ml HEPES buffered saline Medium (HBS) vermischt und für weitere 10 Minuten inkubiert. Diese 4 ml wurden über 4,8 ml Saccharose Waschmedium (SWM) geschichtet und abschließend für 10 Minuten bei 300 g und für weitere 10 Minuten bei 750 g zentrifugiert (HARRISON et al. 1993). Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 0,5 ml, in dem das Pellet resuspendiert wurde, verworfen. Es folgte eine Dichtebestimmung der Spermatozoen im SWM. Um eine Konzentration von

C. Eigene Untersuchungen

7,5 x 10⁶ Zellen/ml Tyrode Medium zu erreichen, wurde jeweils das dafür nötige Volumen an SWM-Spermatozoen Lösung errechnet und dem Tyrode Medium hinzugefügt.

Kryokonservierte Nebenhodenschwanzspermien wurden nicht im Saline-Percoll-Gemisch Dichtegradienten zentrifugiert, sondern mit Androhep behandelt, und mit Farbstoff beladen und dann wie oben beschrieben weiter behandelt.

2.6.2. Vorbereitung der Spermienzellsuspension für die Bestimmung der Akrosomreaktion und Tyrosinphosphorylierung

Für die Messung dieser beiden Parameter wurde zuerst die Dichtegradientenzentrifugation mittels eines Percoll-Saline-Gemisches durchgeführt und anschließend die Dichte auf 7,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Zugabe von FITC-konjugiertem PNA und FITC-konjugiertem Antikörper in den geeigneten Konzentrationen erfolgte 5 Minuten vor einem jeden Messpunkt. In den Versuchen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden 10 µl der Farbstofflösung einem ml PVA/PBS zugesetzt. Die Zonae pellucidae mit den gebundenen Spermatozoen wurden nach viermaligem Waschen durch PVA/PBS für 5 Minuten in 50 µl des Farbstoff-PVA/PBS-Gemisches belassen und dann auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger zur Untersuchung verbracht (siehe 2.13.1).

2.7 Aufbereitung der Zona pellucida

2.7.1 Gewinnung, Entnahme und Aufbereitung der Oozyten

Auf einem Schlachthof wurden Ovarien von peripuberalen Sauen in einem auf 30 °C vorgewärmten Thermogefäß gesammelt. Diese wurden in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in der Außenstelle im Institut für Tierzucht in Mariensee in der Abteilung Biotechnologie aufgearbeitet. Dort wurden sie mit 39 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Follikel, die einen Durchmesser von 2 bis 5 mm mit heller durchsichtiger Oberfläche aufwiesen, wurden mit einer Aspirationsnadel (18-gauge; Mikrolance3 Dickinson) punktiert. Die Nadel war über ein Schlauchsystem mit einem sterilen Auffanggefäß (50 ml Zentrifugenröhrchen, Greiner GmbH, Frickenhausen) verbunden, das mit einer Unterdruckpumpe (20 mmHg) in Verbindung stand. Die die Kumulus-Oozyten-

Komplexe enthaltende Follikelflüssigkeit wurde nach der Punktion mit Spülmedium auf etwa 50 ml aufgefüllt und stehen gelassen. Der Überstand wurde nach einer Sedimentationszeit von 10 Minuten dekantiert und das Sediment resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zur Sedimentation 10 Minuten stehen gelassen und abermals dekantiert. 3 ml des Sedimentes wurden in einer Petrischale mit 94 mm Durchmesser mit 10 ml PBS verdünnt.

Bei 20- bis 50facher Vergrößerung wurden im Stereomikroskop die morphologischen Kriterien der Kumulus-Oozyten-Komplexe beurteilt und die Komplexe klassifiziert. Die Einteilung hinsichtlich der Integrität der Zona pellucida, der Anzahl der Kumuluszellschichten, der strukturellen Homogenität und der einheitlichen Zytoplasmafärbung erfolgte nach den Kriterien von LEIBFRIED und FIRST (1979). In den Versuchen wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe verwendet, die eine dreilagige Kumuluszellschicht aufwiesen. Die ausgewählten Komplexe wurden in Spülmedium zweimal gewaschen und in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm gesammelt.

Für die Untersuchungen, in denen ungereifte Eizellen verwendet werden sollten, mussten diese zunächst mechanisch durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen einer ausgezogenen Mikropipette von den Kumuluszellen isoliert werden. Um die Zona pellucida der Eizelle zu isolieren, wurde eine Pipette verwendet, deren Durchmesser in etwa ein Drittel des Durchmessers einer Eizelle betrug. Die denudierte Eizelle wurde mit dieser Pipette mehrmals aufgezogen und wieder ins Medium gespült, bis dass die Zona pellucida von den übrigen Bestandteilen der Eizelle getrennt war.

Die so aufgearbeiteten Zonae pellucidae konnten entweder direkt für weitere Versuche verwendet werden, oder sie wurden in Aqua bidest. bis zum Versuchstag bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und dann aufgetaut.

2.7.2 In-vitro-Reifung der Oozyten

Die wie in 2.7.1 beschriebenen selektierten Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden dreimal in äquilibriertem Maturationsmedium NCSU 37 (nach PETERS und WELLS 1993) gewaschen. Die Reifung erfolgte in five well dishes (Embryokulturschale mit 5 Vertiefungen; Minitüb, Tiefenbach). In jede Vertiefung wurden 500 μl Maturationsmedium gegeben und danach wurde über einen Zeitraum

C. Eigene Untersuchungen

von mehreren Stunden bei 38,5 °C und fünfprozentiger CO₂-Begasung in feuchtigkeitsgesättigter Luft inkubiert (Nuair NU2700 E, Zapf Instrumente, Sarstedt). Zur Reifung wurden in jede Vertiefung 50 Kumulus-Oozyten-Komplexe, Hormone (PMSG/hCG) und db-cAMP gegeben. Danach wurde über einen Zeitraum von 44 bis 46 Stunden bei 38,5 °C unter fünfprozentiger CO₂-Begasung in feuchtigkeitsgesättigter Luft bebrütet. Nach 24 Stunden erfolgte eine Umsetzung in Maturationsmedium, welches keinen Zusatz an Hormonen enthielt. Die Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden nach der Reifung mehrmals in PBS/2% PVA gewaschen. Es erfolgte die Denudierung und Isolierung wie unter 2.7.1 beschrieben. Danach wurden die Zonae pellucidae bei -20 °C in A. bidest. in silikonisierten Eppendorfgefäßen (Fa. Greiner, Frickenhausen) eingefroren.

2.7.3 Solubilisieren der Zona pellucida

Die wie in 2.7.1 und 2.7.2 aufgearbeiteten Zonae pellucidae wurden über einen Zeitraum von zwei Stunden bei 72 °C erhitzt. Danach wurden sie mit Eis für drei Minuten abgekühlt und bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und anschließend lyophilisiert. Das Protein der Zona pellucida wurde am Versuchstag in äquilibriertem Tyrode Medium gelöst. Daraus ergaben sich 50 Zona pellucida-Äquivalente pro Menge verwendetem Tyrode Medium.

2.8 Verwendete Fluoreszenzproben

2.8.1 Detektion der Membranintegrität mit Propidiumiodid (PI)

Propidiumiodid (Fa. Calbiochem Novabiochem, Bad Soden; Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) ist ein impermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der zur Überprüfung der Membranintegrität dient. Gelangt er in eine Zelle, so bindet er an DNA/RNA. Tote Zellen mit defekter Zellmembran stellen sich PI-positiv dar. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 536 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm. Erfasst wird die rote Fluoreszenz unter Verwendung eines 610 nm Bandpassfilters. Die im Durchflusszytometer registrierte Fluoreszenz wird als Histogramm in Abhängigkeit der gezählten Zellen aufgetragen. In den

Versuchen wurde er dem Tyrode Medium in der vorgesehenen Endkonzentration vor Zugabe der Spermien zugesetzt.

Der Farbstoff wurde vorbereitend in Aqua bidest. mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst und in 1,5 ml Aliquoten bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Dunkelheit gelagert (HARRISON und VICKERS 1990). Kurz vor Gebrauch wurde die Lösung aufgetaut und im Dunkeln gehalten. In den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden 5 $\mu\text{l/ml}$ Kapazitationsmedium dieser Lösung eingesetzt. Der Farbstoff wurde dem Medium vor der Inkubation zugesetzt. In den Versuchen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden 5 μl der Farbstofflösung einem ml PVA/PBS zugesetzt. Die Membranintegrität wurde parallel zu jedem zu untersuchenden Parameter während einer jeden Untersuchung bestimmt und überprüft.

2.8.2 Detektion des Ca^{2+} -Influxes mit Fluo3-AM

Bei diesem Farbstoff handelt es sich um eine im grünen Spektrum fluoreszierende Substanz, die intrazellulär Ca^{2+} -Ionen komplexiert. Im Gegensatz zu freiem Fluo3-AM, welches praktisch keine Fluoreszenz besitzt, fluoreszieren die Komplexe in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Intensität des emittierten grünen Lichtes ist proportional zu der Konzentration der fluoreszierenden Komplexe. Das Absorptionsmaximum liegt bei 506 nm und das Emissionsmaximum bei 526 nm. Durchflusszytometrisch wurde die Fluoreszenz unter Verwendung eines 520 nm Bandpassfilters erfasst. Die registrierten Zellen wurden in Abhängigkeit der gezählten Zellen im Histogramm aufgetragen.

2.8.3 Detektion der Akrosomreaktion mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiertem Peanutagglutinin (PNA-FITC)

PNA-FITC (Fa. Calbiochem Novabiochem, Bad Soden) wurde für die Detektion der Akrosomreaktion eingesetzt. Es handelt sich um ein Lektin der Erdnuss, das spezifisch an β -Galaktosereste der äußeren akrosomalen Membran bindet. Dieses Lektin ist FITC konjugiert, deshalb fluoresziert es im grünen Bereich. PNA-FITC ist für eine intakte Plasmamembran impermeabel und bindet während der Akrosomreaktion. Mit PNA-FITC ist es möglich, nicht nur akrosomreagierende Zellen zu identifizieren, sondern den Verlauf und die Entwicklung der

C. Eigene Untersuchungen

Akrosomreaktion darzustellen (FAZELI et al. 1999). Es wurde in einer Endkonzentration von 3 µg/ml eingesetzt (CROSS und MEIZEL 1989). PNA-FITC wurde in den durchflusszytometrischen Untersuchungen den zu messenden Proben fünf Minuten vor der Erfassung im Gerät zugegeben. Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung eines 520 nm Bandpassfilter erfasst und im Histogramm aufgetragen.

2.8.4 Detektion der Tyrosinphosphorylierung mit Antiphosphotyrosine (Ab-4)

Bei dem Antiphosphotyrosin-Antikörper (Ab-4) handelt es sich um einen FITC konjugierten monoklonalen Antikörper, der spezifisch an tyrosinphosphorylierte Proteine bindet. Es wurde der Clone PY-20 eingesetzt (Oncogene Research Products, Boston). Durch die Bindung wird die Fluoreszenz im grünen Farbspektrum ausgelöst. Der Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 2 µg/ml verwendet. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 100 µg/ml. Die Zugabe des Antikörpers erfolgte fünf Minuten vor einer jeden Messung. Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde die Bindung mit Orthophosphotyrosin blockiert. Hierfür wurden 11 µl Stammlösung Antiphosphotyrosine (Ab-4)-FITC mit 100 µl 50 mmol Orthophosphotyrosin über einen Zeitraum von 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Von diesem Gemisch wurden 100 µl 5 Minuten vor der Messung zu 400 µl über 90 Minuten in Tyrode Medium inkubierter Spermienzellsuspension hinzupipettiert.

Während der Messung wurde ein 520 nm Bandpassfilter verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden im Histogramm in Abhängigkeit der Zellzahl aufgetragen.

2.9 Durchflusszytometrie

In den durchflusszytometrischen Versuchen wurde die Membranintegrität überprüft. Die Membranintegritätsmessung wurde mit der Bestimmung des intrazellulären Kalziumionengehaltes, dem Grad der Tyrosinphosphorylierung sowie dem Grad der Akrosomreaktion unter kapazitierenden Bedingungen kombiniert und durchgeführt. Zuerst wurden die kinetischen Veränderungen dieser Parameter erfasst (siehe 2.11). Anschließend wurde der Einfluss der Zona pellucida Glykoproteine auf diese Parameter getestet (siehe 2.12).

2.9.1 Die technischen Grundlagen

Das Durchflusszytometer ist ein Partikelzählgerät, welches Zellen und ihre Eigenschaften bezüglich Form, Größe und Struktur auf optischer Basis erfasst. Es ist darüber hinaus in der Lage, Fluoreszenzen im grünen, orangen, roten und ultravioletten Farbspektrum (FL-1, FL-2, FL-3, FL4) zu erfassen und einer jeden registrierten Zelle die jeweilige Fluoreszenz mit dazugehöriger Intensität zuzuordnen. Es können große Zellzahlen in kürzester Zeit erfasst und ausgegeben werden.

Die Proben werden über ein Messgefäß dem Gerät zugeführt. Durch Unterdruck wird die Probe aufgesogen und gelangt in die Quarzdurchflussküvette. Die Spermien erfahren eine Beschleunigung in einem hydraulischen System, sodass eine Fokussierung der zufällig verteilten Zellsuspensionen erfolgt und immer nur ein Spermium pro Zeiteinheit von dem Laserstrahl des Gerätes erfasst wird. Das Licht trifft auf das Spermium, wird abgelenkt und gestreut. Ringsum platzierte Lichtdetektoren erfassen das Licht. Je nach Grad der Streuung und Intensität des aufgefangenen Lichtes kann eine Aussage über die Größe, Körnigkeit (Konsistenz) und die Form des Partikels getroffen werden. Es werden zwei Formen des Streulichtes unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC=forward scatter) ist proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC=side scatter) ist abhängig von der Granularität und Konsistenz einer Zelle. Beim Registrieren von Fluoreszenzen wird ein fluoreszierender Farbstoff benötigt, der durch Licht angeregt wird. Die Energie des Lichtes bewirkt, dass Elektronen ein höheres Energieniveau erreichen und infolge dessen ihre Aufenthaltswahrscheinlichkeit ändern. Die Elektronen fallen auf ihr

C. Eigene Untersuchungen

vorheriges Energieniveau zurück und emittieren Licht im größeren Wellenlängenbereich als das Anregungslicht. Die Differenz der aufgenommenen und abgegebenen Energie wird als Stoke'scher Shift bezeichnet. Jeder Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht einer bestimmten, für ihn charakteristischen Wellenlänge. Dieses wird durch spezielle Detektoren nach dem Passieren eines Filters anhand der Intensität registriert.

Bei dem verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um das Gerät DAKO Galaxy (Fa. DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland). Das Gerät arbeitet mit einem Argonionenlaser, der im Bereich von 488 nm intensives monochromatisches Licht erzeugt. Das Durchflusszytometer verfügt über eine integrierte Computereinheit. Die Darstellungen und Analysen der Daten erfolgten mit der mitgelieferten Software Flomax Version 2.0 (Fa. Partec GmbH Münster, Deutschland 1997-1999), die unter Windows 98 der Firma Microsoft ausgeführt wurde. Flomax stellt die Daten vor allem in zwei Formen graphisch dar: dem Histogramm und dem Dot Plot. Es kann die Daten in 1, 3, 4, 6 und 8 Graphen ausgeben. Beim Histogramm handelt es sich um eine graphische Darstellung, bei der ein gemessener Parameter in Abhängigkeit der registrierten Zellen aufgetragen wird. Der Dot Plot gibt eine zweiparametrische Darstellung für jede einzelne Zelle wieder.

Es ist grundsätzlich erforderlich, die Grundeinstellungen des Gerätes an jedem Versuchstag zu überprüfen und gegebenenfalls erneut einzustellen, um eine optimale Darstellung zu gewährleisten. Die zu ändernden Einstellungen beziehen sich auf die zu messenden Parameter. Dazu gehören FSC, SSC und die zu bestimmenden Fluoreszenzsignale. Die änderbaren Werte beziehen sich auf die Optimierung der Empfindlichkeit des Signals und die Verstärkung in einem bestimmten Bereich. Innerhalb eines Tages (Messreihe) werden die Einstellungen konstant gehalten. Jeder vom Gerät erfasste Partikel sendet ein anderes Seitwärtsstreulicht und Vorwärtstreulicht aus. Spermien erzeugen aufgrund ihrer einheitlichen Morphologie eindeutige Signale. Es werden spermien-spezifische Signale bzgl. Länge und Breite erzeugt. So kann eine Spermienpopulation vollständig erfasst und von anderen Partikeln (z.B. Verunreinigungen durch Schmutz oder andere Zellen) unterschieden werden. Bei Bedarf ist eine Unterscheidung durch den Einsatz weiterer Farbstoffe möglich. Es wurden für jeden Farbstoff einzeln die Werte ermittelt, die eine optimale graphische Darstellung gewährleisten. Sollen mehrere Farbstoffe kombiniert werden, wird eine weitere Einstellung mit den entsprechenden Farbstoffen vorgenommen.

2.9.2 Grundeinstellungen des Durchflusszytometers

Es wurde für alle Versuche eine Einstellung gewählt, die die Darstellung von 6 Graphen erlaubte. Dadurch war es möglich, die beiden gemessenen Fluoreszenzparameter und FSC als Histogramm darzustellen. Die drei übrigen Graphen wurden als Dot Plots dargestellt. So wurden zum einen die Intensität der Fluoreszenzsignale in den Kanälen FL-1 und FL-3 gegeneinander aufgetragen, zum anderen FSC gegen SSC und als letztes FL-3 gegen FSC.

Nach erfolgter Einstellung der Dichte wurde zunächst eine native, nicht gefärbte Probe in Sheath Flüssigkeit gemessen. Das Gerät wurde so eingestellt, dass im Histogramm von FSC eine typische Verteilung (Abb. 4A) zu sehen war, die ihr Maximum in etwa bei 50 relativen Einheiten hatte und bei 25 die X-Achse schnitt. Nach rechts lief die Kurve eberspezifisch unterschiedlich aus.

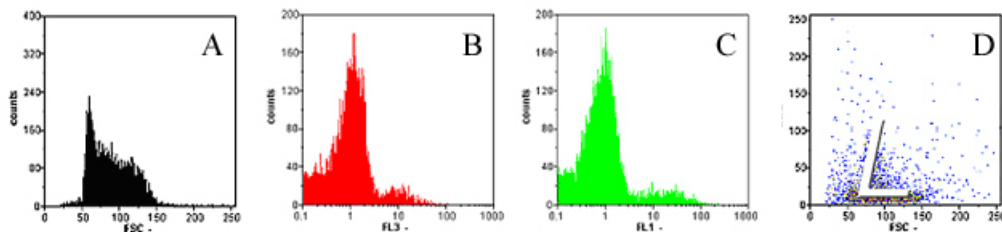


Abb. 4: Graphiken des Durchflusszytometers A) typische Verteilung von FSC im Histogramm, B) Beispiel der Grundeinstellung für PI im Histogramm, C) Beispiel für die Grundeinstellung der grünen Fluoreszenz (FL-1) im Histogramm, D) Beispiel für eine typische Verteilung der Zellen im Dotplot von FSC zu SSC

Der Dot Plot von FSC und SSC wurde so eingestellt, dass keine Achsenschnittpunkte zustande kamen und die Form des Graphen der eines „L“ glich (Abb. 4D). Die Daten wurden gespeichert. Die Messungen von 10.000 Zellen der Proben erfolgten bei einer Geschwindigkeit von vier. In einer Sekunde wurden 400 bis 600 Zellen gemessen. Es wurde eine PI gefärbte Probe im Inkubationsmedium und des weiteren eine Fluoreszenzprobe des jeweiligen zu untersuchenden Parameters Fluo3-AM, Antiphosphotyrosine (AB-4) Mouse Fluorescein Conjugate, PNA-FITC gemessen. Bei Doppelfärbung einer Probe wurden die Einstellungen so vorgenommen, dass für jedes Fluochrom ein eigenes Histogramm erstellt werden konnte, dessen Gipfel mit niedriger Fluoreszenzintensität bei 1 in der ersten Dekade der logarithmischen Skala lag (Abb. 4B und 4C). Die Grundeinstellungen wurden erneut gespeichert. Diese Einstellungen wurden während eines Versuches konstant gehalten. Zur Auswertung des Versuches wurde eine lineare Kompensation durchgeführt, um eine orthogonale

C. Eigene Untersuchungen

Verteilung der Subpopulationen zu erreichen. Diese Kompensation wurde gespeichert und für alle Messungen eines Versuchstages geladen und zur Auswertung verwendet.

2.10 Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Bei dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop handelt es sich um ein technisches Gerät, das die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von Präparaten in exakt einstellbaren Ebenen ermöglicht. Dies geschieht mittels Anregung durch einen Laserstrahl. Der Laserstrahl wird durch einen Kollimator geleitet, der für die Übereinstimmung verschiedenwelligen Lichtes in einer Fokusebene sorgt. Das Licht wird dann vom Hauptfarbteiler zum Scanner reflektiert. Dieser steuert den Lichtstrahl durch das Präparat. Das aus dem Präparat reflektierte oder emittierte Licht passiert den Hauptfarbteiler und wird über Nebenfarteiler spektral gespalten. Die verschiedenen konfokalen Kanäle sind mit einem in Position und Größe frei einstellbaren Pinhole versehen (Einstellen der Schichtdicke). Genau definierte Emissionsfilter können ausschließlich von Photonen einer bestimmten (geforderten) Wellenlänge passiert werden. Die selektierten Photonen werden anschließend mittels Photomultiplier detektiert.

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass der Fokuspunkt und das Pinhole in konjugierten Ebenen liegen, also konfokal sind. Dadurch ist es möglich, exakt eine Ebene des Präparates zu untersuchen, ohne die darüber oder darunter liegende Ebene einzubeziehen. Es wird bei der Untersuchung ausschließlich Licht aus dem Fokuspunkt berücksichtigt, da nur dieses das Pinhole passiert und so vom Photomultiplier registriert wird.

2.11 Kinetik von Prozessen in Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen

Es wurden Spermatozoen in Tyrode Medium über einen Zeitraum von drei Stunden in einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit erfolgten die Messungen. Die Inkubation erfolgte in Messröhrchen (Sarstedt) mit je 1 ml Inhalt. Die Proben der Spermienzellsuspensionen, die auf den Grad der Tyrosinphosphorylierung untersucht wurden, wurden in Greinergefäßen (Messvolumen 500 µl) inkubiert. Die drei Untersuchungsparameter wurden am selben Versuchstag am selben Ejakulat gemessen. Für diese Versuche wurde 24 Stunden gelagerter, flüssigkonservierter Samen verwendet.

Zuerst wurden die Grundeinstellungen für das Durchflusszytometer (wie in 2.9.2 beschrieben) vorgenommen. Die Messungen erfolgten nach 5 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und 180 Minuten.

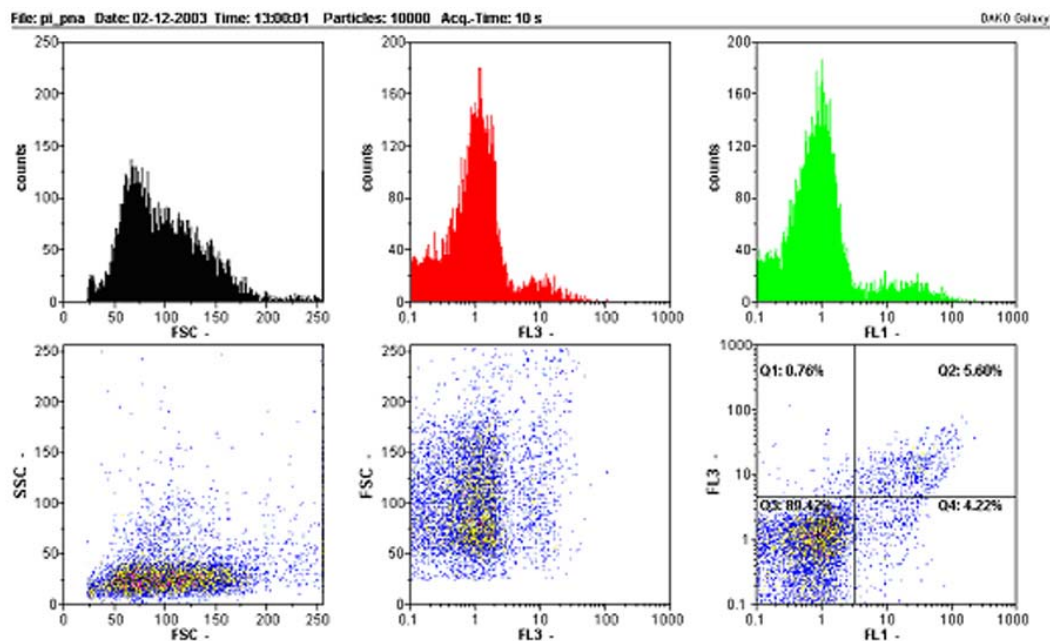


Abb. 5: Graphik der Durchflusszytometrie mit 6 Graphen. Beispiel für eine mit PI und PNA-FITC beladene Spermatozoenprobe nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten in Kapazitationsmedium

2.11.1 Messung des intrazellulären Kalziumionengehaltes

Für die Messungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes wurden die Spermatozoen mit Fluo3-AM beladen (siehe 2.6.1).

C. Eigene Untersuchungen

2.11.2 Messung der Akrosomreaktion

Um den Anteil akrosomreagierender Spermatozoen zu beurteilen, wurde den Messröhrchen fünf Minuten vor einer jeden Messung die entsprechende Menge PNA-FITC zugesetzt (siehe 2.6.2).

2.11.3 Messung der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen

Antiphosphotyrosine (Ab-4) Mouse Fluorescein Conjugate wurde 5 Minuten vor der Messung der entsprechenden Probe zugesetzt (siehe 2.6.2). Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, erfolgte nach 90 Minuten eine weitere Messung mit Orthophosphotyrosin blockiertem Antikörper (siehe 2.8.4).

2.12 Einfluss von Zona pellucida Proteinen von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades auf das Spermium

In diesem Abschnitt wurde ein möglicher Einfluss von Zona pellucida unreifer und 48 Stunden in vitro gereifter Oozyten auf den intrazellulären Kalziumionengehalt, die Proteintyrosinphosphorylierung und die Akrosomreaktion flüssigkonservierten Ebersamens durchflusszytometrisch untersucht.

Es wurden in Vorversuchen zur Bestimmung der optimalen Menge an Zona pellucida Äquivalenten 10 und 50 Äquivalente/ml Inkubationsmedium eingesetzt. Für die Hauptversuche wurden aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (Daten siehe Anhang) 10 Zona pellucida Äquivalente verwendet.

Die Zellsuspension wurde unter kapazitierenden Bedingungen unter fünfprozentiger CO₂-Begasung inkubiert. Die Messungen erfolgten nach 5 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten. Die Untersuchungen der Tyrosinphosphorylierung erforderten einen weiteren Messdurchgang, für den zusätzlich die beiden Messpunkte 120 Minuten und 150 Minuten für eine genauere Darstellung möglicher Veränderungen eingefügt wurden.

Für jeden untersuchten Parameter erfolgten die Messungen an drei Populationen: a) an der Gruppe, der keine Zona pellucida zugesetzt wurde (Kontrollgruppe), b) an der Gruppe, der Zonaäquivalente unreifer Oozyten zugesetzt wurden (GVI), und c) an der Gruppe, der Zonaäquivalente 48 Stunden in vitro gereifter Oozyten zugesetzt wurden (48 Stunden).

Vorbereitend wurden die Zona pellucida Glykoproteine in der entsprechenden Menge Tyrode Medium in Lösung gebracht. Das Protein enthaltende Eppendorfgefäß wurde mit Tyrode Medium mittels einer Pipette mehrfach ausgespült. Das Tyrode Medium wurde in einem sterilen Gefäß gesammelt und auf 38 °C erwärmt. Anschließend wurde die für die Dichte notwendige Menge der Spermienzellsuspension hinzugegeben und im Anschluss auf die Probenröhrchen verteilt. Bei den verwendeten Probenröhrchen handelt es sich um Greinergefäße, die mit 0,5 ml Spermienzellsuspension in Tyrode Medium befüllt wurden.

2.12.1 Messung der Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion wurde mit Hilfe von PNA-FITC (siehe 2.8.3) detektiert.

2.12.2 Messung des intrazellulären Kalziumionengehalt

Zur Bestimmung des intrazellulären Kalziumionengehaltes wurde Fluo3-AM (siehe 2.8.2) verwendet.

2.12.3 Messung der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen

Die Messung der Tyrosinphosphorylierung erfolgte mittels Antiphosphotyrosine (Ab-4) Mouse Fluorescein Conjugate (siehe 2.8.4).

2.13 Einfluss intakter Zonae pellucidae ungereifter und in vitro gereifter Oozyten auf kryokonservierten Samen: Ein funktioneller Vergleich

Es wurden kryokonservierte Nebenhodenschwanzspermien einer Charge und 50 Zonae pellucidae unterschiedlichen Reifungsstadiums koinkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (5, 10, 30 und 60 Minuten) untersucht. Mit einer Digitalkamera wurden Bilder erstellt, die am Computer ausgewertet wurden. Die Daten wurden tabellarisch erfasst.

C. Eigene Untersuchungen

2.13.1 Induktion der Akrosomreaktion

Um die funktionellen Unterschiede der Zona pellucida von unreifen und 48 Stunden gereiften Eizellen zu untersuchen, wurden mittels Spermatozoon-Zona pellucida-Bindungstest kryokonservierte Spermien zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihren Anteil akrosomreagerter Spermatozoen untersucht.

Die wie in 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben aufgearbeitete Zona pellucida wurde aufgetaut und in PBS/2% PVA gewaschen. Anschließend wurde die Zona pellucida in unterteilte Gewebekulturschalen (Greiner GmbH, Frickenhausen) in äquilibriertes Tyrode Medium gegeben. In jeder Abteilung befanden sich zehn Zonae pellucidae in 50 µl Tyrode Medium.

Die kryokonservierten Spermatozoen wurden wie in 2.5.2 behandelt und anschließend in 1,5 ml äquilibriertem Tyrode Medium resuspendiert. Es erfolgte die Dichtebestimmung der im Medium befindlichen Spermatozoen. Zu jedem Tropfen von 50 µl Tyrode Medium, der zehn Zonae pellucidae beinhaltet, wurden 10^5 Spermatozoen pipettiert. Die benötigte Menge an µl Spermienzellsuspension war zuvor anhand der Dichtebestimmung ermittelt worden. Das Spermien-Zona pellucida Gemisch wurde für zehn Minuten im Brutschrank unter fünfprozentiger CO₂-Begasung in feuchtigkeitsgesättigter Luft inkubiert. Danach wurden die Zonae pellucidae samt der gebundenen Spermien mit einer dem Durchmesser einer Zona pellucida entsprechenden Pipette in 50 µl Tyrode Medium umgesetzt und für 5, 10, 30 beziehungsweise 60 Minuten inkubiert. Zu jedem der vier genannten Zeitpunkte wurden zehn Zonae pellucidae entnommen, dann für 10 Minuten in zweieinhalbprozentiges Glutardialdehyd gesetzt und fixiert, in 1 molares Glycin gesetzt und für eine Minute gewaschen und schließlich viermal durch PBS/2% PVA gewaschen. Zum Anfärben der Spermatozoen wurde ein Tropfen PBS/2% PVA, der PI (Stammlösung: 0,5 mg/ml) in einer Konzentration von 5 µl/ml enthielt und PNA-FITC in einer Endkonzentration von 3 µg/ml, verwendet. Die Einwirkzeit betrug 10 Minuten unter Lichtausschluss. Zuletzt wurden die Zonae pellucidae in einen etwa 3 µl großen Tropfen Slowfade (Fa. Molecular Probes, Netherlands), der zuvor mittig auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger platziert wurde, gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Kühlschrank bei 4 °C bis zum Mikroskopieren gelagert. Die Färbung mit PI diente als reine Zährefärbung, da infolge der Fixation die Membranintegrität aller Spermatozoen gestört wurde (FLESCHE et al. 2001). Zur Erfassung des akrosomalen Status diente die Färbung mit

PNA-FITC. Unter Verwendung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes LSM 510 (Carl Zeiss, Jena) wurden die an die Zonae pellucidae gebundenen Spermien mikroskopiert und digital fotografiert. Jede Zona pellucida wurde von oben nach unten im Abstand von 1,7 μm mikroskopiert und digital fotografiert. Die daraus entstandenen Schnittebenen wurden gespeichert und anschließend am Computer ausgewertet. Dieses Verfahren ermöglichte es, jedes gebundene Spermium korrekt zu erfassen und zu beurteilen, da etwaige Überlagerungen von Spermien verschiedener Ebenen vermieden wurden und auch Spermien nicht sichtbarer Ebenen durch das systematische Mikroskopieren aller Ebenen einer Zona pellucida bildlich erfasst werden konnten.

In der Kontrolle wurden Spermatozoen über dieselben Zeiträume inkubiert, wie die Spermien, die mit Zonae pellucidae inkubiert wurden. Es wurde eine zusätzliche Untersuchung zum Zeitpunkt 0 Minuten durchgeführt, um den Status der Zellen vor der Inkubation beurteilen zu können, da die Spermien für die Bindung bereits 10 Minuten mit Zonae pellucidae in Kapazitationsmedium inkubiert wurden. Die Zellen wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und anschließend für 10 Minuten mit Glutaraldehyd fixiert, für 1 Minute in Glycin umgesetzt und viermal in PBS/2% PVA gewaschen. Anschließend wurden die Ausstriche gefärbt. Hierfür wurde eine Lösung von PBS/2% PVA verwendet, die PI und PNA-FITC in den angegebenen Konzentrationen enthielt. Danach wurden 200 Zellen je Objektträger ausgezählt.

2.13.2 Auswertung

Um alle Bilder einer Zona pellucida auswerten zu können, wurden diese mit dem Programm Photoshop der Firma Adobe auf einem PC mit Microsoft's Windows 2000 Professional bearbeitet. Dafür wurden die Bilder jeder Schnittebene aus einer Bilderserie (damit sind alle Bilder einer Zona pellucida gemeint) übereinander gelegt, sodass jedes Bild in einer eigenen Ebene dargestellt wird. Die Bilder wurden so gelegt, dass das Bild, welches im konfokalen Fluoreszenzmikroskop zuerst erstellt wurde, zuoberst lag und das zuletzt geschossene Bild zuunterst, sodass die korrekte Reihenfolge erhalten blieb. Die Hintergrundebene wurde schwarz gefärbt. Es wurde zum Erfassen aller Spermien in einer Ebene eine zusätzliche, leere Arbeitsebene angelegt, die als Markierungsebene diente. Diese Ebene musste die oberste sein, um nicht von anderen Ebenen verdeckt zu werden. Die Deckkraft aller Ebenen mit

C. Eigene Untersuchungen

Ausnahme der Hintergrund- und der Arbeitsebene wurde auf 50 % gestellt. Alle Ebenen wurden ausgeblendet und dann Ebene für Ebene von unten nach oben eingeblendet, bis eine größtmögliche Anzahl von Spermien gut zu erkennen war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Spermatozoen der unteren Ebene noch deutlich zu erkennen waren. Es wurde die Arbeitsebene aktiviert und jedes Spermium mittels eines weißen oder schwarzen 8 px Durchmesser starken Buntstiftwerkzeuges farbig markiert. Der Durchmesser musste mindestens 8 px betragen, um die spätere Vektorisierung sicher zu gewährleisten. Weiß wurde zur Kennzeichnung der PI gefärbten nicht akrosomreagierten Spermatozoen und schwarz für die Spermatozoen mit grüner Kopfkappe oder sichtbar abgelöster Kopfkappe verwendet. Danach wurde die Deckkraft der nachfolgenden Ebene auf 100 % erhöht, damit bereits markierte Zellen der unteren Ebenen nicht irritierten. Die nachfolgenden Ebenen wurden nach dem beschriebenen Prinzip eingeblendet und die sichtbar werdenden Spermatozoen in der Arbeitsebene gekennzeichnet. Dieses wurde solange wiederholt, bis die Spermien aller Ebenen in der Arbeitsebene als schwarzer oder weißer Punkt gekennzeichnet waren. Abschließend wurde das Bild so abgespeichert, dass zwei Bilder entstanden: ein Bild, das die Arbeitsebene auf weißem Hintergrund in einer Bildebene zeigte und ein Bild, das die Arbeitsebene auf der schwarzen Hintergrundebene zeigte. Diese beiden Bilder konnten mit einem Programm namens CorelTrace 12, das Bestandteil der CorelDraw[®] Graphics Suite 12 ist, geöffnet werden. Das Bild mit den weiß (PNA-FITC negative) gekennzeichneten Spermien auf dem schwarzen Hintergrund wurde invertiert und dann in ein Schwarz-Weiß-Bild konvertiert. Das Bild mit den schwarz (PNA-FITC positive) gekennzeichneten Spermien wurde nur zu einem Schwarz-Weiß-Bild konvertiert. Letzterer Schritt war notwendig, um die nachfolgende Vektorisierung mit diesem Programm korrekt durchführen zu können. Die Vektorisierung erfolgte mit dem Befehl „Mittellinienumriss“ in den Standardeinstellungen. Nach dem Ausführen dieses Befehls sind alle Punkte vektoriell dargestellt und nun Objekte, deren Gesamtzahl im oberen rechten Fensterrand ausgegeben wird. Zur Kontrolle wurde die ausgegebene Anzahl der Objekte mit der tatsächlichen Anzahl der von Hand gezeichneten ausgezählten Punkte, verglichen. Es konnte in keinem Fall eine Differenz festgestellt werden. Die Anzahl der Objekte wurde in einer Tabelle schriftlich fixiert.

2.13.3 Der intrazelluläre Kalziumionengehalt

Analog der in 2.13.1 beschriebenen Vorgehensweise wurden kryokonservierte Spermien zunächst gewaschen und die Zonae pellucidae je 10 Stück in eine Abteilung einer unterteilten Gewebekulturschale in einen 50 µl großen Tropfen Tyrode Medium pipettiert. Nach dem Waschen in Androhep wurden die Spermien wie in 2.6.1 weiter behandelt. Je 10^5 Spermatozoen wurden zu den in den Abteilungen der Gewebekulturschale befindlichen Zonae pellucidae gegeben, für 10 Minuten koinkubiert, in einen neuen Tropfen umgesetzt und weiter inkubiert. Zu den in 2.13 angegebenen Zeitpunkten wurden je zehn Zonae pellucidae entnommen und wie in 2.13.1 beschrieben verfahren. Im letzten Waschvorgang befand sich kein Farbstoff in der PBS/2% PVA-Lösung. Danach wurden die Zonae pellucidae auf einem L-Lysin-beschichteten Objektträger in einem Tropfen Slowfade (Fa. Molecular Probes, Netherlands) pipettiert und eingedeckelt. Die Untersuchung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Jena).

Zur Kontrolle wurden Spermienausstriche angefertigt, die im Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden.

2.13.4 Die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen

Für den Nachweis der Tyrosinphosphorylierung wurden die Spermien wie in 2.9.1 gewaschen, in äquilibriertem Tyrode Medium verdünnt. Zu den bereits in Tyrode Medium in der unterteilten Gewebekulturschale befindlichen Zonae pellucidae wurden 10^5 Spermatozoen gegeben, für 10 Minuten koinkubiert und die Zonae pellucidae wurden mit den an ihnen gebundenen Spermatozoen umgesetzt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten (siehe 2.9) wurden zehn Zonae pellucidae entnommen, für 10 Minuten Glutardialdehyd fixiert und anschließend durch Glycin und fünfmal durch PBS/2% PVA gewaschen. Zum Anfärben der Spermatozoen wurde ein Tropfen PBS/2% PVA, dem 10 µl Antiphosphotyrosine (Ab-4)-FITC je 500 µl PBS/2% PVA zugesetzt war, verwendet. Die Einwirkzeit betrug 10 Minuten unter Lichtausschluss. Zuletzt wurden die Zonae pellucidae in einen etwa 3 µl großen Tropfen Slowfade (Fa. Molecular Probes, Netherlands), der zuvor mittig auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger platziert wurde, gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt.

3. Statistische Auswertung

Die in den Untersuchungen erhaltenen Daten wurden unter Verwendung von Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond) erfasst. Die Daten aus den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden zusätzlich mit der Software Flomax (Dako Galaxy, Hamburg, Deutschland) erfasst und zwischenberechnet. Des Weiteren wurden mit diesen Programmen graphische Darstellungen angefertigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit den in SAS[®] (Statistical Analysis System, Institute Ltd., NC, USA Version 8e) zur Verfügung stehenden Funktionen.

Bei der statistischen Auswertung wurden mit Hilfe der im SAS[®]-Programm befindlichen Funktion MEANS die arithmetischen Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimum und Maximum berechnet. Die Standardabweichungen werden in den Abbildungen nicht aufgeführt. Sie befinden sich in tabellarischer Form im Anhang. Die Standardabweichungen waren kleiner als 15 % der Mittelwerte. Alle Ergebnisse wurden unter Verwendung der multifaktoriellen Varianzanalyse im Rahmen der GLM-Prozedur (General Linear Models-Procedure) auf die Faktoren Zeit und Einfluss des Reifestatus verwendeter Eizellen sowie auf die Wechselwirkung dieser beiden Faktoren untereinander analysiert. Die Modellierung der Kinetiken erfolgte mittels der Excel[®]-Software und den SAS-Prozeduren für lineare Regression (REG) und für nonlineare Regression (NLIN). Beim Vergleich der Kinetiken wurde analytisch zwischen den Koeffizienten und den Ableitungen (Prozessraten) unterschiedlicher Behandlungen verglichen.

Die berechneten Wahrscheinlichkeitswerte wurden wie folgt klassifiziert: $p \geq 0,1$ war statistisch nicht signifikant, $p \leq 0,05$ galt als statistisch signifikant. Werte, die zwischen 0,05 und 0,1 lagen, wurden als statistisch auffällig, wenn auch nicht als signifikant gewertet.

D. Ergebnisse

1. Durchflusszytometrische Untersuchungen von Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen

Ziel dieser Untersuchung war es, mit einem objektiven Messverfahren physiologische Prozesse, die in Spermatozoen während der Kapazitation ablaufen, näher zu charakterisieren. Die Messungen erfolgten mittels eines Durchflusszytometers. Als Marker wurden der intrazelluläre Kalziumionengehalt, die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen und die spontane Akrosomreaktion verwendet. In den Voruntersuchungen hat sich ein Inkubationszeitraum von 180 Minuten bei den verwendeten Eberspermien als geeignet erwiesen. Es wurde untersucht, ob die einzelnen Prozesse in unterschiedlichen Zeitfenstern ablaufen und ob eine spezifische Reihenfolge der Vorgänge besteht.

D. Ergebnisse

1.1 Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes [Ca^{2+}]_i

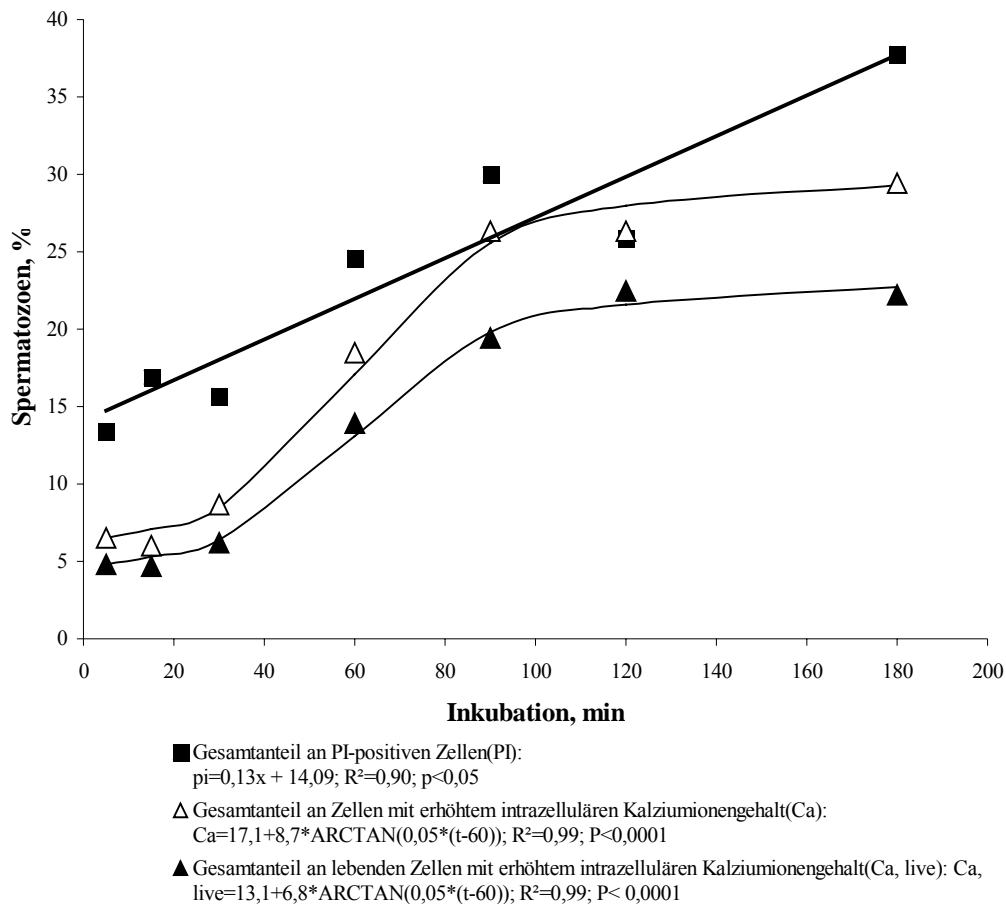


Abb. 7: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes und der Veränderungen der Membranintegrität unter kapazitierenden Bedingungen in Abhängigkeit von der Zeit. (n=7)

Die Abbildung veranschaulicht die Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes innerhalb verschiedener Spermienpopulationen in Abhängigkeit von der Zeit. Sie zeigt die Anteile der Zellen mit erhöhtem zytosolischen Kalziumionengehalt innerhalb der Population lebender Spermatozoen und innerhalb der Gesamtpopulation. Zusätzlich ist der Anteil PI-positiver (membrandefekter) Spermien aufgetragen. Der Anteil der PI-positiven Spermien steigt mit der Inkubationsdauer linear an. Die beiden Kurven, die die Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes beschreiben, haben den selben Verlauf. Sie verhalten sich in dem Beobachtungszeitraum wie Tangensfunktionen.

Es ist ein deutlicher Anstieg des prozentualen Anteils an Spermien mit einem erhöhten intrazellulären Kalziumionengehalt zwischen 30 und 60 Minuten

festzustellen. Nach 120 Minuten erreichen die Kinetiken des Kalziumioneninfluxes sowohl für die Gesamtpopulation als auch für die Population lebender Spermien ein Plateau und die Zunahme stagniert. Es wurde für den Anteil lebender Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Kalziumionengehalt ein Wert von etwa 22 Prozent und für den Gesamtanteil aller Zellen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionengehalt circa 28 Prozent zum Zeitpunkt 180 Minuten erreicht.

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Modelle für die gemachten Untersuchungen signifikant sind.

1.2 Veränderungen der Tyrosinphosphorylierung

Die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen wurde über den Untersuchungszeitraum parallel zum intrazellulären Kalziumionengehalt und zur spontanen Akrosomreaktion gemessen.

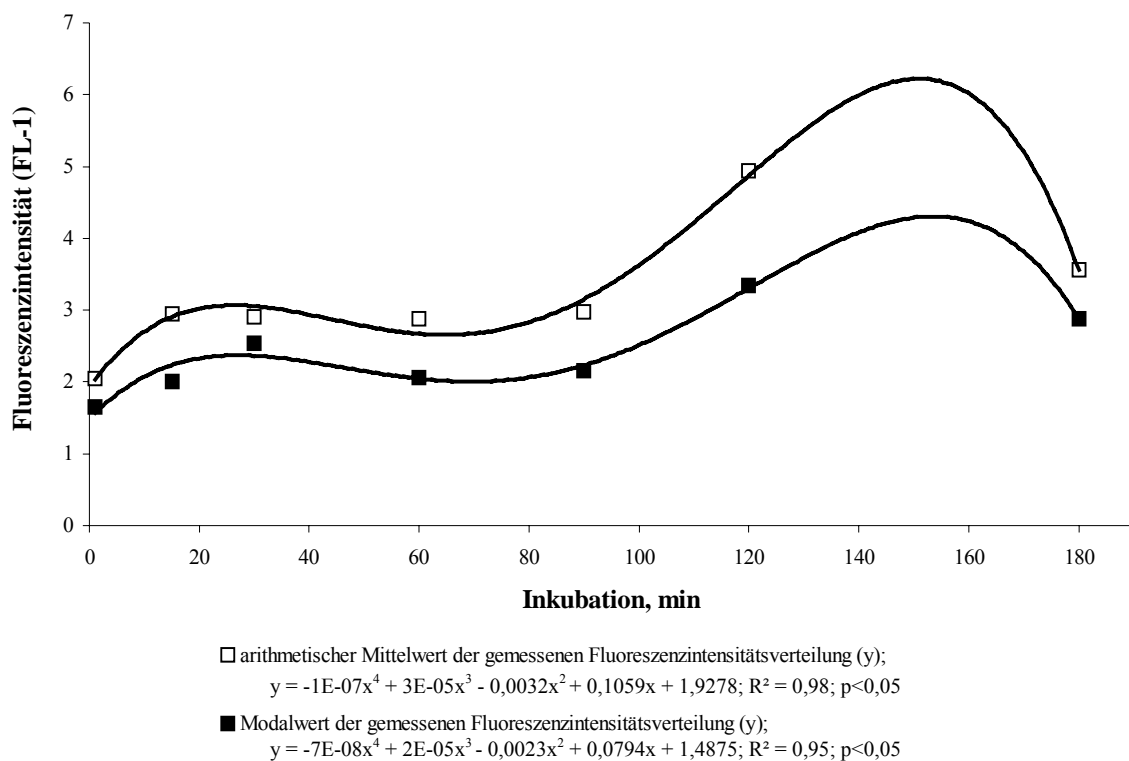


Abb. 8: Durchflusszytometrische Erfassung der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen mit Antiphosphotyrosine (Ab-4) Mouse Fluorescein Conjugate. Die Veränderungen der mittleren und modalen Fluoreszenzintensität unter kapazitierenden Bedingungen in Abhängigkeit von der Zeit. (n=7)

D. Ergebnisse

In der Graphik sind die Kinetiken der Tyrosinphosphorylierung für den Modalwert und den Mittelwert in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Der zeitliche Verlauf kann durch eine polynomische Funktion approximiert werden. Beide Kurven zeigen einen ähnlichen biphasischen Verlauf.

Nach einem primären leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 30 Minuten, kommt es zu einem nahezu konstanten Tyrosinphosphorylierungslevel, der innerhalb der ersten 90 Minuten der Inkubation aufrechterhalten wird. Zu diesem Zeitpunkt setzt ein sekundärer signifikanter Anstieg der Phosphorylierung ein. Die maximalen Werte wurden nach 120 Minuten gemessen. Die Werte, die nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten erfasst wurden, zeigten eine deutlich niedrigere Intensität als die Werte nach 120 Minuten. Dieses Verhalten ist in der Kurve, die den Mittelwert wiedergibt, deutlicher zu sehen als in der des Modalwertes. Das Maximum soll zwischen 120 und 150 Minuten erreicht sein.

Während des ersten Anstieges der Kurve, steigt die Intensität auf das etwa Eineinhalbfache des Ausgangswertes an. Im Verlauf des zweiten Anstieges nimmt die Intensität auf über das Dreifache zu.

Es bestanden signifikante spezifische Unterschiede der einzelnen Individuen im zeitlichen Ablauf der Phosphorylierung der Spermienproteine. Der Einfluss des Faktors „Eber“ war signifikant auf den Mittelwert der relativen Intensität der Fluoreszenzen ($p < 0,05$).

1.3 Veränderungen der spontanen Akrosomreaktion

Die spontane Akrosomreaktion findet an Spermatozoen ohne den Einfluss von Zona pellucida statt. Es wurde der Anteil spontan akrosomreagierter Spermien über einen Zeitraum von 180 Minuten unter kapazitierenden Bedingungen untersucht.

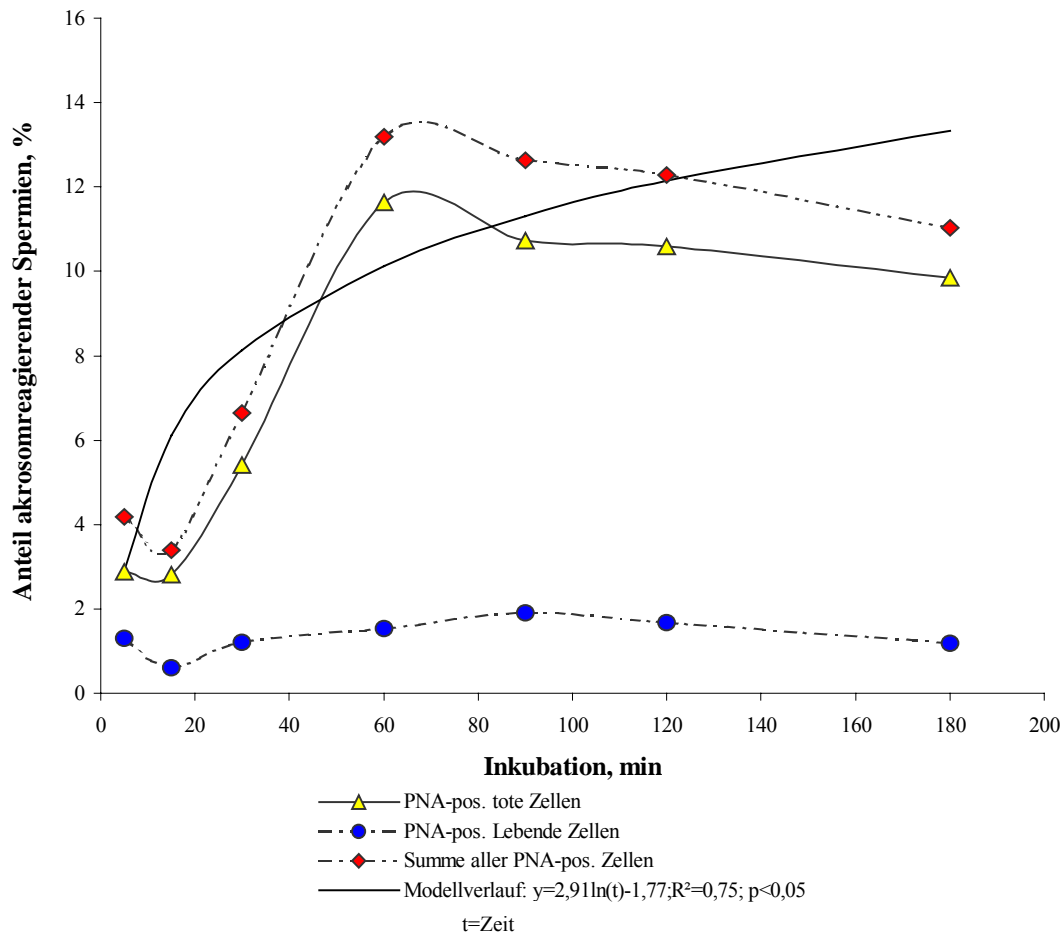


Abb. 9: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderungen der Akrosomreaktion mit PNA-FITC unter kapazitierenden Bedingungen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Abbildung stellt die Veränderungen akrosomreagierender lebender, akrosomreagierender toter, die Summe aller reagierenden (PNA-positiver) Zellen und deren Modellverlauf (Summe aller reagierenden Zellen) dar. Die Angabe in Prozent entspricht dem Anteil der Zellen an der Gesamtheit aller erfassten Zellen. (n=7)

In dem letzten Teil dieses Versuchsabschnittes wurden die Spermienpopulationen auf ihren prozentualen Anteil PNA-FITC-positiver Zellen untersucht. Vergleichend stellt die Abbildung 9 den Anteil lebender und toter Zellen in Abhängigkeit der Zeit dar.

D. Ergebnisse

Des Weiteren ist die Summe aller als PNA-FITC-positiv gewerteten Spermien in einem Graphen aufgetragen. Der Anteil PNA-FITC-positiver, lebender Spermatozoen bleibt unter 2 % während der gesamten Inkubationsdauer. Hingegen findet unter den PI-positiven Spermatozoen in den ersten 30 Minuten ein deutlicher Anstieg von etwa 1,8 auf knapp 6 % statt. Bis zum Ende der Inkubationsdauer erhöht sich dieser Anteil kontinuierlich auf circa 11 %.

Es existiert statistisch absicherbar eine Regression zwischen der Akrosomreaktion und der Zeit. Im Einzelnen hat sich der Anteil akrosomreagierender Zellen wie eine logarithmische Funktion der Zeit im Untersuchungszeitraum verhalten.

2. Der Einfluss von Zona pellucida Protein unterschiedlich lang in vitro gereifter Oozyten auf Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen

In diesem Abschnitt wurden die Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes, der Tyrosinphosphorylierung und der Akrosomreaktion unter dem Einfluss solubilisierter Zonae pellucidae am Durchflusszytometer untersucht. Das Ziel bestand darin herauszufinden, inwiefern sich die Gegenwart von Zona pellucida-Glykoproteinen und der Reifestatus der Eizelle auf die Stoffwechselfvorgänge des Spermiums auswirken.

Die Gruppe der Spermien, die nicht mit Zona pellucida-Glykoproteinen koinkubiert wurden, werden als Kontrollgruppe bezeichnet. Spermien, die mit Glykoproteinen der Zona pellucida nicht gereifter Eizellen koinkubiert wurden, werden als GVI bezeichnet. Mit Zona pellucida-Glykoproteinen von 48 Stunden gereiften Eizellen koinkubierte Spermienzellsuspensionen werden als 48 Stunden bezeichnet.

2.1 Die Induzierbarkeit von Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes

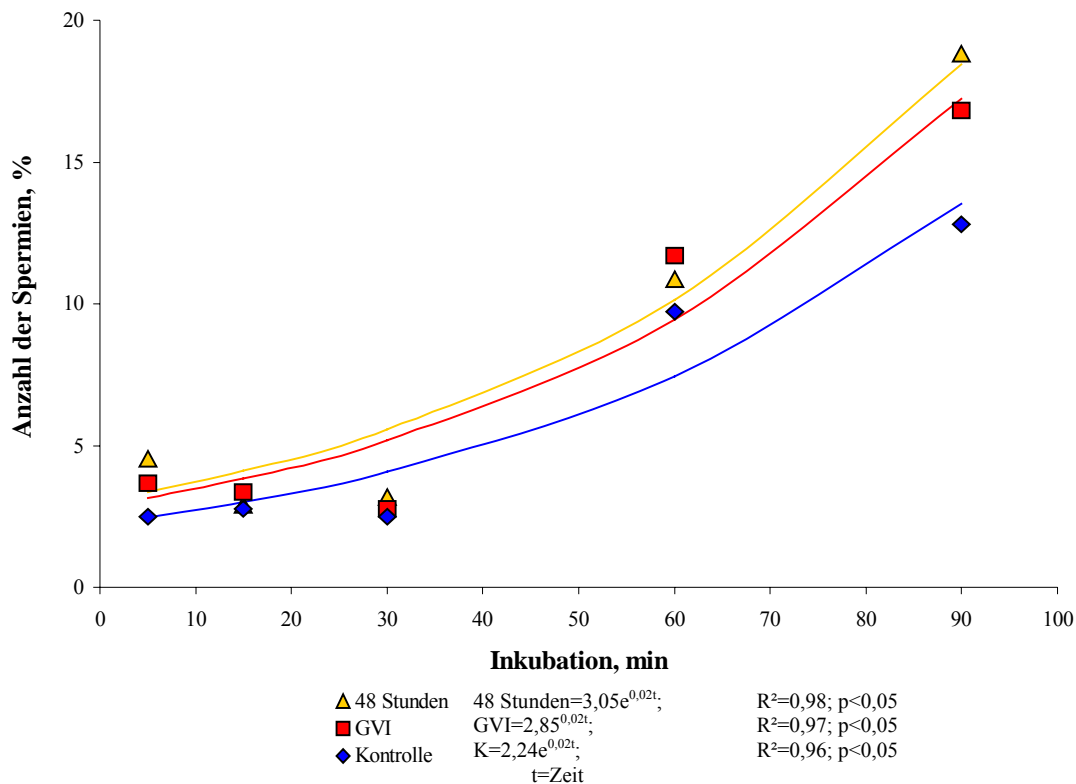


Abb. 10: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderungen des prozentualen Anteils der Spermatozoen, die als Zellen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionengehalt eingestuft wurden, unter dem Einfluss von Zona pellucida-Glykoproteinen von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades, in Abhängigkeit der Zeit. (n=3)

Betrachtet man die Prozesse in ihrem kompletten Zeitverlauf, kann festgestellt werden, dass statistisch absicherbar eine Regression zwischen dem prozentualen Anteil an Zellen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionenspiegel und der Zeit besteht. Im Einzelnen hat sich für alle untersuchten Gruppen die Zunahme des prozentualen Anteils der Zellen verhalten wie eine exponentielle Funktion der Zeit. In den Zellsuspensionen, denen Zona pellucida Proteine zugesetzt wurden, findet ein beschleunigter Anstieg des intrazellulären Kalziumionengehaltes in den Zellen statt. Die Veränderungen waren durch eine Funktion der Art $f(t) = ae^{0,02t}$ approximiert. Die Koeffizienten sind in der folgenden Funktion $ae^{0,02t}$ und t entspricht der Inkubationszeit in Minuten darstellbar. Der Koeffizient a entspricht dem geschwindigkeitsbestimmenden Faktor, mit der die Reaktion abläuft ($f'(t) = 0,2ae^{0,02t}$).

D. Ergebnisse

Für die Kontrolle wurde für a ein Wert von 2,24, für mit GVI-Protein koinkubierten Zellen 2,85 und für Protein von 48 Stunden gereiften Eizellen 3,05 ermittelt (Abb. 10).

Diese Werte belegen die höhere Rate des Prozesses in Spermatozoen, die mit Zonae pellucidae von 48 Stunden gereiften Oozyten koinkubiert wurden.

Bei dem Vergleich der individuellen Messwerte zwischen der Kontrolle und 48 Stunden für den Prozentsatz der Zellen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionenspiegel in der Gesamtpopulation wurde ein signifikanter Einfluss der Zeit ($p \leq 0,05$) festgestellt. Der Reifestatus der Oozyten hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Prozentsatz der Zellen mit hohem intrazellulären Kalziumionengehalt im gesamten Untersuchungszeitraum. Es bestand allerdings eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Status. Das bedeutet, dass in den beiden untersuchten Gruppen der Einfluss des Faktors Zeit unterschiedlich ausgefallen ist.

Mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit zwei Stufen wurden die Kontrollgruppe und GVI über den gesamten Untersuchungszeitraum näher betrachtet. Der Vergleich aller Messwerte beider Gruppen ergab, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Zunahme des prozentualen Anteils von Zellen mit erhöhtem Kalziumionengehalt ausübt. Ein Einfluss des Reifestadiums der Oozyten konnte statistisch nicht abgesichert werden. Die Untersuchung der Wechselwirkung der Faktoren Zeit und Status war statistisch auffällig.

Aufgrund der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Status und der Tatsache, dass der schnelle Anstieg des intrazellulären Kalziumionengehaltes erst nach 30 Minuten stattfindet (Abb. 10), wurde der Messzeitraum zwischen 60 und 90 Minuten genau untersucht.

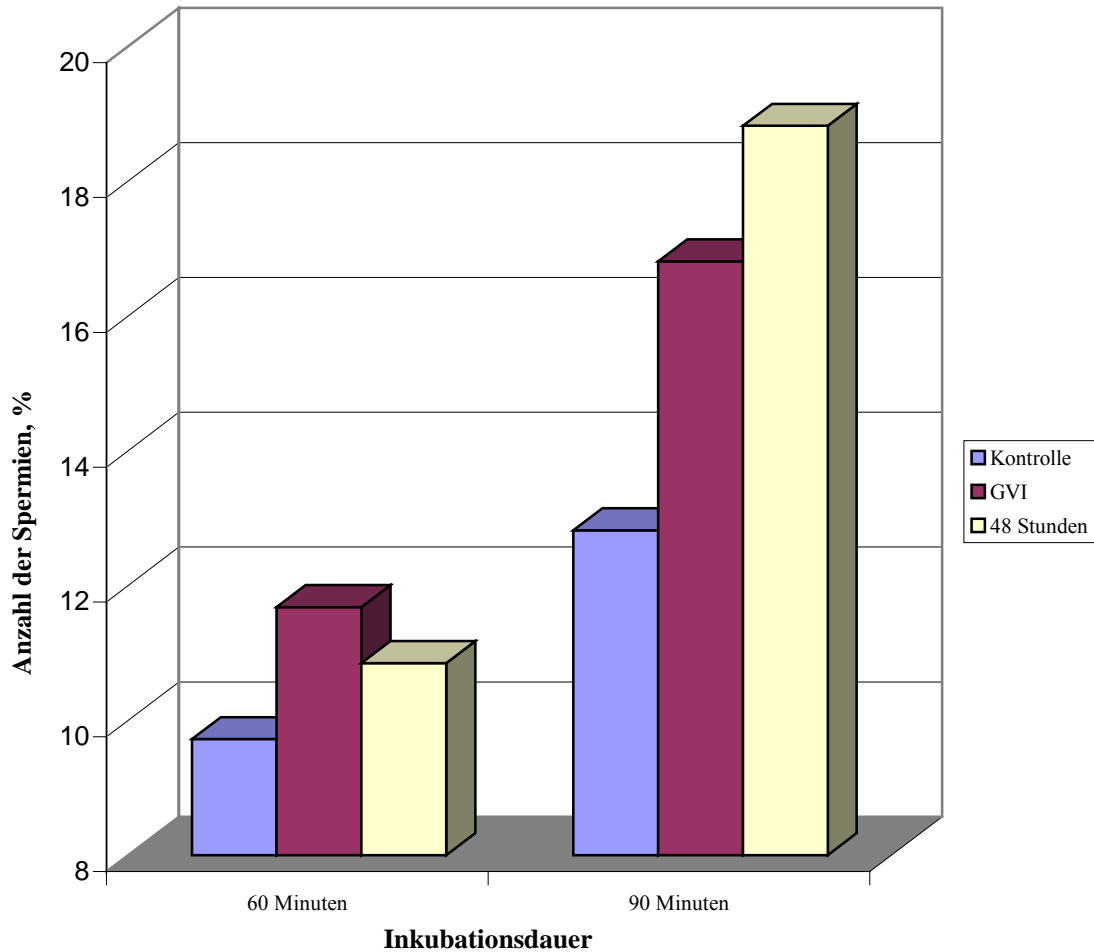


Abb. 11: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderungen des prozentualen Anteils von Spermatozoen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionengehalt zu den Zeitpunkten 60 und 90 Minuten unter dem Einfluss von Zona pellucida-Glykoproteinen von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades (n=3)

Beim Vergleich der Zeitpunkte 60 und 90 Minuten mit der Kontrolle sowie mit den einzelnen Reifestadien der Zona pellucida konnte ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Der deutlichste Anstieg von etwa 8 Prozent erfolgte unter Verwendung von Zona pellucida Protein 48 Stunden gereifter Eizellen. Die Gruppe der Spermatozoen, die mit Protein nicht gereifter Eizellen (GVI) inkubiert wurden, wies einen um 5 Prozent erhöhten Anteil von Zellen mit positiver Fluoreszenz auf. Die Kontrollgruppe nahm um etwa drei Prozent zu.

Im Vergleich der Gruppen 48 Stunden und Kontrolle konnte für diesen Zeitraum gezeigt werden, dass ein signifikanter Einfluss des Reifungsstadiums der Oozyte auf

D. Ergebnisse

die Zunahme des prozentualen Anteils der Spermatozoen mit erhöhtem zytosolischen Kalziumionengehalt besteht.

Der Vergleich der Messwerte 60 und 90 Minuten in der multifaktoriellen Varianzanalyse zweier Gruppen untereinander konnte keinen statistisch absicherbaren Einfluss von Zeit und Reifungsstadium der verwendeten Oozyte und eine Wechselwirkung dieser beiden Faktoren zwischen GVI und 48 Stunden sowie zwischen GVI und Kontrolle zeigen.

2.2 Die Induzierbarkeit der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen

In diesem Versuchsabschnitt wurde der Einfluss des Reifungsstadiums der Eizellen auf die Induzierbarkeit der Tyrosinphosphorylierung durch die Zona pellucida getestet.

In einem ersten Untersuchungsgang wurden die Proben über einen Zeitraum von 90 Minuten untersucht. Die Messwerte waren über den gesamten Zeitraum konstant. Da ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 90 Minuten nicht vorhanden war, wurde in einem zweiten Messgang ein neuer Messzeitraum von 150 Minuten festgelegt.

Auf die kinetische Charakterisierung durch Regressionsmodelle wurde in diesem Fall verzichtet, da nur eine begrenzte Anzahl von Messzeitpunkten (vier) mit ausgedehnten Zeitintervallen (5 bis 90 Minuten) vorlag. Die Daten des ersten Versuchsdurchganges konnten zur Ermittlung der Ergebnisse nicht herangezogen werden, da die Messungen an unterschiedlichen Tagen erfolgten und deswegen nicht miteinander vergleichbar waren. Die Veränderungen der Kernzeitpunkte wurden mittels einer multifaktoriellen Varianzanalyse näher untersucht. Beim Vergleich der Zeitpunkte 5 und 120 Minuten wurden die Fluoreszenzintensitätswerte durch den Wert von 5 Minuten dividiert, um eine Bezugsgröße zu erhalten. Um das Ergebnis zu veranschaulichen, wurden die errechneten Zahlen in relative Werte umgerechnet (relative Zunahmen in Prozent).

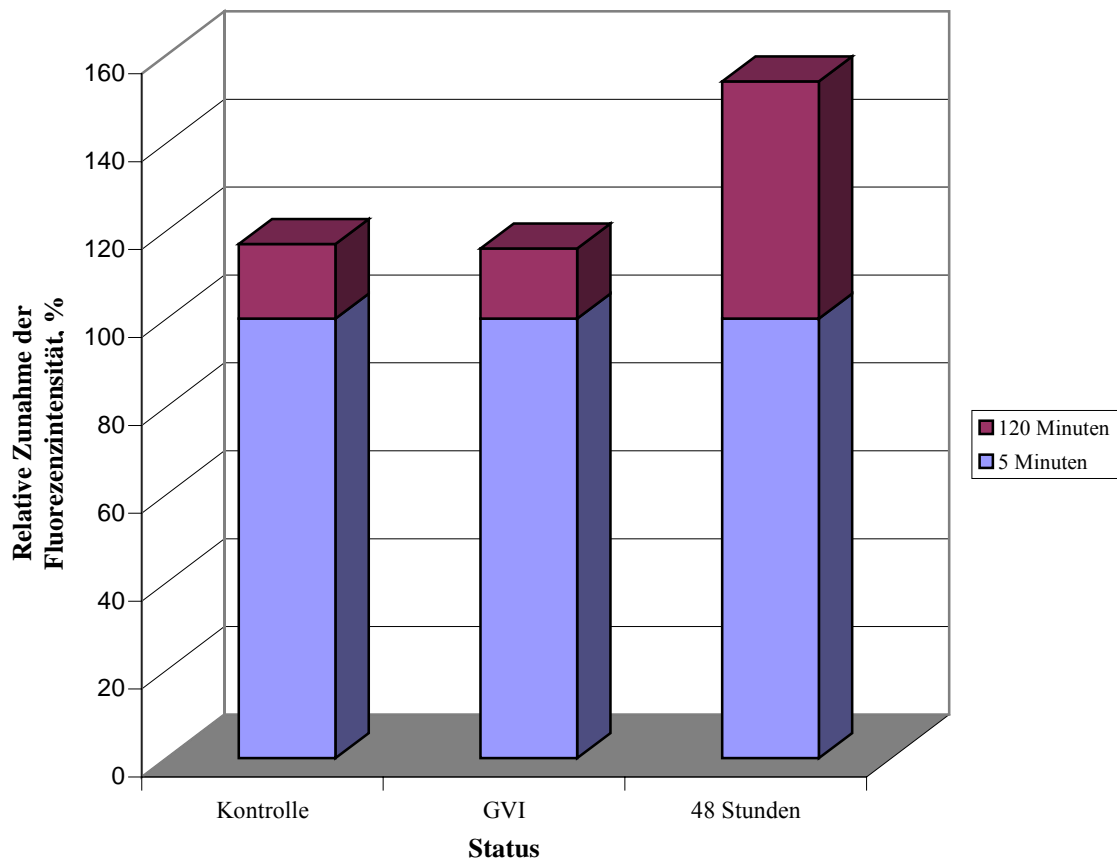


Abb. 12: Durchflusszytometrische Erfassung der relativen Zunahme der Tyrosinphosphorylierung nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten in Gegenwart von Zona pellucida-Glykoproteinen unterschiedlich lang in vitro gereifter Eizellen. Die Daten beziehen sich auf die relative Zunahme der spezifischen Antiphosphotyrosine (AB-4)-FITC-Fluoreszenzintensitäten in der Population lebender Zellen. (n=3)

In dem Diagramm sind die Zunahmen für die jeweilige Messreihe rot dargestellt. Die Graphik zeigt die Werte, die auf die Subpopulation lebender Zellen bezogen sind. Beim Vergleich der relativen Zunahmen der Tyrosinphosphorylierung im Zeitraum von 5 Minuten bis 120 Minuten hat sich herausgestellt, dass der Anstieg der Tyrosinphosphorylierung höher ausfällt, wenn die Suspension mit dem Protein solubilisierter Zona pellucida von 48 Stunden gereiften Oozyten koinkubiert wurde. Die Zunahmen von Kontrollgruppe sowie GVI lagen bei 17 und 16 %, die der 48 Stunden-Gruppe bei 54 % (Abb. 12). Die Unterschiede von 48 Stunden zu den beiden anderen Gruppen waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

2.3 Die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion

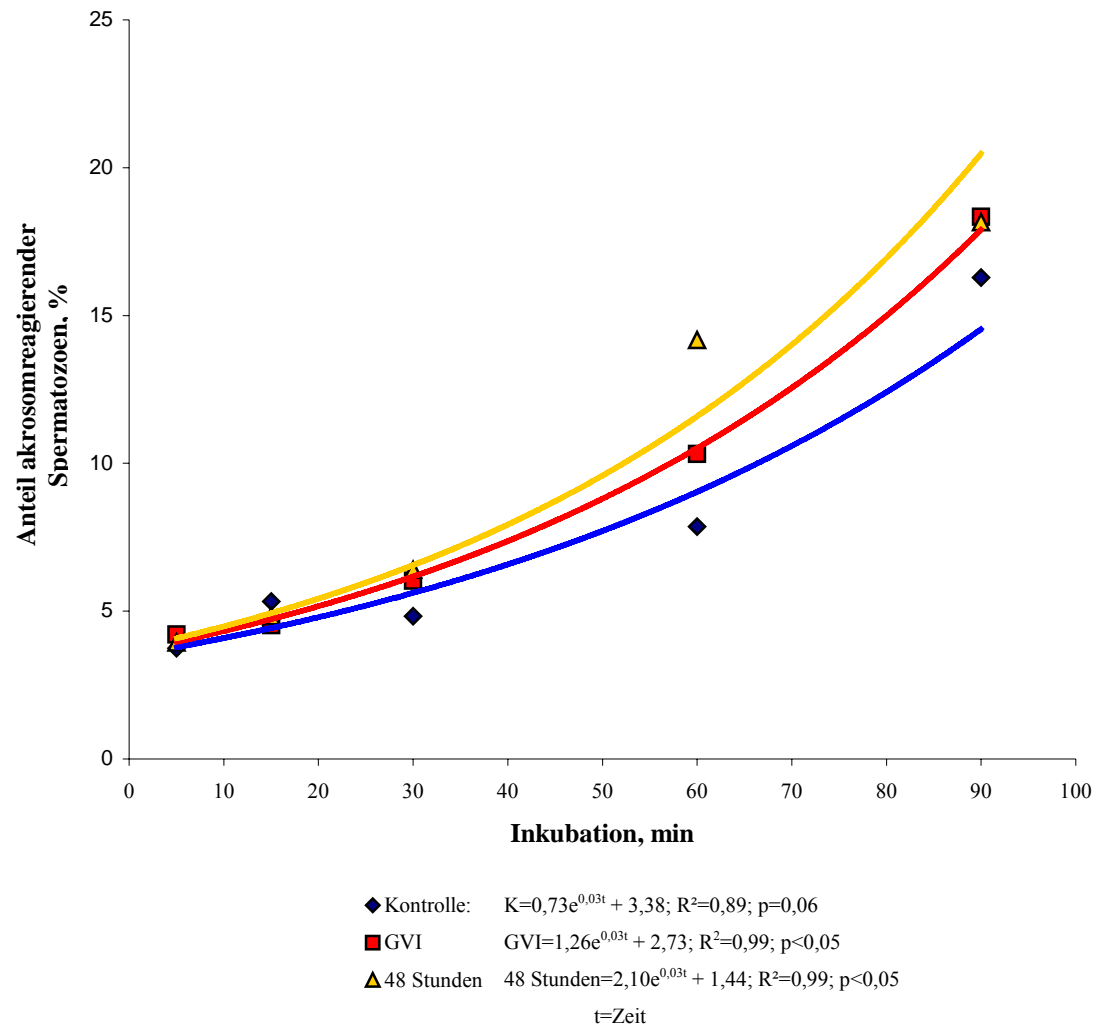


Abb. 13: Durchflusszytometrische Erfassung der Akrosomreaktion unter dem Einfluss von Zona pellucida-Glykoproteinen von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades in Abhängigkeit der Zeit. (n=3)

Über den gesamten Zeitverlauf betrachtet, nimmt der Anteil der akrosomreagierten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit zu (Abb. 13). Der Anstieg der Graphen ist unterschiedlich. Der Graph der Kontrollgruppe steigt am geringsten an. Am größten ist die Steigung des Graphen der Gruppe 48 Stunden. Dabei ist die Zunahme akrosomreagierter Spermatozoen davon abhängig, ob Zona pellucida Protein zu der

Zellsuspension gegeben wurde oder nicht. Die Akrosomreaktion läuft schneller ab, wenn das zugegebene Protein aus gereiften Eizellen gewonnen wurde.

Für die Zunahme akrosomreagierender Zellen der Kontrollgruppe konnte keine signifikante Beziehung zur Zeit ermittelt werden. Die Wahrscheinlichkeit lag nahe der Grenze zur Signifikanz ($p < 0,06$). Für den prozentualen Anteil akrosomreagierender Spermatozoen, die in Gegenwart von Zona pellucida-Glykoproteinen, inkubiert wurden, wurde ein signifikanter Einfluss der Zeit festgestellt. Der Einfluss konnte sowohl für die Gruppe GVI als auch für die Gruppe 48 Stunden nachgewiesen werden.

Zwischen dem prozentualen Anteil akrosomreagierender Spermatozoen und der Zeit besteht signifikant absicherbar eine Regression. Im Einzelnen hat sich der Anteil der Zellen wie eine exponentielle Funktion der Zeit ($f(t) = ae^{0,03t} + b$) dargestellt. Der Koeffizient a entspricht dem geschwindigkeitsbestimmenden Faktor ($f'(t) = 0,03ae^{0,03t}$). Für die Kontrolle wurde für a ein Wert von 0,73, für mit GVI-Protein koinkubierten Zellen 1,26 und für Protein von 48 Stunden gereiften Eizellen 2,10 ermittelt (Abb. 13).

Es wurden die einzelnen Gruppen (Kontrolle, GVI, 48 Stunden) im Rahmen der Varianzanalyse untereinander verglichen. Bei dem Vergleich aller Messwerte der Kontrollgruppe mit allen der Zellsuspensionen, die mit Proteinen ungereifter Eizellen versetzt wurden, konnte ein signifikanter Effekt von der Zeit ($p < 0,01$) abgesichert werden. Ein Effekt des Reifestatus konnte statistisch nicht abgesichert werden ($p < 0,14$). Zwischen der Zeit und dem Status bestand keine Wechselwirkung.

Vergleicht man alle individuellen Werte zu jedem Zeitpunkt der Kontrollgruppe mit denen der Gruppe 48 Stunden (Zweistufige Analyse für den Reifungsstatus) stellt man fest, dass der Faktor Zeit einen signifikanten Effekt auf die Werte hatte ($p < 0,01$). Weiterhin konnte nur eine Tendenz zur Signifikanz für den Status mit $p < 0,12$ und eine Wechselbeziehung von Status und Zeit ($p < 0,1$) erfasst werden.

Die deutlichste Zunahme akrosomreagierender Zellen fand nach 30 Minuten statt (Abb. 13).

D. Ergebnisse

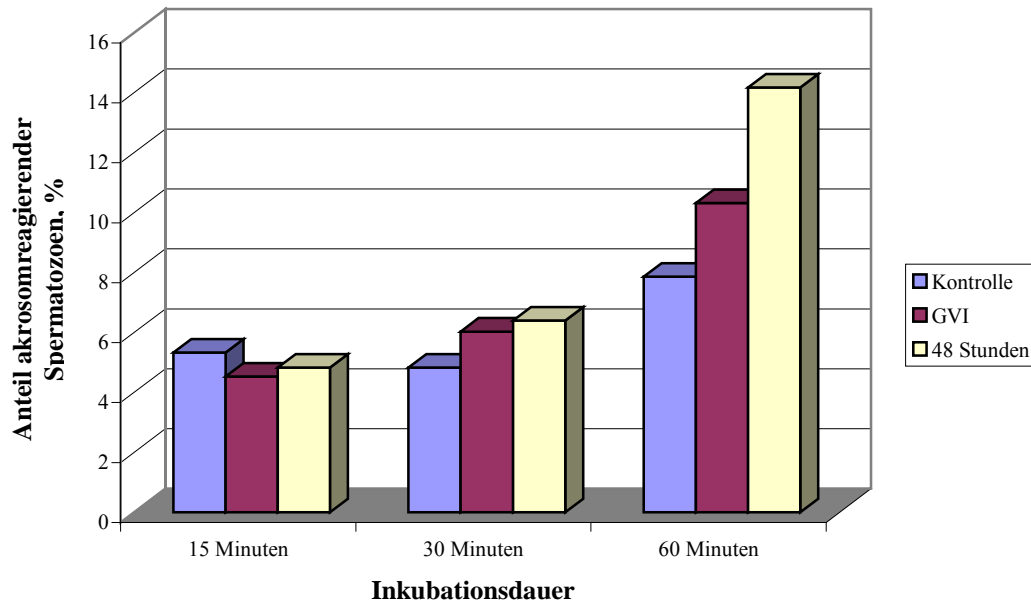


Abb. 14: Durchflusszytometrische Erfassung der Akrosomreaktion im zeitlichen Vergleich ausgewählter Zeitpunkte nach Zugabe von solubilisierter Zona pellucida unterschiedlich lang gereifter Eizellen. (n=3)

Beim Vergleich der Werte zwischen 30 und 60 Minuten, in dem Zeitfenster, in dem die größten Veränderungen stattgefunden haben, konnte festgestellt werden, dass unter dem Einfluss von Zona pellucida Protein die Zunahme größer als in der Kontrollgruppe war. Vergleicht man die Gruppen GVI und 48 Stunden miteinander, fällt auf, dass die Zunahme unter dem Einfluss von Protein gereifter Eizellen größer war als die Zunahme unter dem Einfluss unreifer Eizellen.

Mit Hilfe der multifaktoriellen Varianzanalyse der absoluten Messwerte wurden für die Akrosomreaktion die beiden Zeiträume zwischen „15 und 60 Minuten“ und „30 und 60 Minuten“ untersucht. Beide Analysen führten zu demselben Ergebnis. Das Protein der Zona pellucida von gereiften oder unreifen Oozyten hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Anstieg der Akrosomreaktion der Spermatozoen ($p > 0,05$), obwohl die Messwerte in 48 Stunden zum Zeitpunkt 60 Minuten deutlich höher ausfielen. Die Signifikanzgrenze konnte wegen der grossen Streuung der Messwerte bei nur drei Wiederholungen nicht erreicht werden.

Allerdings konnte bei dem Vergleich des prozentualen Anteils Akrosom- und Plasmamembran intakter Zellen in dem Zeitintervall 30 bis 60 Minuten eine wesentliche Reduzierung dieser Gruppe von Spermatozoen, die in Gegenwart von

Zona pellucida-Glykoproteinen inkubiert wurden, festgestellt werden (Abb. 15). Der Vergleich der Gruppe 48 Stunden zur Gruppe GVI und zur Kontrollgruppe ergab, dass ein Einfluss des Reifestadiums der Oozyte auf die Abnahme des prozentualen Anteils der intakten Spermatozoen bestand ($p < 0,05$). Es konnte beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe GVI der Einfluss der Zona pellucida Glykoproteine statistisch nicht abgesichert werden. Somit zeigte diese Untersuchung nur eine statistische Auffälligkeit für den Einfluss des Reifegrades auf die Geschwindigkeit der Abnahme ($p < 0,1$).

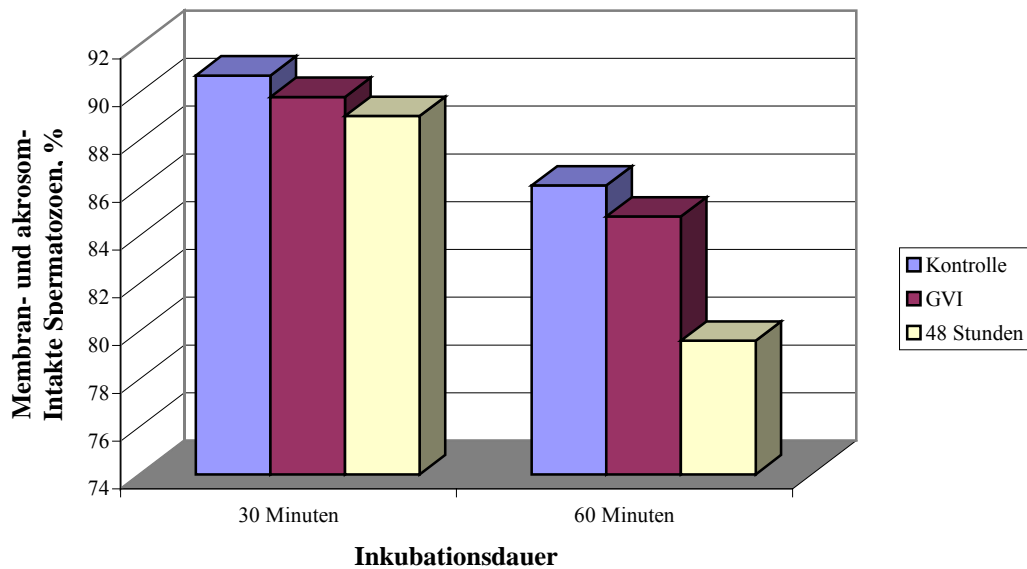


Abb. 15: Durchflusszytometrische Erfassung der prozentualen Abnahme membranintakter und akrosomintakter Spermatozoen (inklusive der Zellen mit vollständig abgelöstem Akrosom) nach der Inkubation in Gegenwart von Zona pellucida-Glykoproteinen zu den Messzeitpunkten 30 und 60 Minuten. (n=3)

3. Der Einfluss von intakter Zona pellucida unterschiedlich lang in vitro gereifter Oozyten auf Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss intakter nicht solubilisierter Zonae pellucidae auf eine Spermiumpopulation untersucht. Hierfür wurden kryokonservierte Ejakulate eines Ebers verwendet. Die Zonae pellucidae wurden mit den intakten Spermien für 10 Minuten koinkubiert, um eine Bindung in der Spermatozoen in ausreichender Zahl sicher zu stellen. Anschließend erfolgte die eigentliche Koinkubation über einen Zeitraum von 60 Minuten unter kapazitierenden Bedingungen. In drei Untersuchungsreihen wurden die an den Zonae pellucidae gebundenen Spermien auf den intrazellulären Kalziumionengehalt, den Grad der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen und die Akrosomreaktion untersucht.

3.1 Der Einfluss auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion

In diesen Untersuchungen wurde an der intakten Zona pellucida untersucht, inwiefern gebundene Spermien in Abhängigkeit von der Zeit die Akrosomreaktion durchführen. Es wurde der prozentuale Anteil der akrosomreagierten Spermien ermittelt.

Das nachfolgende Diagramm (Abb. 16) illustriert den Verlauf der Akrosomreaktion in Abhängigkeit von der Zeit unter dem Einfluss der Zona pellucida unreifer und 48 Stunden gereifter Eizellen. Zusätzlich wurde als Kontrolle die Akrosomreaktion kryokonservierter Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen getestet und aufgetragen. Es wurden die Prozesse in ihrem gesamten Zeitverlauf betrachtet. Es kann festgestellt werden, dass sowohl für die Gruppe GVI als auch für die Gruppe 48 Stunden statistisch absicherbar eine Regression zwischen der Akrosomreaktion und der Zeit besteht ($p < 0,05$).

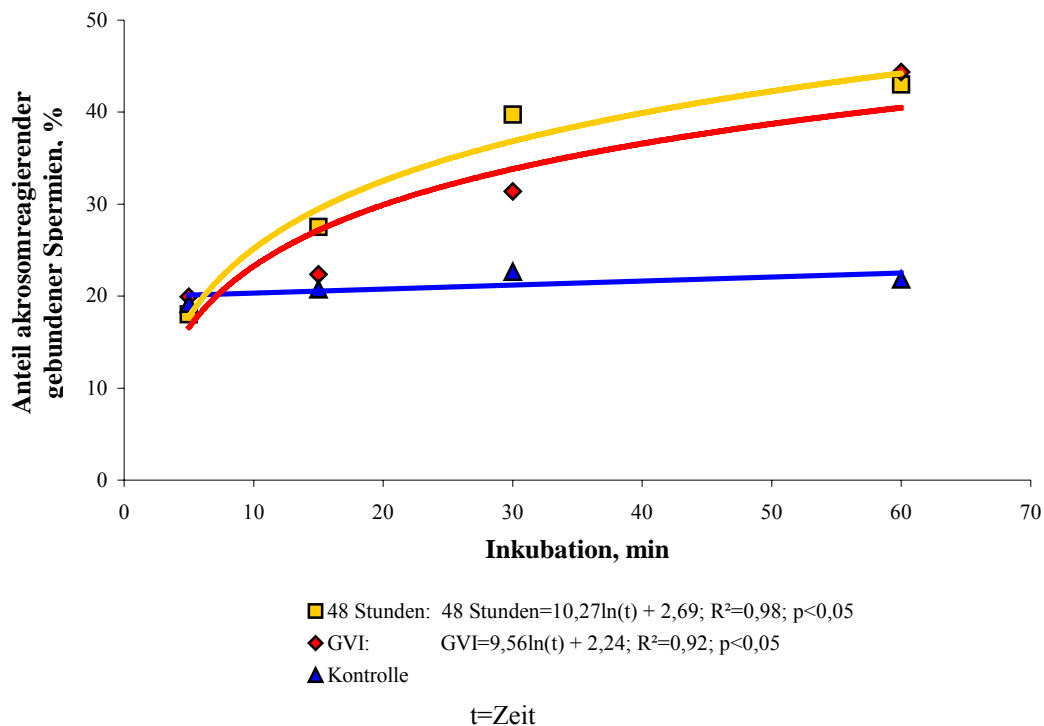


Abb. 16: Erfassung der Akrosomreaktion unter dem Einfluss intakter Zona pellucida von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades am konfokalen Fluoreszenzmikroskop in Abhängigkeit von der Zeit. (n=4)

Die gemessenen Werte der Akrosomreaktion lassen sich als logarithmische Funktion beschreiben. Die Kontrolle wurde lediglich zwecks einer Illustration angefügt und zeigt, dass ein Unterschied zwischen mit und ohne Zona pellucida kokubierten Spermatozoen besteht. Die Zunahme akrosomreagierender Spermatozoen erfolgt in den ersten 30 Minuten der Inkubation in der Gruppe 48 Stunden schneller als in der Gruppe GVI. Zum Zeitpunkt 60 Minuten erreichen beide Gruppen in etwa denselben Anteil akrosomreagierender Zellen.

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte ein hoch signifikanter Einfluss der Zeit auf den prozentualen Anteil akrosomreagierter Zellen zu jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden ($p < 0,0001$). Zwischen Zeit und Status bestand eine signifikante Wechselwirkung ($p < 0,05$). Die Wechselwirkung zeigt an, dass der Effekt Zeit nicht zu allen Zeitpunkten innerhalb des Zeitintervalles gleich groß ist. Ein Einfluss des Reifegrades der Eizelle konnte nicht für den gesamten Zeitraum beim Vergleich der beiden Gruppen statistisch absicherbar festgestellt werden.

D. Ergebnisse

Das Intervall zwischen 5 und 30 Minuten zeigte die größten Zunahmen akrosomreagierter Zellen in den beiden Gruppen. Da eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Reifegrad der Eizelle bestand, wurde der Einfluss des Reifungsstadiums in diesem Intervall näher untersucht.

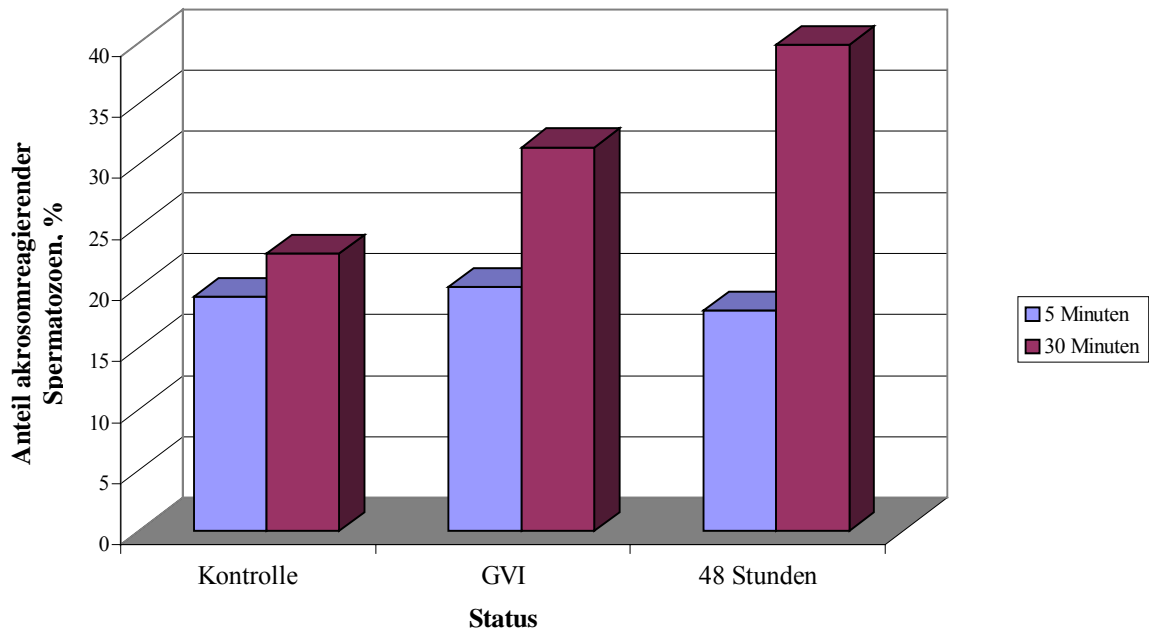


Abb. 17: Die Abbildung zeigt die Zunahme akrosomreagierender Spermien in Prozent zu den Zeitpunkten 5 und 30 Minuten nach Zugabe intakter Zona pellucida von Eizellen unterschiedlichen Reifegrades anhand der Untersuchungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. (n=4)

Wurde nur der einzelne Abschnitt zwischen 5 und 30 Minuten betrachtet, stellte man fest, dass die Faktoren Zeit und Reifungsstadium einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Akrosomreaktion ausgeübt hatten ($p=0,002$ und $p<0,05$). Zwischen diesen beiden Faktoren bestand außerdem eine signifikante Wechselbeziehung ($p=0,02$).

3.2 Der Einfluss von intakter Zona pellucida unterschiedlicher Reifungsstadien auf den intrazellulären Kalziumionengehalt

In der mikroskopischen Untersuchung wurden je Zona pellucida ein Bild im Hellfeld und eines fluoreszenzmikroskopisch angefertigt. Diese beiden wurden anschließend in Photoshop[®] in verschiedenen Ebenen übereinandergelegt. Es konnte in der Auswertung kein Unterschied zwischen den zu den einzelnen Zeitpunkten gemachten Bildern festgestellt werden. Es konnte auch kein Unterschied den Status betreffend festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 5 Minuten waren bereits alle gebundenen Zellen im Bereich des Mittelstücks durch grüne Fluoreszenz gekennzeichnet.

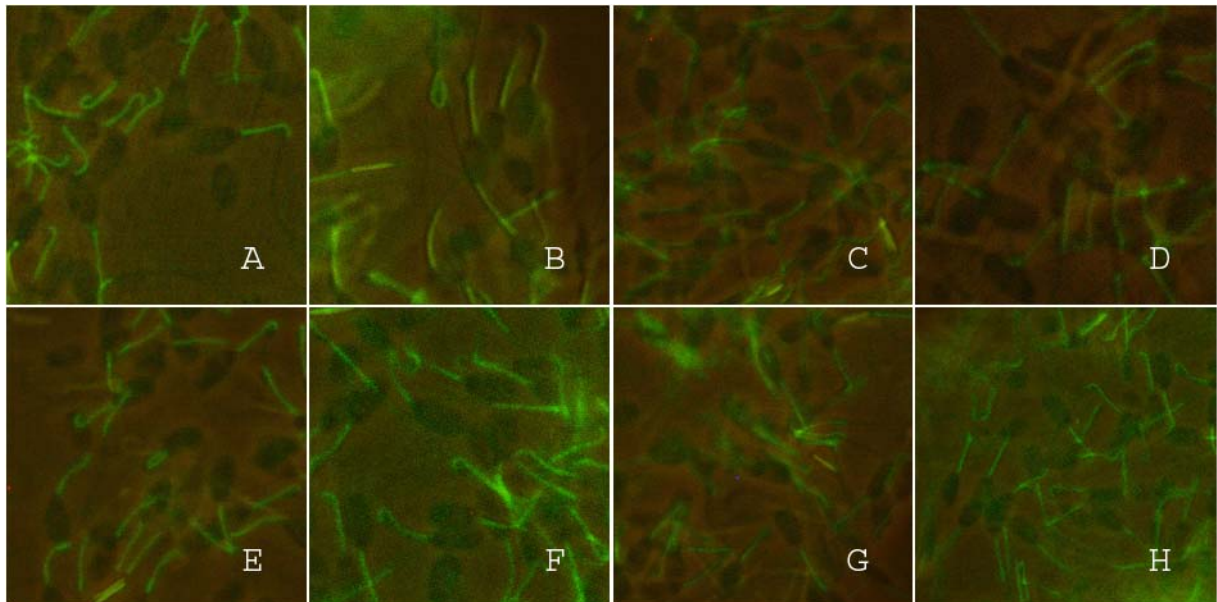


Abb. 18: Overlay von fluoreszenzmikroskopischer Bildern und Hellfeldbilder. An die intakte Zona pellucida unterschiedlichen Reifegrades gebundene Zellen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionengehalt im Bereich des Mittelstückes zu unterschiedlichen Zeitpunkten

A) an nicht gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 5 Minuten, B) an nicht gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 10 Minuten, C) an nicht gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 30 Minuten, D) an nicht gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 60 Minuten, E) an 48 Stunden gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 5 Minuten, F) an 48 Stunden gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 10 Minuten, G) an 48 Stunden gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 30 Minuten, H) an 48 Stunden gereifte Zona pellucida gebundene Spermatozoen zum Zeitpunkt 60 Minuten

3.3 Der Einfluss intakter Zona pellucida von Eizellen unterschiedlichen Reifungsstadiums auf die Tyrosinphosphorylierung

Die Tyrosinphosphorylierung konnte im Fluoreszenzmikroskop nicht erfasst werden, da die Spermienfärbung durch ein Farbrauschen im grünen Farbspektrum der Zona pellucida überlagert wurde.

E. Diskussion

1. Einleitung

Die Speicherung von Samenzellen in spezialisierten Regionen des weiblichen Genitale gehört zu den erfolgreichsten Fortpflanzungsstrategien im Tierreich. Während der Evolution der Vertebraten wurde eine Vielzahl verschiedener Organe zur Speicherung von Spermien entwickelt, die das Vorhandensein fertiler Spermien zum Zeitpunkt des Eisprunges garantieren sollen.

Nach der Ejakulation werden Millionen von Spermien in das weibliche Genitale abgesetzt. Die meisten Spermatozoen gehen auf dem Weg zum caudalen Isthmus des Eileiters für die Befruchtung verloren. Nur eine geringe Anzahl der Spermien wird im Ovidukt gespeichert. Dort verweilen sie gebunden an das Eileiterepithel unter Bedingungen, die die Viabilität verlängern und die Kapazitation bis kurz vor der Ovulation unterdrücken. Es wird beschrieben, dass Spermatozoen über unterschiedlich lange Zeiträume im weiblichen Genitale überdauern können, ohne einer nennenswerten Reifung zu unterliegen. (NEUBAUM und WOLFNER 1999). Im zeitlichen Bereich der Ovulation beginnen die Spermien zu kapazitieren und verlieren mit der Kapazitation ihre Bindungsfähigkeit an das Eileiterepithel (FAZELI et al. 1999). Die Spermatozoen erlangen durch die Kapazitation ihre Hyperaktivität und bewegen sich auf die ovulierte Eizelle zu. Am Übergang von Isthmus und Ampulla findet die Interaktion der Gameten statt. Die Bindung des kapazitierten Spermiums an die Zona pellucida der Eizelle induziert beim männlichen Gameten die Akrosomreaktion. Das akrosomreagierte Spermatozoon penetriert die Zona pellucida und verschmilzt mit der Eizelle. Die Fusion löst den Polyspermieblock aus, sodass kein weiteres Spermium die Zona pellucida durchdringen kann.

Zielsetzungen dieser Arbeit waren es,

1. den zeitlichen Ablauf der Kapazitationsprozesse *in vitro* anhand der Veränderungen des intrazellulären Kalziumionengehaltes und der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen zu bestimmen. Es soll gezeigt werden, in welchem Zusammenhang diese beiden Marker der Kapazitation zueinander stehen.

2. anhand der induzierten Akrosomreaktion zu zeigen, inwiefern das Entwicklungsstadium der Zona pellucida die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst.

2. Endogene Veränderungen des Spermatozoons während der Kapazitation

Das Phänomen „Kapazitation“ wurde erstmalig von AUSTIN und CHANG (1952) beschrieben. Unter Kapazitation versteht man die Summe aller physiologischen Prozesse, die im Spermium ablaufen, damit dieses zur Hyperaktivität und Akrosomreaktion befähigt ist. (YANAGIMACHI 1994). HARRISON (1996) definiert die Kapazitation als kontrollierten Destabilisierungsprozess der Spermienmembran, bei dem es dem Spermium nur innerhalb eines bestimmten Zeitfensters möglich ist, die Eizelle zu befruchten.

Eine Vielzahl von Faktoren kann als Auslöser für die Kapazitation herangezogen werden. Nach HUNTER (1995) gelangen Progesteron, HCO_3^- , und Ca^{2+} durch die ovariellen Venen zum Epithel des Eileiters und induzieren dort die Kapazitation der Spermatozoen. Der genaue physiologische Ablauf der Kapazitation im Spermium ist ungeklärt. Abgesichert ist, dass eine Veränderung der Konzentration an Kalziumionen im Zytosol an diesen Prozessen beteiligt ist. Die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen als Bestandteil der Kapazitation wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt (Hund: SIMON 2002, Ratte: LEWIS und AITKEN 2000; Maus: VISCONTI et al. 1995, Rind: GALANTINO-HOMER et al. 1997, Hamster: VISCONTI et al. 1999, Pferd: POMMER et al. 2002).

Für den genauen Ablauf der Prozesse während der Kapazitation existieren einige Hypothesen. Dabei wurden für verschiedene Spezies unterschiedliche Modelle entwickelt, um die Vorgänge erklären zu können. Am Beispiel des Menschen konnte gezeigt werden, dass während der Kapazitation zunächst eine Zunahme des intrazellulären Kalziumionengehaltes stattfindet. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Untersuchungen an Hundespermatozoen erzielt. Dem intrazellulären Kalziumionenanstieg folgt die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen (PETRUNKINA et al. 2003). Der Konzentrationsanstieg der Kalziumionen im Zytosol führt über einen kalziumabhängigen ATPase-Hemmer dazu, dass vermehrt Proteine tyrosinphosphoryliert werden (DORVAL et al. 2002). Die Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) steigt durch die Hemmung der ATPase im Zytosol an.

Adenylatzyklase wandelt ATP in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) um. Es erfolgt dadurch ein Anstieg der Konzentration von cAMP im Zytosol. FRASER et al. (2003) sehen die Tyrosinphosphorylierung ebenfalls als Folge eines Anstieges von cAMP im Zytosol. Durch FPP (fertilization promoting peptide), Adenosin und Calcitonin wird ein G-Protein abhängiger Prozess gesteuert, der zu einer vermehrten Bildung von cAMP führen soll. Bei Untersuchungen am Hamster wurde gezeigt, dass der Grad der Tyrosinphosphorylierung abhängig von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums ist. Der Grad der Tyrosinphosphorylierung nimmt signifikant ab, wenn im Medium weder Kalzium- und Bikarbonationen noch bovine Serumalbumine (BSA) enthalten war (KULANAND und SHIVAJI 2002). Nach TARDIF et al. (2003) hat BSA auf die Kapazitation porciner Spermatozoen im Gegensatz zu Kalzium- und Bicarbonationen keinen Einfluss. Dagegen beschrieben KOPF et al. (1999) als essentiellen Bestandteil des Mediums ein lipidbindendes Protein (wie zum Beispiel BSA), das als initiales die Kapazitation steuerndes Element fungiert. Die Tyrosinphosphorylierung wurde bei Hund und Schwein als kapazitationsrelevanter Vorgang nachgewiesen. (PETRUNKINA et al. 2003, SIMON 2002, TARDIF et al. 2001).

Beim Schwein konnte die Tyrosinphosphorylierung zweier an der Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida der Oozyten beteiligten Proteine in Verbindung mit der Kapazitation gebracht werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese während der Kapazitation phosphoryliert werden (FLESCH et al. 2001).

Es wurde versucht, die zuvor beschriebenen Vorgänge, die während der Kapazitation ablaufen in einen Zusammenhang zu bringen. Am Beispiel für Mensch und Maus wurde ein Kapazitationsmodell von BALDI et. al (1996) entwickelt (siehe Abb. 19). Die Zunahme der zytosolischen Kalziumionenkonzentration und die der Tyrosinphosphorylierung stehen in einem biologischen Zusammenhang mit der Kapazitation.

E. Diskussion

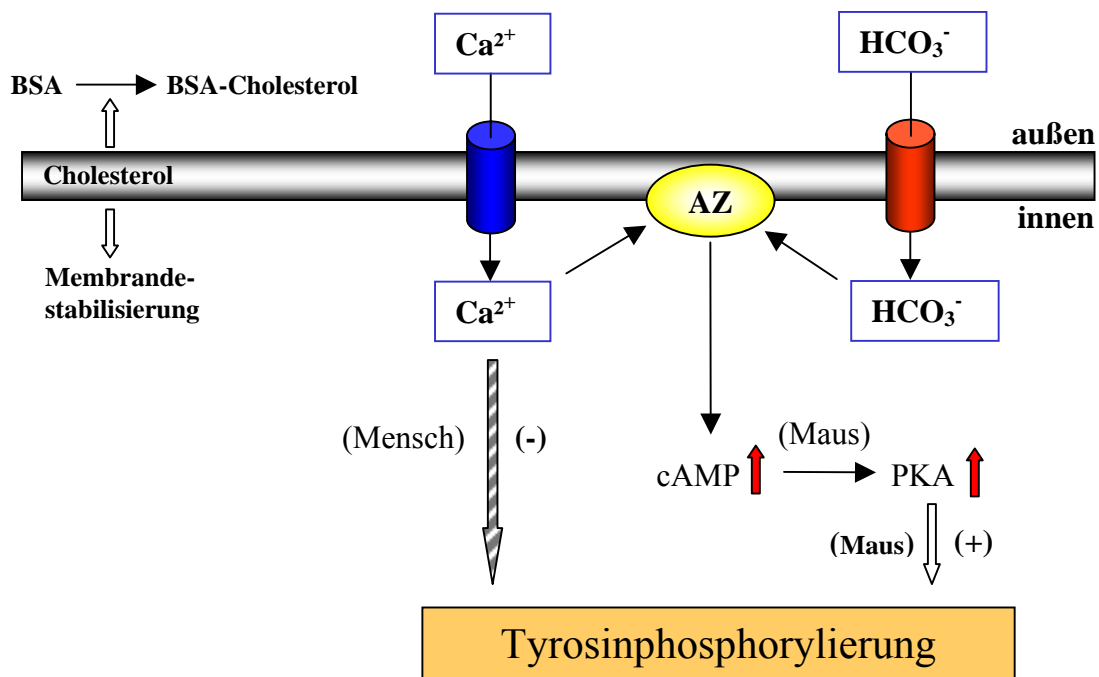


Abb. 19: Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf physiologischer Vorgänge während der Kapazitation. Das Modell verdeutlicht die Veränderungen von Mensch und Maus im Vergleich. Die Ionenströme von Kalzium und Hydrogenkarbonat spielen eine zentrale Rolle. Bovines Serumalbumin (BSA) bindet aus der Membran stammendes Cholesterol. Dadurch wird die Fluidität des Plasmalemmes heraufgesetzt und Ca^{2+} - und HCO_3^- -Ionen passieren vermehrt die Membran in Richtung des Zytosols. Diese Ionen stimulieren die membranständige Adenylatzyklase (AZ), die ihrerseits vermehrt cAMP produziert. Das cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA). PKA aktiviert die Tyrosinkinase und somit die Tyrosinphosphorylierung. Beim Menschen führt die Erhöhung des intrazellulären Kalziumionengehaltes zu einer Hemmung der Proteintyrosinphosphorylierung. Im Gegensatz dazu führt ein erhöhter intrazellulärer Kalziumionenspiegel zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung der Spermienproteine (mod. nach BALDI et al. 1996).

In dem Modell von BALDI beginnt die Kapazitation mit dem Efflux von Cholesterol aus der Spermienmembran (BALDI et al. 1996). Ionenkanäle für Ca^{2+} - und HCO_3^- -Ionen werden geöffnet, die Ionen strömen in die Zelle und aktivieren die Adenylatzyklase. Dieses membranständige Enzym bildet vermehrt cAMP, welches bei der Maus die Proteinkinase A und damit die Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Anhand von Untersuchungen mehrerer Parameter über einen Zeitraum (Abb. 20) wurde geprüft, ob das von BALDI et al. entwickelte Modell für die Maus auch für das

Schwein zutreffen kann. In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals der genaue Ablauf der Kinetiken des intrazellulären Kalziumionengehaltes, der Tyrosinphosphorylierung und der Akrosomreaktion während der Kapazitation am porcinen Spermatozoon und deren zeitliche Abfolge durchflusszytometrisch untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Analyse ist es möglich, zeitgleich verschiedene Parameter einer Spermienpopulation unter kapazitierenden Bedingungen zu erfassen. Die unterschiedlichen Prozesse wurden parallel zueinander untersucht.

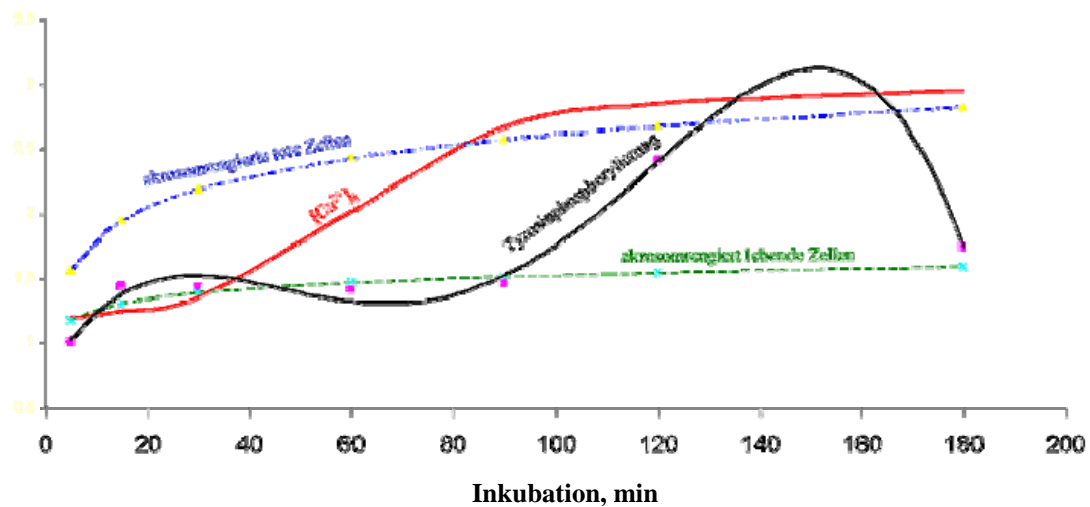


Abb. 20: Relative Veränderungen der Akrosomreaktion lebender (grün) und toter (blau), Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Kalziumionengehalt (rot) und Zellen mit erhöhtem Gehalt tyrosinphosphorylierter Proteine (schwarz) in Abhängigkeit von der Zeit.

Initial entsteht eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumionengehaltes, während die Tyrosinphosphorylierung der Proteine erst später einsetzt. Beide Prozesse finden in unterschiedlichen Zeitfenstern statt und müssen als aufeinanderfolgend ablaufende Vorgänge betrachtet werden. Die gemessenen Parameter müssen in ihrer Gesamtheit als Bestandteil der Kapazitation verstanden werden, da die spontane Akrosomreaktion über den gesamten Messzeitraum einen nahezu konstant niedrigen Level hatte.

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Anstieg des intrazellulären Kalziumionengehaltes und dem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung. Wie im Modell in Abbildung 19 für die Maus beschrieben, gelangt auch beim Schwein zunächst Kalzium in die Zelle, um dort eine Kaskade verschiedener zellulärer Vorgänge zu induzieren, die zur Tyrosinphosphorylierung führen. Die in den Untersuchungen

E. Diskussion

erfassten Veränderungen und deren zeitliche Abfolge sprechen für eine Übertragbarkeit einiger Stufen dieser Prozesse auf das Schwein.

Da der Ablauf der Kapazitationsvorgänge anhand der Marker geklärt werden konnte, sollte im folgenden die Induktion der Akrosomreaktion des Spermiums durch die Zona pellucida der Eizelle untersucht werden.

3. Die Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion führt zur Destabilisierung der Spermatozoen. Während die spontane Akrosomreaktion ohne äußere Einflüsse zustande kommt, ist hiervon die durch die Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion als physiologisch relevanter Prozess abzugrenzen.

Der Akrosomreaktion geht eine kohlenhydratvermittelte Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida voraus. Es ist nicht klar, ob die kohlenhydratvermittelte Bindung der Zona pellucida an Rezeptorstrukturen der Spermienmembran oder eine Protein-Protein-Interaktion zum Auslösen der Akrosomreaktion führt. HINSCH (1998) konnte zeigen, dass ein analog zur ZPC Sequenz der Zona pellucida hergestelltes Peptid die Akrosomreaktion einer bovinen Spermienzellpopulation induziert.

Die Vorgänge am Spermium wurden in vielen Arbeiten untersucht und sind heute bereits weitgehend bekannt (LEYTON et al. 1992, YANAGAMACHI 1994, FRASER et al. 1995, LEYTON et al. 1995, FLORMAN et al. 1999, O'TOOLE et al. 2000). Diese Arbeiten liefern die Basis, um den Effekt der Zona pellucida selbst auf das Auslösen der Akrosomreaktion zu untersuchen. Die Akrosomreaktion eignet sich deswegen als Marker, um den Einfluss unterschiedlicher Reifungszustände der Zona pellucida auf das Spermium zu untersuchen. In diesem Abschnitt soll daher der Effekt der Zona pellucida auf mögliche Veränderungen des Spermatozoons betrachtet werden.

Es ist bekannt, dass durch die Bindung der Zona pellucida an das Spermium ein Anstieg der zytosolischen Kalziumionenkonzentration induziert wird (O'TOOLE 2000). FLORMAN sieht diesen Anstieg als Teil der Akrosomreaktion (siehe Abb. 3). Die Bindung der Zona pellucida an Spermienrezeptoren bewirkt einerseits einen Einstrom von Kalziumionen in einer frühen Phase. Andererseits wird durch die

Bindung eine Alkalisierung des pH-Wertes ausgelöst. In einer mittleren Phase führen diese beiden Vorgänge zu einer Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Es wird ein hoher Level der intrazellulären Kalziumionenkonzentration erreicht, der dann zur Akrosomreaktion führt.

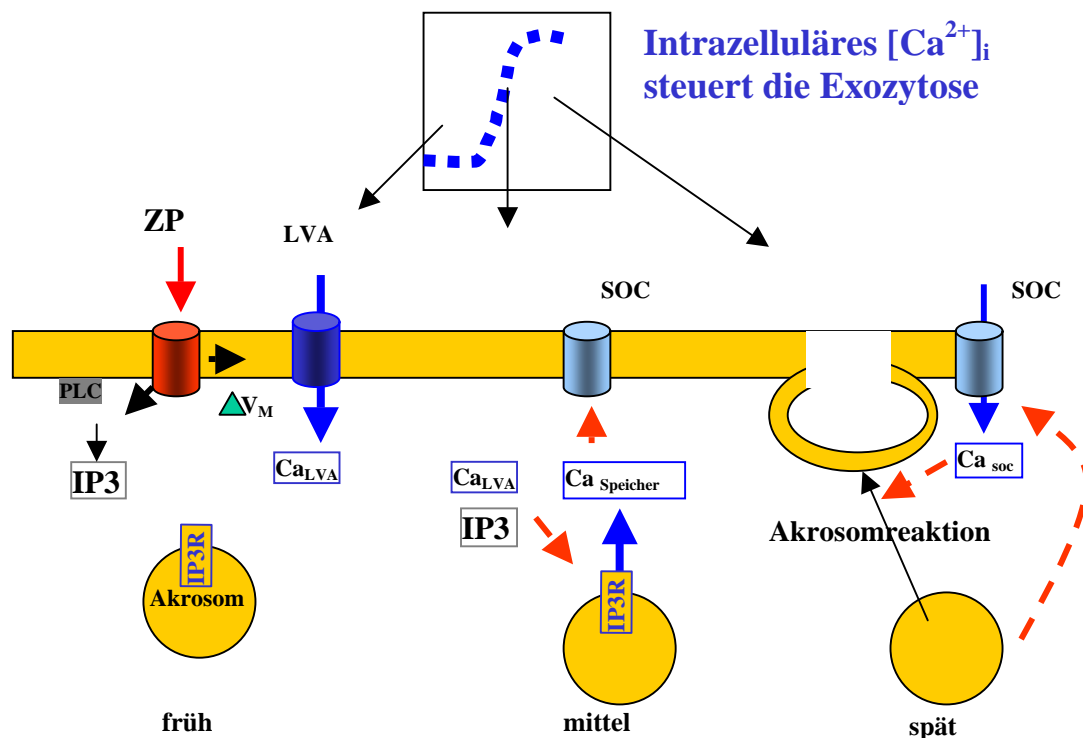


Abb. 21: Vereinfachte schematische Darstellung der Zona pellucida induzierten Veränderungen des zytosolischen Kalziumionenspiegels. Die Bindung der Zona pellucida an die Spermienrezeptoren bewirkt in der frühen Phase (früh) 1.) eine Depolarisation der Membran (ΔV_M), die zur Aktivierung von Kalziumionenkanälen (LVA) führt. Es findet ein Kalziumioneninflux (Ca_{LVA}) statt und 2.) die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Dadurch wird IP3 gebildet, welches in der mittleren (mittel) Phase IP3 Rezeptoren (IP3R) der akrosomalen Membran aktiviert und so zu einer Freisetzung von Kalzium aus Speichern (Ca_s) in das Zytosol führt. In der späten (spät) Phase führt das Leeren der intrazellulären Kalziumspeicher zu einem Öffnen weiterer Kalziumionenkanäle (SOC), durch die weitere Kalziumionen in das Zytosol gelangen. Der hohe zytosolische Kalziumionenspiegel führt dann zur Akrosomreaktion (mod. nach O'TOOLE, 2000).

In einem weiteren Modell zeigten FLORMAN et al. 1999, dass die Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion zur Tyrosinphosphorylierung von Proteinen führt.

E. Diskussion

LEYTON et al. (1992) zeigten an der Maus, dass Proteine phosphoryliert werden. In weiteren Untersuchungen konnten sie zeigen, dass die Bindung der Spermien an die Zona pellucida zur Tyrosinphosphorylierung von Proteinen führt (LEYTON et al. 1995). Die Annahme, dass beim Schwein Zona pellucida Proteine einen Einfluss auf den intrazellulären Kalziumionengehalt, den Grad der Tyrosinphosphorylierung und die Akrosomreaktion haben, konnte durch die eigenen Untersuchungen am Durchflusszytometer gestützt werden. Die Prozesse eignen sich deswegen als Marker für den Einfluss der Reifungszustände der Zona pellucida auf das Spermium. Die Gegenwart von ZP-Glykoproteinen bewirkte eine Beschleunigung der Prozessabläufe in den Spermien. Im Einzelnen ist zu prüfen, ob die Zona pellucida in Abhängigkeit vom Reifegrad der Eizelle die Geschwindigkeit der Akrosomreaktion beschleunigt.

4. Zusammenhang zwischen der Reifung der Zona pellucida und deren Funktionalität

Die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion ist ein signifikanter und gut darstellbarer Parameter, um die Interaktion von Zona pellucida und Spermium zu charakterisieren. Die durchflusszytometrische Analyse der Spermienzellsuspensionen ergab, dass die Geschwindigkeit des Anstieges des intrazellulären Kalziumionengehaltes, der Tyrosinphosphorylierung und der Akrosomreaktion am größten war, wenn man die Spermatozoen mit Zona pellucida-Glykoproteinen der Oozyten im MII-Stadium koinkubierte. Am niedrigsten war die Geschwindigkeit der Prozessabläufe in der Kontrollgruppe, die ohne Zona pellucida-Glykoproteine inkubiert wurde. Das Reifestadium der Eizelle übt einen Einfluss auf die untersuchten Parameter aus. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Reifungsstadium ein wichtiger, die Geschwindigkeit bestimmender Faktor für die Prozessabläufe darstellt.

Die Untersuchungen der Effekte intakter Zona pellucida auf die Prozessabläufe der Akrosomreaktion bestätigte die Ergebnisse der Untersuchungen mit Zona pellucida-Glykoproteinen. Alle an die intakte Zona pellucida gebundenen Zellen zeigten einen erhöhten intrazellulären Kalziumionengehalt, mit deutlicher Fluoreszenz im Bereich des Mittelstückes. Die Akrosomreaktion wird durch Zona pellucida von MII-Stadien stammenden Eizellen deutlich schneller induziert als durch die Zona pellucida der GVI-Stadien.

Der Vergleich beider Untersuchungen zeigte, dass die intakte Zona pellucida gegenüber Zona pellucida-Glykoproteinen die Akrosomreaktion schneller und in einem größeren Teil der Spermienpopulation induziert. Schon GVI-Stadien der intakten Zona pellucida lösen die Akrosomreaktion schneller aus als die Glykoproteine der MII-Stadien. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass sich durch strukturelle Veränderungen der Zona pellucida während der Maturation die funktionellen Eigenschaften ändern.

Die aus drei hoch glykosilierten Glykoproteinen (ZPA / ZPB / ZPC) bestehende Zona pellucida wird tierartlich verschieden zu unterschiedlichen Anteilen von der Oozyte und den Granulosazellen synthetisiert. Eine Ausnahme stellt die Maus (WASSARMAN und KINLOCH 1992, EPIFANO et al. 1995) dar. Hier ist die Zona pellucida das alleinige Produkt der Eizelle. Während der *in vitro* Maturation nimmt der Durchmesser der Zona pellucida mikroskopisch sichtbar deutlich zu. Im elektronenmikroskopischen Bild lässt sich die Oberflächenbeschaffenheit der Zona pellucida von MII-Eizellstadien nicht von denen der GVI-Stadien unterscheiden, da alle *Zonae pellucidae* ein sehr heterogenes Erscheinungsbild zeigen.

In der letzten Phase der Eizellreifung finden biochemische Veränderungen an der Zona pellucida statt (RATH et al. 2005). In der 2D Gelelektrophorese verschieben sich die isoelektrischen Punkte der Proteine ZPA, ZPB und ZPC in Richtung der Anode. Als Ursache für diese Beobachtungen wird die Sulfatierung der Oligosaccharide angenommen. Die Sulfatierung der Oligosaccharide konnte bereits bei den Glykoproteinen der porcinen Zona pellucida nachgewiesen werden (MORI et al. 1998, PARILLO et al. 2000). JONES (1991) konnte zeigen, dass Oligosaccharide mit Sulfatresten Proacrosin binden und mit als sekundäre Rezeptoren innerhalb der Spermatozoon-Oozyten-Bindung agieren.

Um eine Hypothese über die Art der funktionellen Veränderungen der Zona pellucida während der *in vitro* Reifung erstellen zu können, muss die Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida näher betrachtet werden.

E. Diskussion

Bei der Maus wurde ZPC als primärer Spermienrezeptor identifiziert (BLEIL und WASSARMAN 1980) und O-Glykane wurden als spermienbindende Struktur beschrieben (BLEIL und WASSARMAN 1988). Später wurden Zucker der O-Glykane der ZPC in Bezug auf ihre Interaktion mit murinen Spermien untersucht. Durch neuere Studien wurde bekannt, dass verschiedene Monosaccharidreste (Galaktose, N-Acetylglukosamin, Fucose und Mannose) an der Spermienbindung beteiligt sind (NIXON et al. 2001). Welche Rezeptoren der Zona pellucida an der Bindung mit porcinen Spermatozoen beteiligt sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Erste Untersuchungen beschrieben die O-Glykane von ZPB als Rezeptoren (YUREWICZ et al. 1992). Später konnte gezeigt werden, dass N-Glykane des ZPB/ZPC Komplexes eine Bindungsfähigkeit für Spermien besitzen (NAKANO und YONEZAWA 2001). Die Bindung zwischen den Liganden der Zona pellucida und den Rezeptorstrukturen des Spermiums wird nicht nur über eine Zuckerstruktur vermittelt sondern über viele. Die räumliche Anordnung der einzelnen Moleküle zueinander und deren Präsentation bestimmten die Affinität der Bindung und damit die Funktionalität (DUNBAR et al. 1994).

Werden die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen unter Berücksichtigung der Ergebnisse der angeführten Arbeiten betrachtet, kann man daraus schließen, dass sich die Liganden der Zona pellucida während der Reifung verändern und mit zunehmendem Reifegrad der Eizelle zu einer höheren Affinität zu den Rezeptorstrukturen des Spermatozoons führen und deswegen mit zunehmendem Reifegrad die untersuchten Prozesse deutlich schneller induzieren. Desweiteren hat das Solubilisieren einen Effekt auf die Induzierbarkeit der Prozesse am Spermium. Der Vorgang des Solubilisierens zerstört die dreidimensionale Anordnung der Rezeptorstrukturen der Zona pellucida. Die partielle Zerstörung führt zu einer herabgesetzten Affinität zu den Rezeptoren der Spermien. Die Akrosomreaktion läuft unter dem Einfluss in Lösung gebrachter Zona pellucida deutlich langsamer ab als unter dem Einfluss intakter Zona pellucida.

Eine andere Ursache für die reduzierte Reaktionsgeschwindigkeit könnte darin bestehen, dass nur gebundene Spermien im Messsystem erfasst werden. Das heißt, es werden nur kapazitierte Spermien untersucht, bei denen bindungsinduzierte Stoffwechselfvorgänge stattfinden.

Die Tatsache, dass die Proteine der Zona pellucida von Eizellen verschiedenen Reifegrades stammten und einen unterschiedlichen Effekt auf die

Spermienzellsuspension bewirkten, lässt die Vermutung zu, dass die Veränderungen der Struktur während der Eizellreifung zu einer Erhöhung der Funktionalität führen. Vermutlich führen reifungsbedingte Konformationsänderungen der Ligandenstrukturen der Zona pellucida zu einer erhöhten Affinität der Spermienrezeptoren.

5. Abschlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass beim Schwein die Vorgänge während der Kapazitation des Spermiums (die Erhöhung des intrazellulären Kalziumionengehaltes und die Tyrosinphosphorylierung) in unterschiedlichen Zeitfenstern ablaufen und in Abhängigkeit voneinander zu sehen sind. Dieses Ergebnis wird durch die Arbeit von BALDI et al. (1996) am Modell für die Kapazitation bei der Maus untermauert. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Zona pellucida der Eizelle des Schweines die Akrosomreaktion der Schweinespermatozoen induziert. Sowohl die Erhöhung des intrazellulären Kalziumionengehaltes als auch die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung liefen beschleunigt ab.

Die Geschwindigkeit der induzierten Akrosomreaktion ist unter dem Einfluss von solubilisiertem Zona pellucida Protein gereifter Eizellen (MII) deutlich höher als unter dem von Zona pellucida Protein nicht gereifter Eizellen (GVI). Die intakte Zona pellucida nicht gereifter Oozyten führt zu einer erhöhten Geschwindigkeit der Reaktionsabläufe. Eine weitere Beschleunigung ist durch Einsatz intakter Zona pellucida gereifter Eizellen zu beobachten.

Die Ergebnisse lassen sich nur dahingehend interpretieren: Die Zona pellucida unterliegt Reifungsprozessen, durch die sie ihre Funktionalität im Hinblick auf die Interaktion mit Spermatozoen erlangt. Es ist nicht auszuschliessen, dass andere Vorgänge (Penetrierbarkeit, Polyspermieblock, Schutz der befruchteten Eizelle bis zur Implantation), an denen die Zona pellucida beteiligt ist, nicht auch der Zona-Reifung unterliegen.

Eine offene Frage ist in diesem Zusammenhang, ob die Zona pellucida in vivo gereifter Eizellen einen deutlicheren Einfluss auf die Geschwindigkeit der Prozesse hat als die Zona pellucida in vitro gereifter Oozyten.

In der Literatur findet man gegensätzliche Aussagen bezüglich der Morphologie der Zona pellucida gereifter Eizellen. Es wird einerseits eine Korrelation zwischen

E. Diskussion

Oberflächenbeschaffenheit und dem Status der Reifung gesehen (CALAFELL et al. 1992), andererseits wird die Oberfläche der Zona pellucida gereifter Eizellen als netzartig, porenreich beschrieben, während die Oberfläche degenerierter oder unreifer Oozyten glatt und porenlos sein soll.

RATH et al. (2005) zeigten, dass es strukturelle Unterschiede zwischen in vivo und in vitro gereiften Eizellen gibt. In vivo gereifte Oozyten sind in ihrer Morphologie ähnlich. Die Zona pellucida besitzt eine netzartige, glatte, ungefaltete Oberfläche ohne Poren. Dagegen zeigte die Zona pellucida in vitro gereifter Eizellen ein sehr uneinheitliches Bild.

FUNAHASHI et al. (2000) haben gezeigt, dass beim Schwein ein Größenunterschied der Zonae pellucidae zwischen in vitro und in vivo gereiften Oozyten besteht. Sie stellten ebenfalls dar, dass die Oberfläche der Zona pellucida in vitro gereifter Oozyten viel glatter und kompakter ist als die in vivo gereifter Eizellen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die in vitro Reifung von Eizellen einen deutlichen Einfluss auf die Funktionalität der Zona pellucida nimmt. Es wurde gezeigt, dass die Effekte der Zona pellucida in solubilisierter Form nicht so deutlich ausgeprägt waren wie die intakter Zona pellucida. Die von RATH et al. (2005) und FUNAHASHI et al. (2000) erzielten Resultate und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Anlass, die Interaktion von in vivo gereiften Eizellen mit Spermatozoen näher zu untersuchen. Im Hinblick auf die in vitro Fertilisation, in der heute noch die Polyspermie ein großes Problem darstellt, müssen weitere Untersuchungen folgen, die die Ursache für dieses Phänomen klären. Ein Anhaltspunkt ist die Tatsache, dass sich die in vitro Reifung von Oozyten noch von der in vivo stattfindenden Reifung unterscheidet.

F. Zusammenfassung

Erik Pehler

Kinetische Untersuchungen zur in vitro Kapazitation und Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion am Eberspermatozoon

Das Ziel dieser Arbeit war, Prozessabläufe während der Kapazitation der Spermatozoen näher zu charakterisieren und in einen zeitlichen Zusammenhang zu bringen. Desweiteren sollte geprüft werden, ob Veränderungen der Zona pellucida während der in vitro Eizellreifung sich auf die Fähigkeit, die Akrosomreaktion zu induzieren, auswirken.

Um die Kapazitation näher zu untersuchen, wurden 24 Stunden gelagerte Spermien unter kapazitierenden Bedingungen inkubiert und über einen Messzeitraum von 180 Minuten beobachtet. Am Durchflusszytometer wurden der intrazelluläre Kalziumionengehalt, die Tyrosinphosphorylierung und die spontane Akrosomreaktion parallel untersucht.

Um den Einfluss der Zona pellucida auf die Akrosomreaktion des Spermatozoons näher zu untersuchen, wurden zunächst Zonae pellucidae gewonnen. Als Untersuchungsmaterial standen Ovarien frisch geschlachteter Jungsauen zur Verfügung. Nach der Gewinnung der Oozyten wurde entweder die Zona pellucida direkt isoliert oder die Oozyten wurden zunächst einer in vitro Maturation unterzogen. Die Untersuchungen gliederten sich in zwei Versuchsabschnitte:

Erstens wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers der Effekt von Zona pellucida-Glykoproteinen auf porcine Spermatozoen unter kapazitierenden Bedingungen untersucht. Als Marker wurden der intrazelluläre Kalziumionengehalt, die Tyrosinphosphorylierung und die Akrosomreaktion verwendet.

Zweitens wurden die Effekte intakter Zonae pellucidae unterschiedlicher Eizellreifestadien auf kryokonservierte Spermatozoen anhand der Akrosomreaktion und des intrazellulären Kalziumionengehaltes untersucht. Als bildgebendes Mittel wurde zum Nachweis der Akrosomreaktion ein konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet.

F. Zusammenfassung

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass die Sequenz der Prozesse während der Kapazitation beim Schwein spezifisch ist. Die Prozesse laufen nacheinander in unterschiedlichen Zeitfenstern ab. Zuerst findet die Erhöhung des intrazellulären Kalziumionengehaltes und danach folgt die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen.
2. Die Zona pellucida hat abhängig von ihrem Reifungsgrad einen unterschiedlich deutlichen Effekt auf die untersuchten Vorgänge am Spermatozoon. Zonae pellucidae gereifter Oozyten bewirkten eine Beschleunigung der untersuchten Prozessabläufe.
3. Im getesteten System übten intakte Zonae pellucidae einen deutlich ausgeprägteren Effekt auf die untersuchten Prozesse der kryokonservierten Spermatozoen als Zona pellucida-Glykoproteine auf flüssigkonservierte Spermatozoen aus.

Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Zona pellucida reifungsbedingten Umbauprozessen unterliegt, die die Funktionalität der Zona pellucida steigern. Da die intakte Zona pellucida einen größeren Effekt auf die Prozesse als Zona pellucida-Glykoproteine hat, muss davon ausgegangen werden, dass die dreidimensionale Anordnung und Präsentation der Ligandenstrukturen der Zona pellucida ebenso wichtig sind wie die Umbauprozesse während der *in vitro* Maturation.

Inwiefern die *in vivo* Maturation der Eizelle die Funktionalität der Zona pellucida beeinflusst und in welchem Maße, sollten weitere Untersuchungen mit Zona pellucida oder Zona pellucida-Glykoproteinen *in vivo* gereifter Eizellen klären.

G. Summary**Erik Piehler****Kinetics during in vitro capacitation and zona pellucida induced acrosome reaction of boar spermatozoa**

The aim of this study was to characterize quantitatively the main physiological processes related to the capacitation of boar spermatozoa and order them sequentially. Furthermore, it should be tested whether the modification of zona pellucida during in vitro maturation of oocytes affects the capability of zona pellucida to induce acrosome reaction.

In order to perform the kinetic characterization of the capacitation process, the functional changes in diluted and 24-h stored spermatozoa have been observed for 180 minutes during incubation under capacitating conditions. The dynamic changes in the cytosolic calcium ion content, in the overall phosphorylation of the tyrosine residues of sperm proteins and in the spontaneous acrosome reaction were examined in live sperm suspensions by means of flow cytometry.

For investigation of effect of maturation state of oocytes on the induced acrosome reaction, zonae pellucidae were collected from ovaries of gilts slaughtered at the local abattoir. Then zona pellucida was either isolated directly from the collected oocytes (GV) or after in vitro maturation of oocytes (48 h). The experiments were organized in two sections:

First, the effect of zona pellucida glycoproteins on porcine spermatozoa under capacitating conditions was examined using a flow cytometer. As marker were used the cytosolic concentration of calcium ions, the phosphorylation of tyrosine residues of sperm proteins and the induced acrosome reaction. Subsequently, the effects of intact zona pellucida from oocytes at different state of maturation were examined on the time course of acrosome reaction and on the changes in the cytosolic calcium ion content in frozen-thawed spermatozoa. The investigation of acrosome reaction process on the intact zona pellucida was performed by means of confocal laser scanning microscope.

G. Summary

Following results were obtained:

1. The dynamic flow cytometric analysis supports the notion that the sequence of processes related to the *in vitro* capacitation of boar spermatozoa is specifically ordered. The markedly increase in cytosolic calcium ion content is followed by the massive overall rise in protein phosphorylation of tyrosine residues in live sperm suspensions. These both events precede the initiation of spontaneous acrosome reaction and appear therefore to be related to the capacitation process.
2. The effect of zona pellucida on the processes occurring during capacitation in sperm populations depends on the maturation state of the oocytes. Zonae pellucidae collected from *in vitro* matured oocytes induced an acceleration of the examined processes.
3. Within used experimental system, intact zonae pellucidae had a stronger effect on the examined processes in cryopreserved spermatozoa than solubilized zona pellucida glycoproteins in liquid-preserved spermatozoa.

These results let suggest that the biochemical and structural modifications of the zona pellucida occurring during *in vitro* maturation correlate with the functional properties of the zona pellucida. Due to the apparent amplified effects of the intact zona pellucida on the capacitation-related processes in comparison with the effects of zona pellucida glycoproteins it appears that the three-dimensional structure of the ligands of the zona pellucida is another key factor besides the maturation-conditioned modification.

The role of *in vivo* maturation of the oocyte on the functionality of zona pellucida has to be clarified in further studies on zona pellucida and on zona pellucida-glycoproteins.

H. Literaturverzeichnis

ABDULLAH, M., E.E. WIDREN u. M.G. O'RAND (1991):

A mammalian sperm lectin related to rat hepatocyte lectin-2/3. Purification from rabbit testis and identification as a zona binding protein.

Mol. Cell Biochem. 103, 155-161

ASHWORTH, P.J.C., R.A.P. HARRISON, N.G.A. MILLER, J.M. PLUMMER u. P.F. WATSON (1995):

Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations.

Mol. Reprod. Dev. 40, 164-176

AUSTIN, C.R., u. M. C. CHANG (1952):

The capacitation of the mammalian sperm.

Nature 107, 326-329

BALDI, E., M. LUCONI, L. BONACCORSI, C. KRAUSZ u. G. FORTI (1996):

Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways.

Frontiers in Bioscience 1, 189-205

BLEIL, J., u. P.M. WASSARMAN (1980a):

Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1029-1033

BLEIL, J., u. P.M. WASSARMAN (1980b):

Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm.

Cell 20, 873-882

H. Literaturverzeichnis

BLEIL, J.D., u. P.M. WASSARMAN (1988):

Galactose on the non-reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6778-6782

BEDFORD, J. M. (1970):

Sperm capacitation and fertilization in mammals.

Biol. Reprod. 2 (Suppl.), 128-158

BUCCIONE, R., A.C. SCHROEDER u. J.J. EPPIG (1990):

Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis.

Biol. Reprod. 43, 543-547

CALAFELL, J.M., C. NOGUES, M. PONSÀ, J. SANTALO u. J. EGOCUE (1992) :

Zona pellucida surface of immature and in vitro matured mouse oocytes: analysis by scanning electron microscopy.

J. Assist. Reprod. Genet. 9(4), 365-372

CALVETE, J.J., E. CARRERA, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1996):

Boar Spermadhesins AQN-1 and AQN-3: Oligosaccharide and Zona pellucida Binding Characteristics.

Biol. Chem. 377, 521-527

CHERR, G.N., A.I. YUDIN u. J.W. OVERSTREET (2001):

The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling.

Matrix Biol. 20(8), 515-525

CROSS, N. L., u. S. MEIZEL (1989):

Minireview: methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm.

Biol. Reprod. 41, 635-641

DORVAL, V., M. DUFOUR u. P. LECLERC (2002):

Regulation of the phosphotyrosine content of human Sperm Proteins by intracellular Ca^{2+} : role of Ca^{2+} -adenosine triphosphatases.

Biol. Reprod. 67, 1538-1545

DOSTALOVA, Z., J.J. CALVETE, L. SANZ u. E. TÖPFER_PETERSEN (1995):

Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide - and zona pellucida characteristics.

Eur. J. Biochem. 230, 329-336

DUCIBELLA, T. (1996):

The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes.

Hum. Reprod. Update 2, 29-42

DUNBAR, B.S., S. AVERY, V. LEE, S.V. PRASAD, D. SCHWAHN, E.

SCHWOEBEL (1994):

The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression.

Reprod. Fertil. Dev. 6, 59-76

EBELING, S. (2002):

Charakterisierung der porcinen Zona pellucida und ihrer Veränderungen während der In-vitro-Maturation.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

EPIFANO, O., L. LIANG, M. FAMILARI, M.C. MOORS u. J. DEAN (1995):

Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis.

Development 121, 1947-1956

EPPIG, J.J. (1996):

Coordinations of nuclear and cytoplasmatic oocyte maturation in eutherian mammals.

Reprod. Fertil. Dev. 8, 485-489

H. Literaturverzeichnis

EKHLASI-HUNDRIESER, M., F. SINOWATZ, I. GREISER DE WILKE, D. WABERSKI u. E. TÖPFER-PETERSEN (2002):
Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts.
Mol. Reprod. Dev. 61, 32-41

EKHLASI-HUNDRIESER, M., K. GOHR, A. WAGNER, M. TSOLOVA, A. PETRUNKINA u. E. TÖPFER-PETERSEN (2005):
Spermadhesin AQN-1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig.
Biol. Reprod. in press

FAZELI, A., A.E. DUNCAN, P.F. WATSON u. W.V. HOLT (1999):
Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species.
Biol. Reprod. 60, 879-886

FAZELI, A., W.J. HAGE, F.-P. CHENG, W.F. VOORHOUT, A. MARKS, M.M. BEVERS u. B. COLENBRANDER (1997):
Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro.
Biol. Reprod. 56, 430-438

FLESCHE, F.M., E. WIJNAND, C.H.A. VAN DE LEST, B. COLENBRANDER, L.M.G. VAN GOLDE u. B.M. GADELLA (2001):
Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for zona pellucida.
Mol. Reprod. Dev. 60, 107-115

FLORMAN, H.M., C. ARNOULT, I.G. KAZAM, C. LI u. C.M.B. O'TOOLE (1999):
Calcium channels of mammalian sperm: properties and role in fertilization.
The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications; Cache River Press

FLORMAN, H.M., u. P.M. WASSARMAN (1985):

O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity.
Cell 41, 313-324

FRASER, L.R., S.A. ADEOYA-OSIGUWA u. R.W. BAXENDALE (2003):

First messenger regulation of capacitation via G protein coupled mechanisms: a tale of serendipity and discovery.

Mol. Hum. Reprod. Vol.9 No.12, 739-748

FRASER, L.R. (1995):

Ionic control of sperm function.

Reprod. Fert. Dev. 7, 905-925

FUNAHASHI, H., H. EKWALL, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2000):

Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro seen with scanning electron microscopy.

Biol. Reprod. 63, 1437-1442

GABIUS, H.J., u. S. GABIUS (1992):

Angewandte Lektinforschung.

Biologie in unserer Zeit, 330-335

GADELLA, B.M. (1994):

Metabolism and localization of seminolipid in ejaculated mammalian spermatozoa.

Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, Diss.

GALANTINO-HOMER, H.L., P.E. VISCONTI u. G.S. KOPF (1997):

Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic

adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway.

Biol. Reprod. 56, 707-719

H. Literaturverzeichnis

- GROOTENHUIS, A.J., H.L.A. PHILIPSEN, J.T.M. DE BREET-GRUSBACH u.
M. VAN DUIN (1996) :
Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmosets,
rhesus monkeys and human ovaries using antigody against ZP3.
J. Reprod. Fertil. 50 (Suppl.), 43-54
- HAFEZ, E. S. E. (1993):
Reproduction in farm animals.
Lea & Febiger, Philadephia 6
- HANCOCK, J.L. (1956):
The morphology of boar spermatozoa.
J. R. Micro. Soc. 76, 84-97
- HARDY, D.M., u. D.L. GARBERS (1995):
A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg
extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor.
J. Biol. Chem. 270, 26025-26028
- HARRISON, R.A.P. (1996):
Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals.
Reprod. Fertil. Dev. 8, 581-594
- HARRISON, R.A.P., H.M. DOTT u. C.G. FOSTER (1982):
Bovine serum albumin, sperm motility, and the „dilution effect“.
J. Exp. Zool. 222, 81-88
- HARRISON, R.A.P. u. S.E. VICKERS (1990):
Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. 88, 343-352

HARRISON, R.A.P., B. MAIRET u. N.G.A. MILLER (1993):

Flow cytometric studies of bicarbonate mediates Ca^{2+} influx in boar sperm populations.

Mol. Reprod. Dev. 35, 197-218

HARRISON, R. A. P, P. J. C. ASHWORTH u. N. G. A. MILLER (1996):

Assessment of sperm function under fertilizing conditions.

Reprod. Dom. Anim. 31(1), 25-30

HEDRICK, J.L. (1996):

Comparative studies and antigenic properties of zona pellucida glycoproteins.

J. Reprod. Fertil. 50 (Suppl.), 9-17

HEDRICK, J.L., u. N.J. WARDRIP (1980):

The macromolecular composition of porcine zona pellucida.

Fed. Proc. 39, 2081

HEDRICK, J.L., u. N.J. WARDRIP (1987):

On the macromolecular composition of the zona pellucida from pig oocytes.

Dev. Biol. 121, 478-488

HINSCH, E. (1998):

Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von ZP2- und ZP3-Proteinen.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Habil.-Schr.

HUNNICUTT, G.R., P. PRIMAKOFF u. D.G. MYLES (1996):

Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary binding.

Bio. Reprod. 55, 80-86

HUNTER, R.H. u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2004):

Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes.

Mol Reprod Dev. 67(2), 243-250

H. Literaturverzeichnis

HUNTER, R.H. (1995):

Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes.

In: H.M. CHARLTON (Hrsg.): Oxford Reviews of Reproductive Biology.

Oxford University Press, Bd 17, S. 85-124

HUNTER, R.H. (1988):

Transport of gametes, selection of spermatozoa and gamete lifespans in the female reproductive tract.

in: R.H. HUNTER (Hrsg.): The Fallopian Tubes: Their role in fertility and infertility.

Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, S. 53-80

JANSEN, S., M, QUINGLEY, W. REIK u. J. JONES (1995):

Analysis of polysulphate-binding domains in porcine proacrosin, a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa.

Dev. Biol. 39, 501-501

JONES, R. (1991):

Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulfated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa.

Development 111, 1155-1163

KAWAKAMI, E., T. HORI u. T. TSUTSUI (1998):

Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid.

J. Vet. Med. Sci. 60, 197-202

KIRCHOFF, C., u. IVELL (1995):

Molekulare Aspekte der Spermienreifung im Nebenhoden. Eine Übersicht.

Fertilität 11, 167-174

KOBATA, A. (1992):

Structures and functions of the sugar chains in glycoproteins.

Eur. J. Biochem. FEBS 209, 483-501

KÖNIG, I. (1990)

Schweinebesamung.

Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin GmbH

5. überarbeitete Auflage

KÖLLE, S., F. SINOWATZ, G. BOIE u. G. PALMA (1998):

Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo.

Mol. Reprod. Dev. 49, 435-443

KÖLLE, S., F. SINOWATZ, G. BOIE, I. TOTZAUER, W. AMSELGRUBER u. J. PLENDL (1996):

Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3a in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization.

Histochem. J. 28, 441-447

KOPF, G.S., X.P. NING, P.E. VISCONTI, M. PURDON, H. GALANTINO-HOMER u. M. FORNÉS (1999):

Signaling mechanisms controlling mammalian sperm fertilization competence and activation.

In: GAGNON, C.:

The male gamete: from basic science to clinical applications.

Cache River Press, Vienna

KOPF, G.S., u. G.L. GERTON (1991):

The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction.

in: J.W. WASSARMAN (Hrsg.): Elements of Mammalian Fertilization.

CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 155-203

KRAUSE, D. (1966):

Untersuchungen an Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Habil-Schr.

H. Literaturverzeichnis

KULANAND, J.H.A., u. S. SHIVAJI (2002):

Identification of the major tyrosine phosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm a kinase anchoring protein.

Mol. Reprod. Dev. 61, 258-270

LEIBFRIED, M.L., u. N.L. FIRST (1979):

Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.

J. Anim. Sci. 48, 76-86

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., H.M. FLORMAN u. N.L. FIRST (1989):

The generation of oocytes.

in: H. SCHATTEN u. G. SCHATTEN (Hrsg.): The Molecular Biology of Fertilization.

Academic Press, London, S. 273-275

LEYTON, L., P. LEGUEN, D. BUNCH u. P. SAILING (1992):

Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11692-11695

LEYTON, L., C. TOMES u. P. SAILING (1995):

LL95 monoclonal antibody mimics functional effects of ZP3 on mouse sperm: evidence that the antigen recognized is not hexokinase.

Mol. Reprod. Dev. 42, 347-358

LEWIS, B. u. R.J. AITKEN (2000):

A redox regulated tyrosine phosphorylated cascade in rat spermatozoa.

J Androl 22, 611-622.

LIN, Y., L.H. KIMMEL, D.G. MYLES u. P. PRIMAKOFF (1993):

Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10071-10075

MANN, T. (1954):

The biochemistry of semen.

Methuen, London - New York

MANN, T., u. C. LUTWACK-MANN (1981):

Male reproductive Function and Semen.

Springer Verlag, New York

MILLER, D.J., A. MARTIN, A. WINER u. R.L. AX (1990):

Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin.

Biol. Reprod. 42, 899-915

MOOR, R.M., M. MATTIOLI, J. DING u. T. NAGHAI (1990):

Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro.

J. Reprod. Fert. 40, (Suppl.), 197-210

MORI, E., J.L. HEDRICK, N.J. WADRIP, T. MORI u. S. TAKASAKI (1998):

Accurrence of reducing terminal N-acetylglucosamine-3-sulfate and fucosylated outer chains in acidic N-glycans of porcine zona pellucida glycoprotein.

Glycoconj. J. 15, 447-456

MOTLIK, J. u. J. FULKA (1976):

Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro.

J. Exp. Zool. 198, 155-162

MOTTA, P.M., S. MAKABE, T. NAGURO u. S. CORRER (1994):

Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy.

Arch. Histol. Cytol. 57, 369-394

NAKANO, M., u. N. YONEZAWA (2001):

Lokalization of sperm-ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins.

Cells Tissues Organs 168, 65-75

H. Literaturverzeichnis

NEUBAUM, D.M., u. M.F. WOLFNER (1999):

Wise, winsome, or weird? Mechanisms of sperm storage in female animals.

Curr. Top. Dev. Biol. 41, 67-97

NIXON, B., Q. LU, M.J. WASSLER, C.I. FOOTE, M.A. ENSSLIN u. B.D. SHUR (2001):

Galactosyltransferase function during mammalian fertilization.

Cells Tissues Organs 168, 46-57

NOGUCHI, S., u. M. NAKANO (1992):

Structure of the acid N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida.

Eur. J. Biochem. 209, 883-894

O'RAND, M.G., E.E. WIDGREN u. S.J. FISCHER (1988):

Characterization of the rabbit sperm membrane autoantigen, RSA, as a lectin-like zona binding protein.

Dev. Biol. 129, 231-240

O'TOOLE, C.M.B., C. ARNOULT, A. DARSZON, R.A. STEINHARDT u. H.M. FLORMAN (2000):

Ca²⁺ Entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction.

Mol. Biol. Cell Vol. 11, 1571-1584

PARILLO, F., O. FAGIOLI, C. DALL'AGLIO u. A. VERINI-SUPPLIZI (2000):

Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocytes.

Acta Histochem. 102, 1-10

PETERS, R.M. u. M.L. WELLS (1993):

Culture of pig embryos.

J. Reprod. Fertil. 48(Suppl.), 62-73

PETRUNKINA, A.M., K. SIMON, A.R. GÜNZEL-APEL u. E. TÖPFER-PETERSEN (2003):

Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation.

J. Androl. 24(3), 423-37.

PETRUNKINA, A.M., R.A. HARRISON u. E. TÖPFER-PETERSEN (2000):

Only low levels of spermadhesin AWN are detectable on the surface of live ejaculated boar spermatozoa.

Reprod. Fertil. Dev. 12(7-8), 361-71

POMMER, A.C., J. RUTLLANT u. S.A. MEYERS (2002):

Phosphorylation of proteine tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions.

Biol. Reprod. 68, 1208-1214

PRASAD, S.V., B. WILKINS, S.M. SKINNER u. B.S. DUNBAR (1998):

Evaluating zona pellucida structures and function using antibodies to rabbit 55kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system.

Mol. Reprod. Dev. 43, 519-529

PRIMAKOFF, P., L. WOOLMAN-GAMER, K.S. TUNG u. D.G. MYLES (1997):

Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs.

Biol. Reprod. 56, 1142-1146

RATH, D., E. TÖPFER-PETERSEN, H.-W. MICHELMANN, P. SCHWARTZ u. S. EBELING (2005):

Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa.

Theriogenology 63, 352-362

H. Literaturverzeichnis

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., A. IBORRA, P. MARTINEZ u. J.J. CALVETE
(1998):

Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida.

Reprod. Fertil. Dev. 10, 491-497

SANZ, L., J.J. CALVETE, K. MANN, W. SCHAFER, E.R. SCHMIED, W.
AMSELGRUBER, F. SINOWATZ, M. EHRHARD u. E. TÖPFER-PETERSEN
(1992):

The complete primary structure of the spermadhesin AWN, zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa.

Febs. Lett. 300(3), 213-218

SACCO, A.G., E.C. YUREWICZ, M.G. SUBRAMANIAN u. F.J. DEMAYO (1981):

Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA).

Biol. Reprod. 25, 997-1008

SCHNOOR, B. (1989):

Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch. 2. Aufl.

Verlag Enke, Stuttgart

SCHÜLKE, B. (1991):

Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie

In: BUSCH, W., K. LÖHLE u. W. PETER

Künstliche Besamung bei Nutztieren.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

SEKI, N., J. TOYAMA u. T. NAKANO (1992):

Changes in the distribution of filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus.

Anat. Rec. 232, 221-230

SERRANO, H. u. D. DIAZ-ESPARZA (2001):

Pig sperm membrane integrity. Evaluated by lectin labelling.

Arch. Androl. 47, 59-65

SETCHELL, B.P. (1982):

Spermiogenesis and Spermatozoa.

In: C.R. AUSTIN u. R.V. SHORT (Hrsg.): Reproduction of Mammals.

Cambridge University Press, Bd. 1

SETCHELL, B., S. MADDOCKS u. D. E. BROOKS (1994):

Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract.

In: Knowlton, E. u. J. NEILL (Hrsg.):

The Physiology of Reproduction, Vol. 1, second edition

Raven Press, Ltd. New York, 1063-117

SHIVAJI, S., K.-H. SCHEIT u. P.-M. BHAGARA (1990):

Proteins of seminal plasma.

John Wiley and Sons Inc., New York

SIMON, K. (2002):

In vitro Untersuchungen zur Kapazitation caniner Spermien und deren Regulation durch das Ovidukt.

Hannover Tierärztl. Hochschule, Diss.

SINOWATZ, F., W. AMSELGRUBER, E. TÖPFER-PETERSEN, J.J. CALVETE, L.

SANZ u. J. PLENDL (1995):

Immunocytochemical localization of spermadhesin AWN in porcine genital tract.

Cell and Tissue Res. 282, 175-179

TARDIF, S., C. DUBÉ u. J.L. BAILEY (2003):

Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium.

Biol. Reprod. 68, 207-213

H. Literaturverzeichnis

TARDIF, S., C. DUBÉ, S. CHEVALIER u. J.L. BAILEY (2001):

Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins.

Biol. Reprod. 65, 784-792

TARDIF, S., M.A. SIRARD, R. SULLIVAN u. J.L. BAILEY (1999):

Identification of capacitation-associated phosphoproteins in porcine sperm electroporated

with ATP-gamma-(32)P.

Mol. Reprod. Dev. 54, 292–302.

TÖPFER-PETERSEN, E. (1999):

Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization.

Hum. Reprod. Update 5(4), 314-329

TÖPFER-PETERSEN, E., D. WABERSKI, O. HESS, S. BELLAIR, A.

SCHAMBONY, M. EKHLASI-HUNDRIESER, M. GENTZEL u. A. REINEKE

(1998):

Bedeutung des Seminalplasmas für die Befruchtung – ein kurzer Überblick.

Tierärztl. Umschau 53, 447-454

TÖPFER-PETERSEN, E., M. ENSSLIN u. D. WABERSKI (1996):

Kapazitation: Eine kurze Übersicht.

Fertilität 12, 183-189

TÖPFER-PETERSEN, E.T., E.J.J. CALVETE, L.SANZ u. F. SINOWATZ (1995):

Carbohydrate- and heparin-binding proteins in mammalian fertilization.

Andrologia 27(6), 303-324

TÖPFER-PETERSEN, E., D. CECHOVA, A. HENSCHEN, M. STEINBERGER,

A.E. FRIES u. A. ZUCKER (1990):

Cell biology of acrosomal proteins.

Andrologia 22(1), 110-121

VARNER, D.D., J.A. BOWEN u. L. Johnsen (1993)

Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm.

Arch. Androl. 31(3), 199-207

VINES C.A., M.W. LI, X. DENG, G.N. CHERR u. J.W. OVERSTREET (2001):

Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling.

Mol. Reprod. Dev. 60(4), 542-52

VISCONTI, P.E., J.L. BAILEY, G.D. MOORE, D. PAN, P. OLDS-CLARKE u.

G.S. Kopf (1995):

Capacitation of mouse spermatozoa.

I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation.

Development 121, 1129–1137

VISCONTI, P.E., L.R. JOHNSON, M. OYASKI, M. FORNES, M. MOSS, S.B.

GERTON u. G.S. KOPF (1997):

Regulation, localization, and anchoring of protein phosphorylation during sperm capacitation.

Biol. Reprod. 59, 1-6

VISCONTI, P. E., u. G. S. KOPF (1998):

Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation.

Biol. Reprod. 59, 1-6

VISCONTI, P.E., J. STEWART-SAVAGE, A. BLASCO, L. BATTAGLIA, P.

MIRANDA, G.S. KOPF u. J.G. TEZÓN (1999):

Roles of Bicarbonate, cAMP, and Protein Tyrosine Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm.

Biol. Reprod. 61, 76-84

H. Literaturverzeichnis

WASSARMAN, P.M. (1999):

The Parkes Lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization.

J Reprod Fertil. 116(2), 211-216.

WASSARMAN, P.M., u. R.A. KINLOCH (1992):

Gene expression during oogenesis in mice.

Mutat. Res. 296, 3-15

WASSARMAN, P.M. (1990):

Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins.

J. Reprod. Fert. 42 (Suppl.), 79-87

WEITZE, K.-F., u. E. MÜLLER (1991):

Prinzipien der Spermauntersuchung.

In: BUSCH, W., K. LÖHLE u. W. PETER (Eds.): Künstliche Besamung bei Nutztieren.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

WEITZE, K.-F. (2001):

Spermatologische Untersuchung.

In: BUSCH, W., HOLZMANN, A. (2001):

Veterinärmedizinische Andrologie

Schattauer, Stuttgart, 67-82

YANAGIMACHI, R. (1994):

Mammalian Fertilization.

In E. Knobil u. J.D. NEILL (Hrsg.): The physiology of Reproduction.

Raven Press, New York, 2. Aufl., S. 189-317

YUDIN, A.I., C.A. VANDEVOORT, M.W. LI u. J.W. OVERSTREET (1999):

Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida.

Mol. Reprod. Dev. 53, 350-362

YUREWICZ, E.C., B.A. PACK u. A.G. SACCO (1992):

Porcine oocyte zona pellucida Mr 55,000 glycoproteins: Identification of O-glycosylated domains.

Mol. Reprod. Dev. 30, 126-134

YUREWICZ, E.C., B.A. PACK u. A.G. SACCO (1991):

Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55kDa glycoprotein.

Mol. Reprod. Dev. 30, 126-134

Eigene Veröffentlichungen:

PIEHLER, E. (2004):

Kinetics of capacitation related events in boar sperm.

Wien. Tierärztl. Mschr. 91, Suppl. 2, 50

RATH D., E. TÖPFER-PETERSEN, H.W. MICHELMANN, P.SCHWARTZ, D. von WITZENDORFF, S. EBELING, M EKHLASI-HUNDRIESER, E. PIEHLER, A. PETRUNKINA u. R. ROMAR (2005):

Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs.

Reprod. Suppl. (im Druck)

J. Anhang

1. Rezeptverzeichnis

Alle Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt, soweit nicht anders angegeben.

Pufferlösungen

PBS (Phosphat buffered saline)

154 mM NaCl; 9,1 mM Na₂HPO₄; 2,71 mM KH₂PO₄; pH-Wert 7,4

TBS (Tris buffered saline)

50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH-Wert 7,5

Physiologische Kochsalzlösung

0,9 % NaCl (154 mM)

Oozytenpuffer

10 mM Na₂HPO₄; 125 mM NaCl; 3 mM Na₃-Citrat x 2 H₂O; 2 mM EDTA; 10 mM NaH₂PO₄

pH-Wert 7,0-7,4

Hyperosmolare Salzlösung

1,5 M MgCl₂ x 6 H₂O; 40 mM HEPES; 0,1% Dextran pH-Wert 7,0-7,4

Percoll-Lösungen (35 % und 70 %)

(Zusammensetzung nach HARRISON et al. 1982)

a. 10fach salines Hepes-Medium:

NaCl	8,00 g
Hepes	4,77 g
Glucose x H ₂ O	1,80 g
KOH, 1M	2,50 ml
A.dest.	100,00 ml

pH=7,6 (einstellen mit NaOH / HCl)

b. Lösung M:

10fach salines Hepes-Medium	10,80 g
A.dest.	100,00 ml

pH=7,4 (einstellen mit NaOH / HCl)

Osmolalität m~295 mosm/kg

c. Lösung 1+9P:

10fach salines Hepes-Medium	5,40 g
Percoll [®] ~295 mosm/kg, unverdünnt	50,90 g
A.dest.	100,00 ml

pH=7,4 (einstellen mit NaOH / HCl)

Osmolalität dp~350 mosm/kg

d. Percoll[®], unverdünnt

Osmolalität p~15 mosm/kg

Rechnung: $O_a = 0,1 \times (10m + 9p)$

$R = [O_a - (0,1 \times dp)] / (0,9 \times dp) \quad (\sim 0,85)$

$V_p = (10m - 295) / [R \times (295 - p)] \quad (\sim 11)$

e. 100prozentiges Percoll

Lösung 1 + 9 P

Percoll[®], unverdünnt $[(V_p - 9) \times 1,13 \times 5] \text{ g}$

Osmolalität ~295 mosm/kg

f. 70prozentiges Percoll-Salines-Medium

½ 100prozentiges Percoll-Salines-Medium = V

Lösung M $\text{ad } V \times 100 / 70$

Gentamycin (70prozentiges Percoll / 500) ml

g. 35prozentiges Percoll-Salines-Medium

½ 100prozentiges Percoll-Salines-Medium = V

Lösung M $\text{ad } V \times 100 / 35$

Gentamycin (70prozentiges Percoll / 500) ml

Spül- und Waschmedium für Oozyten bzw. Zonae pellucidae (PBS/PVA):

PBS/2% PVA (w/v)

Maturationsmedium NCSU 37 (PETTERS u. WELLS 1993):

1,7 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 0,6 mM Cystein; 10 ng/ml EGF; 5,6 mM Glucose; 1,0 mM Glutamin; 10 % immature Follikelflüssigkeit; 5,0% Insulin, 4,8 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄ x 6 H₂O; 108,7 mM NaCl; 25,1 mM NaHCO₃; 100 IE/l Penicillin G; 12 mM Sorbitol; 50 mg/l Streptomycin

Formolcitrat, (mod nach HANCOCK 1956):

2,9 g/100 ml Tri-Natriumcitrat x 2 H₂O

Davon 4 ml verwerfen und durch 4 ml 37prozentige Formalinlösung ersetzen.

Tyrode Medium (nach ASHWORTH et al. 1995, HARRISON 1993):

96,0 mM NaCl; 3,1 mM KCl; 2,0 mM CaCl₂; 0,4 mM MgSO₄ x 6 H₂O; 0,3 mM Na₂PO₄; 5 mM Glucose; 21,6 mM Na-lactat; 1,0 mM Na-pyruvat; 15,0 mM NaHCO₃; 20,0 mM Hepes; 0,3% BSA; 0,001% Phenolrot; pH 7,4; Osmolalität 295 mosm/kg

Saccharose Waschmedium (SWM):

232 mM Saccharose; 10 mM Glucose x H₂O; 20 mM Hepes; 2,5 mM KOH; 0,3% BSA; pH 7,4; Osmolalität 295 mosm/kg

Hepes buffered saline medium (HBS):

137 mM NaCl; 10 mM Glucose x H₂O; 20 mM Hepes; 2,5 mM KOH; 0,3% BSA; pH 7,4; Osmolalität 295 mosm/kg

Androhep-Puffer:

20 mM Hepes pH 7,4; 1,5 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 95 mM NaCl; 1 mM K₂HPO₄; 5 mM Glucose; 60 mM Saccharose; 5 mM Na-pyruvat; 0,3% BSA

Bei den Lösungen für die durchflusszytometrischen Versuche wird nach Komplettierung die Osmolalität geprüft (soll: 295 mosm/kg bis 310 mosm/kg). Bei den Kapazitationsmedien wird der pH-Wert geprüft (soll: 7,5 bis 7,55).

Die Kapazitationsmedien werden zur Äquilibration in den Brutschrank (38 °C und 5 % CO₂) gestellt, danach wird der pH-Wert erneut geprüft (soll: 7,4 +/- 0,05).

2. Messung des pH-Wertes und der Osmolalität

2.1. Messung des pH-Wertes

Die Messung und die Einstellung des pH-Wertes der Medien erfolgte mit Hilfe des pH-Meters (microprocessor pH/ION Meter pMX 3000 WTW GmbH) bei zeitgleicher Überprüfung der Temperatur. Das Gerät wurde täglich mit zwei Pufferlösungen nach DIN 19266 geeicht.

2.2. Messung der Osmolalität

Die Bestimmung der Osmolalität der verwendeten Medien erfolgte wurde mit einem Kryosmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH). Das Gerät misst nach dem Prinzip der Gefrierpunktsenkung. Es senkt die Temperatur der zu messenden Probe. Diese kristallisiert und anhand der Kristallisierungstemperatur wird die Osmolalität errechnet. Das Gerät gibt die Osmolalität in osmol/kg an. Vor Gebrauch wurde das Gerät mittels A. dest. (0 mosm/kg) und einer Eichlösung (300 mosm/kg) der Firma Gonotec GmbH kalibriert.

3. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

3.1 Daten von Spermatozoen während der Inkubation unter kapazitierenden Bedingungen

Tab. 1: Durchflusszytometrische Erfassung der Spermatozoen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionengehalt ($[Ca^{2+}]_i$) unter kapazitierenden Bedingungen (n=7).

Zeitpunkt	lebende Spermatozoen mit erhöhtem $[Ca^{2+}]_i$		Summe aller Zellen mit erhöhtem $[Ca^{2+}]_i$	
	Mittelwert (%)	Standard-abw.	Mittelwert (%)	Standard-abw.
5 Minuten	4,80	5,24	6,50	6,95
15 Minuten	4,70	4,24	6,00	5,16
30 Minuten	6,20	4,40	8,70	4,07
60 Minuten	13,90	13,60	18,50	16,13
90 Minuten	19,40	15,90	26,30	19,09
120 Minuten	22,50	20,56	26,30	21,82
150 Minuten	22,20	19,95	29,40	20,60

Tab. 2: Durchflusszytometrische Erfassung der Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit der Zeit (n=7).

Zeitpunkt	Mittelwerte der Fluoreszenzintensität		Modalwerte der Fluoreszenzintensität	
	Mittelwerte (%)	Standard-abw.	Mittelwerte (%)	Standard-abw.
5 Minuten	2,04	0,84	1,66	0,88
15 Minuten	2,95	2,06	2,00	1,85
30 Minuten	2,92	2,22	2,54	1,86
60 Minuten	2,88	1,89	2,06	1,00
90 Minuten	2,98	0,96	2,16	1,05
120 Minuten	4,94	2,68	3,34	1,55
150 Minuten	3,56	1,58	2,89	1,36

Nach 75 oder 90 Minuten wurde die Spezifität des Antikörpers mit Orthophosphotyrosin jeweils nachgewiesen.

Tab. 3: Durchflusszytometrische Erfassung des Anteils lebender und toter akrosomreagerter Spermatozoen in Abhängigkeit der Zeit (n=7).

Zeitpunkt	akrosomreagierte tote Spermien		akrosomreagierte lebende Spermien	
	Mittelwert (%)	Standard abw.	Mittelwert (%)	Standard abw.
5 Minuten	2,89	3,80	1,30	2,16
15 Minuten	2,80	2,08	0,60	0,64
30 Minuten	5,42	5,76	1,21	1,44
60 Minuten	11,64	7,24	1,54	0,57
90 Minuten	10,73	6,64	1,90	1,79
120 Minuten	10,60	6,10	1,68	0,39
150 Minuten	9,85	5,94	1,19	0,87

3.2 Daten von Spermatozoen unter dem Einfluss von solubilisierter Zona pellucida unterschiedlichen Reifegrades

Tab. 4: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderung des prozentualen Anteils an Zellen mit erhöhtem intrazellulären Kalziumionengehalt (n=3).

Zeitpunkt	Kontrolle		GVI		48 Stunden gereift	
	Mittelwert (%)	Standard abw.	Mittelwert (%)	Standard abw.	Mittelwert (%)	Standard abw.
5 Minuten	2,48	1,56	3,67	1,44	4,52	1,40
15 Minuten	2,76	1,82	3,37	3,86	2,90	3,33
30 Minuten	2,50	3,56	2,77	4,31	3,19	3,95
60 Minuten	9,71	6,03	11,68	7,66	10,85	6,68
90 Minuten	12,82	7,17	16,81	10,31	18,83	8,43

Tab. 5: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderung der Fluoreszenzintensität der Tyrosinphosphorylierung anhand von Mittel- und Modalwert in Abhängigkeit der Zeit (n=3).

Zeitpunkt		Kontrolle		GVI		48 Stunden gereift	
		Mittelwert	Standard-abw.	Mittelwert	Standard-abw.	Mittelwert	Standard-abw.
Mittelwerte	5 Minuten	1,39	0,16	1,41	0,17	1,11	0,35
	90 Minuten	1,96	0,41	2,06	0,32	2,18	0,59
	120 Minuten	1,89	0,40	2,07	0,30	2,46	0,68
	150 Minuten	1,75	0,29	1,84	0,32	2,21	1,02
Modalwerte	5 Minuten	1,30	0,10	1,33	0,21	0,90	0,27
	90 Minuten	1,40	0,26	1,31	0,29	1,25	0,78
	120 Minuten	1,03	0,21	1,27	0,21	1,27	0,21
	150 Minuten	1,25	0,64	1,23	0,21	1,43	0,85

Nach 90 Minuten wurde die Spezifität des Antikörpers mit Orthophosphotyrosin jeweils nachgewiesen.

Tab. 6: Durchflusszytometrische Erfassung der Veränderung des Anteils akrosomreagierender Spermatozoen in Abhängigkeit der Zeit (n=3).

Zeitpunkt	Kontrolle		GVI		48 Stunden gereift	
	Mittelwert (%)	Standard-abw.	Mittelwert (%)	Standard-abw.	Mittelwert (%)	Standard-abw.
5 Minuten	3,75	3,35	4,22	3,43	3,94	3,69
15 Minuten	5,34	5,29	4,53	2,90	4,83	3,68
30 Minuten	4,84	3,90	6,03	4,83	6,40	5,30
60 Minuten	7,84	6,08	10,32	8,78	14,17	11,68
90 Minuten	16,28	10,55	18,35	12,86	18,16	10,98

3.3 An intakte Zona pellucida unterschiedlichen Reifegrades gebundene Spermatozoen

Tab. 7: Auswertung der Daten der Untersuchungen von akrosomreagierenden Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (n=4).

Zeit in Minuten	48 Stunden gereift		GVI		Kontrolle
	Mittelwert (%)	Standard-abw.	Mittelwert (%)	Standard-abw.	Mittelwert (%)
5 Minuten	18,04	2,10	19,94	2,55	19,80
10 Minuten	27,15	2,43	22,35	5,61	20,74
30 Minuten	39,73	3,06	31,39	1,89	22,66
60 Minuten	42,99	2,03	44,35	5,12	21,80

K. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Kinetische Untersuchungen zur in vitro Kapazitation
und
Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion am Eberspermatozoon**

selbstständig verfasst habe.

1. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:
Am Institut für Reproduktionsmedizin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und an der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft - Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee - wurden die Versuche mit dem im Kapitel „C. Eigene Untersuchungen“ aufgeführten Hilfen und Hilfsmitteln durchgeführt.
2. Die fachliche Beratung wurde von Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Edda Töpfer-Petersen und Frau Dr. rer. biol. hum. Anna M. Petrunkina - Institut für Reproduktionsmedizin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover - übernommen.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgenden Instituten angefertigt:

- Institut für Reproduktionsmedizin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht Mariensee

K. Eidesstattliche Erklärung

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe

Erik Olaf Piehler

L. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Dr. Edda Töpfer-Petersen für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme im Institut für Reproduktionsmedizin, die persönliche Betreuung und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Anna Petrunkina für ihr Engagement und die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung der entsprechenden Versuchsteile.

Herrn Prof. Dr. D. Rath danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe innerhalb der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft im Institut für Tierzucht. Stellvertretend für andere Mitarbeiter danke ich Antje Frenzel für die hilfreiche Unterstützung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop sowie für die Bereitstellung der ungereiften und der in vitro gereiften Oozyten.

Bei allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden des Institutes für Reproduktionsmedizin besonders bei Frau Dr. Mahnaz Ekhlesi-Hundrieser und Frau Christiane Hettel möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Frau Dr. Silke Küker und Frau Dr. Katrin Gohr danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung sowie das Korrekturlesen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie insbesondere bei meiner Mutter für die Ermöglichung von Studium und Promotion.