

Eine neue Form der Pyruvatkinase in Säugerspermien

- Vergleichende zell- und molekularbiologische Charakterisierung -

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sandra Feiden
geb. 1976 in Koblenz

Mainz, 2006

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iv
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE ENTWICKLUNG UND FUNKTION VON SÄUGERSPERMIEN	2
1.1.1 <i>Spermatogenese</i>	2
1.1.2 <i>Reifung von Säugerspermien im Nebenhoden sowie im weiblichen Genitaltrakt</i>	6
1.1.3 <i>Morphologie des reifen Säugerspermiums</i>	9
1.1.4 <i>Besamung und Befruchtung</i>	11
1.2 BIOCHEMISCHE BESONDERHEITEN VON SÄUGERSPERMIEN	17
1.2.1 <i>Der Spermienkopf: Träger des Erbmaterials</i>	17
1.2.1.1 Der Zellkern und die perinukleare Theka	17
1.2.1.2 Das Akrosom und die Kopfform.....	19
1.2.2 <i>Das Spermienflagellum: Motor für den Transport des männlichen Erbmaterials</i>	22
1.2.2.1 Die fibröse Scheide.....	23
1.2.2.2 Die dicken Filamente	25
1.2.3 <i>Energiestoffwechsel</i>	26
1.2.3.1 ATP-konsumierende Reaktionen	26
1.2.3.2 ATP-Synthese in Spermien.....	28
1.2.4 <i>Stoffwechselkompartimentierung</i>	33
1.2.5 <i>Strukturbindungen glykolytischer Enzyme</i>	36
1.3 DIE PYRUVATKINASE	38
1.3.1 <i>Somatische Pyruvatkinase</i>	39
1.3.2 <i>Pyruvatkinase in Spermien und Zielsetzung dieser Arbeit</i>	40
2 MATERIAL UND METHODEN	42
2.1 VERSUCHSMATERIAL	42
2.2 CHEMIKALIEN UND GERÄTE.....	43
2.2.1 <i>Verwendete Chemikalien</i>	43
2.2.2 <i>Verwendete Geräte und Hilfsmittel</i>	43
2.3 EXTRAKTION STRUKTURGEBUNDENER PK AUS EBERSPERMIEN	44
2.4 REINIGUNG DER TRYPTISCH VON SPERMIENSTRUKTUREN ABGELÖSTEN PK	46
2.4.1 <i>Hydrophobizitätschromatographie</i>	46
2.4.2 <i>Ionenaustauschchromatographie</i>	47
2.4.3 <i>Kombination von Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie</i>	49
2.5 ANREICHERUNG DER LÖSLICHEN PK AUS EBERSPERMIEN	51
2.6 ENZYMAKTIVITÄTSBESTIMMUNGEN	52

2.6.1	Das Prinzip.....	52
2.6.2	Die Testsysteme für Aktivitätsmessungen von Enzymen.....	54
2.6.2.1	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12).....	54
2.6.2.2	Enolase (ENO: EC 4.2.1.11).....	55
2.6.2.3	Pyruvatkinase (PK: EC 2.7.1.40).....	55
2.6.2.4	Laktatdehydrogenase (LDH: EC 1.1.1.27).....	56
2.7	PROTEINBESTIMMUNG.....	56
2.7.1	Messung bei 280nm.....	56
2.7.2	Proteinbestimmung nach BRADFORD (BIO-RAD Microassay).....	57
2.8	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL.....	58
2.9	SDS-GELELEKTROPHORESE.....	58
2.9.1	Proteinanfärbung.....	60
2.9.1.1	Färbung mit Coomassie Brilliantblau.....	60
2.9.1.2	Färbung mit Silbernitrat.....	60
2.10	PRODUKTION VON POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN DIE GEREINIGTE STRUKTURGEBUNDENE PK AUS EBERSPERMIEN.....	61
2.11	SEQUENZIERUNG.....	62
2.12	SEQUENZBEURTEILUNG/-VERGLEICH.....	63
2.13	PEPTIDSYNTHESE UND ANTIKÖRPERPRODUKTION.....	63
2.14	ANTI-KÖRPERREINIGUNG.....	65
2.15	PRÜFUNG DER SPEZIFITÄT DER ANTIKÖRPER.....	66
2.16	IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	67
2.16.1	Immunoblotting.....	67
2.16.2	Fluoreszenzmarkierung.....	68
2.16.2.1	Ausstriche von Eberspermien mit oder ohne deren nachträgliche Fixierung/ Permeabilisierung.....	69
2.16.2.2	Hodenpräparation.....	69
2.16.2.3	Gewebefixierung für Kryoeinbettung.....	70
2.16.2.4	Kryoeinbettung von fixiertem oder unfixiertem Gewebe.....	70
2.16.2.5	Anfertigung von Kryostatschnitten.....	71
2.16.2.6	Fixierung/Permeabilisierung von Schnitten aus unfixiertem Hodengewebe.....	71
2.16.2.7	Ablauf der Fluoreszenzmarkierung.....	71
2.16.2.8	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung.....	72
2.16.3	Immunogoldmarkierung.....	72
2.16.3.1	Durchführung der Immunogoldmarkierung.....	72
2.16.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	76
2.16.3.3	Auswertung der Goldmarkierung.....	76
3	ERGEBNISSE.....	78
3.1	EXTRAKTION VON PK AUS EBERSPERMIEN.....	78

3.2	REINIGUNG DER PK-S AUS EBERSPERMIEN	78
3.2.1	<i>Optimierte Reinigung der PK-S über die Kombination von Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie.....</i>	<i>81</i>
3.3	ANREICHERUNG DER LÖSLICHEN PK AUS EBERSPERMIEN	84
3.4	KINETISCHE EIGENSCHAFTEN VON PK AUS EBERSPERMIEN	85
3.5	TEILSEQUENZIERUNG DER GEREINIGTEN PK-S.....	89
3.6	GEWINNUNG SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER GEGEN DIE PK-S	95
3.6.1	<i>Produktion und Charakterisierung des Antiserums gegen die gereinigte PK-S.....</i>	<i>95</i>
3.6.2	<i>Synthese eines Peptids mit PK-S spezifischer Sequenz</i>	<i>104</i>
3.6.3	<i>Produktion und Charakterisierung der Antiseren gegen das synthetisierte Peptid</i>	<i>105</i>
3.6.4	<i>Immunoaffinitätsreinigung von Antikörpern gegen PK-S aus dem Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien.....</i>	<i>109</i>
3.7	PRÜFUNG DER SPEZIFITÄT VON ANTIKÖRPERN GEGEN GAPDH UND ACROSIN	112
3.8	LOKALISIERUNG VON PK UND GAPDH SOWIE ACROSIN IN SPERMIEN VERSCHIEDENER SÄUGER.....	115
3.8.1	<i>Fluoreszenzmarkierung an ejakulierten Eberspermien.....</i>	<i>115</i>
3.8.2	<i>Immunogoldmarkierung an ejakulierten Eberspermien.....</i>	<i>123</i>
3.8.3	<i>Immunogoldmarkierung an Spermien anderer Säuger</i>	<i>130</i>
3.9	LOKALISIERUNG VON PK UND GAPDH SOWIE ACROSIN IN EBERHODENSCHNITTEN ÜBER FLUORESZENZMARKIERUNG	142
4	DISKUSSION.....	172
4.1	LÖSLICHE UND GEBUNDENE PYRUVATKINASE IN EBERSPERMIEN	172
4.2	PK-S BESITZT EINE N-TERMINALE VERLÄNGERUNG	173
4.3	LOKALISIERUNG VON PK IN SÄUGERSPERMIEN.....	179
4.4	LOKALISIERUNG VON GAPDH UND KOMPARTIMENTIERUNG DER GLYKOLYSE IN SÄUGERSPERMIEN	185
4.5	PRODUKTION VON PK UND GAPDH IM LAUFE DER SPERMATOGENESE.....	189
4.6	BEDEUTUNG DER GLYKOLYSE IN SÄUGERSPERMIEN	197
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	204
6	LITERATURVERZEICHNIS	206
7	PUBLIKATIONEN.....	226

Abkürzungsverzeichnis

A	= Ampere
ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
AK	= Adenylatkinase
AKAP	= Ankerproteine für Proteinkinase-A
ALD	= Aldolase
AMP	= Adenosin-5'-monophosphat
Anti-GAPDH-S	= Antiserum gegen die gereinigte strukturgebundene GAPDH aus Eberspermien
Anti-PK-M1	= Antikörper gegen die PK aus Kaninchenmuskel
Anti-PK-S	= immungereinigte Antikörper gegen die strukturgebundene PK aus Eberspermien
AP ₅ A	= p ¹ , p ² -Di (adenosin-5'-) pentaphosphat
APS	= Ammoniumpersulfat
AR	= Akrosomreaktion
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
Bis	= Methylen-Bisacrylamid
2,3BPG	= 2,3-bisphosphoglycerat
BSA	= Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BTS	= Beltsville Thawing Solution
°C	= Grad Celsius
cAMP	= cyclo-AMP
CAPS	= 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cDNA	= komplementäre DNA
CK	= Creatinkinase
Cr	= Creatin
Da	= Dalton
DAB	= Diaminobenzidin
DAG	= Diacylglycerin
DAP	= Dihydroxyacetonphosphat
DAPI	= 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DDBJ	= DNA Data Bank of Japan
dH ₂ O (ddH ₂ O)	= destilliertes (zweifach destilliertes) Wasser
DIC	= Differential Interference Contrast, Differentialphasenkontrast
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
DOC	= Natriumdesoxycholat
DOG	= 2-Deoxy-D-Glukose
DTT	= DL-Dithiothreitol
EDTA	= Ethylendiaminotetraessigsäure
EM	= Elektronenmikroskop
EMBL	= European Molecular Biology Laboratory
ENO	= Enolase
F1,6P ₂	= Fruktose-1,6-bisphosphat
F2,6P ₂	= Fruktose-2,6-bisphosphat
F6P	= Fruktose-6-phosphat
F-Aktin	= filamentöses Aktin
FPLC	= Fast Performance Liquid Chromatography
FSH	= Follikel stimulierendes Hormon
FSP	= Fibrous sheath protein
ΔG	= Änderung der freien Energie eines Systems
g	= Gramm
x g	= Vielfaches der Erdbeschleunigung
G6P	= Glukose-6-phosphat
G6PDH	= Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
G-Aktin	= globuläres Aktin
GAP	= Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH-S (GAPDS, GAPD2)	= keimzellspezifische GAPDH
GDH	= Glycerinphosphat-Dehydrogenase
GLUT	= Glukosetransporter
GSH	= Glutathion
GTP	= Guanosintriphosphat
GTPase	= Guanosintriphosphatase

h	= Stunde
H	= Homogenat
HEPES	= 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HK	= Hexokinase
HK1-S	= keimzellspezifische HK, ähnlich der somatischen HK1
HOADH	= β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
HPLC	= High Performance Liquid Chromatography
HRP	= Meerrettich-Peroxidase
HSP	= Hitzeschockprotein
IgG (IgG ₁ , IgM)	= Immunglobulin G (G ₁ , M)
IP ₃	= Inositol-1,4,5-trisphosphat
IU	= International Unit
J	= Joule
k	= Kilo
k.A.	= keine Angabe
KLH	= Keyhole Limpet Hemocyanin, Hämocyanin der Schlüssellochschnecke
KV	= Küvettenvolumen
l	= Liter
LDH (-A, -C)	= Laktatdehydrogenase (Isoform A, C)
LMW	= low molecular weight (Standardproteine)
log	= dekadischer Logarithmus
μ	= mikro
m	= Meter
mm	= milli
M	= molar (Mol/l)
MALDI-TOF-MS	= Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Massenspektrometrie
MES	= 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	= Molekulargewicht
min	= Minute
3MPS	= 3-Mercaptopropansulfonsäure
M _r	= relative molekulare Masse
mRNA	= messenger-RNA
MyRIP	= myosin Va-Rab interacting protein
n	= Stichprobengröße (bei statistischen Angaben)
nm	= nano (bei Maßangaben)
NAD(P) ⁺	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (Phosphat), oxidiert
NAD(P)H	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (Phosphat), reduziert
OD	= optische Dichte
ODFs	= outer dense fibers, dicke Filamente
PAGE	= Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	= phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCr	= Phosphocreatin
PDB	= Protein Data Bank
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PFA	= Paraformaldehyd
(6-)PFK	= (6-)Phosphofruktokinase
6PF-2-K/Fru-2,6-P ₂ ase	= 6-Phosphofruktose-2-kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase
PGI	= Phosphoglucose Isomerase
PGK	= 3-Phosphoglycerat Kinase
PGM	= Phosphoglycerat Mutase
pH	= potentia hydrogenii
P _i	= anorganisches Phosphat
pI	= isoelektrischen Punkt
PITC	= Phenylisothiocyanat
PK	= Pyruvatkinase
PKA	= Proteinkinase A
PK-M1, -M2, -L, -A, -R	= M1-, M2- (A-), L-, R-Isoform der Pyruvatkinase
PK-S	= strukturegebundene PK aus Eberspermien
PLA ₂ (PLC)	= Phospholipase A ₂ (Phospholipase C)
PMSF	= Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	= Pentosephosphatweg
PT	= perinukleare Theka

PTH	= Phenylthiohydantoin
PV	= Probenvolumen
PVDF	= Polyvinylidendifluorid
red.	= reduziert
RNA	= Ribonukleinsäure
RPM	= revolutions per minute
RT	= Raumtemperatur
S	= Sediment
Sak	= spermatogenic cell/sperm-associated keratin
SDS	= Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	= SDS-Polyacrylamidgel(elektrophorese)
sec	= Sekunde
SNAP	= soluble NSF attachment protein
SNARE	= SNAP-Rezeptoren
Spag	= sperm associated antigen
t	= Zeit
TCA	= Trichloressigsäure
TEMED	= N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	= Trifluoressigsäure
TIM	= Triosephosphat Isomerase
TP	= transition protein, Übergangprotein
TRAP	= Triethanolaminhydrochlorid
TrEMBL	= Translated EMBL
Triton X-100	= Polyoxyethylen-r-isooctylphenylether
U	= Unit (= μmol Substratumsatz/min)
Ü	= Überstand
u.a.	= unter anderem
UE	= Untereinheit
ÜnT	= Überstand nach Trypsinbehandlung
V	= Volt
v/v	= volume/volume
v/w	= volume/weight
var.	= variabel
w/v	= weight/volume
ZP	= Zona pellucida

1 Einleitung

Spermien sind hochspezialisierte Zellen, welche für die Arterhaltung von entscheidender Bedeutung sind. Die Funktion einer Samenzelle ist der Transport des männlichen Erbmaterials zur Eizelle, um durch Befruchtung einer Oozyte die Entwicklung eines neuen Individuums auszulösen.

In den letzten Jahren sind wichtige Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Befruchtung bei Säugern erzielt worden. Man weiß mittlerweile, dass Spermien verschiedene Reifungsprozesse durchlaufen, bevor sie in der Lage sind, ein Ei zu befruchten. Bedeutsam ist die Kapazitation, ein komplexer Reifeprozess, der von ejakulierten Spermien im weiblichen Genitaltrakt durchlaufen wird und eine Serie biochemischer Modifikationen umfasst, die bisher nur zum Teil verstanden sind. Molekulare Veränderungen in Kopf und Flagellum einer Samenzelle führen während der Kapazitation zu zwei wichtigen Effekten: Zum einen wechselt das Spermium von progressiver Bewegung zu Hyperaktivität (DE LAMIRANDE et al., 1997; BEDFORD, 1998). Unter Hyperaktivität versteht man eine Bewegung mit hohem kraftvollen Amplitudenschlag. Zum anderen bewirkt die Kapazitation Modifikationen der Spermienoberfläche und dadurch die Fähigkeit zur Akrosomreaktion. Das Resultat beider Reifungsvorgänge ist die Befruchtungsfähigkeit.

Als essentiell für die Befruchtungsfähigkeit vieler Säugerspermien hat sich die Fähigkeit zur Glykolyse erwiesen. Letztgenannte wird auch mit Kapazitationsereignissen in Zusammenhang gebracht. Ferner weist die Organisation der Glykolyse in Samenzellen Besonderheiten gegenüber der in anderen Zelltypen auf. Laktat oder Fettsäuren können von Spermien oxidiert werden, aber Glukose oder Fruktose nicht völlig ersetzen. WESTHOFF und KAMP lieferten 1997 eine erste Erklärung für dieses Phänomen mit der Hypothese, dass die besondere Aufgabe der Glykolyse darin besteht, ATP in den mitochondrienfreien Abschnitten, z.B. für die Geißelbewegung des Spermiums, bereitzustellen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das letzte, ATP-produzierende Enzym der Glykolysekette, die Pyruvatkinase (PK), untersucht. Eine umfassende Charakterisierung dieses Enzyms soll das Verständnis von Lokalisation, Aufbau und Funktion der Glykolyse in Säugerspermien erweitern.

Die Erforschung der Glykolyse in Säugerspermien ist auch anwendungsrelevant. Die abnehmende Fertilität bei Männern in den hoch entwickelten Industrieländern (JACOBI, 1999) ist ein bislang nicht verstandenes Phänomen. Neue Erkenntnisse zu den funktionellen Abläufen und zum Energiestoffwechsel in Säugerspermien, besonders während der Spermienreifung und Befruchtung, könnten für ein besseres Verständnis sorgen. Auf der

Grundlage neuen Wissens könnte fördernd und/oder hemmend in die Fortpflanzung eingegriffen werden, sei es um Unfruchtbarkeit zu behandeln oder neue Methoden zur Kontrazeption zu entwickeln. Ein weiterer Anwendungsbereich liegt darin, die Konservierung und Qualitätsbewertung von Spermien zu optimieren.

In diesem Kapitel wird zunächst der Weg von Säugerspermien von der Entstehung bis hin zur Befruchtung der Oozyte aufgezeigt. Anschließend werden die morphologischen und biochemischen Besonderheiten von Säugerspermien genauer betrachtet. Neben spermien-spezifischen Zellstrukturen und Proteinen wird das bisherige Wissen zum Stoffwechsel von Säugerspermien, und hier besonders zur Glykolyse, vorgestellt. Ein kurzer Abriss über das vorhandene Wissen zur somatischen und Spermien-PK soll das Kapitel beenden.

1.1 Die Entwicklung und Funktion von Säugerspermien

1.1.1 Spermatogenese

Die Entwicklung von reifen Spermien aus Stammzellen, den Spermatogonien, wird als Spermatogenese bezeichnet. Diese kann in vier Phasen unterteilt werden: der mitotischen Teilung und Differenzierung der diploiden Spermatogonien (Spermatogoniogenese oder Spermatozytogenese) folgen meiotische Reifeteilungen, welche über primäre und sekundäre Spermatozyten zur Bildung von haploiden Spermatiden führen. In der dritten Phase, der Spermio-genese, differenzieren sich die runden zu reifen, elongierten Spermatiden. Unter Spermiation versteht man die Freisetzung der ausdifferenzierten Spermatiden vom Keimzellepithel in das Lumen eines Hodenkanälchens. Die freigesetzten Keimzellen werden als Spermien bezeichnet (HOLSTEIN et al., 2003; BERGMANN, 2005).

Grundlage für die Spermientstehung bilden Urkeimzellen im embryonalen Hoden, die sich zu Spermatogonien entwickeln. Bei den meisten Säugern (z.B. Mensch, Eber, Bulle) unterliegen diese undifferenzierten Stammzellen der Spermienbildung von Beginn der Pubertät bis zum Lebensende kontinuierlich extensiven Mitoseteilungen. Hierdurch ist die Entstehung von Spermien bei gleichzeitiger Erhaltung eines Spermatogonien-Pools gewährleistet. Die Spermatogonien liegen in der Außenzone der Hodenkanälchen in direktem Kontakt mit der Basallamina der Tubuluswand. Anhand ihrer Lage im basalen Bereich des Keimepithels, ihrer Morphologie und der Anfärbbarkeit der Zellkerne unterscheidet man Spermatogonien vom Typ A („hell“ [„pale“] und „dunkel“ [„dark“]) und Typ B (Abbildung

1). Spermatogonien vom Typ A sind mitotisch aktiv und besitzen kein Heterochromatin im Kern. Mitotische Teilungen dieser Zellen führen über die Bildung von Typ A-Spermatogonien zu einem lebenslangen Stammzellpool für die Spermatogenese. Sie führen aber auch zur Bildung von Typ B-Spermatogonien, welche ebenfalls mitotisch aktiv sind, aber nicht mehr, wie Typ A, als Stammzellen fungieren. Die Entstehung von Typ B-Spermatogonien stellt also den ersten Schritt in der Keimzellentwicklung dar. Spermatogonien vom Typ B besitzen reichlich Heterochromatin im Kern. Sie lösen sich von der Basallamina des Hodenkanälchens ab, treten in die Meiose ein und liefern nach Verdopplung des DNA-Gehaltes die primären Spermatozyten (ABOU-HAILA und TULSIANI, 2000; HOLSTEIN et al., 2003; BERGMANN, 2005).

Die Zellteilungen der Spermatogonien sind gewöhnlich unvollständig, so dass die resultierenden Zellen über Cytoplasmabrücken miteinander verbunden sind. Dies führt zu einem Syncytium der Zellen, die aus einer Ursprungszelle entstanden sind und ermöglicht eine synchrone Entwicklung der Keimzellen. Die Interzellularbrücken bleiben bei Spermatogonien und Spermatozyten erhalten und werden erst während der Reifung der Spermatischen aufgelöst (HOLSTEIN et al., 2003).

Primäre Spermatozyten sind die größten Keimzellen des Keimepithels und liegen in der luminal an die Spermatogonien grenzenden Schicht. Die Reduktionsteilung (1. meiotische Teilung, 1. Reifeteilung) einer primären Spermatozyte führt zur Bildung von zwei haploiden sekundären Spermatozyten. Diese treten kurz darauf in die Äquatorialteilung (2. meiotische Teilung, 2. Reifeteilung) ein, wodurch die haploiden runden Spermatischen entstehen. Diese Zellen erfahren dann eine umfangreiche Differenzierung zu reifen elongierten Spermatischen, die als Spermiogenese bezeichnet wird. Hierbei treten grundlegende strukturelle und biochemische Veränderungen ein. In Anbetracht der deutlichen Gestaltänderung der Spermatischen von rund zu elongiert, sind vier parallel ablaufende Prozesse entscheidend: die Bildung des Spermienkopfes (Abschnitt 1.2.1), des dem Kern aufgelagerten Akrosoms (Unterabschnitt 1.2.1.2) und des Flagellums (Abschnitt 1.2.2) sowie die Abschnürung von überflüssigem Cytoplasma als Residualkörper. Die Freisetzung der reifen elongierten Spermatischen (Spermiation) wird von Sertolizellen gesteuert. Die freigesetzten Keimzellen sind schlanke, hydrodynamisch geformte Spermien, welche, wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, aus Kopf, Mittel-, Haupt- und Endstück bestehen und morphologisch an ihre Funktion angepasst sind (ABOU-HAILA und TULSIANI, 2000; HOLSTEIN et al., 2003; BERGMANN, 2005).

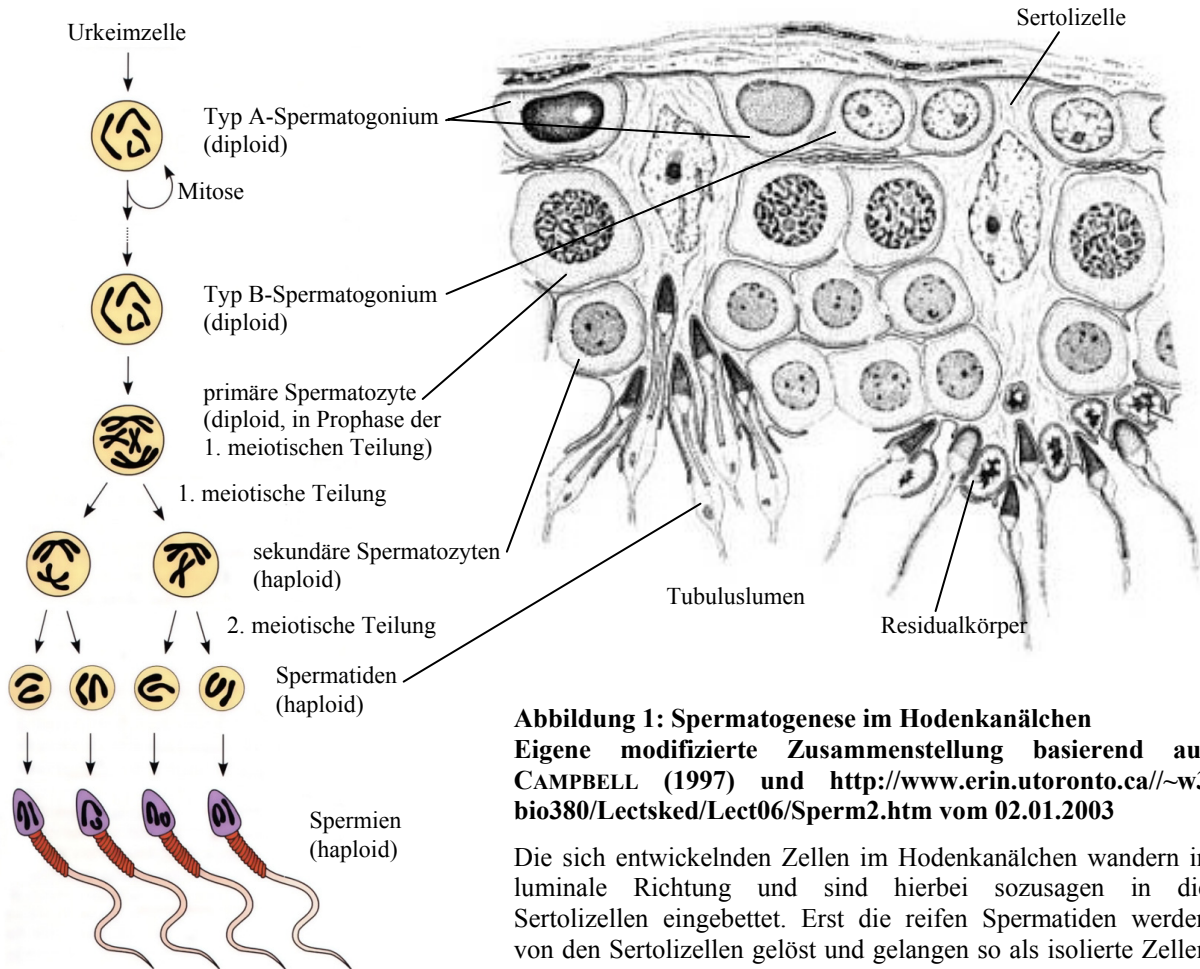


Abbildung 1: Spermatogenese im Hodenkanälchen
 Eigene modifizierte Zusammenstellung basierend auf
 CAMPBELL (1997) und <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio380/Lectsked/Lect06/Sperm2.htm> vom 02.01.2003

Die sich entwickelnden Zellen im Hodenkanälchen wandern in luminaler Richtung und sind hierbei sozusagen in die Sertolizellen eingebettet. Erst die reifen Spermatischen werden von den Sertolizellen gelöst und gelangen so als isolierte Zellen (Spermien) ins Lumen des Hodenkanälchens (Spermiation).

Während der Entwicklung der Spermatogonien zu Spermatischen wandern die Zellen, ihrem Entwicklungsgrad entsprechend, in luminaler Richtung. Hierbei stehen sie in allen Stadien mit Sertolizellen, welche die Funktion von Ammenzellen besitzen, in engem Kontakt (Abbildung 1). Sertolizellen sitzen gleichmäßig zwischen den Keimzellen verteilt und besitzen eine hoch irreguläre bis säulenförmige Gestalt. Sie erstrecken sich von der Basallamina bis zum Lumen des Hodenkanälchens und bilden u.a. die Blut-Hoden-Schranke. Durch die Verbindung lateraler Fortsätze der Sertolizellen über Tight Junctions wird das Keimepithel in zwei Kompartimente geteilt, ein basales und ein adluminales. Im basalen Kompartiment sind die Spermatogonien lokalisiert. Primäre Spermatozyten passieren nach Eintritt in die Meiose die Sertolizellbarriere und treten in das adluminale Kompartiment ein, wo sie vom Blut abgegrenzt vorliegen und somit vor Autoimmunreaktionen geschützt sind. Die Sertolizellen besitzen also wichtige Funktionen für die Spermatogenese. Neben mechanischer und nährnder Unterstützung sowie dem Schutz der reifenden Keimzellen über die Blut-Hoden-Schranke und die Kontrolle der Spermatischenfreisetzung, sind sie die einzigen

Zellen im Keimepithel, die Rezeptoren für Testosteron und FSH besitzen und somit hormonell stimulierbar sind (HOLSTEIN et al., 2003; BERGMANN, 2005).

Wichtig für die Spermatogenese sind auch die Leydigschen Zellen, welche die Mehrheit der Zellen im intertubulären Raum darstellen. Sie treten in Ansammlungen auf, welche Kapillaren umgeben, und produzieren und sezernieren unter anderem Androgene. Bedeutend ist beispielsweise das Testosteron, welches aktivierend auf die Initiation, Entwicklung und Erhaltung der Spermatogenese wirkt (HOLSTEIN et al., 2003). Über die Sertolizellen kann dieses Testosteron auf die Keimzellentwicklung einwirken.

In Abbildung 2 ist in schematischer Darstellung ein Schnitt durch Hodengewebe gezeigt. Die Hodenkanälchen bestehen aus der Lamina propria, einer Wand aus kontraktile Zellen und kollagenen Fasern sowie dem davon umgebenden Keimepithel. Im Keimepithel sind die verschiedenen Stadien der Keimzellentwicklung sowie die Sertolizellen gekennzeichnet. Zwischen den Hodenkanälchen sind neben den o.g. Leydigschen Zellen, Mikrogefäße, Nervenfasern, Makrophagen, Fibroblasten, Bindegewebszellen und Lymphgefäße gelegen (HOLSTEIN et al., 2003).

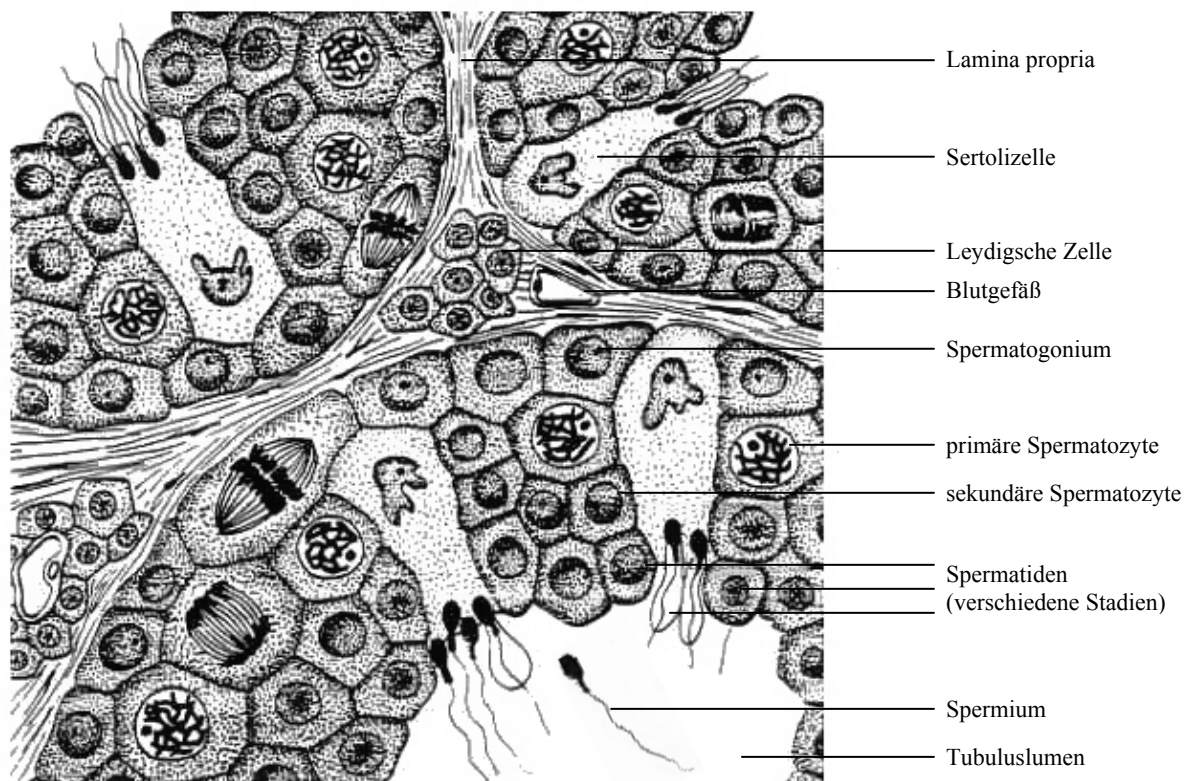


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Hodengewebeschnitts
 Modifizierte Darstellung basierend auf http://cohen.svt.free.fr/1L/procreation/testicule_et_spz.jpg vom 03.11.2006

1.1.2 Reifung von Säugerspermien im Nebenhoden sowie im weiblichen Genitaltrakt

Vom Lumen der Hodenkanälchen gelangen die Spermien in die Nebenhoden (Epididymes). Sie passieren zunächst das proximale Segment (Caput epididymidis) und werden im distalen Segment (Cauda epididymidis) bis zur Ejakulation gespeichert. Im Nebenhoden findet die 1. Reifephase statt. Veränderungen der Zelloberfläche ermöglichen verschiedene Zell-Zell-Erkennungsmechanismen (HARAYAMA et al., 2000), insbesondere die, welche für die Bindung der Spermien an die Zona pellucida und an das Ei bedeutsam sind. Daneben wird eine Agglutination von Spermien möglich (DACHEUX et al., 1983; FLAHERTY et al., 1993). Dieses „Zusammenkleben“ der Samenzellen kann, ebenso wie die anderen genannten Zell-Zell-Erkennungsmechanismen, durch Faktoren in den Sekreten des männlichen Fortpflanzungstrakts beeinflusst (vgl. HARAYAMA et al., 2000) und somit gesteuert werden.

Des Weiteren befreit sich das Spermium in den Nebenhoden von Zellbestandteilen, die es für seine weitere Funktion nicht mehr benötigt. Während bei der Reifung der Spermatiden der Hauptanteil des Cytoplasmas als Residualkörper abgeschnürt wird, ist ein kleiner Anteil an Cytoplasma gewöhnlich auch nach der Spermiation noch erhalten. Dieser sitzt bei Spermien im Hoden und im Caput epididymidis des Nebenhodens als so genannter Cytoplasmatropfen nahe der proximalen Region des Flagellums, d.h. nahe dem Verbindungsstück, und wandert in Richtung des Überganges zwischen Mittel- und Hauptstück, wo er bei Spermien im Cauda epididymidis vorwiegend zu beobachten ist (TOSHIMORI, 2003). Hier kommt es dann meist zur Abschnürung des Cytoplasmatropfens, wodurch auch Reste des Biosyntheseapparates, z.B. das endoplasmatische Retikulum oder der Golgi-Apparat, abgestoßen werden (BEDFORD, 1979; JOHNSON, 1995; KAMP und SCHMIDT, 2002). Durch diesen Vorgang wird das Spermium auf die Aufgabe des Erbguttransportes vorbereitet. Sowohl die günstigere hydrodynamische Gestalt als auch der Gewichtsverlust fördern die Fähigkeit zu aktiver Bewegung der Samenzelle, die im Nebenhoden erlangt, aber noch nicht ausgeübt, und in Verbindung mit Plasmamembran-Modifikationen (JONES, 1989) gebracht wird. Es handelt sich hierbei um die so genannte progressive Motilität, d.h. um eine schnelle Vorwärtsbewegung mit niedrigem Amplitudenschlag des Flagellums (KAMP und SCHMIDT, 2002). Spermien, die man aus den Nebenhoden entfernt, bewegen sich aktiv. Im Nebenhoden selbst werden sie jedoch durch ein leicht saures Sekret der Nebenhodengänge gehemmt (SPORNITZ, 1996). Man spricht daher von der Säurestarre des Spermiums.

Kommt es beim Geschlechtsakt zur Ejakulation, d.h. zur peristaltischen Kontraktion der glatten Muskulatur von Nebenhodengang, Samenleiter, Samenbläschen und Prostata sowie des tiefen Beckenbodens, so gelangen die Spermien von den Epididymiden über die Samenleiter und die Ducti ejaculatorii zur Harnröhre und werden schließlich durch diese in der Nähe des äußeren Gebärmuttermundes freigesetzt. Im Fortpflanzungstrakt des Mannes werden die Samenzellen (in Hodensekret) mit den Sekreten von drei akzessorischen Drüsen vermischt. Es handelt sich hierbei um die paarig vorliegenden Samenbläschen, die Vorsteherdrüse (Prostata) und die paarigen bulbourethralen Drüsen. Die Sekrete dieser Drüsen weisen unterschiedliche Eigenschaften und Zusammensetzungen auf und dienen sowohl dem Transport und der Nährstoffversorgung der Spermien als auch der Neutralisierung des sauren Milieus in Harnröhre und Vagina (vgl. CAMPBELL, 1997). Daneben sind Effekte verschiedener Inhaltsstoffe des Seminalplasmas, welches sich aus den Sekreten der Nebenhoden und der akzessorischen Drüsen zusammensetzt, auf die Motilität, Kapazitation und Fertilität der Spermatozoen beobachtet worden (MARDEN und WERTHESSEN, 1956; NISHIKAWA, 1975; DOTT et al., 1979; TSO und LEE, 1980; DE LAMIRANDE et al., 1984; HARAYAMA et al., 2000; DE JONGE, 2005). So wird die beschriebene Säurestarre des Spermiums in den Nebenhoden durch die während der Ejakulation beigefügten Sekrete aufgehoben (SPORNITZ, 1996).

Die durch die Sekrete motil gewordenen Spermien sind noch nicht in der Lage an die Oozyte zu binden, die Akrosomreaktion zu vollziehen und somit in der Folge das Ei zu befruchten. Sie müssen zuvor im weiblichen Genitaltrakt eine 2. Reifephase, die so genannte Kapazitation, durchlaufen. Diese findet im Uterus und im Ovidukt statt und umfasst eine Serie biochemischer und funktioneller Modifikationen der Spermatozoen, die bisher nur zum Teil verstanden sind. Das wahrscheinliche Resultat dieser Reifungsvorgänge ist die Befruchtungsfähigkeit.

Molekulare Veränderungen in Kopf und Flagellum einer Samenzelle führen während der Kapazitation zu zwei fundamentalen Effekten: Zum einen wechselt das Spermium von progressiver Bewegung zu Hyperaktivität (DE LAMIRANDE et al., 1997; BEDFORD, 1998). Unter Hyperaktivität versteht man eine weniger schnelle Bewegung, die aber mit hohem kraftvollen Amplitudenschlag erfolgt (vgl. SCHMIDT und KAMP, 2004). NAABY-HANSEN et al. (2002) sprechen von einer Peitschenschlag (whiplash)-ähnlichen Bewegung des Spermischwanzes. Der erhöhte Energieumsatz der Spermatozoen nach dieser 2. Reifephase ist höchstwahrscheinlich auf diese Motilitätsveränderung zurückzuführen. Zum anderen erhält das Spermium, wahrscheinlich über Modifikationen der Oberfläche, die Fähigkeit zur Akrosomreaktion.

Welche molekularen Ereignisse nun aber zu diesem funktionellen Wandel führen, ist nur ansatzweise bekannt. Mit Hilfe von Versuchen *in vitro* und *in vivo* an Säugerspermien wurden mögliche Kapazitationsfaktoren getestet. Notwendig sind Proteine wie Albumin, die Energiesubstrate Glukose, Pyruvat oder Laktat sowie die Signalsubstanzen Ca^{2+} und HCO_3^- (DOW und BAVISTER, 1989; VISCONTI et al., 1995a,b; LECLERC et al., 1996; OSHEROFF et al., 1999). Albumin ist ein Hauptprotein in den Sekreten des weiblichen Genitaltrakts (YANAGIMACHI, 1994). Glukose steht sowohl in den Sekreten der akzessorischen Drüsen des männlichen Fortpflanzungstraktes als auch im Eileitersekret als Substrat bereit (YANAGIMACHI, 1994; KAMP und SCHMIDT, 2002).

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Kapazitation mit molekularen Modifikationen und einer Reorganisation der Plasmamembranmoleküle (Proteine, Glykoproteine und Lipidkomponenten) einhergeht (BEDFORD, 1991; YANAGIMACHI, 1994; FLESCH und GADELLA, 2000). Eine Oberflächenadsorption von Seminalplasmaproteinen/-glykoproteinen durch die ejakulierten Samenzellen wurde außerdem beschrieben (YANAGIMACHI, 1994). Auch die Verminderung des Cholesteringehaltes der Plasmamembran scheint für die Akrosomreaktion unabdingbar (DOW und BAVISTER, 1989; CROSS, 1998) und wird durch das Albumin im Genitaltrakt des Weibchens begünstigt (DAVIS, 1976, 1980; DAVIS et al., 1979; GO und WOLF, 1985; LANGLAIS und ROBERTS, 1985; SUZUKI und YANAGIMACHI, 1989; DOW und BAVISTER, 1989; YANAGIMACHI, 1994; CROSS, 1998). Albumin vermittelt die Verminderung des Cholesteringehaltes der Plasmamembran, jedoch nur, wenn Bikarbonat gleichzeitig zur Verfügung steht (FLESCH und GADELLA, 2000). Die Umgestaltung der Plasmamembran der Spermien hat ein verändertes Barriere- und Signalverhalten zur Folge. Sie führt zu gesteigerter Fluidität und Permeabilität der Membran durch den Cholesterinverlust (YANAGIMACHI, 1994) sowie zu Modifikationen von Ionenkanälen im Plasmalemma und so zu einem erhöhten transmembranen Flux von Ionen (BEDFORD, 1991; YANAGIMACHI, 1994) sowie zu einer Verminderung des Membranpotentials (TRAVIS et al., 2001).

Bei der Signaltransduktion während der Kapazitation sind Ca^{2+} -, HCO_3^- - sowie Zn^{2+} -Ionen beteiligt, vermutlich auch Na^+ - und K^+ -Ionen. Des Weiteren wurde die Beteiligung reaktiver O_2 -Spezies, cAMP und Adenylatzyklase sowie von Proteinkinasen und -phosphatasen beschrieben (vgl. BALDI et al., 1996, 2002; DE LAMIRANDE et al., 1997; VISCONTI und KOPF, 1998; FLESCH und GADELLA, 2000). Die Signaltransduktionswege, welche die äußeren Reize in die beobachteten Effekte während der Kapazitation übersetzen, sind nur in Ansätzen bekannt. Jedoch muss hier von einer Vielzahl, teilweise sehr vielschichtig wirkender Faktoren ausgegangen werden.

Die Kapazitation führt also zu grundlegenden Modifikationen der Säugerspermien, deren Bedeutung wahrscheinlich darin besteht, die Befruchtungsfähigkeit zeitlich und lokal optimal einzustellen.

1.1.3 Morphologie des reifen Säugerspermiums

Spermien zählen zu den kleinsten Körperzellen und können in ihrer Morphologie, abhängig von der Tierart sehr unterschiedlich sein. In Säugetieren sind sie jedoch weitgehend gleich gestaltet, so dass die in Abbildung 3 gezeigte Ultrastruktur eines Eberspermiums allgemeinere Gültigkeit besitzt. Wichtige Unterscheidungsmerkmale der Säugerspermien verschiedener Spezies sind die Form des Kopfes sowie die Länge des Flagellums (CUMMINS und WOODALL, 1985; MEISNER et al., 2005).

Säugerspermien sind lang gestreckte und polar organisierte motile Zellen, die verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen Funktionen besitzen. Sie bestehen aus Spermienkopf und -flagellum. Der Spermienkopf enthält den haploiden Zellkern mit dem stark kondensierten Chromatin, welcher für die Befruchtung zur Eizelle transportiert werden muss. Im vorderen Bereich wird der Kern von einer spermien-spezifischen Organelle, dem Akrosom, ummantelt. Dieses wird unterteilt in einen anterioren Bereich (anteriores Akrosom, akrosomale Kappe) und einen posterioren Bereich (posteriores Akrosom, equatoriales Segment). Es enthält lysosomale Enzyme, welche nach Freisetzung die lokale Auflösung und das Durchdringen der Zona pellucida-Matrix des Eies erleichtern. Akrosomale Matrixproteine kontrollieren vermutlich u.a. die Verteilung der hydrolytischen Enzyme im Akrosom und deren Freisetzung bei der Akrosomreaktion (vgl. GUPTA, 2005). Der Zellkern wird direkt umgeben von einer dichten Schicht, der perinuklearen Substanz (oder perinuklearen Theka), welche aus der subakrosomalen Substanz im akrosomalen Bereich und der postakrosomalen Substanz im hinteren (postakrosomalen) Bereich des Kopfes besteht.

Im Übergangsbereich zwischen Spermienkopf und -flagellum, welcher als Verbindungsstück oder Hals bezeichnet wird, befindet sich eine Art Scharnier aus der Implantationsfossa mit der Basalplatte des Kerns, in die das sog. Capitulum hineinragt (FAWCETT und PHILLIPS, 1969). Dieses bedeckt die proximale Centriole und Überreste der distalen Centriole, aus welcher die Mikrotubuli entstammen, sowie pericentriolare Komponenten (TOSHIMORI, 2003). Das Gelenk im Spermienhals führt zu einer flexiblen Verbindung zwischen Kopf und Flagellum.

Das Spermienflagellum wird in Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt und von einem Axialfilament (auch Axonem genannt) zentral durchzogen. Dieses weist die typische 9+2-

Anordnung der Mikrotubuli eukaryotischer Cilien und Geißeln auf. Zwei zentrale einzelne Mikrotubuli werden demnach peripher von 9 Mikrotubulipaaren umgeben (Abbildung 5). Das Axonem bildet nun durch den Gleitfilamentmechanismus (vgl. Unterabschnitt 1.2.3.1) die Grundlage für die Bewegung des Spermischwanzes. Seine Dynein-ATPasen hydrolysieren ATP zu ADP und anorganischem Phosphat und liefern so freie Energie für den Flagellenschlag.

Das Axonem wird von den spermien-spezifischen dicken Filamenten (Unterabschnitt 1.2.2.2) umgeben, die wahrscheinlich u.a. eine Stütz- und Schutzfunktion besitzen (BALTZ et al., 1990). Im Mittelstück des Flagellums wird jedes der 9 Mikrotubulidupletts von einem dicken Filament begleitet. Im mittleren oder posterioren Hauptstück von Säugerspermien wird nach FAWCETT (1975) die Anzahl der dicken Filamente auf 7 reduziert.

Dem Verbindungsstück des Spermiums folgt das relativ kurze Mittelstück des Flagellums (Mittelstücklängen verschiedener Säuger in CUMMINS und WOODALL, 1985), wo alle Mitochondrien vorliegen und die dicken Filamente umhüllen. Im distal folgenden Hauptstück fehlt die Mitochondrienhülle. An ihre Stelle rückt eine netzartige Struktur, die fibröse Scheide (Unterabschnitt 1.2.2.1), welche typisch für die Spermien von Säugern (FOUQUET und KANN, 1994) sowie einiger Reptilien (JAMIESON et al., 1996) ist. Sie besteht aus zwei lateralen, longitudinalen Säulen, die über zahlreiche transversale Rippen miteinander verbunden sind (SI und OKUNO, 1995). Sie ummantelt die dicken Filamente, stützt und liefert flagellare Flexibilität (FAWCETT und PHILLIPS, 1969). Das Hauptstück verjüngt sich in distaler Richtung und die fibröse Scheide endet schräg zur Längsachse des Flagellums (WESTHOFF, 1996). Auch die dicken Filamente laufen allmählich aus, so dass im Endstück des Flagellums nur noch Reste des Axonems zu finden sind (TOSHIMORI, 2003). Die Mikrotubulidupletts des Axonems enden auf unterschiedlichen Höhen und liegen im Endstück scheinbar ungeordnet vor (WESTHOFF, 1996).

Bei ejakulierten Säugerspermien ist der Cytoplasmotropfen meist abgeschnürt und das Cytoplasma somit auf ein Minimum reduziert. Das verbleibende Cytoplasma befindet sich hauptsächlich im Mittelstück (STARCK, 1975) und in einem Cytoplasmasaum im Bereich des Verbindungsstückes, welcher als Überbleibsel des Abschnürungsprozesses anzusehen ist (BUSCH et al., 1991). Nicht selten sind im Ejakulat aber auch Spermien zu beobachten, welche noch einen Cytoplasmotropfen im Bereich des Mittelstücks besitzen. Daneben sind auch abgeschnürte Cytoplasmotropfen zu finden.

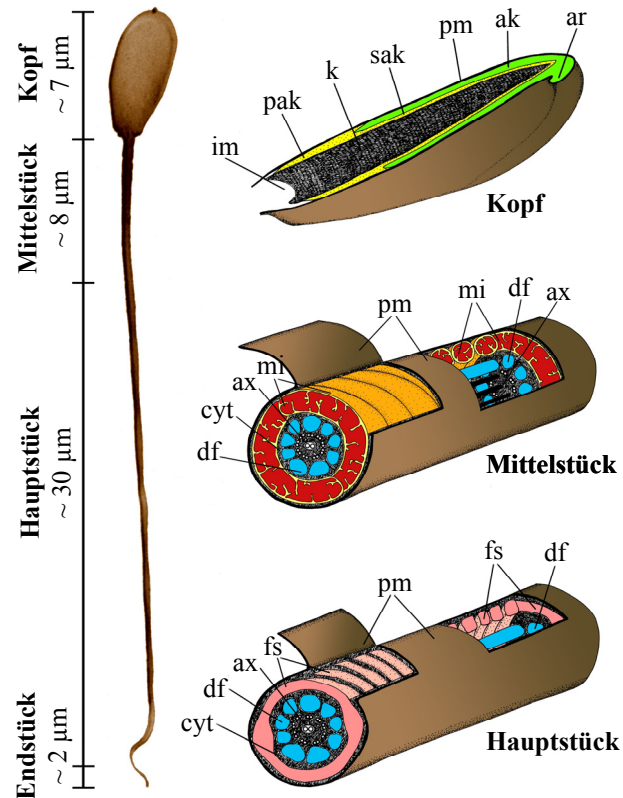


Abbildung 3: Ultrastruktur eines Eberspermiums

In schematischer Darstellung sind folgende für Säugerspermien typische Zellstrukturen gezeigt:

ak, Akrosom; ar, akrosomaler Rand; ax, Axialfilament, Axonem; cyt, Cytoplasma; df, dicke Filamente; fs, fibröse Scheide; im, Implantationsfossa; mi, Mitochondrien; k, Zellkern; pak, postakrosomale Substanz; pm, Plasmamembran; sak, subakrosomale Substanz.

1.1.4 Besamung und Befruchtung

Im englischen Sprachgebrauch wird der Begriff „fertilization“ (deutsch: Befruchtung) verwendet, um die gesamten Interaktionen zwischen Spermium und Ei mit dem Endresultat der Verschmelzung ihrer Zellkerne zu beschreiben. Der Ausdruck „insemination“ (deutsch: Besamung) wird im Englischen nur selten, meist in Zusammenhang mit künstlicher Befruchtung („artificial insemination“) verwendet. Im deutschen Sprachgebrauch hingegen wird die „fertilization“ oftmals in zwei Vorgänge unterteilt: Der Begriff „Besamung“ bezeichnet den Eintritt der Samenzelle in das Ei, der Ausdruck „Befruchtung“ steht für die Fusion des männlichen und weiblichen Gametenkerns unter Bildung der Zygote. Es entsteht hierdurch eine doppelte Wortbedeutung für den Begriff „Befruchtung“, zum einen als Übersetzung aus dem Englischen und zum anderen im deutschen Sprachgebrauch, welcher zu Verwirrungen führen kann. Im Folgenden werden die Begriffe im deutschen Sinne verwendet.

Das Eindringen eines Spermiums in eine Eizelle wird also als Besamung bezeichnet. Die erste Barriere für das Spermium stellt die viskose Cumulus oophorus-Masse dar, eine Eihülle aus Follikelzellen und einer interzellulären Matrix aus sauren Mucopolysacchariden, Hyaluronsäure und Proteinen. Diese wird vermutlich durch enzymatische Spaltungen aufgelockert, so dass sie vom Spermium überwunden werden kann. Die Herkunft dieser Enzyme, vermutlich Hydrolasen und eventuell Proteasen, ist nicht geklärt. Sie könnten auf der Spermienoberfläche exponiert sein und so in der direkten Umgebung der Samenzelle wirken. Die Spermien könnten sie aus der Umgebung an die Spermienoberfläche gebunden haben, z.B. aus den luminalen Flüssigkeiten des Nebenhodens oder aus der Seminalflüssigkeit. Andererseits könnten akrosomale Enzyme vom Innern an die Spermienoberfläche gebracht worden sein. Spontane Akrosomreaktionen nur einiger Spermien, welche den noch intakten Zellen die Cumulus-Passage erleichtern, wären ebenfalls möglich (TULSIANI et al., 1998).

Die zweite Hürde, die das Spermium auf seinem Weg in das Ei überwinden muss, ist die Zona pellucida. Sie besteht bei vielen Säugerarten aus drei Glycoproteinen (ZP1, ZP2 und ZP3 [WASSARMAN, 1988a] bzw. ZPA, ZPB und ZPC [HARRIS et al., 1994]), die während der Oogenese synthetisiert und sezerniert werden (WASSARMAN, 1988b) und ein 3-dimensionales Netzwerk aus nichtkovalent verbundenen Filamenten bilden (WASSARMAN, 1988a). Nach der Passage der Cumulus oophorus-Masse bindet das akrosomintakte Spermium über Oberflächenrezeptoren artspezifisch an die extrazelluläre Matrix des Eies, wahrscheinlich primär an Glycan- bzw. Oligosaccharidanteile des ZP3 (=ZPC) (FLORMAN et al., 1984; FLORMAN und WASSARMAN, 1985; TULSIANI et al., 1998), was als wichtigster Auslöser der Akrosomreaktion nachgewiesen wurde (WASSARMAN, 1988a; NAKANO et al., 1996; TSUBAMOTO et al., 1999). Man spricht von der primären Spermium-ZP-Bindung, welche der sekundären nach der Akrosomreaktion gegenübersteht. Die primäre Bindung ist dadurch gekennzeichnet, dass das Akrosom noch intakt ist und dass nur Proteine der apikalen Plasmamembran des Spermienkopfes beteiligt sind (FLESCH und GADELLA, 2000). In Abschnitt 1.1.2 wurde beschrieben, dass die Kapazitation zur Ermöglichung einer kontrollierten akrosomalen Exozytose notwendig ist. Ein Grund hierfür könnte in der Modifikation von primären ZP-Rezeptoren liegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität des Spermiums für ZP während der Kapazitation stark ansteigt (YANAGIMACHI, 1994; HARKEMA et al., 1998). Als mögliche primäre ZP-Rezeptoren bzw. als Teile dieser werden u.a. ein 95 kDa-Protein (p95) sowie das Enzym β 1,4-galactosyltransferase der Spermien diskutiert. Des Weiteren wird vermutet, dass kleine Spermien-assoziierte Proteine, Adhesine, zu einer festeren Bindung an die Zona pellucida

beitragen und somit bspw. eventuelle Immunreaktionen gegen die Samenzelle unterdrücken könnten (vgl. FLESCH und GADELLA, 2000).

Die Überwindung der Zona pellucida wurde schon vor etwa 40 Jahren mit den sauren Glycohydrolasen im Spermienakrosom in Verbindung gebracht (DE DUVE, 1963). Hiermit war der Grundstein für die Aufklärung der Akrosomreaktion gelegt. Heute liegt umfangreiche Literatur zu dieser Thematik vor, die molekularen Vorgänge bei der Akrosomreaktion sind jedoch noch immer nicht vollständig geklärt. Es soll hierzu nur ein kurzer Überblick gegeben werden.

Die Akrosomreaktion folgt der Bindung des Spermiums an die Zona pellucida. Hierbei kommt es zu einer Verschmelzung der Spermienplasmamembran mit der darunter liegenden äußeren Akrosommembran. Man spricht hierbei oft von multiplen Fensterungen zwischen der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran (YANAGIMACHI, 1994) sowie von einer folgenden exozytotischen Ausschüttung akrosomaler Enzyme. Bei den Enzymen im Spermienakrosom handelt es sich um saure Glycohydrolasen, Proteinasen, Esterasen, Sulfatasen, Phosphatasen und Phospholipasen (vgl. TULSIANI et al., 1998 und GUPTA, 2005), welche nach Freisetzung zu einer lokalen Auflösung der ZP-Matrix in der unmittelbaren Umgebung des Spermiums führen könnten.

Wie es als Folge der ZP-Bindung zur akrosomalen Exozytose kommt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Hier sollen nur einige bekannte Aspekte angesprochen werden. Die primäre Bindung der Spermienoberflächenrezeptoren an das Zona pellucida-Glycoprotein ZP3 führt vermutlich zur Aggregation (LEYTON und SALING, 1989a; FLESCH und GADELLA, 2000) und Phosphorylierung (LEYTON und SALING, 1989b; BURKS et al., 1995) der Rezeptoren sowie nachfolgend zu einer Signalkaskade mit dem endgültigen Ergebnis der akrosomalen Exozytose. So kommt es in der Folge der Rezeptoraggregation und -phosphorylierung zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (FLORMAN et al., 1989, 1992; BAILEY und STOREY, 1994; BREWIS et al., 1996). Dieser Anstieg wird auf entscheidende Veränderungen im Spermium zurückgeführt: Der intrazelluläre pH-Wert wird, anscheinend u.a. über ein G_i -Protein vermittelt (LEE und STOREY, 1989; FLORMAN et al., 1989, 1992; ZANEVELD et al., 1991; ARNOULT et al., 1996), erhöht und es kommt zur Depolarisierung der Spermienplasmamembran über die Aktivierung wenig selektiver Kationenkanäle. Eine Folge dieser Änderungen ist die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (FLORMAN, 1994; ARNOULT et al., 1996).

Wie auch bei der Kapazitation spielt das Ca^{2+} eine zentrale Rolle im Signaltransduktionsgeschehen der Akrosomreaktion. Hier konnte eine Abhängigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} (ADEOYA-OSIGUWA und FRASER, 1993; BALDI et al., 1995) wie auch ein

erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel nach Initiation durch ZP3 (FLORMAN et al., 1989, 1992; BAILEY und STOREY, 1994; BREWIS et al., 1996) sowie durch Progesteron (THOMAS und MEIZEL, 1989; BLACKMORE et al., 1990, 1991; BLACKMORE, 1993) gezeigt werden. Das Ca^{2+} in der Samenzelle aktiviert eine Reihe nachgeschalteter Enzyme [z.B. PLC in Humanspermien und PLA_2 (BALDI et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997)] und wurde als notwendig und ausreichend zur Sekretionsinitiation beschrieben (YANAGIMACHI und USUI, 1974; FLORMAN et al., 1998). Es handelt sich bei der Akrosomreaktion also um einen Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionsweg. Nun stellt sich jedoch die Frage, wie es durch die Bindung von Spermium und Ei zu einer Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels im Spermium kommt. Hier müssen offensichtlich sowohl extrazelluläre Ca^{2+} -„Vorräte“ als auch eine Ca^{2+} -Speicherung in der Samenzelle in Betracht gezogen werden. Zur Steigerung der intrazellulären Konzentration über extrazelluläres Ca^{2+} muss dieses die Plasmamembran überwinden. Hier sind Ionenkanäle, deren Durchlassstatus über G-Proteine, Spannungsänderungen über der Membran und/oder Ligandenbindung reguliert wird, von großer Bedeutung. Die ZP3-Bindung führt vermutlich zu einer, über die Aktivierung von Kationenkanälen, zu einer Membrandepolarisierung und zum anderen zu einer G_i -Protein-abhängigen intrazellulären Alkalisierung mit der Gesamtfolge der Öffnung spannungsabhängiger T-Typ Ca^{2+} -Kanäle (low voltage-activated) (LEE und STOREY, 1989; FLORMAN et al., 1989, 1992; ZANEVELD et al., 1991; FLORMAN, 1994; ARNOULT et al., 1996). Bei den ZP3-aktivierten Kationenkanälen handelt es sich um beschränkt selektive Kationenkanäle, welche Na^+ und viele divalente Kationen durchlassen, jedoch undurchlässig für große organische und für trivalente Kationen sowie komplett undurchlässig für organische und anorganische Anionen scheinen (FLORMAN, 1994; ARNOULT et al., 1996). Daneben werden auch Kationenkanäle vorgeschlagen, die durch zyklische Nukleotide (WEYAND et al., 1994), Progesteron (FORESTA et al., 1993b) und extrazelluläres ATP (FORESTA et al., 1996) geöffnet werden können und selektiver für monovalente Ionen sind (FLORMAN et al., 1998). Die Abgabe von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wird ebenfalls diskutiert. So wird z.B. eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Akrosom über IP_3 -Rezeptor-gekoppelte Ca^{2+} -Kanäle in der äußeren akrosomalen Membran vermutet (WALENSKY und SNYDER, 1995). Ferner wurde das Ca^{2+} -Bindungsprotein Calreticulin im Rattenakrosom nachgewiesen (NAKAMURA et al., 1993). Neben dem Ca^{2+} könnten auch Flüsse anderer Ionen über die Spermienplasmamembran eine bedeutende Rolle im Signaltransduktionsnetzwerk spielen. Nachgewiesen sind Flüsse von Na^+ (ADEOYA-OSIGUWA und FRASER, 1993; FORESTA et al., 1993b), K^+ (FRASER und GALLOSTRA-BARRI, 1994), Cl^- (WISTROM und MEIZEL, 1993; BLACKMORE et al., 1994; TURNER et al., 1994; MELANDREZ und MEIZEL, 1995), Bikarbonat

(SAUBER und MEIZEL, 1995) und H^+ (ADEOYA-OSIGUWA und FRASER, 1993; FORESTA et al., 1993b; FLORMAN et al., 1995). Die Beteiligung von u.a. Na^+ -Kanälen, Na^+/Ca^{2+} -Austauschern und Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen ist im Gespräch. Die Ionenspezifität der verschiedenen Ionenkanaltypen in den Spermienmembranen wie auch die Bewegungsrichtung der Ionen scheint also sehr wichtig bei der Durchführung der Akrosomreaktion zu sein.

Die Regulation der Akrosomreaktion bzw. die Verhinderung spontaner, vorzeitiger Akrosomreaktionen ist ein immens wichtiges Utensil der Natur, um die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung zu erhöhen bzw. überhaupt zu gewährleisten. Hierzu sollte man wissen, dass ein Spermium, welches in einer gewissen Entfernung vom Ei bereits eine Akrosomreaktion vollzieht, nur eine herabgesetzte Fähigkeit besitzt, die erste Barriere, die Cumulus oophorus-Matrix, zu überwinden sowie an die zweite, die Zona pellucida, zu binden. Ein Spermium, welches nicht in der Lage ist eine Akrosomreaktion durchzuführen, wird nicht über die ZP-Barriere gelangen und somit das Ei nicht befruchten können (FLORMAN et al., 1998). Eine bedeutende Rolle bei der Regulation der AR nimmt wahrscheinlich die Kapazitation ein. Hier wird das Spermium, wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, in vielfältiger Weise modifiziert; es erhält u.a. die Fähigkeit die Cumulus oophorus-Matrix zu überwinden und an die Zona pellucida zu binden (BALDI et al., 1996). Eine Vorbereitung von Spermienionenkanälen für ihre Funktionen bei der Akrosomreaktion während bzw. durch die Kapazitation erscheint möglich (vgl. mögliche Modulationsvorgänge für spannungsgesteuerte T-Typ Ca^{2+} -Kanäle in FLORMAN et al., 1998). Auch ein Niedrighalten des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels ist zur Verhinderung einer vorzeitigen Akrosomreaktion vermutlich sehr wichtig (DRAGILEVA et al., 1999; FENG et al., 2006). Ferner könnte man von einer Kontrolle bzw. Beeinflussung des Spermiums und folglich der AR über die „richtige“ Umgebung (Stimuli in Ovidukt- und Follikularflüssigkeiten sowie in der Cumulus-Matrix; ZP3; extrazelluläres Ca^{2+} ; etc.) sprechen und als steuernde Faktoren schließlich auch die quasi-vorprogrammierten Signalwege und ihre „Cross-talks“ ansehen.

Die Akrosomreaktion führt zur Exponierung der inneren akrosomalen Membran. Diese bildet folglich eine kontinuierliche Membran mit der Plasmamembran und wird somit zu einem Teil der äußeren Barriere der Spermienzelle. Auf diesem Membranabschnitt werden nun intra-akrosomale Proteine exponiert, welche mit der Zona pellucida interagieren. Es kommt hierdurch zu einer vermutlich festeren Bindung des akrosomreagierten Spermiums an die Zona pellucida (und hier wahrscheinlich v.a. an ZP1 [= ZPA]), welche als sekundäre Spermium-ZP-Bindung bezeichnet wird (FLESCH und GADELLA, 2000). Auf welche Art das

Spermium die Zona pellucida überwindet, wird kontrovers diskutiert. Die Theorie der lokalen Auflösung der Zona durch die Enzyme des Akrosoms war lange Zeit unbestritten und wird selbst heute noch von vielen Autoren als Fakt beschrieben. Die hydrolytische und proteolytische Aktivität der ausgeschütteten Akrosomenzyme führt hierin, eventuell gepaart mit der enzymatischen Aktivität gewisser Spermienrezeptoren der sekundären ZP-Bindung (Acrosin, PH-20), zu einer lokalen Verdauung der Zona pellucida, wobei das Spermium nach und nach durch erneute Wechsel seiner Bindungspartner die ZP überwinden könnte (FLESCH und GADELLA, 2000). Obwohl gezeigt werden konnte, dass lösliche Extrakte des Akrosoms die Zona pellucida verformen sowie manchmal auflösen können, dass die Akrosomreaktion eine Voraussetzung für das Durchdringen der Zona darstellt und dass die Befruchtung in der Anwesenheit von Enzyminhibitoren ausbleibt, stehen dieser Theorie bei Betrachtung der Placentatiere (Eutheria) allerdings begründete Zweifel gegenüber. So zeigte sich z.B., dass die lokale Ausschüttung von löslichen akrosomalen Enzymen zu keinem offensichtlichen Effekt auf der Zona pellucida-Oberfläche führt und dass die o.g. Enzyminhibitoren auch die Akrosomreaktion sowie die Zerstreuung der Akrosommatrix verhindern können. Des Weiteren führt die Akrosomreaktion, neben der Ausschüttung von Enzymen, wie oben beschrieben, zur Exponierung der inneren akrosomalen Membran, welche die Notwendigkeit der Akrosomreaktion zum Durchdringen der Zona erklären könnte. Auch das ungewöhnlich asymmetrische Design des Spermienkopfes bei den Eutheria, könnte ein Überwinden der, im Gegensatz zu den Beuteltieren (Marsupiala) sehr viel Proteolyse-resistenteren, Zona pellucida mittels mechanischer Kraft begünstigen. So wird davon gesprochen, dass die Durchdringung der Zona nicht nur auf eine gerichtete Kraftausübung, sondern auch auf hebelartige oder oszillierende Bewegungen des Spermienkopfes zurückzuführen ist. Die hyperaktive Motilität der kapazitierten Samenzelle scheint ebenfalls notwendig. Daneben bestärkt die flache, spitz zulaufende, scharfe Form und die chemische Stabilisierung bzw. Verstärkung des Spermienkopfes, sowie die ungewöhnliche Kristallgitterorganisation, die Festigkeit und Elastizität der inneren akrosomalen Membran die Theorie des mechanischen Vordringens in den perivitellinen Raum. Mit diesen und weiteren Zweifeln, stellt BEDFORD (1998) die Akrosomreaktion als allein lytisches Ereignis bei den Placentatieren in Frage, wobei er keinen Beweis für eine absolute Nicht-Beteiligung der Lyse-Enzyme an der AR liefern kann.

Das Spermium, welches sich im perivitellinen Raum, also im Raum zwischen der Zona pellucida und dem Oolemma, befindet, besitzt nun die Möglichkeit mit der Plasmamembran der Oozyte zu interagieren. Bei diesem Vorgang handelt es sich um einen Prozess, welcher von FLESCH und GADELLA (2000) in drei Abschnitte unterteilt wird. Der Bindung der apikalen

Spermienspitze an das Oolemma folgen das Wenden der Spermienzelle zu einer Spermienkopfbindung im equatorialen Bereich mit dem fortwährenden hyperaktiven Schlagmuster des Flagellums und die anschließende Spermium-Oolemma-Fusion. Dies führt zur Aufnahme des Spermienkerns durch die Oozyte. Die folgende Fusion des männlichen und weiblichen Zellkerns (Befruchtung) beendet den Reproduktionsprozess.

1.2 Biochemische Besonderheiten von Säugerspermien

Säugerspermien weisen eindeutige Gemeinsamkeiten auf, die sie von somatischen Zellen unterscheiden. Offensichtlich ist dies bei Zellstrukturen, die nur in Spermien zu beobachten sind (z.B. Akrosom, perinukleare Theka, dicke Filamente und fibröse Scheide). Daneben ist auch das Auftreten zahlreicher Proteine in spermien-, keimzell- oder testisspezifischer Form auffällig. Auch für viele Stoffwechsellzyme wurden Formen beschrieben, die sich von den Isoformen in somatischen Zellen unterscheiden. Zudem scheint der Stoffwechsel in Säugerspermien deutlich kompartimentiert zu sein. So sind Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung durch die örtliche Beschränkung der Mitochondrien auf das Mittelstück des Flagellums nur dort möglich. Die Glykolyse scheint hingegen im Hauptstück des Flagellums an der fibrösen Scheide lokalisiert (STOREY und KAYNE, 1975; WESTHOFF und KAMP, 1997; BUNCH et al., 1998; TRAVIS et al., 1998; MORI et al., 1998) und für die lokale Energieversorgung der Dynein-ATPasen wichtig zu sein.

1.2.1 Der Spermienkopf: Träger des Erbmaterials

1.2.1.1 Der Zellkern und die perinukleare Theka

Während der Entwicklung runder Spermatiden zu reifen elongierten Spermatiden (nach Freisetzung: Spermien) wird das Volumen des Zellkerns deutlich reduziert. Die DNA wird hierbei so stark gepackt, dass Säugerspermien die kompakteste DNA in Eukaryoten aufweisen (WARD und COFFEY, 1991; FUENTES-MASCORRO et al., 2000). Neben dem Auftreten testisspezifischer Histone (vgl. GUPTA, 2005), wird ein großer Teil der Histone (ca. 85%) in den runden Spermatiden durch Übergangproteine („transition proteins“ TP1 und TP2) ersetzt. Diese wiederum werden in den elongierenden Spermatiden gegen Protamine (P1 und P2-Familie) ausgetauscht (AOKI und CARRELL, 2003; vgl. OLIVA, 2006), die während der Spermienreifung im Nebenhoden über Disulfidbrücken verbunden werden und somit zu einer Stabilisierung des Nukleoprotaminkomplexes führen (BALHORN et al., 1992). Protamine sind kleine, argininreiche Proteine, die nur postmeiotisch in der Spermatogenese exprimiert werden (GUPTA, 2005). Sie ermöglichen ein effizienteres Packen der DNA in Spermien im Vergleich zu somatischer DNA durch Histone (WARD und COFFEY, 1991). So können die

Spermatidenkerne während der Spermiogenese deutlich verkleinert werden. Vermutlich sorgen Umklammerungskräfte später für die artspezifische hydrodynamische Form des Zellkerns (Unterabschnitt 1.2.1.2). Weitere Funktionen der Protamine wurden von OLIVA und DIXON (1991) vorgeschlagen. So könnten sie z.B. dem Schutz des genetischen Materials vor Nukleasen oder Mutagenen und/oder der DNA-Reparatur während oder nach dem Austausch von Histonen dienen. Eine korrekte Kondensation des Chromatins ist essentiell für eine normale Spermatogenese und für die Fruchtbarkeit der entstehenden Spermien (vgl. TOSHIMORI, 2003). Nach der Besamung wird der Spermienkern wieder auf den Zellkern einer somatischen Zelle „umprogrammiert“ (MCLAY und CLARKE, 2003). Hierbei wird das Chromatin dekondensiert, spermienspezifische Protamine durch Histone der Oozyte ersetzt und das Chromatin in Nukleosomen gepackt.

Der Spermienkern wird von einem spermienspezifischen extranuklearen und elektronendichten Cytoskelettelement, der perinuklearen Theka, umgeben. Sie liegt im akrosomalen Bereich zwischen der Kernhülle und der inneren akrosomalen Membran (subakrosomale Substanz) und im postakrosomalen Bereich zwischen Kernhülle und Plasmamembran (postakrosomale Substanz oder Calyx). Die postakrosomale Substanz wird unterteilt in eine innere, der Kernhülle aufliegende („postacrosomal layer“) und eine äußere Schicht („postacrosomal sheath“), die über eine parakristalline Struktur („paracrystalline sheet“) fest mit der Plasmamembran verbunden ist (LONGO et al., 1987). Während sich die subakrosomale Substanz gleichzeitig zum Akrosom in runden und elongierenden Spermatiden entwickelt, bildet sich das postakrosomale Cytoskelett erst in den späten Spermatiden (FOUQUET und KANN, 1994), wenn die Manschette (vorübergehend auftretendes Cytoskelettelement in der Spermiogenese, Unterabschnitt 1.2.1.2) nach caudal wandert (MUJICA et al., 2003; TOVICH et al., 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass an der Manschette Proteine für die postakrosomale Substanz transportiert werden (TOVICH et al., 2004). Die perinukleare Theka ist resistent gegen Extraktion mittels nicht-denaturierenden Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen (LONGO et al., 1987). Einige Proteine der perinuklearen Theka wurden identifiziert [z.B. F-Aktin v.a. in Spermatiden sowie G-Aktin in späten Spermatiden und Spermien, Calicin, Cylicin I und II, Alkali soluble PT proteins, Multiple band polypeptides (MBPs), Thekine, Calmodulin, Spectrin (vgl. FOUQUET und KANN, 1994; OKO, 1998; MUJICA et al., 2003) und somatische Histone (TOVICH und OKO, 2003)]. Diese Cytoskelettproteine der perinuklearen Theka unterscheiden sich oft biochemisch von Cytoskelettproteinen somatischer Zellen (TOSHIMORI, 2003; MUJICA et al., 2003).

1.2.1.2 Das Akrosom und die Kopfform

Das Akrosom ist eine besondere Organelle, die den stark kondensierten Zellkern im vorderen Bereich ummantelt und mit vielen, zum Teil spermien-spezifischen Enzymen und anderen Proteinen gefüllt ist. Ausgelöst durch Faktoren der Oozyte wird der Inhalt des Akrosoms ausgeschüttet. Die freigesetzten lysosomalen Enzyme unterstützen dann das Durchdringen der Eihülle, wodurch die Befruchtung ermöglicht wird. Andere Moleküle des Akrosoms sind bei der Interaktion zwischen Spermium und Ei notwendig, so z.B. bei der ZP-Bindung, beim Induzieren der Akrosomreaktion und beim Durchdringen der Zona pellucida (SAXENA et al., 1999, 2000; KIM et al., 2001). Die normale Entwicklung des Akrosoms, die Fähigkeit zu einer zeitlich definierten Akrosomreaktion und folglich die Verhinderung einer vorzeitigen Akrosomreaktion sind Voraussetzungen für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien.

Die Entwicklung von Akrosomen beginnt in den frühen runden Spermatiden. BERGMANN (2005) unterteilt die Akrosomentwicklung in 3 Hauptphasen: In der Golgi-Phase verschmelzen vom Golgi-Apparat abgeschnürte proakrosomale Vesikel zu einem akrosomalen Bläschen, welches sich in der Kappenphase an den Kern anlagert. In der folgenden Akrosomphase entwickelt sich das akrosomale Bläschen simultan zur Kondensation des Spermatidenkerns zum Akrosom. ABOU-HAILA und TULSIANI (2000) fügen diesen 3 Phasen eine vierte Phase, die Reifungsphase, zu. Ein entscheidender Schritt in der Morphogenese der Spermatiden ist nach RAMALHO-SANTOS et al. (2002) das Wandern des Akrosom-Kern-Komplexes zur Plasmamembran, wobei der dazwischen liegende Golgi-Apparat zum Cytoplasmalappen wandert, von wo er später mit dem Cytoplasmotropfen abgeschnürt wird. Das Akrosom liegt nun direkt unter der Plasmamembran, flacht am Ende seiner Entwicklung ab und ummantelt je nach Art bis zu $\frac{2}{3}$ des Zellkerns.

KIERSZENBAUM und TRES (2004) geben einen weitaus detaillierteren Einblick in die Biogenese des Akrosoms und die Formgebung des Spermatidenkopfes. Eine besondere Rolle spielen hierbei der Akrosom-Akroplaxom-Manschetten-Komplex sowie das Zusammenspiel zwischen dem tubulobulbaren Komplex an der konkaven Seite des sich verlängernden Spermatidenkopfes und speziellen ektoplasmatischen Strukturen umgebender Sertolizellen. Im Folgenden sollen diese strukturellen Besonderheiten von Spermatiden in Bezug auf die Entwicklung von Akrosom und Kopfform erörtert werden.

Die Biogenese des Akrosoms beginnt mit der Verschmelzung aus dem Golgi-Apparat abgeschnürter proakrosomaler Vesikel zu einem akrosomalen Bläschen. Das sog. Akroplaxom bestimmt den Ort der Verschmelzung und verankert das sich entwickelnde

Akrosom an der Kernhülle. Es handelt sich hierbei um eine Cytoskelettplatte, die aus F-Aktin, Sak57 (Keratin-Orthologon) und Myosin Va besteht. Sie schließt mit dem Grenzring („marginal ring“) ab, welcher eine Desmosomen-ähnliche Struktur besitzt. In diesem Bereich verbinden Sak57-haltige Filamente den äußeren Rand der akrosomalen Membran mit der gegenüberliegenden Kernhülle.

Der Transport proakrosomaler Vesikel zum Ort der Akrosomentstehung erfolgt über Mikrotubuli- und/oder Aktin-basierte Motorproteine (Kinesin/Dynein bzw. Myosin Va). Sobald der Spermatidenkern beginnt, seine längliche Form einzunehmen, entwickelt sich die sog. Manschette am caudalen Ende des entstehenden Akrosoms und des Akroplaxoms. Hier gehen von einem perinuklearen Ring, der vom Grenzring des Akroplaxoms durch eine gürtelartige Einkerbung (groove belt) abgetrennt ist, Mikrotubulibündel aus. Mit diesen sind F-Aktin sowie die molekularen Komponenten für Mikrotubuli- und F-Aktin-abhängigen Vesikeltransport assoziiert. Nicht-akrosomale Vesikel und Makromoleküle werden an den Mikrotubuli über Kinesin/Dynein und entsprechende Linker sowie an F-Aktin über Myosin Va/Myosin VIIa, MyRIP (myosin Va-Rab interacting protein)/Melanophilin und die Vesikel-Rezeptoren Rab27a/b zur Centrosom-Region (am entgegengesetzten Kernpol zum Akrosom), dem sich entwickelnden Spermienflagellum und ins Cytoplasma transportiert. Neben der Transportfunktion scheint die Manschette aber auch auf die Gestaltgebung des Spermatidenkopfes einzuwirken.

Die Kopfform einer reifen Spermide ist vermutlich das Resultat eines komplexen Zusammenspiels exogener und endogener Faktoren. KIERSZENBAUM und TRES (2004) stellen hierzu eine Hypothese auf. An einer Seite des Spermatidenkopfes entspringen röhrenförmige, verdickt endende Ausstülpungen aus Zytoplasma und Plasmamembran, der sog. tubulobulbare Komplex (Abbildung 4). Dieser ragt in entsprechende Einbuchtungen der angrenzenden Sertolizelle. Spermide und Sertolizelle sind sowohl hier als auch auf der gegenüberliegenden Seite des Spermatidenkopfes über sog. Linker (Afadin-Nectin-2/3-F-Aktin-Adhäsionseinheit, β -Integrin u.a.) verbunden. Dies gewährleistet eine chemische und mechanische Stabilisierung und Positionierung der Spermide im Keimepithel über ihren Kopfbereich. So könnte eine gleichmäßige Wirkung exogener kontraktile Kräfte auf den Spermatidenkopf erzielt werden. Die angrenzenden Sertolizellen besitzen ektoplasmatische Spezialisierungen, zahlreiche parallele F-Aktin-enthaltende Bänder, die den Spermatidenkopf umhüllen. Durch sukzessive Reduktion der Länge der Bänder wird der Spermatidenkopf und somit der Zellkern exogen fest umklammert und erfährt so einen formenden Druck. Neben der exogenen Umklammerung des Zellkerns kommt es auch zu einer endogenen Umklammerung. So passen der perinukleare Ring der Manschette und der Grenzring des Akroplaxoms ihren

Durchmesser dem des sich verlängernden Spermatidenkerns an, während sie allmählich nach hinten wandern. KIERSZENBAUM und TRES (2004) sprechen hier von endogenen Umklammerungskräften des Akrosom-Akroplaxom-Manschetten-Komplexes, die als nach caudal wandernde Einschnürungen die Form des Kernes mitbestimmen könnten. Während einige Teile des Akrosom-Akroplaxom-Manschetten-Komplexes nach Vollendung der Kernverlängerung und -kondensation zerfallen, könnten andere (z.B. Akroplaxom) auch für spätere Funktionen, z.B. bei der Akrosomreaktion, erhalten bleiben (vgl. KIERSZENBAUM und TRES, 2004).

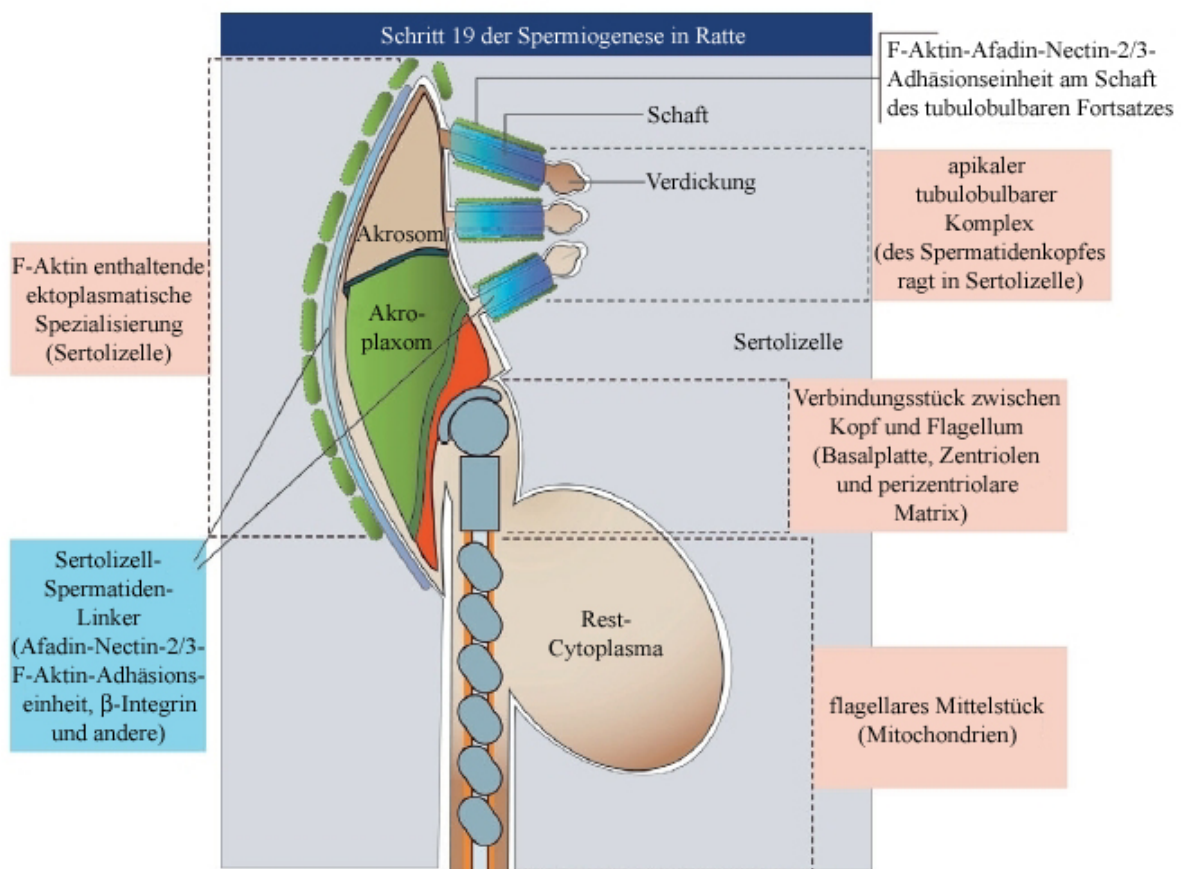


Abbildung 4: Schematische Darstellung des tubulobulbaren Komplexes einer elongierenden Rattenspermatide

Quelle: übersetzt aus KIERSZENBAUM und TRES (2004)

Der Akrosominhalt scheint nicht homogen zu sein, so dass akrosomale Proteine bei der Akrosomreaktion selektiv freigesetzt werden können. Auf diese Art könnte das Spermium auf den unterschiedlichen Bedarf an akrosomalen Enzymen zur Überwindung verschiedener Schichten der Eihülle reagieren. Neben einer kontrollierten Freisetzung der akrosomalen Enzyme, könnten die Proteine der akrosomalen Matrix auch Funktionen bei Membranfusionsereignissen und der Interaktion zwischen Spermium und Ei übernehmen. Zum Beispiel wurden Fusionsproteine wie Equatorin, SNAP-25 und SNAREs im Akrosom

nachgewiesen und für die akrosomalen Matrixproteine Mouse Sp 56 und SP17 wurde eine hohe Affinität für ZP-Protein gezeigt (GUPTA, 2005).

Zu den lysosomalen Enzymen des Akrosoms zählen saure Glycohydrolasen, Proteinasen, Esterasen, Sulfatasen, Phosphatasen und Phospholipasen (TULSIANI et al., 1998; GUPTA, 2005). Sie dienen insbesondere der chemischen Auflösung der Eihülle, können aber auch weitere Funktionen besitzen. Eines dieser Enzyme ist das β -Acrosin. Acrosin ist eine spermien-spezifische Serinproteinase mit Ähnlichkeit zum Trypsin. Das Enzym wird als enzymatisch inaktives Zymogen, dem Proacrosin, in frühen haploiden Spermatiden hergestellt und während der Akrosomreaktion zum reifen Enzym aktiviert. Hierbei wird das einsträngige Zymogen in zwei Polypeptide, eine schwere (H-) und eine leichte (L-) Kette, geteilt, welche über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. So wird das α -Acrosin oder auch die kleineren Isoformen β - und γ -Acrosin gebildet. Neben der lytischen Wirkung des Acrosins, welche dem Spermium wahrscheinlich das Durchdringen der Eihülle erleichtert, werden für das β -Acrosin weitere Funktionen angenommen. Es scheint als Rezeptor für Proteine der Zona pellucida zu wirken und so eine Rolle bei der sekundären ZP-Bindung einzunehmen. Zudem wird vermutet, dass es die Freisetzung akrosomaler Proteine während der Akrosomreaktion beschleunigt (vgl. HONDA et al., 2002). Für die Auslösung der Akrosomreaktion sind die Kapazitation des Spermiums im weiblichen Genitaltrakt und der Kontakt mit der Oozyte entscheidend. Dem Akrosom kommt möglicherweise auch eine Schutzfunktion für den Zellkern zu. Da sich der Zellkern dem Flagellum vorausbewegt, könnte er bis zum Erreichen der Oozyte durch das Akrosom vor mechanischer Beschädigung geschützt werden (ähnlich einem Airbag). Andererseits könnte das Akrosom bei Beschädigungen der Zelle durch vorzeitige Akrosomreaktion sicherstellen, dass der evtl. beschädigte Zellkern nicht mehr für die Befruchtung „zugelassen“ wird.

1.2.2 Das Spermienflagellum: Motor für den Transport des männlichen Erbmaterials

Das Flagellum gibt dem Spermium die Möglichkeit sich aktiv zu bewegen und eine gewisse Vorschub- bzw. Schlagkraft zu entwickeln. Beide Eigenschaften sind für die Befruchtungsfähigkeit des Spermiums notwendig. Zentral gelegen, liefert das Axonem die eigentliche Maschinerie für die Bewegung. Spermien-spezifische periaxonemale Cytoskelettelemente (dicke Filamente und fibröse Scheide) dienen der flagellaren Elastizität, Stabilität und Flexibilität. Daneben besitzt die fibröse Scheide eine Ankerfunktion für zahlreiche funktionelle Proteine, die für Energiegewinnung und Signaltransduktion im Spermium wichtig zu sein scheinen. Die Entwicklung des Flagellums während der

Spermiogenese geht von zwei Zentriolen aus, die in T-Stellung zueinander liegen (BERGMANN, 2005). Das proximale Zentriol nimmt Kontakt mit dem Spermatidenkern auf und wird im Spermium vom Capitulum bedeckt. Das distale Zentriol bildet den Ursprung des Axonems. Mit der Kappenphase der Akrosombildung wachsen hieraus Mikrotubuli. Dies führt zur Entwicklung des Flagellums, welche erst mit der Spermiation endet (BERGMANN, 2005). Wichtig bei der Flagellenentwicklung scheint auch die Manschette zu sein. Hier können Proteine (z.B. Sak57, Odf1 und Odf2, Spag4 und 26S Proteasom) vorübergehend gespeichert werden, bevor sie an ihren Bestimmungsort im entstehenden Flagellum transportiert werden („intramanchette transport“; KIERSZENBAUM, 2001).

1.2.2.1 Die fibröse Scheide

Die fibröse Scheide ist ein spezialisiertes Cytoskelettelement in den Spermien von Säugern (FOUQUET und KANN, 1994) und denen einiger Reptilien (JAMIESON et al., 1996), das weder auf struktureller noch auf biochemischer Ebene ein Gegenstück in somatischen Zellen besitzt. Es handelt sich also um ein spermienspezifisches Zellelement, das im Hauptstück des Flagellums unter der Plasmamembran liegt und die dicken Filamente (und das Axonem) ummantelt. Zwei laterale, longitudinale Säulen sind über zahlreiche transversale, halbkreisförmige Rippen miteinander verbunden (SI und OKUNO, 1995). Die longitudinalen Säulen sind im vorderen Bereich des Hauptstücks mit den dicken Filamenten 3 und 8 verbunden. Im mittleren und hinteren Bereich ersetzen sie diese und stehen somit mit den zentraler liegenden Mikrotubulidupletts 3 und 8 in Verbindung. Vermutlich werden hierdurch die Bewegungsmöglichkeiten des Flagellums eingeschränkt. Zudem verjüngen sich die longitudinalen Säulen vom vorderen zum hinteren Bereich des Hauptstücks, während die transversalen Rippen ebenfalls dünner werden (FAWCETT, 1975). Die einzigartige Struktur der fibrösen Scheide beeinflusst vermutlich die flagellare Flexibilität sowie die Ebene und Gestalt der Flagellenbewegung (EDDY et al., 2003). Daneben bewirken intermolekulare Disulfidbrücken der fibrösen Scheide vermutlich eine Stabilisierung des Flagellums während der Passage des Nebenhodens sowie der Spermienreifung (BEDFORD und CALVIN, 1974; SHALGI et al., 1989).

Die Entwicklung der fibrösen Scheide wurde an Ratten- und Mausspermatiden untersucht (IRONS und CLERMONT, 1982; SAKAI et al., 1986; OKO und CLERMONT, 1989). Die fibröse Scheide wird hier von distal nach proximal aufgebaut. Zuerst werden die longitudinalen Säulen gebildet, die in proximale Richtung wachsen. Dann erscheinen die transversalen Rippen, die sich von distal nach proximal mit den longitudinalen Säulen verbinden. Die Entwicklung endet mit der Bildung zusätzlicher Rippen und dem

Dickerwerden der longitudinalen Säulen. Nach OKO (1998) werden die Proteine der fibrösen Scheide in der zweiten Hälfte der Spermiogenese gebildet.

Wie die perinukleare Theka, ist die fibröse Scheide hochresistent gegen Solubilisierung. Hierdurch konnte sie isoliert und einige ihrer Bestandteile identifiziert werden. Es zeigte sich, dass die fibröse Scheide, neben ihrer mechanischen Funktion, als Gerüst für Proteine dient. Es handelt sich sowohl um Komponenten von Signaltransduktionswegen als auch um Enzyme der Glykolyse (vgl. EDDY et al., 2003). Die Hauptkomponente der fibrösen Scheide stellen Ankerproteine für Proteinkinase-A (PKA) (AKAPs) dar, und hier vor allem das AKAP4. Daneben wurden auch AKAP3 (AKAP110 und FSP95) und TAKAP-80 (testis A-kinase anchoring protein-80) identifiziert. GUPTA (2005) beschreibt weitere Ankerproteine für Proteinkinasen (Sperm AKAP82, Fibrous sheath component 1 [FSC1]), die in der fibrösen Scheide gefunden wurden. Über die Phosphorylierung von Proteinen an Serin- und Threoninresten aktiviert die Proteinkinase A eine bisher nicht identifizierte Tyrosinkinase, die wiederum Proteine v.a. im Flagellum phosphoryliert (SAKKAS et al., 2003). Der PKA wird allgemein eine wichtige Rolle für die Spermienmotilität, Kapazitation und Akrosomreaktion zugeschrieben (vgl. EDDY et al., 2003). Die Signalwege, die hierzu führen, sind allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Die Bindungsregion für PKA in AKAP3 interagiert auch mit dem keimzellspezifischen Ropporin, welches reichlich auf der inneren, aber auch auf der äußeren Oberfläche der fibrösen Scheide gefunden wurde (FUJITA et al., 2000). Dieses tritt über Rhophilin, welches hauptsächlich auf der äußeren Oberfläche der dicken Filamente, aber auch auf der inneren und äußeren Oberfläche der fibrösen Scheide lokalisiert ist (FUJITA et al., 2000), mit der kleinen GTPase Rho in Kontakt. Rho induziert über Effektormoleküle den Aufbau von Cytoskelettkomponenten, reguliert Zell-Substrat-Adhäsion, Motilität und Cytokinese (BISHOP und HALL, 2000; TAKAI et al., 2001). Für Spermien wurde dementsprechend die Funktion der AKAP3 als Anker für einen Rho-GTPase-Signalweg vorgeschlagen, wobei Rho über die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen die Motilität von Spermien regulieren soll (NAKAMURA et al., 1999; FUJITA et al., 2000; CARR et al., 2001).

Auch glykolytische Enzyme wurden als Komponenten der fibrösen Scheide identifiziert. So wurde keimzellspezifische GAPDH (GAPDH-S, GAPDS oder GAPD2 genannt) gefunden, welche fest an der fibrösen Scheide von Eber- und Mausspermien gebunden vorliegt (WELCH et al., 1992; WESTHOFF und KAMP, 1997; BUNCH et al., 1998; KRISFALUSI et al., 2006). In Human- und Rattenspermien wurde GAPD2 bzw. GAPDS im Hauptstück der Flagellen detektiert (WELCH et al., 2000, 2006). Auch eine keimzellspezifische Form der Hexokinase (HK1-S) ist an die fibröse Scheide gebunden, jedoch weniger fest als die

GAPDH-S (TRAVIS et al., 1998; MORI et al., 1998; KRISFALUSI et al., 2006). PK und die A-Isoformen von Aldolase 1 und Laktatdehydrogenase (LDH) wurden weder durch Triton X-100 noch durch KSCN oder Harnstoff aus gereinigter fibröser Scheide von Mausspermien gelöst (KRISFALUSI et al. 2006). Die fibröse Scheide besitzt also eine Ankerfunktion für glykolytische Enzyme (EDDY et al., 2003), vermutlich um hier ATP unabhängig von den Mitochondrien für die Dynein-ATPasen (WESTHOFF und KAMP, 1997), aber auch für andere Spermienfunktionen [Signaltransduktion (TRAVIS et al., 2001), Ionentransport, etc.] bereitstellen zu können.

Neben den PKA-Anker-Proteinen und den glykolytischen Enzymen wurden einige weitere Bestandteile der fibrösen Scheide gefunden. Hierunter befinden sich eine keimzellspezifische Form der Glutathion S-Transferase Familie (μ -Klasse), die GSTM5, sowie ein Intermediärfilament-ähnliches Protein, das FS39 (EDDY et al., 2003). Die Funktion dieser Proteine in der fibrösen Scheide ist noch nicht geklärt. Hinweise auf weitere Proteine der fibrösen Scheide sind in GUPTA (2005) zusammengestellt.

1.2.2.2 Die dicken Filamente

Bei den dicken Filamenten („outer dense fibers, ODFs“) handelt es sich, neben der fibrösen Scheide, um eine weitere spermien-spezifische Cytoskelettkomponente, die das Axonem im Mittelstück und teilweise im Hauptstück des Flagellums direkt ummantelt. Neun dicke Filamente verlaufen parallel zu den Mikrotubulidupletts und sind umgeben von den Mitochondrien im Mittelstück sowie von der fibrösen Scheide im Hauptstück. Nach FOUQUET und KANN (1994) enden sie ca. in der Hälfte des Hauptstücks während GUPTA (2005) hinzufügt, dass sie in einigen Arten, wie Ratte und Hamster, im gesamten Hauptstück zu finden sind. FAWCETT (1975) beschreibt, dass die dicken Filamente 3 und 8 im mittleren oder hinteren Teil des Hauptstücks enden und ab hier durch die longitudinalen Säulen der fibrösen Scheide ersetzt werden. Zudem unterscheiden sich die dicken Filamente in ihrer Form im Querschnitt und ihrer Länge in unterschiedlichen Arten (GUPTA, 2005). Die dicken Filamente nehmen wahrscheinlich eine mechanische Funktion ein, z.B. für die Elastizität des Flagellums (FAWCETT, 1975), zur Verbesserung des Biegungsmaßes („bending torque“) des Flagellums (LINDEMANN, 1996) und/oder zum Schutz vor Scherkräften während dem Transport durch den Nebenhoden und der Ejakulation (BALTZ et al., 1990). Daneben wurde auch vorgeschlagen, dass der Phosphorylierungszustand von Proteinen der dicken Filamente die genannten Funktionen und somit die Spermienmotilität beeinflussen kann (ROSALES et al., 2003).

Die Entwicklung der dicken Filamente findet in der zweiten Hälfte der Spermiogenese statt. In dieser Phase werden von den Spermatiden die entsprechenden Proteine produziert, die vorübergehend als körnige Substanz im Cytoplasmalappen gespeichert und dann von proximal nach distal um das Axonem angeordnet werden (OKO, 1998). Für einige Proteine (Odf1, Odf2, Sak57 und Spag 4) gibt es Hinweise darauf, dass sie vorübergehend an der Manschette gespeichert werden, bevor sie in das entstehende Flagellum transportiert werden (KIERSZENBAUM, 2001). In Rattenspermien wurden elektrophoretisch 6 Hauptproteine der dicken Filamente identifiziert, wobei die Mehrheit dieser an Serinresten phosphoryliert werden (VERA et al., 1984; OKO, 1988; GUPTA, 2005). Darüber hinaus sind auch einige Gensequenzen für Proteine der dicken Filamente bekannt. Als Bestandteile dicker Filamente wurden Odf1 bzw. ODF27 und das ihm ähnliche RT7 sowie Odf2 bzw. ODF84 und sein Orthologon KTT4 beschrieben. Daneben wurden Proteine gefunden, die mit Odf1 interagieren (SPAG2, Spag4, Spag5, OIP1). Einige Cystein-reiche Proteine (z.B. TPX-1 und Sak57) sind ebenfalls in den dicken Filamenten zu finden (vgl. GUPTA, 2005).

1.2.3 Energiestoffwechsel

1.2.3.1 ATP-konsumierende Reaktionen

In ihren Zellfunktionen sind Spermien im Vergleich zu somatischen Zellen deutlich reduziert. Um ihre Aufgabe, den sicheren Transport zur Eizelle und die Übertragung des männlichen Erbmateri als, zu erfüllen, werden in Spermien nur noch die Funktionen ausgeübt, die hierzu notwendig sind. Überflüssiger „Ballast“, wie z.B. der Hauptteil des Cytoplasmas, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat, werden mit dem Residualkörper und dem Cytoplasmotropfen entfernt. So ist die Zelle speziell für ihre Transport- und Übertragungsaufgabe ausgerüstet und optimiert.

Die Nutzung von Energie im reifen Spermium scheint aus diesem Grund relativ einseitig gestaltet zu sein. Da in der reifen Samenzelle keine Biosynthesen, kein Zellwachstum und keine Zelldifferenzierung mehr stattfinden, muss für diese Vorgänge kein ATP bereitgestellt werden (HAMMERSTEDT, 1993). Für die Spermienmotilität hingegen wird sehr viel ATP gebraucht (BOHNENSACK und HALANGK, 1986; FORD und REES, 1990; MITA et al., 1991; HOFMANN et al., 1992). Die Bewegung des Spermienflagellums basiert auf einem Gleitfilamentmechanismus. Hierbei kommt es durch aufeinander folgende Bindung und Hydrolyse von ATP durch das Dynein an den Subfasern A zu Ablösung und erneuter Anbindung der Subfaser A eines Mikrotubulidupletts an die Subfaser B des benachbarten Dupletts (Abbildung 5). Die Kopfregion des Dyneins erfährt wahrscheinlich bei Assoziation mit der Subfaser B eine energiefreisetzende Konformationsänderung, wodurch die

Dyneinarme der A-Subfaser durch ATP-Hydrolyse entlang der Subfaser B des benachbarten Dupletts wandern. Das aneinander Vorbeigleiten der äußeren Dupletts des Axonems führt gekoppelt mit dem Widerstand der radialen Speichen zu einer lokalen Biegung des Flagellums.

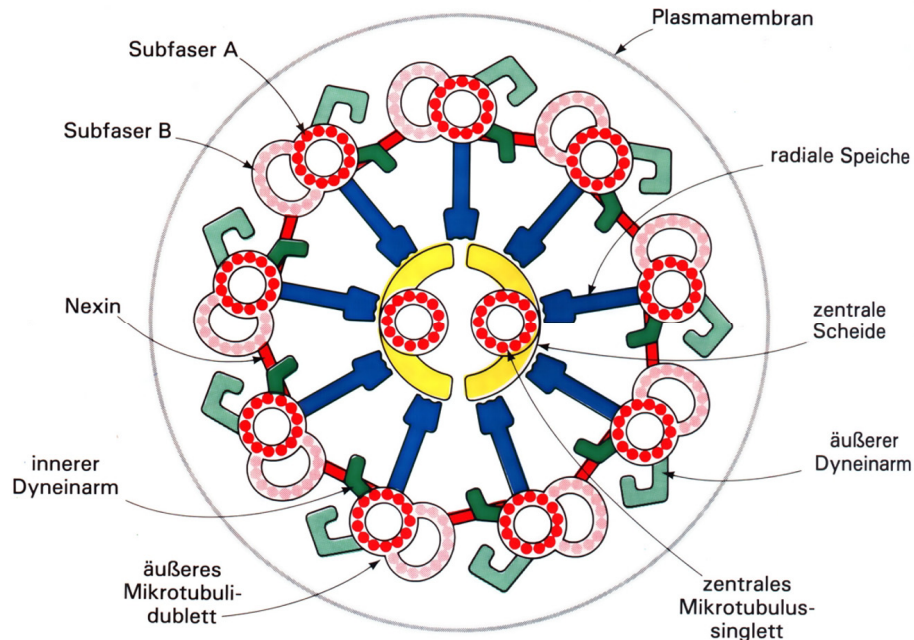


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Axonemstruktur

Quelle: STRYER (1999)

Ein anderer Teil des Energieumsatzes ist vermutlich auf regulatorische Prozesse im Spermium zurückzuführen. Von großer Bedeutung ist u.a. der ATP-Verbrauch in Zusammenhang mit der Kapazitation und der Akrosomreaktion. ATP-erfordernde Ionentransporte über Plasma- und Akrosommembranen sowie das Erfordernis von ATP für Signaltransduktionsprozesse scheinen hier wichtig zu sein. So wird ATP bspw. von den ATP-gekoppelten Ca^{2+} -Pumpen in der Spermienplasmamembran und in den Membranen des Akrosoms benötigt, um eine vorzeitige Einleitung der Kapazitation bzw. der Akrosomreaktion zu verhindern (vgl. FENG et al., 2006). Mehrere Ca^{2+} -ATPasen wurden im Akrosombereich und im Übergangsbereich, aber auch in der Plasmamembran des Flagellums gefunden (vgl. JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2006). Verglichen mit anderen ATPasen benötigen Ca^{2+} -ATPasen für ihre Funktion höhere negative ΔG_{ATP} -Werte (KAMMERMEIER, 1993) und somit eine effiziente ATP-Regeneration. KAMMERMEIER (1987) bestimmte für die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase des humanen Herzmuskels ein ΔG des ATP von 52 kJ/mol. Wichtig für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials sind Na^+, K^+ -ATPasen. Die testisspezifische Isoform der Na^+, K^+ -ATPase (ATP1A4) wurde in Kopf und Mittelstück von Bullenspermien gefunden und mit der Kapazitation in Zusammenhang gebracht (THUNDATHIL

et al., 2006). Zudem wurde eine testisspezifische Isoform der V-ATPase (vacuolar-type H⁺-ATPase, E1-Untereinheit-Isoform) im Akrosombereich reifer Mausspermien gefunden (SUN-WADA et al., 2002). Diese soll, über eine Ansäuerung des Akrosoms, einen geeigneten pH für die bei der Akrosomreaktion ausgeschütteten Hydrolasen schaffen (NELSON und HARVEY, 1999). Neben dem aktiven Ionentransport wird ATP auch in Spermien zur Herstellung des sekundären Messengers cAMP und für Proteinphosphorylierungen gebraucht. cAMP und die Phosphorylierung von Proteinen spielen vermutlich im Signaltransduktionsgeschehen der Kapazitation sowie der Akrosomreaktion eine wichtige Rolle, der Bedarf an ATP für diese Reaktion ist jedoch marginal im Vergleich zur Motilität.

1.2.3.2 ATP-Synthese in Spermien

Jede Zelle benötigt ATP, um ihre energieabhängigen Aktivitäten durchführen zu können. Zur Aufrechterhaltung dieser Prozesse ist es unumgänglich, den chemischen Energieträger ATP zu regenerieren. Die notwendige Energie hierzu kann aus organischen Betriebsstoffen wie Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen gewonnen werden, wobei jeder Zelltyp unterschiedliche Stoffwechselwege nutzt bzw. bevorzugt.

Trotz umfangreicher Literatur zum Energiestoffwechsel von Säugerspermien, ist bislang nur für einige Arten geklärt, welche Substrate von den Spermien genutzt werden können. Viele Untersuchungen liegen vor, in denen bestimmte Stoffwechselwege über Enzyminhibitoren oder Gen“knockout“ ausgeschaltet wurden, um die Folgen auf die Funktionen von Spermien zu belegen. Zum Teil lieferten die Untersuchungen gegensätzliche Ergebnisse, so dass es sehr schwierig ist, allgemeingültige Aussagen zur Nutzung der verschiedenen Stoffwechselwege *in vivo* zu treffen. Es ist offenbar nicht mehr haltbar vom „typischen Energiestoffwechsel“ bzw. von „der ATP-Gewinnung“ in Säugerspermien zu sprechen. Vielmehr zeichnen sich mittlerweile klare Unterschiede im Stoffwechsel der Spermien verschiedener Säuger ab. Es wurden aber mittlerweile auch einige allgemeingültige Merkmale der ATP-Produktion in Säugerspermien anerkannt.

Die untersuchten Spermien unterschiedlicher Säuger sind generell in der Lage, verschiedene Stoffwechselwege zur ATP-Produktion zu nutzen. Sowohl die Glykolyse mit anschließender Laktatproduktion (Gärung) als auch mit anschließendem Citratzyklus, Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung sind möglich. Substrate wie Citrat und Laktat können auch direkt in den Citratzyklus eingeführt werden (MEDRANO et al., 2006a). Daneben scheinen einige Säugerspermien eine Enzymausstattung zu besitzen, die sie dazu befähigt, Fette zu spalten und die Produkte, sei es über Glykolyse und Citratzyklus oder β -Oxidation,

zur ATP-Produktion zu nutzen (LENZI et al., 1992; JONES und BUBB, 2000; TANAKA et al., 2004). Inwiefern Fette *in vivo*, in der natürlichen, kohlenhydratreichen Umgebung der Säugerspermien für die Energiegewinnung Bedeutung besitzen, ist allerdings fraglich. Auch eine Protein- oder Aminosäurenutzung zur ATP-Synthese hat, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Bedeutung für Säugerspermien. In der Literatur konnten hierzu keine Angaben gefunden werden. Neben den katabolen Stoffwechselwegen wurden auch anabole Stoffwechselwege in Spermien einiger Säuger beschrieben. Neben dem Pentosephosphatzyklus (MOUNIB und CHANG, 1964; HICKS et al., 1973; FORD et al., 1997; URNER und SAKKAS, 1999) sind die Spermien einiger Säugerarten, entgegen früherer Vorstellungen (ANDERSON und PERSONNE, 1970; BROOKS und MANN, 1972; BACCETTI et al., 1975), auch in der Lage Glykogen zu produzieren und bei Bedarf zur Energiegewinnung zu nutzen. Ein funktioneller Glykogenstoffwechsel wurde überzeugend an Hundespermien gezeigt (BALLESTER et al., 2000; PALOMO et al., 2003).

Wie durch die Vielseitigkeit der Stoffwechselwege zu erwarten, sind Säugerspermien in der Lage, verschiedene Substrate für die ATP-Produktion zu nutzen, wobei die Substratbevorzugung sowie die -verwertung artspezifisch sind (BUSCH et al., 1991; RODRIGUEZ-GIL, 2006). Generell stellen jedoch die Kohlenhydrate sehr wahrscheinlich die Hauptenergiequelle für Säugerspermien dar. Neben Monosacchariden wie Glukose, Fruktose, Sorbitol und Mannose (JONES und CONNOR, 2000; RIGAU et al., 2002; MARIN et al., 2003; MEDRANO et al., 2006b) sind u.a. Pyruvat, Laktat, Citrat und Glycerin als Energiesubstrate bekannt (JONES et al., 1992; JONES, 1997; MEDRANO et al., 2006a). In begrenztem Ausmaß können nach JONES und CHANTRILL (1989) auch kurzkettige Fettsäuren (wie Acetat und Propionat) genutzt werden. Mögliche Quellen endogener Substrate sind wahrscheinlich Di- und Triglyceride sowie Membranphospholipide und Acetylcarnitin (JONES und BUBB, 2000). Säugerspermien besitzen also vielfältige Möglichkeiten ihren Stoffwechsel den vorliegenden Substraten anzupassen. Inwiefern und ob bestimmte Stoffwechselwege oder auch Substrate speziell zur ATP-Produktion notwendig sind, wird kontrovers diskutiert.

Aus Kohlenhydratsubstraten kann ATP über die Folge von Glykolyse, Citratzyklus, Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung sowie über die Glykolyse mit Laktatproduktion gewonnen werden. Die Zellatmung stellt das leistungsfähigste System zur Bildung von ATP dar. Dennoch weisen praktisch alle Säugerspermien in frischem Ejakulat eine sehr hohe glykolytische Aktivität auf (RODRIGUEZ-GIL, 2006). Sie produzieren auch dann Laktat, wenn genügend O₂ zur Zellatmung sowie die notwendigen Stoffwechselwege vorhanden sind (JONES, 1997; KAMP et al., 2003). Zudem wurden in Säugerspermien spezifische glykolytische Enzyme mit ungewöhnlicher Lokalisation identifiziert (Abschnitt

1.2.5). Diese Besonderheiten lassen vermuten, dass die Glykolyse eine außergewöhnliche Bedeutung in Säugerspermien besitzt. So wird angenommen, dass sie für die ATP-Versorgung der Dynein-ATPasen im Hauptstück des Flagellums unabhängig von den Mitochondrien verantwortlich ist (WESTHOFF und KAMP, 1997), und somit notwendig für die essentielle Spermienmotilität (vgl. EDDY et al., 2003). Auf Stoffwechselebene wird diese Hypothese unterstützt durch eine Untersuchung von MUKAI und OKUNO (2004). Sie zeigten zum einen, dass bei Hemmung der mitochondrialen ATP-Produktion (über Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon [CCCP] oder Antimycin A) das ATP aus der Glykolyse für die praktisch unveränderte Spermienmotilität (verglichen zur Motilität ohne Atmungsinhibitor bei gleicher Glukosekonzentration von 5 mM) ausreicht. Zum anderen berichten sie, dass 2-Deoxy-D-Glukose (DOG), welches die Glykolyse teilweise hemmt, nicht aber den Citratzyklus, die Motilität von Mausspermien in Anwesenheit von Pyruvat (ohne Glukose) stark reduziert. Auch FRASER und QUINN (1981) hatten bereits eine Reduktion der generellen Motilität mittels 2-Desoxyglukose in Mausspermien beobachtet. Hieraus folgern MUKAI und OKUNO eine wichtige Rolle der Glykolyse für die Spermienmotilität. Da Mausspermien, welchen nur Pyruvat, aber keine Glukose zur Verfügung gestellt wird, nicht in ihrer Motilität gehemmt sind, nehmen sie weiterhin an, dass die Atmungssubstrate hier über die Gluconeogenese in Glukose umgewandelt werden und so als Glykolysesubstrat genutzt werden können. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Glykolyse für die Spermienmotilität lieferten MIKI et al. (2004). Sie zeigten, dass die Spermien von Mäusen, in denen das Gen für die testis-/spermienspezifische GAPDH-S ausgeschaltet („Knock out“) war, nicht progressiv motil waren und trotz unveränderter mitochondrialer Atmung, einen niedrigen ATP-Gehalt hatten. FORD (2006) bezweifelt jedoch, dass die Folgen des Gen-„Knock out“s auf eine Notwendigkeit der Glykolyse für die Spermienmotilität zurückzuführen sind. Er ist vielmehr der Meinung, dass der niedrige ATP-Gehalt und somit die Immotilität auf eine Anreicherung von glykolytischen Metaboliten zurückzuführen ist, wodurch anorganisches Phosphat gebunden wird und nicht mehr für die oxidative Phosphorylierung bereitsteht. Auch bei der von MUKAI und OKUNO eingesetzten DOG vermutet er einen ähnlichen Abzug von Phosphat durch die Anhäufung von 2-Deoxyglukose 6-Phosphat. Da die Hemmung der Motilität durch DOG jedoch über die Zugabe von Glukose wieder aufgehoben werden kann, scheint noch genügend Phosphat für die Produktion von ATP vorhanden zu sein und es ist fraglich, ob FORDS Einwände weiterhin haltbar sind. Aber auch die Ergebnisse anderer Autoren sind nicht vollständig mit den beschriebenen Ergebnissen zur Glykolyse in Einklang zu bringen, sind zum Teil sogar gegensätzlich. So beeinträchtigt der Antifertilitätswirkstoff Ornidazol, ein Inhibitor glykolytischer Enzyme

(vermutlich GAPDH und geringer TIM), die Motilität von Rattenspermien, wenn Glukose als alleiniges Substrat vorliegt (YEUNG et al., 1995; COOPER et al., 1997), nicht aber wenn Pyruvat oder Laktat zugefügt wird (YEUNG et al., 1995). Dass Pyruvat und Laktat über mitochondriale ATP-Produktion die Spermienmotilität und die ATP-Konzentration in der Samenzelle, trotz Glykolyseinhibition, vermutlich aufrechterhalten können (FORD und HARRISON, 1987) steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von MUKAI und OKUNO. Ebenso stehen die Ergebnisse von MANN und LUTWAK-MANN (1981), dass Eberspermien in anoxischer Umgebung ihre Vorwärtsbewegung verlieren, obwohl sie eine relativ hohe glykolytische Kapazität besitzen (KAMP et al., 1996), nicht in Einklang mit MUKAI und OKUNOS Ergebnis, dass das ATP aus der Glykolyse für die Spermienmotilität ausreicht. Dass die Glykolyse einen hohen Stellenwert in Säugerspermien einnimmt, ist nicht zuletzt aufgrund der gezeigten hohen glykolytischen Aktivitäten und der Besonderheiten der Glykolyse in Säugerspermien sehr wahrscheinlich. Inwiefern die Glykolyse tatsächlich für die Bereitstellung von ATP im Hauptstück oder auch für andere Funktionen notwendig ist, bleibt allerdings noch zu klären.

Auch für den Citratzyklus (Krebszyklus) ist nicht klar, welche Bedeutung er in der ATP-Produktion von Säugerspermien einnimmt. Während MUKAI und OKUNO (2004) ihn als nicht notwendig für die Spermienmotilität ansehen, beschreiben andere Autoren das Gegenteil, obwohl für einige Arten gezeigt wurde, dass vermutlich nur wenig ATP über diesen Stoffwechselweg erhalten wird (HALANGK et al., 1985; FOLGERO et al., 1993; RUIZ-PESINI et al., 1998). Diese kontroversen Ergebnisse wie auch weitere, die andere Stoffwechselwege (z.B. Glykolyse, Glykogenstoffwechsel und Pentosephosphatzyklus) betreffen, könnten unterschiedliche Gründe haben (vgl. RODRIGUEZ-GIL, 2006). Zum einen muss beachtet werden, dass die Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungen meist auf der Grundlage unterschiedlicher Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Dies ist bei Spermien besonders nachteilig, da bei diesen Zellen kleinste Veränderungen der externen Bedingungen (z.B. Medienzusammensetzung, O₂-Druck, extrazellulärer pH) zu großen Veränderungen in der Zelle und somit auch ihres Energiestoffwechsels führen können. So wird das Gleichgewicht zwischen der ATP-Gewinnung über Gärung oder Zellatmung vermutlich u.a. über die extrazelluläre Umgebung kontrolliert. Es ist auch wichtig zu beachten, welche anderen Energiesubstrate vorhanden sind und genutzt werden können, wenn Aussagen zur Notwendigkeit oder Nicht-Notwendigkeit von Stoffwechselwegen getroffen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt liegt beim funktionellen Status, den die Spermien bei der Untersuchung besitzen. Säugerspermien durchlaufen verschiedene Stadien mit großen Veränderungen ihrer Funktionen (Teil 1.1). Dementsprechend ist es anzunehmen, dass sich

der ATP-Bedarf den jeweiligen Anforderungen, z.B. von epididymalen, ejakulierten, kapazitierten und bereits akrosomreagierten Spermien, anpasst. RODRIGUEZ-GIL vermutet, dass kapazitierte Spermien, die ihre hyperaktive Motilität sowie Prozesse in Verbindung mit Akrosomreaktion und Besamung aufrechterhalten müssen, mehr ATP benötigen als frisch ejakulierte Spermien und es somit zu Veränderungen der ATP-Produktion während der Kapazitation kommen muss. Es wird vermutet, dass in Phasen erhöhten ATP-Bedarfs die Zellatmung überwiegt, da die konstante Erhaltung eines angemessenen ATP-Spiegels nur über die Glykolyse schwierig erscheint. Dementsprechend scheint die mitochondriale ATP-Produktion in frisch ejakulierten Spermien sehr gering zu sein, während sie bei *in vitro*-kapazitierten Spermien deutlich ansteigt (RODRIGUEZ-GIL, 2006). Überdies zeichnet sich immer mehr ab, dass es bei Säugerspermien unterschiedliche metabolische Phänotypen gibt, d.h., dass der Energiestoffwechsel von Spermien unterschiedlicher Säugerarten deutlich differieren kann. Bei den bisher untersuchten Spermien weisen die von Hunden einen speziellen Stoffwechsel auf, der sich z.B. von dem in Eberspermien unterscheidet (MARIN et al., 2003). Bei Betrachtung ejakulierter Spermien ist der Eberspermien-Phänotyp durch eine hohe Glykolyserate mit niedrigem G6P-Spiegel und das Fehlen anaboler Stoffwechselaktivitäten charakterisiert (MARIN et al., 2003; MEDRANO et al., 2006b). Extrazellulär bereitgestellte Glukose wurde von den Eberspermien also hauptsächlich über die Glykolyse metabolisiert, nur ein geringer Teil wurde in den Citratzyklus eingeführt. Die Glukose wurde weder über Gluconeogenese noch über den Pentosephosphatweg oder die Fettsäuresynthese metabolisiert. Eine geringe Glykogensynthese über den direkten Weg wurde aber beschrieben. Währenddessen zeigt sich beim Hundespermien-Phänotyp ein anderes Bild (BALLESTER et al., 2000; RIGAU et al., 2002). Frisch ejakulierte Hundespermien sind in der Lage Glykogen zu synthetisieren und besitzen einen hohen Spiegel an G6P. Sie zeigen eine höhere oxidative Aktivität der Mitochondrien als Eberspermien. Zudem besitzen Hundespermien im Gegensatz zu den anderen untersuchten Spermien eine zweite Isoform der Hexokinase mit geringerer Affinität zu Glukose, welche an die Glucokinase von Leber und Pankreas erinnert (FERNANDEZ-NOVELL et al., 2004). Diese könnte den Eintritt der verschiedenen Energiemetabolite je nach Bedarf in anabole oder katabole Stoffwechselwege regulieren (RODRIGUEZ-GIL, 2006). Der Grund unterschiedlicher metabolischer Phänotypen bei den Säugerspermien könnte in den ebenfalls unterschiedlichen Reproduktionsstrategien (z.B. Toleranz gegen Glukosemangel im weiblichen Genitaltrakt) liegen.

1.2.4 Stoffwechselkompartimentierung

Die Kompartimentierung von Stoffwechselwegen ist in Säugerspermien insbesondere für die mitochondrialen Stoffwechselwege offensichtlich, da die Mitochondrien sich nur im relativ kurzen Mittelstück des Flagellums befinden. Immer deutlicher werden auch die Befunde, die für eine Kompartimentierung der Glykolyse im Hauptstück des Flagellums sprechen. Hier scheinen Glykolyseenzyme an der fibrösen Scheide assoziiert zu sein (STOREY und KAYNE, 1975; WESTHOFF und KAMP, 1997; BUNCH et al., 1998; TRAVIS et al., 1998; MORI et al., 1998).

Die ATP-Versorgung der axonemalen Dynein-ATPasen entlang des gesamten Flagellums stellt die Zelle vor eine besondere Aufgabe. Aufgrund der Kompartimentierung der oxidativen Phosphorylierung im Mittelstück des Spermiums kann nur hier effizient ATP generiert werden. Da der Transfer von ATP jedoch in den langen Spermienflagellen [bei den meisten Arten 40-200 μm (KALDIS et al., 1997)] vermutlich diffusionsbedingten Beschränkungen unterliegt, wird davon ausgegangen, dass die Spermien Mechanismen entwickelt haben, um die Versorgung der Dynein-ATPasen im Hauptstück zu gewährleisten.

Eine mögliche Strategie ist der Transport energiereichen Phosphates über ein CK/PCr-Shuttle-System. Eine mitochondriale Creatinkinase überträgt eine Phosphorylgruppe von ATP auf Creatin, so dass entstandenes Phosphocreatin zu den Orten des ATP-Verbrauchs im Flagellum diffundieren kann. Creatin und anorganisches Phosphat diffundieren anschließend zu den Mitochondrien zurück (Abbildung 6). Der Vorteil dieses Shuttles liegt in einer Optimierung der Diffusion, da die Metabolite Phosphocreatin und Creatin in deutlich höherer Konzentration in den Spermien vorliegen, als ATP bzw. ADP. Zudem sind die Moleküle Phosphocreatin und Creatin kleiner als ATP und ADP, was ebenfalls die Diffusion verbessert (vgl. KALDIS et al., 1997).

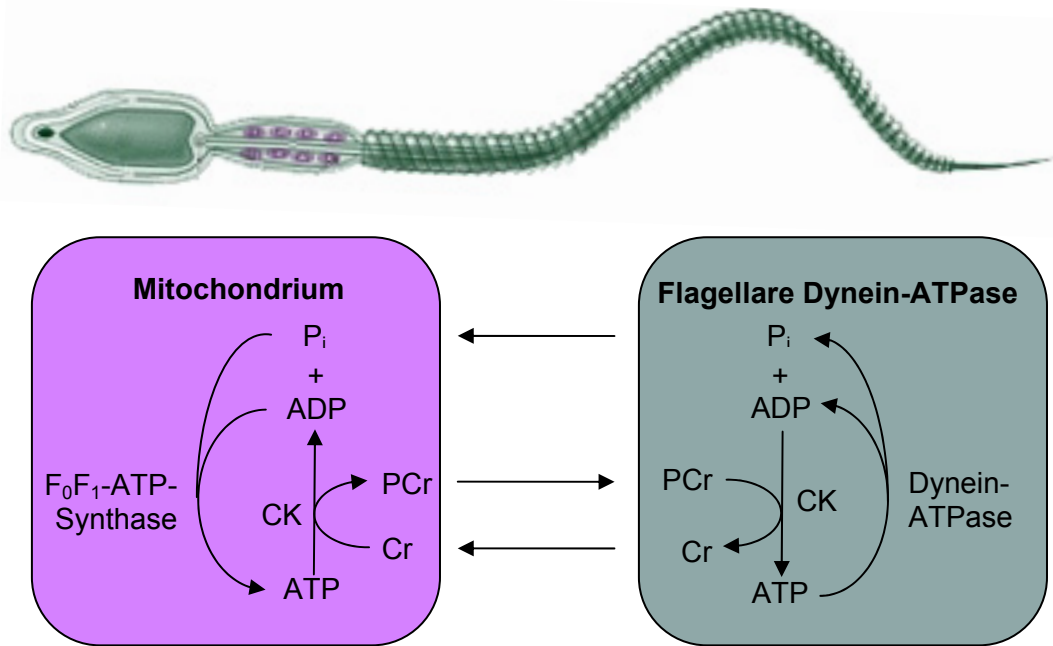


Abbildung 6: Modell des CK/PCr-Shuttle-Systems in Säugerspermien

Quelle: Eigener Entwurf in Anlehnung an KALDIS et al. (1997)

Wie in anderen Geweben mit hohem ATP-Bedarf (z.B. Herz, arbeitender Skelettmuskel, Gehirn) kann in den Spermien vieler Spezies Phosphocreatin als Reservoir für energiereiches Phosphat generiert werden. Während diesem Transportsystem in den Spermien von Seeigel, Hahn und Forelle eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird, existiert es in Säugerspermien nicht in vergleichbarem Maße. In Eber- und Bullenspermien scheint dieses System sogar völlig zu fehlen (KALDIS et al., 1997), da weder Creatinkinaseaktivität (KAMP et al., 1996) noch Phosphocreatin (BROOKS, 1971; ROBITAILLE et al., 1987) in ejakulierten Spermien zu finden waren. Ferner wurde festgestellt, dass bei ejakulierten Bullenspermien die Creatinkinase, die wahrscheinlich auf der Außenseite der Plasmamembran sitzt und im Nebenhoden noch aktiv zu sein scheint, vermutlich durch einen sehr wirksamen Inhibitor aus dem Sekret akzessorischer Drüsen ausgeschaltet wird (KALDIS et al., 1997). Der biologische Sinn dieser Inhibition ist gegenwärtig nicht geklärt.

Ein weiterer Energie-Shuttle wurde durch SCHOFF et al. (1989) vorgeschlagen. Es handelt sich hierbei um den Adenylatkinase (AK)-Shuttle (Abbildung 7), welcher in Spermien, die keinen CK/PCr-Shuttle besitzen, vermutet wird. In diesem System würden, in Analogie zum CK/PCr-Shuttle, das Cr durch AMP als mitochondrialer Akzeptor des energiereichen Phosphats sowie die mitochondrialen und cytosolischen CK-Isoenzyme durch entsprechende AK-Isoformen ersetzt (TANABE et al., 1993). Es würden dementsprechend durch ein Wechselspiel der mitochondrialen AK mit der ATP-Synthase im Mitochondrium energiereiche Phosphatgruppen auf AMP übertragen, wodurch ADP und nachfolgend ATP

gebildet wird. ATP diffundiert zum Ort seines Verbrauchs, den Dynein-ATPasen, wo es zu ADP und energiereichem Phosphat hydrolysiert würde. Aus dem entstandenen ADP könnte nun mit Hilfe der cytoplasmatischen AK wieder ATP und AMP werden. AMP würde dann wieder mit zwei energiereichen Phosphatgruppen in den Mitochondrien beladen.

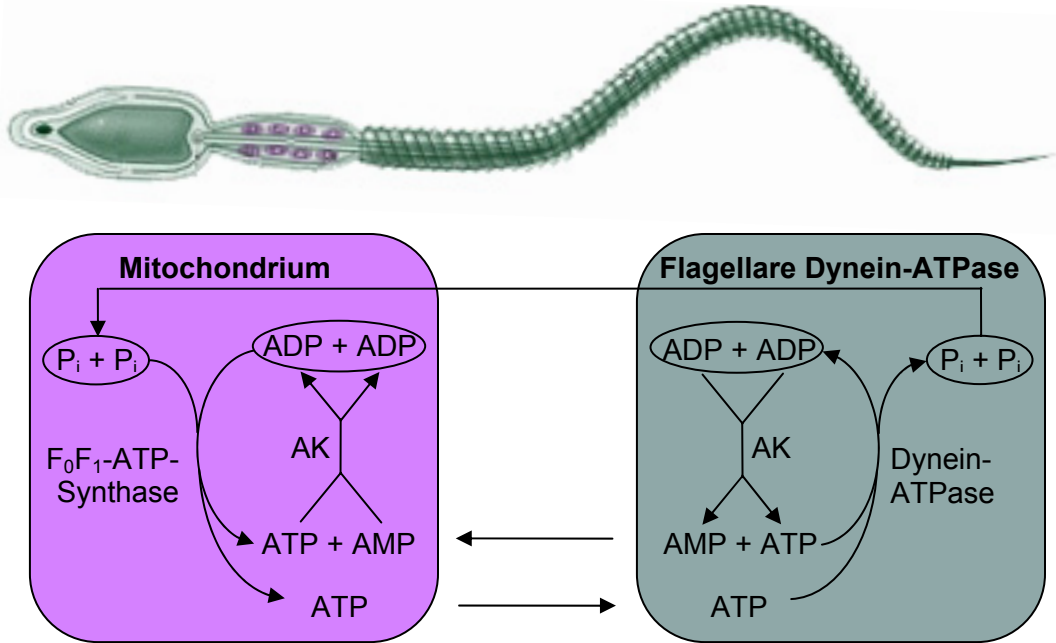
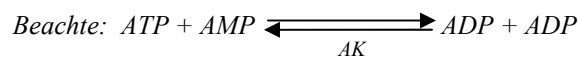


Abbildung 7: Modell des AK-Shuttle-Systems in Säugerspermien

Quelle: Eigener Entwurf



Ob ein solches Shuttle-System in Säugerspermien operiert, ist noch nicht ausreichend geklärt. Gegenüber dem CK/PCr-Shuttle hätte es den Vorteil, dass pro Molekül ATP 2 energiereiche Phosphate transportiert würden. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass die Diffusionsrate für AMP deutlich niedriger liegt als für Creatin. Dennoch gibt es Anzeichen für eine besondere Bedeutung der AK in Säugerspermien. SCHOFF et al. (1989) konnten einen experimentellen Hinweis für die Beteiligung der AK am Energiestoffwechsel liefern. Permeabilisierte Bullenspermien waren bei Bereitstellung von MgADP in der Lage, ihre Motilität aufrechtzuerhalten, d.h., ADP wurde zu AMP und ATP umgesetzt. Weiterhin konnten in Mausspermien zwei verschiedene Isoformen (AK1 und AK2) identifiziert werden, die in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind (CAO et al., 2006). *AK2* mRNA wird während der gesamten Spermatogenese in geringen Mengen gefunden. Das zugehörige Protein ist im Bereich der Mitochondrien im Mittelstück des Flagellums lokalisiert. *AK1* mRNA hingegen ist keimzellspezifisch und wird vermehrt in der späten Spermiogenese gebildet. Im Spermium wurde AK1 im Bereich der äußeren Mikrotubulidupletts sowie der dicken Filamente lokalisiert. Diese beiden Isozyme könnten Teil des vorgestellten AK-Shuttle-Systems sein. Da

bei männlichen *AK1*-null-Mäusen aber keine Fertilitätseinbußen beobachtet wurden (JANSSEN et al., 2000), ist zu vermuten, dass dieser Shuttle die Spermienmotilität unterstützen kann, aber nicht essentiell ist. Es wäre auch möglich, dass die Bedeutung der Adenylatkinasereaktion an einer anderen Stelle zu suchen ist. So wurde ein AK-Shuttle zwischen ATP-produzierenden und -verbrauchenden Reaktionen im Zytoplasma (ZELEZNIKAR et al., 1995) sowie im Intermembranraum der Mitochondrien vorgeschlagen, welches die Anhäufung von cytosolischem ADP im Flagellum verhindern und somit wichtig für die thermodynamische Effizienz ATP-produzierender und -verbrauchender Reaktionen sein könnte (KALDIS et al., 1997). Auch ein Wechselspiel zwischen CK-Shuttle- und AK-Shuttle-System, wie für Muskelgewebe beschrieben (DZEJA et al., 1996), wäre im Spermium denkbar.

Eine weitere Möglichkeit, die axonemalen Dynein-ATPasen im Spermienflagellum mit ihrem Substrat ATP zu versorgen, könnte in der Kompartimentierung von Stoffwechselwegen im Spermium liegen. Wie in Abschnitt 1.2.5 genauer beschrieben, wurde eine Assoziation glykolytischer Enzyme mit der fibrösen Scheide des Flagellums gezeigt. Diese Assoziation könnte für die Versorgung der Dynein-ATPasen mit ATP bedeutsam sein, da sie die Möglichkeit böte, die ATPasen im mitochondrienfreien Teil des Flagellums unabhängig von den Mitochondrien mit ATP zu versorgen. Über die Substratkettenphosphorylierung der Glykolyse könnte in direkter Nachbarschaft vom Verbrauchsort ATP generiert werden (WESTHOFF und KAMP, 1997; EDDY et al., 2003).

Neben der Versorgung der Dynein-ATPasen mit ATP wird diskutiert, dass die Lokalisierung der Glykolyse an der fibrösen Scheide ATP für Signalereignisse bereitstellt. Die fibröse Scheide fungiert wahrscheinlich auch als Gerüst für Signalmoleküle, die an der Kontrolle der Motilität beteiligt sind. So wäre eine lokale Kopplung der Energieversorgung und Regulation der Motilität im Flagellum denkbar (TRAVIS et al., 2001).

Man muss davon ausgehen, dass bei Säugerspermien je nach Art verschiedene Systeme zur ATP-Versorgung genutzt werden (vgl. FORD, 2006). Die Kompartimentierung der Glykolyse im Hauptstück bietet hier eine der Möglichkeiten. Dieses Ergebnis passt zu der Erkenntnis, dass wichtige physiologische Funktionen im Organismus mehrfach abgesichert sind (Redundanz).

1.2.5 Strukturbindungen glykolytischer Enzyme

Die glykolytischen Enzyme in vielen somatischen Zellen wurden hauptsächlich als cytosolische Proteine beschrieben. Daneben wurden aber auch Interaktionen glykolytischer Enzyme mit Strukturkomponenten gefunden. So können glykolytische Enzyme über schwache ionische oder hydrophobe Interaktionen mit dem Cytoskelett, mit kontraktilen

Fasern (Muskel), mit Mikrotubuli und mit der Plasmamembran (Erythrozyten) assoziiert sein (MASTERS et al., 1987; SRERE, 1987; DURRIEU et al., 1987; HUITOREL und PANTALONI, 1985; KUMAGAI und SAKAI, 1983; VÉRTESSY et al., 1997; WALSH et al., 1989; KNULL und WALSH, 1992; SRERE und KNULL, 1998). Für somatische Hexokinase vom Typ 1 ist bekannt, dass sie über eine Porin-Bindungsdomäne an die äußere mitochondriale Membran gebunden werden kann (FELGNER und WILSON, 1977; POLAKIS und WILSON, 1985; SMITH und WILSON, 1991). Diese Assoziationen sind reversibel und können teilweise die Enzymaktivitäten modulieren (über Phosphorylierung oder als Folge von Enzym-Struktur-Interaktionen), so dass regulatorische Effekte möglich sind (MINASCHEK et al., 1992).

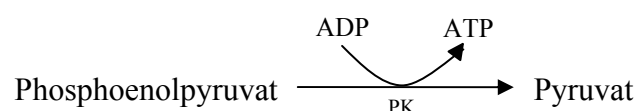
In den letzten Jahren wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen Besonderheiten glykolytischer Enzyme in Säugerspermien aufgezeigt. Bereits 1975 berichteten STOREY und KAYNE, dass glykolytische Enzyme und die Laktatdehydrogenase nur partiell aus Kaninchenspermien extrahierbar sind. JONES und PICCOLO (1999) beobachteten bei hypotonisch behandelten Eberspermien, dass die glykolytischen Enzyme, mit Ausnahme von Phosphofruktokinase und Laktatdehydrogenase in nicht-löslicher Form vorliegen. Die am häufigsten untersuchten glykolytischen Enzyme in Säugerspermien sind die Hexokinase und die GAPDH. Für beide Enzyme wurden keimzell- bzw. spermien-spezifische Isoformen auf der Ebene der Nukleinsäuren identifiziert und in Säugerspermien lokalisiert (HK1-S: MORI et al., 1993; TRAVIS et al., 1998; GAPDH-S: WELCH et al., 1992, 2000, 2006; WESTHOFF und KAMP, 1997). Die zugehörigen Aminosäuresequenzen beider Enzyme besitzen N-Termini, die sich von denen der entsprechenden Enzyme in somatischen Zellen unterscheiden. Für die Hexokinasen somatischer Zellen ist eine N-terminale Porinbindungsdomäne typisch, die der Anbindung an die Mitochondrien dient. Der HK1-S fehlt diese Domäne. Sie wird durch eine keimzellspezifische Region ersetzt (MORI et al., 1993; TRAVIS et al., 1998). Gegenüber somatischen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen ist die GAPDH-S N-terminal verlängert. So wurde z.B. anhand einer spezifischen cDNA aus Mäusekeimzellen GAPDH-S vorhergesagt, welche N-terminal eine zusätzliche 105 Aminosäuren lange, prolinreiche Sequenz besitzt (WELCH et al., 1992). Über die Nukleotidebene wurde auch keimzellspezifische GAPDH-S bei Mensch (WELCH et al., 2000) und Ratte (WELCH et al., 2006) identifiziert, für die ebenfalls prolinreiche Verlängerungen am Aminoterminus beschrieben sind. Für beide Proteine, HK1-S und GAPDH-S, wurde zudem gezeigt, dass sie während der Spermatogenese erstmals in Spermatozyten auftreten. So könnten sie gebildet werden, um spezielle Funktionen in Spermien zu unterstützen. Aufgrund einer ungewöhnlichen Lokalisierung der beiden Enzyme in Säugerspermien wurde vermutet, dass die ungewöhnlichen N-Termini für die Bindung der Proteine an Zellstrukturen verantwortlich

sind. Für beide Enzyme wurde eine ungewöhnliche Bindung an Spermienstrukturen beschrieben, wobei sich die Art der Bindung unterscheidet. Während HK1-S mit Hilfe von Detergenzien wie Triton X-100 abgelöst werden konnte (TRAVIS et al., 1998; KRISFALUSI et al., 2006), war dies bei der GAPDH-S nicht möglich (WESTHOFF und KAMP, 1997; KRISFALUSI et al., 2006). Zur Ablösung der in Eberspermien zu über 90% fest gebundenen GAPDH-S war ein kurzfristiger proteolytischer Verdau, z.B. mit Trypsin, nötig (WESTHOFF und KAMP, 1997). Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde die GAPDH-S ausschließlich im Hauptstück von Spermienflagellen (WELCH et al., 2000, 2006; MIKI et al., 2004) und hier an der fibrösen Scheide (WESTHOFF und KAMP, 1997) lokalisiert. Die HK1-S wurde neben der fibrösen Scheide auch im Bereich der Mitochondrien und an Membranen des Spermienkopfes gefunden (TRAVIS et al., 1998). Wie bereits in Unterabschnitt 1.2.2.1 beschrieben, wurden an gereinigter fibröser Scheide aus Mausspermien neben der HK1-S und der GAPDH-S, weitere glykolytische Enzyme identifiziert, welche ebenfalls eine ungewöhnlich feste Bindung an diese Struktur aufwiesen. So wurden die A-Isoform der Aldolase 1 sowie die PK, aber auch die LDH-A weder durch Triton X-100 noch durch KSCN oder Harnstoff von der fibrösen Scheide gelöst (KRISFALUSI et al., 2006). Verschiedene glykolytische Enzyme und die LDH sind also ungewöhnlich fest mit der fibrösen Scheide assoziiert.

Neben den bereits angeführten glykolytischen Enzymen, wurden weitere mit besonderen Eigenschaften beschrieben. So wurden für die Phosphoglyzeratkinase (PGK-2, CHEN et al., 2004) und die Enolase (EDWARDS und GROOTEGOED, 1983) testes- bzw. spermien-spezifische Formen nachgewiesen. Für andere glykolytische Enzyme -die Phosphoglucoseisomerase (BUEHR und McLAREN, 1981), Aldolase (GILLIS und TAMBLYN, 1984), Triosephosphatisomerase (RUSSELL und KIM, 1996), Phosphoglyzeratmutase (FUNDELE et al., 1987) und auch die Pyruvatkinase (STOREY und KAYNE, 1980; KRISFALUSI et al., 2006)- liegen zwar noch keine Aminosäuresequenzen vor, sind aber strukturelle oder funktionelle Besonderheiten bekannt.

1.3 Die Pyruvatkinase

Die Pyruvatkinase (PK) katalysiert die unter physiologischen Bedingungen irreversible Übertragung der Phosphorylgruppe von Phosphoenolpyruvat auf ADP. Sie kontrolliert die Bildung der Glykolyse-Produkte ATP und Pyruvat über folgende Reaktion:



Entstandenes Pyruvat kann in den Mitochondrien weiter zu CO₂ abgebaut werden oder unter Produktion von NAD zu Laktat reduziert werden. Für ihre katalytische Aktivität benötigt die PK mono- und divalente Kationen (K⁺, Mg²⁺; NOWAK und SUELTER, 1981).

1.3.1 Somatische Pyruvatkinase

In somatischen Zellen wurden bisher vier Isozyme der PK identifiziert, welche sich sowohl in ihren molekularen und kinetischen Eigenschaften als auch in ihrem Vorkommen und der genetischen Herkunft unterscheiden. Es handelt sich um PK-M1, PK-M2, PK-L und PK-R. Bei der nativen somatischen PK handelt es sich um ein Tetramer, welches je nach Isoform aus gleich- (Homomer; bei PK-M1, PK-M2 und PK-L) oder verschiedenartigen Untereinheiten (Heteromer; bei PK-R) besteht. Die Molekulargewichte der Untereinheiten variieren zwischen 47,5 und 62,5 kDa (HALL und COTTAM, 1978). Diese Variationen in den Molekulargewichten dürften zumindest teilweise methodisch bedingt sein.

Obwohl die Isoenzyme der PK ähnlich aufgebaut sind, unterscheiden sie sich in ihren regulatorischen Eigenschaften. Besonders die M1-Isoform weist deutliche kinetische Unterschiede im Vergleich mit den drei anderen Isoformen auf. So zeigt die PK-M1 eine hohe Affinität für das Substrat PEP und eine hyperbolische Abhängigkeit der Aktivität von der PEP-Konzentration gegenüber einer sigmoidalen bei PK-L und PK-R (HALL und COTTAM, 1978). Ein weiterer Unterschied besteht in der allosterischen Aktivierung durch Fruktose 1,6-bisphosphat. Die PK-L, -R und -M2 sind aktivierbar, nicht jedoch die M1-Form (HALL und COTTAM, 1978; STOREY und KAYNE, 1980). Auch die inhibitorische Wirkung von L-Alanin zeigt sich nur bei der L-, R- und M2-Form der PK (HALL und COTTAM, 1978; IMAMURA und TANAKA, 1982). Während die L-Form der PK deutlich durch ATP gehemmt wird, wird PK-M1 hierdurch nur leicht gehemmt (NEWSHOLME und LEECH, 1983). Durch solch unterschiedlich geregelte Enzymformen ist es dem Organismus möglich, die Glykolyse gewebespezifisch zu kontrollieren (NEWSHOLME und LEECH, 1983) und an spezielle Stoffwechselerfordernisse anzupassen.

Die Isoenzyme der PK werden in den Geweben zu verschiedenen Zeiten der Ontogenese unterschiedlich stark exprimiert. So findet man in ausdifferenzierten Geweben wie Herz, Gehirn und adultem Skelettmuskel hauptsächlich das M1-Isoenzym. Der M2-Typ herrscht z.B. im Fötus und in undifferenzierten oder proliferierenden Geweben vor, ist aber auch in reifen Geweben (z.B. in der Niere) stark verbreitet. Das L-Typ-Isoenzym ist vorwiegend in der Leber zu finden. In Erythrozyten sowie hämatopoetischen Geweben liegt der R-Typ der PK vor (vgl. DĄBROWSKA et al., 1998). Die PK-Isozyme wurden im Cytosol und im Kern verschiedener Gewebezellen nachgewiesen (IMAMURA und TANAKA, 1972; CARBONELL et al.,

1973; STRANDHOLM et al., 1976; NOWAK und SUELTER, 1981; GUMINSKA et al., 1988). Interaktionen der PK mit Komponenten des Cytoskeletts (z.B. Aktin), vermutlich über elektrostatische Kräfte, wurden ebenfalls beschrieben (REID und MASTERS, 1986; MASTERS et al., 1987).

Die bekannten PK-Isozyme in Säugern werden von zwei Genen codiert: *PKM* und *PKL*. PK-M1 und PK-M2 werden in Ratte und Mensch vom *PKM*-Gen codiert und unterscheiden sich aufgrund von alternativem Splicing des gleichen Primärtranskripts (TAKENAKA et al., 1989, 1991). Das *PKM*-Gen besteht aus 12 Exons und 11 Introns, wobei für PK-M1 spezifische Sequenzen in Exon 9 und für PK-M2 spezifische in Exon 10 liegen. Zur Herstellung von PK-M1 wird also das Exon 10, zu der von PK-M2 das Exon 9 aus dem Primärtranskript geschnitten. Unterschiedliche Transkripte für PK-L und PK-R in Ratte werden vom *PKL*-Gen durch alternative gewebespezifische Promotoren erhalten (NOGUCHI et al., 1987). Die N-Termini von PK-L und PK-R sind im Vergleich zu PK-M1 und PK-M2 verlängert, worin ein Grund für die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Isozyme liegen könnte (vgl. MUIRHEAD et al., 1986).

1.3.2 Pyruvatkinase in Spermien und Zielsetzung dieser Arbeit

Über die PK von Säugerspermien ist bislang nur wenig bekannt. STOREY und KAYNE (1975, 1980) untersuchten die PK reifer Epididymalspermien von Kaninchen und fanden heraus, dass PK bei hypotonischer Behandlung der Spermien an Zellstrukturen gebunden bleibt. Die katalytischen Eigenschaften ähnelten denen der Muskel-PK (PK-M1), welche als lösliches bzw. leicht ablösbares Enzym vorliegt (Abschnitt 1.3.1). So wurden ähnliche K_M -Werte für die Substrate (PEP und ADP) sowie keine Aktivierung durch Fruktose 1,6-bisphosphat (bis zu 1 mM) festgestellt. Die Zugabe von ATP (1 mM) hatte nur eine partielle Hemmung der PK zur Folge. Außerdem inhibierte Phenylalanin (2,5 bzw. 4,5 mM) die Spermien-PK, während Alanin (4,8 bzw. 2,9 mM) teilweise de-inhibierend wirkte. Ferner wurde beobachtet, dass die Aktivität der Spermien-PK zwischen verschiedenen Tieren einer Art variiert (STOREY und KAYNE, 1975).

MEDRANO et al. (2006b) untersuchten die Substratabhängigkeit von PK aus Eberspermien. Nach Ultraschallbehandlung gewaschener Eberspermien in Homogenisationspuffer und anschließender Zentrifugation wurde sowohl im Überstand als auch im Sediment PK-Aktivität gezeigt. Lösliche und gebundene PK zeigten hohe Affinität für PEP und ADP. Besonders dem ADP wurde hier eine besondere Funktion für die Aktivität *in vivo* zugesprochen. Das intrazelluläre Verhältnis von ADP zu ATP könnte also wesentlich für die PK-Aktivität und damit für die Glykolyserate sein.

Die Bindung von PK an Spermienstrukturen wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen beobachtet. So sprechen JONES und PICCOLO (1999) von nicht löslich vorliegender PK in Eberspermien. Nach WESTHOFF (1996) liegt in Eberspermien etwa 83% der PK strukturgebunden vor. Vor wenigen Monaten berichteten KRISFALUSI et al. (2006) erstmals, dass die PK fest an gereinigter fibröser Scheide aus Mausspermien gebunden ist und weder durch Triton X-100, noch KSCN oder Harnstoff abgelöst werden konnte. Sie folgerten aufgrund von mRNA-Untersuchungen während der Spermatogenese in Mäusen (DE LUIS und DEL MAZO, 1998), dass es sich bei der gebundenen PK um PK-M1 handelt.

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht klar, an welchen Strukturen der Spermien die PK gebunden ist. Auch nach der Publikation von KRISFALUSI und Mitarbeitern bleibt weiterhin unklar, ob die PK ausschließlich an der fibrösen Scheide lokalisiert ist und ob Spermien eine somatische und/oder eine spermien-spezifische Form besitzen. Außerdem ist unklar, in welcher Art PK an Spermienstrukturen gebunden ist und worin die physiologischen Funktionen der Strukturbindung liegen. Dient sie der räumlichen Organisation der Glykolyse in Spermien oder verändert sie die kinetischen Eigenschaften des Enzyms oder beides? Des Weiteren ist zu überprüfen, ob die PK in Spermien unterschiedlicher Säugerarten ähnlich oder unterschiedlich lokalisiert vorliegt. So könnten bekannte artspezifische Unterschiede im Stoffwechsel von Säugerspermien (MARIN et al., 2003) eventuell über eine unterschiedliche Lokalisierung von Stoffwechsellenzymen erklärt werden. Zu klären ist weiterhin, in welchem Ausmaß PK in den verschiedenen Stadien der Spermatogenese in den männlichen Keimzellen vorhanden ist, und ob beim Vorliegen mehrerer PK-Formen, deren Expression während der Spermatogenese Unterschiede aufweist. Wird eine spermien-spezifische PK-Form eventuell erst für spezielle Funktionen im Spermium gebildet?

Um einige dieser offenen Fragen zu beantworten, wurde in dieser Arbeit die an Strukturen gebundene PK aus ejakulierten Eberspermien gereinigt und spezifische Antikörper gegen ihre N-terminale Aminosäuresequenz produziert. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde untersucht, ob unterschiedliche Formen der PK in Säugerspermien vorliegen und wo diese lokalisiert sind. Zudem wurden sie genutzt, um die gebundene PK in Spermien verschiedener Säuger (Eber, Bulle, Mann) sowie in Eberhodenschnitten zu lokalisieren. Es wurde außerdem überprüft, ob die kinetischen Eigenschaften von PK aus Eberspermien sich von denen somatischer PK unterscheidet. Letztlich dient diese Studie dazu, die Bedeutung der Glykolyse in Säugerspermien besser zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterial

Eberejakulate wurden über die Genossenschaft zur Förderung der Schweinehaltung eG (GFS) in 59387 Ascheberg (Zum Pöpping 29) bezogen. Die Lieferung erfolgte per Nachtexpress. Die Eberejakulate waren zur kurzfristigen Aufbewahrung 1:2 mit Beltsville Thawing Solution (BTS) verdünnt. Für die Immunogoldmarkierung glykolytischer Enzyme an Säugerspermien wurden in das Methylacrylat LR White eingebettete Eber-, Bullen- und Humanspermien verwendet. Die LR White-Blöckchen wurden von Dr. D. Westhoff bereitgestellt. Hoden eines geschlechtsreifen Ebers wurden von einer lokalen Veterinärstation bezogen.

Polyklonales Antiserum gegen gereinigte strukturegebundene Eberspermien-PK wurde bei der Firma CovalAb (69007 Lyon, Frankreich) produziert. Die Antikörper wurden dann über Sepharose gereinigt, an die ein für die strukturegebundene Eberspermien-PK spezifisches Peptid gekoppelt war. Das Peptid wurde ebenfalls bei der Firma CovalAb synthetisiert und an die Sepharose gekoppelt. Käuflich erworbene Antikörper, die verwendet wurden, sind nachfolgend aufgelistet.

	Antikörper	Herstellerangaben	Bezugsfirma
Primär-antikörper	Anti-PK-M1	Anti-Kaninchenmuskel-PK aus Ziege	DPC Biermann, 61231 Bad Nauheim
	Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH	monoklonale Antikörper gegen Kaninchenmuskel-GAPDH aus Maus, Isotyp IgG1, Klon 6C5, Protein A affinitätsgereinigt	Calbiochem, EMD Biosciences Inc., San Diego, CA, USA
	Anti-GAPDH-S	Antiserum gegen die gereinigte strukturegebundene GAPDH aus Eberspermien	bereitgestellt von Dr. D. Westhoff
	Anti-Acrosin	monoklonale Antikörper gegen Eberacrosin aus Maus, Isotyp IgG1, Klon ACR-2, Protein A affinitätsgereinigt	Acris Antibodies GmbH, 32120 Hiddenhausen
Peroxidase-konjugierte Sekundär-antikörper	Anti-Ziegen IgG	Anti-Ziegen IgG (ganzes Molekül) aus Kaninchen, affinitätsgereinigt	Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, USA
	Anti-Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen IgG (ganzes Molekül) aus Ziege, affinitätsgereinigt	Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, USA
	Anti-Maus IgG	Anti-Maus IgG [H&L] aus Ziege, affinitätsgereinigt	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA 19525, USA
Fluoreszenz-markierte Sekundär-antikörper	Anti-Ziegen IgG	Anti-Ziegen IgG aus Esel, Alexa Fluor 546	Molecular Probes, 2333AA Leiden, Niederlande
	Anti-Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen IgG aus Ziege, highly cross-adsorbed, Alexa Fluor 568	Molecular Probes, 2333AA Leiden, Niederlande
	Anti-Maus IgG	Anti-Maus IgG aus Ziege, highly cross-adsorbed, Alexa Fluor 488	Molecular Probes, 2333AA Leiden, Niederlande
Gold-markierte Sekundär-antikörper	Anti-Ziegen IgG	Anti-Ziegen IgG [H&L] aus Kaninchen, affinitätsgereinigt, 10 nm Goldpartikel	Biotrend Chemikalien GmbH, 50933 Köln
	Anti-Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen IgG [H&L] aus Ziege, affinitätsgereinigt, 10 nm Goldpartikel	Biotrend Chemikalien GmbH, 50933 Köln
	Anti-Maus IgG	Anti-Maus IgG [H&L] aus Ziege, affinitätsgereinigt, 10 nm Goldpartikel	Biotrend Chemikalien GmbH, 50933 Köln

2.2 Chemikalien und Geräte

2.2.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsfirma
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München
BTS	Minitüb, 84184 Tiefenbach
DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, USA
Fractogel EMD Phenyl (S), Propyl (S) und SO ₃ ⁻ (S)	Merck KGaA, 64271 Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH und Co., 76185 Karlsruhe
Kaltwasserfischgelatine	Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, USA
LMW	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79111 Freiburg
LR White	Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, USA
Mowiol	Hoechst, 65926 Frankfurt
Ovalbumin	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt
Roti-Block und Roti-Load 1	Carl Roth GmbH und Co., 76185 Karlsruhe
Tissue tec, Jung Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems Nussloch GmbH, 69226 Nussloch
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim
Tween 20	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt

Andere Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Inc., Merck KGaA und Serva Electrophoresis GmbH (69115 Heidelberg) sowie Biochemikalien und Enzyme von Roche Diagnostics GmbH (68305 Mannheim) und Sigma-Aldrich Inc. bezogen.

2.2.2 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsfirma
Centrifuge 5412	Eppendorf, 50389 Wesseling-Berzdorf
DM RP Mikroskop	Leica, 64625 Bensheim
FPLC System bestehend aus:	Amersham Bioscience Europe, 79111 Freiburg
1. 2 x Pump P-500	
2. Programmer GP-250 Plus	
3. Mixer 24 V, 50-60 Hz, 5 MPa	
4. Valve V-7, 5 MPa	
5. Fraktionssammler FRAC-100	
6. Monitor UV-M	
Gelsystem (Glasplatten, Käbme und Spacer)	Biotec-Fischer GmbH, 35447 Reiskirchen
Grids für Elektronenmikroskopie	Plano, 35578 Wetzlar
Kontron Uvikon Spectrophotometer 922	Tresser Instruments, 64846 Groß-Zimmern
Gefriertrocknungsanlage	Christ, 37520 Osterode am Harz
Metrawatt Servogor 120	Asea Brown Boveri (ABB), 8050 Zürich, Schweiz
Mikrotom HM 560	MICROM International GmbH, 69190 Walldorf
Multiskan Ascent	Thermo Life Sciences, 63505 Langenselbold
Nitrocellulosemembran (Protan BA 85 Cellulosenitrat)	Schleicher und Schuell, 37582 Dassel
ORCA ER CCD Kamera	Hamamatsu, 82211 Herrsching
PAP-Pen, Liquid Blocker	Science Services, 80637 München
Phero-minivert Elektrophoresekammer	Biotec-Fischer GmbH, 35447 Reiskirchen
pH-Meter CG 702	Schott, 55122 Mainz
Plastibrand Einmalküvetten, 1,5 ml, halbmikro	Brand, 97861 Wertheim
PM2 DL Spektralphotometer	Carl Zeiss AG, 73447 Oberkochen
Resource Phe- und Resource Q-Säule	Amersham Bioscience Europe, 79111 Freiburg
Säulen	Amersham Bioscience Europe, 79111 Freiburg
Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut
Sorvall Rotor SS-34	Thermo Electron Corporation, 63505 Langenselbold
Sorvall Zentrifuge RC5C	Thermo Electron Corporation, 63505 Langenselbold

Spannungsgerät: PHERO-stab. 500,
Electrophoresis Powersupply
Tecnai 12 Biotwin Elektronenmikroskop
Tischzentrifuge
Trans-Blot Semi-Dry
Transsonic 460
Ultrospec III
Waagen PN 1210 und AE 240
Wasserbad
96well Platten

Biotec-Fischer GmbH, 35447 Reiskirchen
FEI Company, 5600 KA Eindhoven, Niederlande
Amicon Bioseparations, Millipore, 65824 Schwalbach/Ts.
Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA
Schalltec, 64546 Mörfelden-Walldorf
Amersham Bioscience Europe, 79111 Freiburg
Mettler-Toledo GmbH, 35353 Gießen
GFL, 30938 Burgwedel
Thermo Life Sciences, 63505 Langenselbold

2.3 Extraktion strukturgebundener PK aus Eberspermien

Die Eberspermien wurden zuerst von Seminalplasma und BTS getrennt. Hierzu wurde die Spermiesuspension 15 min bei 3000 x g und 17°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen; die sedimentierten Spermien wurden bis zum Versuchsbeginn bei -20°C gelagert.

Aufgetaute Spermien wurden in Natriumphosphatpuffer (25 mM; pH 7,3) inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (5-7 x 6 sec, dazwischen Lagerung auf Eis). Anschließend wurde das Homogenat 3-4 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in Phosphatpuffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation der Probe wurde das Sediment zweimal in Phosphatpuffer gewaschen (d.h. jeweils Resuspendierung und Zentrifugation wie zuvor). Das Sediment wurde dann erneut in Phosphatpuffer resuspendiert und für 5 min bei RT mit Trypsin (3 mg/g Spermienassgewicht) inkubiert. Der Trypsinverdau wurde mit je 20 µl 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) pro g Spermienassgewicht gestoppt. Anschließend wurde die Probe sofort für 20 min bei 40000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der proteolytisch von Spermienstrukturen abgelösten PK wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

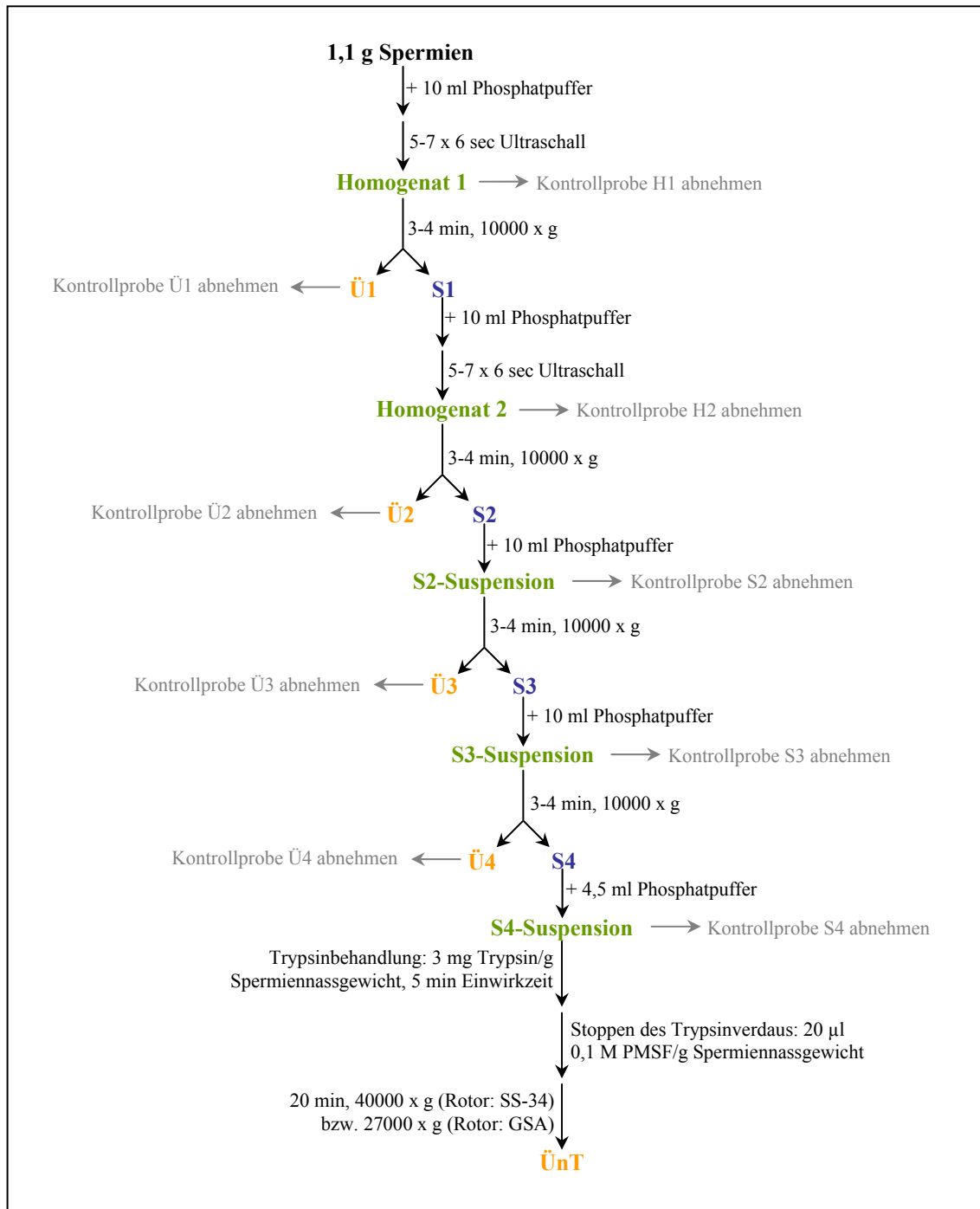


Abbildung 8: Ablauf der Extraktion von PK aus Eberspermien.

Die aufgetauten Spermien (z.B. 1,1 g) werden über die Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen. Die nach Zentrifugation sedimentierten Spermienstrukturen werden gewaschen und mit Trypsin inkubiert. Mit Trypsin ablösbare Proteine (u.a. PK) befinden sich nach Zentrifugation der Probe im Überstand.

Abkürzungen: H=Homogenat, Ü=Überstand, S=Sediment, ÜnT=Überstand nach Trypsinbehandlung, PMSF=Phenylmethylsulfonylfluorid

2.4 Reinigung der tryptisch von Spermienstrukturen abgelösten PK

Die proteolytisch von den Eberspermienstrukturen abgelöste PK sollte nun angereichert werden. Es wurde versucht, die verunreinigenden Proteine im Überstand nach Trypsinbehandlung auf der Grundlage unterschiedlicher Proteineigenschaften von der PK abzutrennen. So wurde geprüft, ob Unterschiede in Hydrophobizität oder Proteinladung zur Reinigung der PK genutzt werden können. Die Chromatographien wurden jeweils als FPLC (Fast Performance Liquid Chromatographie) durchgeführt, bei der die mobile Phase flüssig (Liquid) ist und eine schnelle Durchführung (Fast Performance) durch Pumpen erreicht wird. An einer Kontrolleinheit werden u.a. die Flussrate und das Mischungsverhältnis der zur Chromatographie verwendeten Lösungen über die Säule definiert.

Das Ergebnis der Reinigung wurde über die Bestimmung von spezifischer Aktivität, Reinigungsfaktor und Ausbeute, SDS-gelelektrophoretische Proteinauftrennung und -anfärbung sowie teilweise über die Messung von Fremdaktivitäten (v.a. der GAPDH) bewertet.

2.4.1 Hydrophobizitätschromatographie

Bei der Hydrophobizitätschromatographie werden die spezifischen hydrophoben Oberflächen von Proteinen ausgenutzt. Diese werden durch Aminosäuren mit hydrophobem Charakter, welche auf der Proteinoberfläche exponiert liegen, gebildet. Die Säulenmatrix trägt hydrophobe Gruppen, mit welchen die hydrophoben Oberflächen der Proteine interagieren. Diese Protein-Säulen-Wechselwirkung kann je nach Aufbau und Struktur der Proteine sehr unterschiedlich ausfallen. Salze beeinflussen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial. So führen hohe Salzkonzentrationen zu einem gesteigerten nach außen Kehren von hydrophoben Proteinregionen und somit zu einer vermehrten Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen. Zum Probenauftrag wird eine Salzkonzentration im Puffer gewählt, bei welcher das Zielprotein ausreichend hydrophob vorliegt und (fest) an das Säulenmaterial bindet. Den Einfluss der Ionenstärke auf die hydrophoben Wechselwirkungen macht man sich auch bei der Elution zunutze. Je nach Hydrophobizitätsgrad können die Proteine durch Reduktion der Salzkonzentration unterschiedlich schnell von der Säule gelöst und somit im günstigsten Fall voneinander getrennt werden.

Zu Beginn wurde versucht, die proteolytisch abgelöste PK aus dem Überstand nach Trypsinbehandlung über das hydrophobe Säulenmaterial Resource Phe von Pharmacia Biotech (Volumen: 1 ml) anzureichern. Die polymerische Matrix (Polystyren/Divinyl Benzen) trägt hier Phenylketten, die an aromatische Aminosäuren binden. Die Anbindung von Proteinen (u.a. der PK) an das Säulenmaterial erfolgte bei 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [in

Natriumphosphatpuffer (25 mM; pH 7,3) inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT]. Nach dem Auswaschen nicht bindender Proteine wurde über eine lineare und/oder gestufte Absenkung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Chromatographiepuffer die Elution sowie teilweise auch eine Trennung der Proteine bewirkt.

Um Aktivitätsverluste während/infolge der Reinigungsprozedur zu verhindern, wurde nachfolgend versucht, die PK durch 10% Glycerin in den Chromatographiepuffern zu stabilisieren. Außerdem wurde die Einsatzmenge an Spermien und so die auf die Säule aufgetragene Proteinmenge erhöht, um ausreichend PK für die nachfolgenden Vorhaben (Reinigungsbeurteilung, Antikörperproduktion, Teilsequenzierung und kinetische Untersuchungen) zu reinigen.

Um die Menge an gereinigtem Protein zu erhöhen, wurden zwei weitere hydrophobe Säulenmaterialien auf ihr Vermögen zur PK-Reinigung hin getestet. Es handelte sich hierbei um Fractogel EMD Phenyl (S) und Fractogel EMD Propyl (S) von Merck (jeweils kreuzvernetzte Polymethacrylatharze mit Phenyl bzw. Propyl als funktionelle Gruppen; Partikelgröße 20-40 μm ; Volumen: 10 ml). Es wurden jeweils 50 ml Überstand nach Trypsinbehandlung des Zentrifugationssediments von Spermienhomogenat eingesetzt. Diese wurden mit 25 mM Natriumphosphatpuffer inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7,3), auf 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebracht und auf die jeweilige, mit Laufpuffer [Natriumphosphatpuffer (25 mM; pH 7,3) inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 10% Glycerin und 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] äquilibrierte (Puffervolumen: 110 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min) Säule aufgetragen (Probenvolumen: 125 ml, Pumpgeschwindigkeit: 1 ml/min). Nach dem Probenauftrag wurden die Säulen mit Laufpuffer gewaschen (Puffervolumen: 55 bzw. 150 ml, Pumpgeschwindigkeit: 1 bzw. 3 ml/min). Auftrage- und Waschdurchfluss wurden aufgefangen und auf PK-Aktivität hin überprüft. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines linearen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 30% nach 0% über 50 bzw. 120 ml (Pumpgeschwindigkeit: 1 bzw. 2 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die Aktivitäten von PK und GAPDH sowie von Enolase und LDH wurden für die aufgefangenen Fraktionen bestimmt.

2.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Reinigung über Ionenaustauschchromatographie basiert auf der reversiblen Wechselwirkung zwischen einem geladenen Protein und einem entgegengesetzt geladenen Chromatographiemedium. Die Proteinoberflächenladung variiert mit dem pH-Wert. Über dem isoelektrischen Punkt (pI) ist das Protein negativ geladen. Zur Reinigung dieses Proteins wäre ein positiv geladenes Chromatographiemedium (Anionenaustauscher) notwendig. Ein pH-Wert unter dem pI eines Proteins führt bei diesem zu positiver Ladung. Entsprechend wäre

hier ein Kationenaustauscher zur Reinigung des Proteins notwendig. Die Elution der Proteine erfolgt über Erhöhung der Salzkonzentration oder pH-Änderung.

Zur Anreicherung der strukturgebundenen Spermien-PK wurden zwei Säulenmaterialien verwendet: der Anionenaustauscher Resource Q von Pharmacia Biotech (Polystyren/Divinyl Benzen mit quaternärem Ammonium als funktionelle Gruppen; Partikelgröße: 15 μm ; Volumen: 1 ml) und der Kationenaustauscher Fractogel EMD SO_3^- (S) von Merck (kreuzvernetzte Polymethacrylatharze mit Sulfoisobutyl als funktionelle Gruppen; Partikelgröße: 20-40 μm ; Volumen: 10 ml).

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde ein Fraktionsmix nach Chromatographie über Resource Phe verwendet, welcher große Mengen an mit Glycerin stabilisierter PK und GAPDH enthielt und über Nacht gegen Laufpuffer (20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% Glycerin, pH variiert) dialysiert worden war. Der pH-Wert der Proteinprobe nach der Dialyse wurde überprüft. Die Chromatographie wurde bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 7,6 und 8,6 durchgeführt. Nach dem Äquilibrieren der Resource Q-Säule mit 20 ml Laufpuffer (Pumpgeschwindigkeit: 1 ml/min) wurde die Proteinprobe auf die Säule aufgetragen (Probenvolumen: zw. 1 und 2 ml, Pumpgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Nachfolgend wurden nichtbindende Proteine mit Laufpuffer von der Säule gewaschen (Puffervolumen: 40 ml, Pumpgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die Proteinelution erfolgte über eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Puffer (0 bis 1 M, 0 bis 0,2 M, 0 bis 0,1 M und zuletzt 0 bis 0,05 M NaCl über 50 ml, Pumpgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die Aktivitäten von PK und GAPDH in den aufgefangenen Fraktionen (Auftragedurchfluss bis Eluat) wurden über Enzymaktivitätsmessungen am Multiskan Ascent bestimmt. Der aufgetragene Fraktionsmix sowie die beim Auftragen bei den verschiedenen pH-Werten nicht bindenden Proteine wurden einer SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgender Proteinfärbung unterzogen. So wurde die Reinigung sowie der Effekt unterschiedlicher pH-Werte auf die Bindung von PK und GAPDH an das Säulenmaterial bewertet.

Bei der Kationenaustauschchromatographie über Fractogel EMD SO_3^- (S) wurde Überstand nach Trypsinbehandlung (ÜnT) des Zentrifugationssediments von Spermienhomogenat eingesetzt, wobei die Trypsinbehandlung in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,3 (inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT) durchgeführt wurde. Es sollte zuerst mit Hilfe eines pH-Gradienten herausgefunden werden, bei welchem pH-Wert die PK gerade noch am Säulenmaterial bindet. Hierzu wurde der pH-Wert im ÜnT auf pH 6,1 eingestellt. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Laufpuffer [Phosphatpuffer (10 mM; pH 6,1) inkl. 1 mM DTT und 10% Glycerin; Puffervolumen: ca. 200 ml, Pumpgeschwindigkeit:

5 ml/min] wurde die Proteinprobe aufgetragen (Probenvolumen: 25 ml ÜnT, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min) und die Säule gewaschen (Puffervolumen: 150 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min). Der Auftrage- und der Waschdurchfluss wurden auf PK-Aktivität hin geprüft. Dann wurden am Säulenmaterial gebundene Proteine mit Hilfe eines linearen pH-Gradienten von 6,1 nach 7,9 über 190 ml eluiert (Pumpgeschwindigkeit: 3 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Bei dem ermittelten pH-Wert, bei welchem die PK gerade noch am Säulenmaterial bindet, wurde eine zweite Chromatographie über Fractogel EMD SO_3^- (S) durchgeführt. Hierbei sollten die gebundenen Proteine aus dem ÜnT über eine Erhöhung der Molarität des Phosphatpuffers getrennt werden. Durch den zuvor ermittelten pH-Wert (pH 7,15) sollte die Menge an Fremdproteinen, die bei diesem pH noch keine ausreichende Ladung besitzen, um an das Säulenmaterial zu binden, maximiert werden. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Laufpuffer [Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,15) inkl. 1 mM DTT und 10% Glycerin; Volumen: ca. 200 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min], dem Probenauftrag (34 ml ÜnT in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3, nachträglich auf pH 7,15 eingestellt; Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min) und dem anschließenden Waschen der Säule (Puffervolumen: 150 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min) wurde mit einem linearen Gradienten von 10 mM bis 250 mM Phosphatpuffer über 190 ml eluiert (Pumpgeschwindigkeit: 3 ml/min, Fraktionsgröße: 2 ml). Die Aktivitäten von PK und GAPDH in den aufgefangenen Fraktionen wurden über Enzymaktivitätsmessungen am Multiskan Ascent bestimmt. Die Fraktionen des PK-Peaks wurden zusätzlich auf LDH-Aktivität hin überprüft. Das Reinigungsergebnis wurde über die Bestimmung von spezifischer Aktivität, Reinigungsfaktor und Ausbeute sowie über die Messung der genannten Fremdaktivitäten bewertet.

2.4.3 Kombination von Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie

Nachdem sowohl für die Reinigung über Kationenaustausch-, als auch über Hydrophobizitätschromatographie gute Ergebnisse erzielt waren, wurden sie kombiniert. Der Kationenaustauscher wurde hierbei an erster Stelle gewählt, da er mit 130 mg (Lysozym) pro ml Gel eine höhere Proteinbindungskapazität besitzt als das Fractogel EMD Propyl (S) [20-30 mg (Ovalbumin) pro ml Gel] und somit größere Mengen der PK aus dem ÜnT praktisch für die Hydrophobizitätschromatographie vorgereinigt werden konnten. Die Abtrennung der GAPDH sollte über die hydrophobe Chromatographie erfolgen.

Die Spermieneinsatzmenge wurde nun stark erhöht (von ursprünglich 3 g auf 88 g Spermiennassgewicht). Das Extraktionsprotokoll wurde an die erhöhte

Spermienausgangsmenge sowie an die nachstehende Kationenaustauschchromatographie angepasst. Die Trypsinbehandlung wurde nicht wie zuvor in 25 mM, sondern in 10 mM Phosphatpuffer ausgeführt. Nach dem Abstoppen des Trypsinverdaus wurde das mit Trypsin behandelte Spermienhomogenat sofort zentrifugiert (20 min bei 40000 x g und 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zum Auftragen auf die Fractogel EMD SO₃⁻ (S)-Säule auf pH 7,15 eingestellt.

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Laufpuffer [Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,15) inkl. 1 mM DTT und 10% Glycerin; Puffervolumen: ca. 200 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min] wurde ÜNT, pH 7,15 auf die Säule aufgetragen (Probenvolumen: 372 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min). Die proteinbeladene Säule wurde nach dem Probenauftrag über Nacht gewaschen (Puffervolumen: ca. 1 l, Pumpgeschwindigkeit: 1 ml/min). Auftrage- und Waschdurchfluss wurden auf PK- und GAPDH-Aktivität hin überprüft. Am nächsten Morgen wurde mit einem Stufengradienten eluiert: zunächst mit 15 mM Phosphatpuffer (Puffervolumen: 80 ml, Pumpgeschwindigkeit: 3 ml/min, Fraktionsgröße: 5 ml), dann mit 38 mM Phosphatpuffer (Puffervolumen: 285 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min, Fraktionsgröße: 3 ml) und schließlich mit 50 mM Phosphatpuffer (Puffervolumen: 150 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min, Fraktionsgröße: 3 ml). Die PK- und die GAPDH-Aktivitäten in den Elutionsfraktionen wurden am Multiskan Ascent gemessen. Die Fraktionen des PK-Hauptpeaks wurden dann vereinigt, auf pH 7,3 eingestellt und auf 30% (NH₄)₂SO₄ gebracht (mit 25 mM Phosphatpuffer inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 50% (NH₄)₂SO₄, pH 7,3). Nach nochmaligem Überprüfen des pH-Wertes wurde die Probe auf die Fractogel EMD Propyl (S)-Säule aufgetragen (Probenvolumen: 398 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min). Die Säule war zuvor mit Laufpuffer [Phosphatpuffer (25 mM; pH 7,3) inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 10% Glycerin und 30% (NH₄)₂SO₄] äquilibriert worden (Puffervolumen: 110 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min). Nach dem Probenauftrag wurde die Säule über Nacht gewaschen (Puffervolumen: ca. 400 ml, Pumpgeschwindigkeit: 0,5 ml/min). PK- und GAPDH-Aktivitätsmessungen wurden mit Auftrage- und Waschdurchfluss durchgeführt. Die Proteinelution wurde am nächsten Morgen ebenfalls über einen Stufengradienten bewirkt. Neben den Stufen bei 20,5% (Puffervolumen: 230 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min, Fraktionsgröße: 5 ml) und 14% (NH₄)₂SO₄ (Puffervolumen: 88 ml), die zur Elution der GAPDH und der PK dienen sollten, wurden noch drei Sicherheitsstufen bei 19,5% (Puffervolumen: 96 ml), 12,5% (Puffervolumen: 58 ml) und 11% (NH₄)₂SO₄ (Puffervolumen: 44 ml) eingesetzt. Die Elution bei 19,5%, 14%, 12,5% und 11% (NH₄)₂SO₄ wurde bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml/min und einer Fraktionsgröße von 2 ml durchgeführt.

Der Reinigungserfolg der beiden Chromatographien wurde über die Bestimmung von spezifischer Aktivität, Reinigungsfaktor, Ausbeute und dem Verhältnis von PK- zu GAPDH-Aktivität sowie über SDS-gelelektrophoretische Proteinauftrennung und -anfärbung bewertet.

Die 4 Fraktionen nach der Chromatographie über Fractogel EMD Propyl (S), für welche die beste Reinigung der PK gezeigt werden konnte, wurden vereinigt. Hiervon wurden 5,5 ml gegen Natriumphosphatpuffer (1 mM; pH 7,3) dialysiert (3maliger Pufferwechsel, je 1 l Dialysepuffer, Dauer insgesamt 22 h). Nach Abnahme einer Kontrollprobe nach der Dialyse (Probenvolumen nach Dialyse: 7 ml) wurden 6,7 ml der PK-Lösung in einem Rundkolben für 3½ h lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat wurde gewogen und anschließend trocken bei -40°C gelagert. Ein Teil des Lyophilisates wurde zur Produktion von Antikörpern gegen die von Eberspermienstrukturen proteolytisch abgelöste, gereinigte PK eingesetzt (Teil 2.10).

2.5 Anreicherung der löslichen PK aus Eberspermien

Um die Spezifität der immungereinigten Antikörper zu überprüfen (Teil 2.15), war eine Anreicherung der löslichen PK aus Eberspermien notwendig. Es wurde versucht, die lösliche PK mit einem an die Reinigung der strukturgebundenen PK angelehnten Verfahren anzureichern. 20 g Eberspermien wurden in 120 ml Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,15) inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT resuspendiert. Die PK wurde mit Hilfe von Ultraschall (6 x 6 sec, dazwischen Kühlung auf Eis) aus den Eberspermien extrahiert. Nach Zentrifugation (40000 x g, 1 h, 4°C) befand sie sich im Überstand. Dieser wurde einer Ionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD SO₃⁻ (S) unterzogen. Hierzu wurde das Kationenaustauschmaterial zuerst mit Laufpuffer [Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,15) inkl. 1 mM DTT und 10% (v/v) Glycerin] äquilibriert (Puffervolumen: 200 ml, Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/min). Nach Überprüfung des pH-Wertes des Überstandes mit der löslichen PK (Sollwert: pH 7,15), wurde dieser auf die Säule aufgetragen (Probenvolumen: 113 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min). Der Durchfluss wurde aufgefangen und auf PK-Aktivität hin überprüft. Die Säule wurde über Nacht mit dem Laufpuffer gewaschen (Puffervolumen: ca. 500 ml, Pumpgeschwindigkeit: 0,5 ml/min). Es wurde dann mit einem linearen Gradienten von 10 mM nach 225 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,1; inkl. 1 mM DTT und 10% (v/v) Glycerin) über 285 ml eluiert (Pumpgeschwindigkeit: 3 ml/min, Fraktionsgröße: 3 ml). Die PK-Aktivitäten in den aufgefangenen Fraktionen wurden am Multiskan Ascent sowie bei Fraktionen mit PK-Aktivität zusätzlich am Photometer gemessen. Die Fraktionen des PK-Peaks wurden vereinigt, auf pH 7,3 eingestellt und mit 25 mM Phosphatpuffer inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 50% (NH₄)₂SO₄, pH 7,3 auf 30%

(NH₄)₂SO₄ gebracht. Nach erneuter Prüfung des pH-Wertes wurden die vereinigten Fraktionen auf die mit Laufpuffer äquilibrierte [Natriumphosphatpuffer (25 mM; pH 7,3) inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 10% (v/v) Glycerin und 30% (v/w) (NH₄)₂SO₄; Puffervolumen: 110 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min] Fractogel EMD Propyl (S)-Säule aufgetragen (Probenvolumen: 80 ml, Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min). Der Auftragedurchfluss wurde auf PK-Aktivität hin überprüft und die Säule dann über Nacht mit Laufpuffer gewaschen (Puffervolumen: ca. 450 ml, Pumpgeschwindigkeit: 0,5 ml/min). Am nächsten Morgen wurde mit einem linearen Gradienten von 30% nach 0% (NH₄)₂SO₄ (in Natriumphosphatpuffer [25 mM; pH 7,3] inkl. 1 mM EDTA und 1 mM DTT sowie 10% Glycerin) über 190 ml eluiert (Pumpgeschwindigkeit: 2 ml/min, Fraktionsgröße: 2 ml). Die PK-Aktivitäten in den aufgefangenen Fraktionen wurden am Multiskan Ascent gemessen, um die PK-haltigen Fraktionen aufzufinden. Die PK-Aktivitäten in diesen wurden dann am Photometer gemessen.

Über die Bestimmung von spezifischer Aktivität und Reinigungsfaktor sowie über SDS-gelelektrophoretische Proteinauftrennung und -anfärbung wurde überprüft, ob und wie gut die lösliche PK aus Eberspermien angereichert wurde.

2.6 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.6.1 Das Prinzip

Der optische Test nach WARBURG basiert auf dem Unterschied der Absorptionseigenschaften von NAD(P)H und NAD(P)⁺ bei 340 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbiert die reduzierte Form des NAD(P)⁺, die oxidierte aber nicht. Die Absorption einer Probe bei 340 nm ist demnach direkt proportional zur Menge an reduziertem NAD(P)⁺. Dies kann man sich zunutze machen, um die Aktivität von Enzymen photometrisch zu bestimmen.

Die Aktivitätstests wurden im vorliegenden Fall modifiziert nach BERGMAYER (1983) durchgeführt. Mit Hilfe von einfachen und gekoppelten Testsystemen wurde in den Proben bei Anwesenheit des getesteten Enzyms eine Zu- oder Abnahme von NAD(P)H erreicht, welche in direktem Zusammenhang zur Menge des untersuchten Enzyms steht. Durch eine kontinuierliche Absorptionsmessung der Probenlösung im Testverlauf kann die Konzentrationsänderung des NAD(P)H als Funktion der Zeit (= Umsatzrate) ermittelt und daraus die Enzymaktivität berechnet werden. Damit ein Enzymtest Gültigkeit besitzt, müssen für die enzymkatalysierte Reaktion eine über einen bestimmten Messzeitraum lineare Extinktionsveränderung sowie eine proportionale Umsatzreaktion mit zunehmender

Probeneinsatzmenge gewährleistet sein. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Substratkonzentration, Ionenstärke, etc.) müssen genau definiert sein. (SUELTER, 1990)

Grundlage für die Absorptionsphotometrie stellt das LAMBERT-BEER'sche Gesetz dar:

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * d$$

E : Extinktion

I : Intensität des einfallenden Lichtes

I₀ : Intensität des ausfallenden Lichtes

d : Schichtdicke

c : Konzentration der absorbierenden Substanz

ε : Extinktionskoeffizient

(abhängig von der Wellenlänge der Messstrahlung, der absorbierenden Substanz, dem Lösungsmittel)

Durch ein elektrisches Photometer wird die durch eine Lösung bewirkte Lichtschwächung, durch Messung der Intensität eines Lichtstrahls vor und nach Durchtritt durch die Messlösung, direkt bestimmt. Der Quotient aus austretender Strahlungsintensität I und eintretender Strahlungsintensität I₀ gibt die Durchlässigkeit der Testlösung an. Die Extinktion ist direkt proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz und zur Schichtdicke der Messlösung.

Die Maximalaktivitäten der PK und anderer glykolytischer Enzyme wurden wie folgt berechnet:

$$\frac{\Delta E}{t * \varepsilon * d} * \frac{KV}{PV} \left[\frac{\mu \text{Mol}}{\text{ml} * \text{min}} = \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]$$

ΔE : Extinktionsänderung

t : Zeit [min]

ε : Extinktionskoeffizient [für NAD(P)H + H⁺: 6,22]

d : Schichtdicke [hier: 1 cm]

KV : Küvettenvolumen [hier: 500 oder 1000 μl]

PV : Probenvolumen im Test [μl]

Die Menge an Enzym in einer Probe wurde in Form von „Internationalen Einheiten“ angegeben. Hierbei ist 1 IU (International Unit) oder kurz 1 U (Unit) definiert als die Menge eines Enzyms, die zu 1 μMol Substratumsatz/min unter definierten Reaktionsbedingungen (hier: 25°C, pH 7,6) führt.

Die spezifische Aktivität eines Enzyms unter bestimmten Reaktionsbedingungen ist definiert als (SUELTER, 1990):

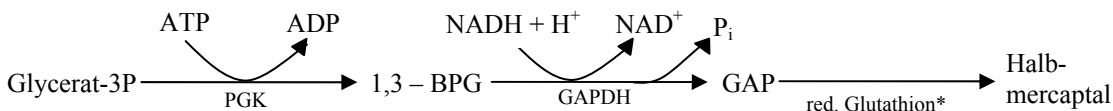
$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Gesamteinheiten an Enzymaktivität in einer Probe}}{\text{in der Probe enthaltenes Gesamtprotein}}$$

$$\left[\frac{U}{mg \text{ Protein}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\mu Mol}{min * mg} \right]$$

2.6.2 Die Testsysteme für Aktivitätsmessungen von Enzymen

2.6.2.1 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12)

a) Testprinzip:



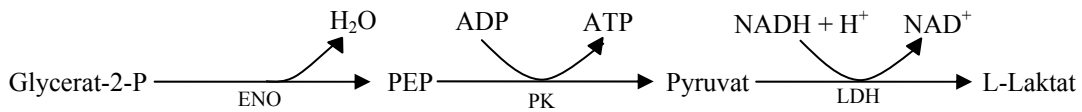
* Das reduzierte Glutathion entfernt das entstehende GAP unter Bildung eines Halbmercaptals. Somit kann GAP nicht mehr über DAP zu Glycerol-3-P reduziert werden und Ergebnisverfälschungen wird vorgebeugt.

b) Testansatz:

Substanz	Vorratslösung	Testkonzentration	Einsatzmenge/Test
TRAP, pH 7,6	250 mM	50 mM	100 μ l
EDTA, pH 7,6	25 mM	1 mM	20 μ l
MgSO ₄	100 mM	4 mM	20 μ l
Glutathion (red.)	60 mM	2,4 mM	20 μ l
NADH	5 mM	0,2 mM	20 μ l
ATP	25 mM	1 mM	20 μ l
PGK	250 U/ml	10 U/ml	20 μ l
Extrakt	var.	var.	var.
H ₂ O			ad 480 μ l
<i>Vorlauf</i>			
3-Phosphoglycerat	175 mM	7 mM	20 μ l
<i>Gesamtvolumen</i>			<i>500 μl</i>

2.6.2.2 Enolase (ENO: EC 4.2.1.11)

a) Testprinzip:

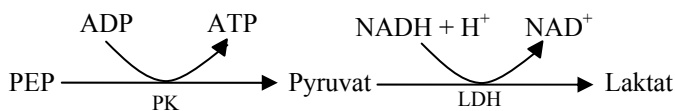


b) Testansatz:

Substanz	Vorratslösung	Testkonzentration	Einsatzmenge/Test
TRAP, pH 7,6	250 mM	50 mM	100 µl
NADH	5 mM	0,2 mM	20 µl
MgSO ₄	100 mM	8 mM	40 µl
ADP	12,5 mM	0,5 mM	20 µl
LDH	275 U/ml	22 U/ml	40 µl
PK	50 U/ml	2 U/ml	40 µl
Extrakt	var.	var.	var.
H ₂ O			ad 480 µl
<i>Vorlauf</i>			
2-Phosphoglycerat	125 mM	5 mM	20 µl
Gesamtvolumen			500 µl

2.6.2.3 Pyruvatkinase (PK: EC 2.7.1.40)

a) Testprinzip:



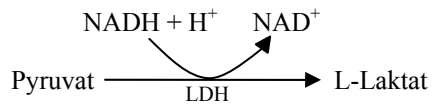
b) Testansatz:

Substanz	Vorratslösung	Testkonzentration	Einsatzmenge/Test
TRAP, pH 7,6	250 mM	50 mM	100 µl
KCl	500 mM	50 mM	50 µl
MgCl ₂	100 mM	4 mM	20 µl
NADH	5 mM	0,2 mM	20 µl
PEP	25 mM	1 mM	20 µl
LDH	100 U/ml	4 U/ml	20 µl
Extrakt	var.	var.	var.
H ₂ O			ad 480 µl
<i>Vorlauf</i>			
ADP	25 mM	1 mM	20 µl
Gesamtvolumen			500 µl

Wenn die Aktivität der PK in Proben mit Adenylatkinaseaktivität (z.B. Extrakten) gemessen werden sollte, wurde dem Testsystem ein spezifischer Inhibitor letztgenannter, das Diadenosinpentaphosphat (AP₅A), zugefügt (Testkonzentration 10 µM).

2.6.2.4 Laktatdehydrogenase (LDH: EC 1.1.1.27)

a) Testprinzip:



b) Testansatz:

Substanz	Vorratslösung	Testkonzentration	Einsatzmenge/Test
TRAP, pH 7,6	250 mM	50 mM	100 µl
EDTA, pH 7,6	125 mM	5 mM	20 µl
NADH	5 mM	0,2 mM	20 µl
Extrakt	var.	var.	var.
H ₂ O			ad 480 µl
<i>Vorlauf</i>			
Pyruvat	50 mM	2 mM	20 µl
<i>Gesamtvolumen</i>			<i>500 µl</i>

2.7 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden zwei Methoden angewandt: die grobe Bestimmung durch Extinktionsmessung bei 280 nm sowie die Proteinbestimmung nach BRADFORD.

2.7.1 Messung bei 280nm

Eine grobe Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung wurde durch Extinktionsmessung bei 280 nm erreicht. Diese Methode basiert auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Der Anteil an diesen Aminosäuren unterscheidet sich von Protein zu Protein, was teilweise zu großen Differenzen im Extinktionskoeffizienten führt. Zudem können Verunreinigungen durch andere Zellbestandteile zu Verfälschungen führen. Nukleinsäuren bspw. absorbieren ebenso bei 280 nm. (ECKERT und KARTENBECK, 1997)

Diese Methode zeichnet sich durch ihre Einfachheit aus, ist allerdings nicht für alle Zwecke geeignet.

Eine Standardgerade zur Proteinbestimmung durch Extinktionsmessung bei 280 nm wurde mit BSA-Lösung verschiedener Konzentration (0,2 mg bis 1 mg BSA/ml Phosphatpuffer) erstellt.

2.7.2 Proteinbestimmung nach BRADFORD (BIO-RAD Microassay)

Bei der quantitativen Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) handelt es sich um einen kolorimetrischen Proteinnachweis. Man nutzt aus, dass Proteine mit bestimmten farbstoffbildenden Reagenzien Farbreaktionen eingehen. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau erfährt durch Bindung an Proteine im sauren Milieu eine Absorptionsänderung. Chemisch betrachtet tritt hierbei eine Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff ein, wobei der Farbstoff an kationische und nicht polare, hydrophobe Seitenketten des Proteins bindet. So tritt eine bevorzugte Bindung an Argininreste und in kleinerem Umfang an einige andere basische und aromatische Aminosäurereste statt. Das Coomassie-Brilliantblau wird in seiner unprotonierten, anionischen Form stabilisiert. (ECKERT und KARTENBECK, 1997)

Die hier verwendete Testlösung der Firma Bio-Rad (BIO-RAD Protein Assay) enthält den Trimethylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G 250. Bei diesem tritt durch Bindung an Proteine eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm auf. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm macht man sich zunutze, um den Gehalt an Protein in Lösung zu bestimmen. Hierzu wird vorab mit Hilfe von Standardprotein eine Standardgerade erstellt. Im vorliegenden Fall wurde Rinderserumalbumin (BSA) zur Erstellung der Standardgerade eingesetzt. BSA-Stammlösung (25 mg/l) wurde gemäß nachfolgender Tabelle in eine 96-well-Platte pipettiert und mit dH₂O entsprechend verdünnt.

Tabelle 1: Pipettierschema für die Erstellung einer Standardgerade zur Proteinbestimmung nach BRADFORD in 96-well-Platte

BSA-Stammlösung [µl]	dH ₂ O [µl]	BIO-RAD Protein Assay [µl]	Protein [µg/ml]	E
0	80	20	0	0
5	75	20	1,25	
10	70	20	2,5	
20	60	20	5	
30	50	20	7,5	
40	40	20	10	
50	30	20	12,5	
60	20	20	15	
70	10	20	17,5	
80	0	20	20	

Auch die Proteinproben wurden mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von je 80 µl verdünnt. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen angesetzt, um einen Absorptionswert innerhalb der Standardgerade zu erhalten. Die Farbstoffreaktion wurde durch Zugabe von je 20 µl BIO-RAD Protein Assay in jedes well gestartet.

Die Proteinbestimmung wurde durch einen Multiskan Ascent V1.24 ausgeführt. Mit Hilfe der zugehörigen Ascent Software wurden die Messparameter und -schritte definiert: Nach 10-sekündigem Schütteln der Messplatte bei 960 RPM und einer 10-minütigen Inkubationspause, wurde die Platte ein zweites Mal geschüttelt (10 sec, 960 RPM). Nun folgte die eigentliche Absorptionsmessung bei 595 nm.

Später wurde die Proteinmenge in größeren Gesamtvolumina (500 oder 1000 µl) photometrisch genauer bestimmt, wenn ein ausreichendes Probenvolumen vorhanden war.

2.8 Bestimmung der Zellzahl

Die Auszählung der Spermien erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²) und eines Phasenkontrastmikroskops. Die Proben wurden anfänglich mit dH₂O verdünnt. Aufgrund der Erschwerung der Zellzahlbestimmung wegen teilweiser Aggregation der Spermien wurde später 20 mM EDTA zur Verdünnung eingesetzt. Ziel war hierbei das Abfangen von Ca²⁺ und Metallionen. Je Probe erfolgte jeweils eine Auszählung von zehn Kleinquadraten aus drei Großquadraten. Spermien, die sich nur zum Teil im betrachteten Kleinquadrat befanden, wurden nur dann gezählt, wenn sie eine von zwei vorher definierten Seiten des Quadrats überragten.

Die Berechnung der Zellzahl a pro ml erfolgte nach folgender Formel:

$$a = \frac{\sum \text{Zellzahl der Quadrate}}{\text{Anzahl der Quadrate}} * 4 * 10^6 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.9 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese stellt eine sehr verbreitete Methode zur Auftrennung von Proteinkomponenten unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse dar. Eine Zugabe des anionischen Detergenz SDS zur Proteinprobe führt dazu, dass fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen des nativen Proteins zerstört werden. Durch die Zugabe von Thiolreagenzien wie β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zum Probenpuffer können auch Schwefelbrücken gespalten werden. Mit Hilfe von diesen Reagenzien und Hitze werden Proteine vollständig denaturiert und gegebenenfalls in ihre Untereinheiten zerlegt. Die SDS-Anionen binden über hydrophobe Wechselwirkungen gleichmäßig an die Polypeptidketten.

So werden letztgenannte, unter Überdeckung ihrer Eigenladung, stark negativ geladen, wobei diese negative Ladung in etwa proportional zu ihrer Masse ist. Eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine/Proteinuntereinheiten nach ihrer relativen Molekülgröße ist durch ihre unterschiedlich verzögerte Wanderung innerhalb der vernetzten Matrix des Polyacrylamidgels möglich. Die Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld, wobei ihre Beweglichkeit meist direkt proportional zum Logarithmus ihrer Masse ist. Über parallel aufgetrennte Standardproteine kann die relative molekulare Masse (M_r) eines Proteins im Gel nach Proteinfärbung bestimmt werden.

Proteine, die nur gering konzentriert in Lösung vorlagen, wurden gefällt, um sie in ausreichender Menge auf das Gel auftragen zu können. Hierzu wurden sie jeweils mit 1/10 der Probe an 0,15% Na-Desoxycholat und 1/10 der Probe an 72%iger Trichloressigsäure versetzt. Die gut gemischten Proben wurden dann 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteinsedimente in SDS-Probenpuffer gelöst. Käuflich erworbene Proteine/Enzyme wurden meist durch Zentrifugation (10000 x g, 5 min) von der Ammoniumsulfatlösung, in der sie vorlagen, getrennt und im Probenpuffer gelöst. War das Volumen der Proteinsuspension verhältnismäßig sehr gering, so wurde die Ammoniumsulfatlösung nicht abgetrennt. Die LMW-Standardproteine (Phosphorylase, 97×10^3 ; Albumin, 66×10^3 ; Ovalbumin, 45×10^3 ; Carbonische Anhydrase, 30×10^3 und Trypsin Inhibitor, $20,1 \times 10^3$), die lyophilisiert vorlagen, wurden direkt in Probenpuffer gelöst. Anfangs wurde SDS-Probenpuffer nach LÄMMLI (1970; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 10% Glycerin, 20 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,01% Bromphenolblau) verwendet, später der reduzierende SDS-Probenpuffer Roti-Load 1 (Carl Roth GmbH + Co, 76185 Karlsruhe). Alle Proteinproben wurden schließlich für 5 min bei 100°C bzw. später für 6 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in Anlehnung an LÄMMLI (1970) durchgeführt. Die denaturierten Proteine wurden in SDS-Minigelen (8,1 x 9,1 x 0,2 cm) oder großen SDS-Polyacrylamidgelen (17 x 16 x 0,2 cm) mit einem 10%igen Trenngel sowie einem 4%igen Sammelgel (zur Herstellung s. Tabelle 2) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer PHERO-minivert Elektrophoresekammer (Biotec-Fischer GmbH, 35447 Reiskirchen) bei 4°C und 70 V (Sammelgel) sowie 130 V (Trenngel) durchgeführt. Der Elektrophoresepuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin sowie 0,1% SDS. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliantblau angefärbt oder durch Western-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Minigels

Trenngel: T = 10%		Sammelgel: T = 4%	
Lösung	Einsatzvolumen [ml]	Lösung	Einsatzvolumen [ml]
30% Acrylamid / 0,8% Methylen-bisacrylamid	3,3	30% Acrylamid / 0,8% Methylen-bisacrylamid	1,3
Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris, pH 8,8	2,5	Sammelgelpuffer (4x) 0,5 M Tris, pH 6,8	2,5
dH ₂ O	4,1	dH ₂ O	6,1
SDS (10%)	0,1	SDS (10%)	0,1
TEMED	0,01	TEMED	0,01
APS (10%)	0,05	APS (10%)	0,05

2.9.1 Proteinanfärbung

Es wurden zwei Methoden angewandt, um die Proteine im Polyacrylamidgel anzufärben. Die Standardmethode mit Coomassie Brilliantblau zeichnet sich durch ihre einfache Durchführbarkeit aus. Die aufwendigere Färbung durch Silberimprägnierung führt hingegen zu einer deutlich empfindlicheren Proteinanfärbung.

2.9.1.1 Färbung mit Coomassie Brilliantblau

Zur Proteinanfärbung wurde ein ähnlicher Farbstoff wie beim BRADFORD-Test verwendet (vgl. Abschnitt 2.7.2). Es handelt sich hierbei um den Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250, welcher in saurem Medium v.a. über elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine bindet. So steht die Intensität einer Proteinbande im Gel in Korrelation zum Anteil von Lysin-, Arginin- und Histidinresten im jeweiligen Protein. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,3-1 µg Protein pro Bande.

Um die Proteine im Gel anzufärben, wurde das Trenngel bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung für eine Stunde in Färbefixierlösung (0,2% Coomassie Brilliantblau R-250 in 44,44% Methanol, 11,12% Essigsäure, 44,44% dH₂O) inkubiert. Anschließend wurde die starke Hintergrundfärbung durch mehrfaches Waschen mit Entfärbelösung (10% Methanol, 10% Essigsäure, 80% dH₂O) entfernt. Die Dauer des Entfärbens richtete sich nach dem jeweiligen Kontrast zwischen Protein- und Hintergrundfärbung.

2.9.1.2 Färbung mit Silbernitrat

Bei der Silberimprägnierung werden unter sauren oder alkalischen Bedingungen Silberionen an den Proteinbanden reduziert und als metallisches Silber abgelagert. Im vorliegenden Fall wurde sie nach BLUM et al. (1987) durchgeführt. Bei dieser Methode wird

Natriumthiosulfat eingesetzt, um das Silbernitrat zu reduzieren und überschüssige Silberionen zu entfernen.

Nach Abtrennung des Sammelgels wurde das Trenngel 60 min in Fixierlösung (500 ml Methanol, 120 ml Eisessig, 0,5 ml Formaldehyd [37%], mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen) inkubiert. Danach wurde es 3 x 20 min in Waschlösung (50% Methanol in ddH₂O) gewaschen, um es dann exakt 1 min in Vorbehandlungslösung (0,2 g Na₂S₂O₃ in 1000 ml ddH₂O) zu bewegen. Nach 3-maligem Waschen mit ddH₂O (jeweils exakt 20 sec) wurde das Gel für 20 min in Imprägnierlösung (2 g AgNO₃, 0,75 ml Formaldehyd [37%] in 1000 ml ddH₂O lösen) inkubiert. Dem erneuten Waschen (2 x 20 sec mit ddH₂O) folgte die 10-minütige Behandlung mit Entwicklungslösung (60 g Na₂CO₃, 0,5 ml Formaldehyd [37%], 4 mg Na₂S₂O₃·5H₂O in 1000 ml ddH₂O lösen). Das Gel wurde dann gewaschen (2 x 2 min mit ddH₂O) und die Silberimprägnierung gestoppt (10 min Inkubation in 50% Methanol und 12% Eisessig in ddH₂O). Zuletzt wurde das Gel für 20 min in Waschlösung (50% Methanol in ddH₂O) gewaschen und bis zum Scannen dunkel und kalt (4°C) gelagert, um weitere Verfärbungen zu verhindern (aus ECKERT und KARTENBECK, 1997).

2.10 Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen die gereinigte strukturegebundene PK aus Eberspermien

Mit der Produktion von Antikörpern gegen die gereinigte strukturegebundene PK aus Eberspermien wurde die Firma Coring System Diagnostix GmbH in 64579 Gernsheim beauftragt. Ihre Partnerfirma CovalAb in 69007 Lyon, Frankreich führte die Antikörperproduktion aus.

Vor der Immunisierung wurden die Präimmunseren zweier Kaninchen auf unspezifische Proteindetektion hin untersucht. Hierzu wurden, neben Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH, lösliche und strukturegebundene Eberspermienproteine (Überstand 1, Überstand nach Trypsinbehandlung und ein PK- und GAPDH-enthaltender Fraktionsmix) SDS-gelelektrophoretisch getrennt. Im Immunoblotting wurde dann getestet, ob und in welchem Ausmaß die unterschiedlich verdünnten Präimmunseren (jeweils 1:2000 und 1:200) zu unspezifischer Proteindetektion führen. Das geeignete Kaninchen [New Zealand White-Stamm, Aufzucht nach Norm S.P.F. (Specific Pathogen Free), weiblich, Gewicht am Tag 0: 2,5-2,7 kg] wurde nach standardisiertem Protokoll (Tabelle 3) immunisiert. Als Antigen wurden 4 x 100 µg von Eberspermienstrukturen abgelöste, gereinigte und lyophilisierte PK subkutan an multiplen Stellen injiziert. Die Primärimmunisierung erfolgte mit komplettem Freund's Adjuvans, die weiteren Immunisierungsschritte mit inkomplettem Freund's Adjuvans. Während der Immunisierung (insgesamt 88 Tage) wurden von der Firma CovalAb

steril gewonnene Testseren von den Tagen 53, 74 und 81 zur Kontrolle der Antikörperproduktion und -spezifität bereitgestellt. Die terminale Blutabnahme fand am Tag 88 statt.

Tabelle 3: Protokoll zur Immunisierung eines Kaninchens mit gereinigter Spermien-PK

Tag	Protokoll
-23	Versand der Präimmunseren
-3	Transfer der Tiere in die Versuchsräume
0	Präimmun-Blutabnahme (4 ml) 1. Injektion (1 ml) Ansatz für ein Kaninchen: 0,5 ml Antigen + 0,5 ml komplettes Freund's Adjuvans
21	2. Injektion (1 ml) Ansatz für ein Kaninchen: 0,5 ml Antigen + 0,5 ml inkomplettes Freund's Adjuvans
42	3. Injektion (1 ml, Ansatz wie an Tag 21)
53	Blutabnahme (15 ml)
54	Versand der Seren von den Tagen 0 und 53
63	4. Injektion (1 ml, Ansatz wie an Tag 21)
74	Blutabnahme (3 ml)
75	Versand des Serums vom Tag 74
81	Blutabnahme (15 - 20 ml)
88	Letzte Blutentnahme (70 ml)
89	Versand der Seren von den Tagen 81 und 88

2.11 Sequenzierung

Die Teilsequenzierung der Eberspermien-PK wurde am Theodor-Boveri-Institut der Universität Würzburg (Physiologische Chemie II, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg) durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe mit proteolytisch von Eberspermienstrukturen abgelöster und anschließend über Ionenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie gereinigter PK verwendet.

Die in SDS-Probenpuffer gelöste, bereits erhitzte (6 min, 95°C) PK-Probe wurde an das Institut in Würzburg gesendet. Hier wurde die Proteinprobe einer Polyacrylamidgelelektrophorese [10% PAGE (30% Acrylamid, 0,8% Bis, Geldicke 0,75 mm)] und nachfolgend einem Westen-Blotting (semi-dry Phase; 1 h bei 65 mA; Transferpuffer: 35 mM CAPS, 0,75 mM 3MPS, pH 10, 30% CH₃OH, 0,1% SDS; Färbelösung: 50 mg Coomassie + 25 ml CH₃OH + 25 ml H₂O + 6,25 ml AcOH) auf eine PVDF-Membran unterworfen. Die Spermien-PK-Hauptbande bei $64,5 \times 10^3$ wurde ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingesetzt.

Die Teilsequenzierung wurde mit Hilfe eines Aminosäuresequenators (ABI 473A) durchgeführt. Es sollten die ersten 20 Aminosäuren des Aminoterminus über Edman-Abbau bestimmt werden. Beim Edman-Abbau wird mit Hilfe einer reaktiven Chemikalie, dem Phenylisothiocyanat (PITC), eine Aminosäure nach der anderen vom Aminoterminus eines Peptids oder Proteins abgespalten. Das PITC reagiert im mild alkalischen mit der ungeladenen endständigen Aminogruppe zu einem Phenylthiocarbamoylderivat. Unter schwach sauren Bedingungen wird dann ein zyklisches Derivat der endständigen Aminosäure abgespalten. Es entsteht ein Thiazolinonderivat, welches im Säuren zu einer Phenylthiohydantoin(PTH)-Aminosäure reagiert. Von dem um eine Aminosäure verkürzten Peptid/Protein kann dann mit Hilfe des PITC die nächste Aminosäure abgespalten werden.

PTH-Aminosäuren können über HPLC getrennt werden. Im Vergleich mit Standard-PTH-Aminosäuren, können die durch Edman-Abbau abgespaltenen PTH-Aminosäuren über ihre Retentionszeit identifiziert werden.

2.12 Sequenzbeurteilung/-vergleich

Auf der Grundlage der HPLC-Elutionsprofile wurde eine Aminosäuresequenz bestimmt. Hierbei wurde für jeden Aminosäureabspaltungsschritt basierend auf der Peakanzahl, -höhe und -retentionszeit auch beurteilt, wie sicher die Aminosäure bestimmt werden konnte.

Die erhaltene Sequenz wurde mit denen der Proteine in den Datenbanken Swiss-Prot und TrEMBL sowie mit übersetzten Nukleotidsequenzen aus den Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ und PDB verglichen, um ähnliche Sequenzen aufzuspüren. Sie wurde zudem mit bekannten Sequenzen der PK verschiedener Herkunft und verschiedener Isotypen sowie mit der Elongation der spermien-spezifischen GAPDH verglichen. Hierzu wurden die Computerprogramme ClustalX und Jalview genutzt.

2.13 Peptidsynthese und Antikörperproduktion

Bei der Wahl des Peptids für die Antikörperproduktion ist anzustreben, dass es eine bestmögliche Immogenität besitzt, d.h., dass es eine möglichst starke Immunantwort bewirkt, wenn es in den Körper eingeführt wird. Zur Überprüfung bzw. Beurteilung der Immogenität eines Peptids werden verschiedene Kriterien, wie z.B. Antigenindex, Hydrophobizität, Zugänglichkeit, etc. herangezogen. Um die Spezifität des Peptids bzw. seiner Teilabschnitte zu überprüfen, wurden dieses bzw. diese mit Sequenzen diverser Proteine aus Datenbanken (SwissProt und TrEMBL) verglichen. Vom N-Terminus der erhaltenen Teilsequenz der Spermien-PK ausgehend, wurden nach und nach die weiteren Aminosäuren an das Peptid angehängt und für jede Sequenz nach gleichen bzw. ähnlichen Sequenzen in

Proteindatenbanken gesucht. So sollte der Peptidabschnitt mit der höchsten Spezifität gefunden werden.

Nach meiner Beurteilung des Peptids, wurde die erhaltene Peptidsequenz über die Firma Coring System Diagnostix GmbH (64579 Gernsheim) an die französische Partnerfirma CovalAb weitergeleitet. In der letztgenannten wurde die Peptidsequenz einer Reihe von Untersuchungen unterzogen, um den Peptidabschnitt mit der stärksten Antigenität zu ermitteln. Neben Untersuchungen zur Antigenität, Hydrophobizität, Zugänglichkeit und Spezifität des Peptids bzw. seiner Abschnitte wurden Sekundärstrukturanalysen sowie Studien zur Realisierbarkeit der Peptidsynthese durchgeführt. Obwohl die ersten 5 Aminosäuren (TSEAM) für das Vorhaben als nicht ideal befunden wurden, war CovalAb bereit, die Sequenz aus den 13 N-terminalen Aminosäuren der gereinigten Eberspermien-PK zu synthetisieren und nachfolgend zur Immunisierung einzusetzen. Die Peptidsynthese erfolgte nach der Festphasenmethode und der Fmoc-Strategie unter Einsatz moderner Syntheseautomaten. Die Reinheit des synthetisierten Peptids wurde über HPLC (Chromolith RP18e; Puffer A: 0,1% TFA in Wasser, Puffer B: 0,1% TFA in Acetonitril; Gradient von 5% nach 100% Puffer B in 10 min und von 100% nach 5% Puffer B in 2,5 min; 3,5 ml/min; Detektion bei 215 nm) überprüft und die Molekülmasse des Peptids über Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) bestimmt. Das Peptid wurde an das Hämocyanin der Schlüssellochschnecke (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) als Trägerprotein über Cystein C-terminal gekoppelt. Die Sequenz lautete somit: NH₂-TSEAMPKAHMDAGC-COOH.

Vor der Immunisierung wurden die Präimmunsereen von 4 Kaninchen auf unspezifische Proteindetektion hin untersucht. Nach Auswahl der 2 am besten geeigneten Kaninchen [New Zealand White-Stamm, Aufzucht nach Norm S.P.F. (Specific Pathogen Free)], wurde der Auftrag erteilt, diese mit dem synthetisierten, Carrier-gekoppelten Peptid gemäß Standardimmunisierungsprotokoll zu immunisieren. Das konjugierte Peptid wurde gemäß dem Protokoll subkutan an multiplen Stellen injiziert. Die Primärimmunisierung erfolgte mit komplettem Freund's Adjuvans, die weiteren Immunisierungsschritte mit inkomplettem Freund's Adjuvans. Die Antikörperproduktion wurde hierbei immunisierungsbegleitend über ELISA von Testseren kontrolliert. Hierzu wurde ein von CovalAb entwickelter Festphasen-Enzymimmunoassay (CovAbtest) verwendet. Aufgrund der hierüber gezeigten schlechten Immunantwort beider Kaninchen auf das synthetisierte, KLH-gekoppelte Peptid wurde der Proteincarrier für das Peptid gewechselt. So wurde bei der 4. Antigeninjektion an Ovalbumin gekoppeltes Peptid verwendet. Das Immunisierungsprotokoll wurde verlängert und eine 5. und 6. Injektion des synthetisierten Peptids (d.h. eine 2. und 3. Injektion des an Ovalbumin

gekoppelten Peptids) hinzugefügt. Das endgültige Immunisierungsprotokoll ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Protokoll zur Immunisierung zweier Kaninchen mit dem synthetisierten Peptid

Tag	Protokoll
-23	Versand von 4 Präimmunsereen
-3	Transfer der Tiere in die Versuchsräume
0	Präimmun-Blutabnahme (je 4 - 5 ml) 1. Injektion (1 ml) Ansatz für zwei Kaninchen: 1 ml Antigen + 1 ml komplettes Freund's Adjuvans
21	2. Injektion (1 ml) Ansatz für zwei Kaninchen: 1 ml Antigen + 1 ml inkomplettes Freund's Adjuvans
42	3. Injektion (1 ml/Kaninchen, Ansatz wie an Tag 21)
53	Blutabnahme (je 15 ml) ELISA
54	Versand der Seren von den Tagen 0 und 53
63	Wechsel von KLH auf Ovalbumin als Trägerprotein für das synthetisierte Peptid, 4. Injektion (1 ml/Kaninchen, Ansatz wie an Tag 21)
74	Blutabnahme (je 20 ml) ELISA
84	5. Injektion (1 ml/Kaninchen, Ansatz wie an Tag 21)
95	Blutabnahme (je 5 ml) ELISA
105	6. Injektion (1 ml/Kaninchen, Ansatz wie an Tag 21)
116	Letzte Blutentnahme (88 und 103 ml) ELISA Immunoaffinitätsreinigung (Teil 2.14) und ELISA
124	Versand der Seren von den Tagen 74, 95 und 116, der immungereinigten Antikörper, der Immunoaffinitätssäule und des restlichen Peptidvorrats

2.14 Antikörperreinigung

Ein Teil des synthetisierten Peptids wurde bei der Firma CovalAb an Sepharose gekoppelt, um Antikörper gegen das Peptid aus den gewonnenen Antiseren zu reinigen.

CovalAb setzte 10 ml der Antiseren vom Tag 74 (Pool der Seren der 2 immunisierten Kaninchen) zur Immunoaffinitätsreinigung an dieser Peptid-gekoppelten Sepharose ein. Das Serum wurde 1:1 mit PBS (139 mM NaCl, 12 mM Na₂HPO₄, 3,6 mM KH₂PO₄; pH 7,2) verdünnt und zur Peptid-Sepharose (1 ml in 5 ml PBS inkl. 0,02% Natriumazid) gegeben. Das

Sepharose-Serum-Gemisch wurde dann unter leichtem Schütteln zuerst 1 Stunde bei 37°C, dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch in eine leere Säule gefüllt und der Durchfluss aufgefangen. Das Säulenmaterial wurde mit 15 ml PBS inkl. 0,1% Tween 20 und anschließend mit 30 ml PBS gewaschen. Die Extinktion des Waschdurchflusses bei 280 nm wurde kontrolliert (Die Extinktion sollte unter 0,002 liegen. Wenn Extinktion >0,002: Waschen mit weiteren 20 ml PBS notwendig). In den Auffangröhrchen für die immungereinigten Antikörper wurden jeweils 200 µl Tris (1 M; pH 8) vorgelegt. Zur Elution der Antikörper wurde zuerst die über dem Säulenmaterial stehende Waschlösung fast vollständig entfernt. Dann erfolgte die Elution mit 5 ml Glycin (0,1 M; pH 2). Es wurde jeweils 1 ml des Eluates pro Röhrchen aufgefangen und die Extinktion bei 280 nm zur Bestimmung des Proteingehalts gemessen. Die Antikörper-enthaltenden Eluate wurden zusammengegeben und die Extinktion der Lösung bei 280 nm erneut gemessen. Abschließend wurde die Spezifität der immungereinigten Antikörper durch ELISA bestimmt. Es wurde ein kompetitiver Immunoassay durchgeführt, wobei freies Peptid als Inhibitor verwendet wurde.

Die Affinitätssäule wurde regeneriert [Waschen mit 10 ml PBS inkl. 0,02% Natriumazid, Kontrolle des pH-Wertes des Durchflusses (Soll-Wert: pH 7)] und mir für weitere Immunreinigungen bereitgestellt. Die Lagerung der Säule erfolgte bei 4°C.

Um eventuell im Antiserum gegen die gereinigte, strukturegebundene Eberspermien-PK enthaltene Antikörper gegen das synthetisierte Peptid zu reinigen, wurden 10 ml des Antiserums vom Tag 88 eingesetzt. Die Immunreinigung erfolgte größtenteils wie oben beschrieben. Die Elution erfolgte dagegen in 1 ml-Stufen bei 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 80% und 100% Glycin (0,1 M; pH 2) in PBS. Anschließend wurde mit weiteren 11 ml Glycin (0,1 M; pH 2) eluiert. Die Extinktion der Eluatfraktionen wurde bei 280 nm gemessen. Verschiedene Eluatfraktionen wurden im Immunoblotting eingesetzt, um die am besten gereinigten Antikörper aufzufinden.

2.15 Prüfung der Spezifität der Antikörper

Zur Prüfung der Antikörperspezifität wurden neben Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH, lösliche und strukturegebundene Eberspermienproteine (Überstand 1, Überstand nach Trypsinbehandlung und vereinigte PK- und GAPDH-enthaltende Fraktionen nach chromatographischer Anreicherung) SDS-gelelektrophoretisch getrennt. Im Immunoblotting wurde dann getestet, ob und in welchem Ausmaß die verschiedenen Testseren, Endseren und die immungereinigten Antikörper sowie die gekauften Antikörper gegen verschiedene

somatische Enzyme der Glykolyse und das Acrosin zu unspezifischer Proteindetektion führen. Das Immunoblotting wurde mit unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörper/-seren durchgeführt. Die immungereinigten Antikörper gegen die strukturgebundene PK aus Eberspermien wurden zudem auf unspezifische Detektion der angereicherten löslichen PK aus Eberspermien hin überprüft.

Weiterhin wurde die Spezifität der Antikörper bei der Immunogoldmarkierung nach Präinkubation mit dem jeweiligen Antigen (Protein oder Peptid) kontrolliert, wenn dieses vorlag (Unterabschnitt 2.16.3.1).

2.16 Immunologische Methoden

2.16.1 Immunoblotting

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägermembranen wird als Western-Blotting-Verfahren bezeichnet. Schließt sich dem Western-Blotting ein immunologischer Nachweis spezifischer Antigene auf dem Protein-Blot an, so bezeichnet man dieses Verfahren in seiner Gesamtheit als Immunoblotting.

Die durch Polyacrylamidgelelektrophorese getrennten Proteine wurden mit Hilfe einer lateralen Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Sie waren hierdurch für die spezifischen primären Antikörper leichter zugänglich. Um die Protein-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen, wurden für die primären Antikörper spezifische sekundäre Antikörper eingesetzt, an welche ein Enzym, die Meerrettich-Peroxidase (HRP), zum kolorimetrischen Nachweis chemisch gekoppelt war. Als Nachweisreagenz wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet, welches, wenn sowohl HRP als auch H_2O_2 vorhanden ist, durch oxidative Polymerisierung und Zyklisierung in ein unlösliches, braun gefärbtes Phenazin-Polymer umgesetzt wird. Diese Methode macht die Detektion eines spezifischen aufgetrennten Proteins im Blot und folglich auch im parallelen Polyacrylamidgel möglich.

Nachdem die zu untersuchenden Proteinproben über eine SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurde das Gel für ca. 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 25 mM Glycin, pH 8,3) gelegt, um das SDS herauszuwaschen und das Gel auf den Transfer-pH-Wert von 8,3 vorzubereiten. Die Proteine aus dem Gel wurden dann mit Hilfe eines Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) über das SemiDry-Blotting-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (15V, $\leq 5.5 \text{ mA/cm}^2$, 20 min). Anschließend wurde die Membran in PBS (139 mM NaCl, 12 mM Na_2HPO_4 , 3,6 mM KH_2PO_4 ; pH 7,2) überführt. Es folgte der immunologische Nachweis des jeweiligen Proteins auf der Blot-Membran entsprechend Tabelle 5.

Wenn für die Auswertung erforderlich, wurde vor der immunchemischen Detektion geprüft, ob die Proteine einwandfrei auf die Membran transferiert wurden. Hierzu wurden die Proteine, nach Waschen der Membran in dH₂O, reversibel mit dem sauren Azofarbstoff Ponceau S [0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Essigsäure] angefärbt. Die Färbung wurde visuell beurteilt, mit dem zugehörigen Coomassie-gefärbten SDS-Gel verglichen und die Markerproteine auf der Membran mit einem weichen Bleistift markiert. Der Farbstoff wurde dann durch 2-maliges Waschen der Membran in dH₂O (je 100 ml und 1 min) zum Großteil entfernt. Die immunchemische Antigendetektion (Tabelle 5) folgte.

Tabelle 5: Ablauf der immunchemischen Detektion eines Antigens auf der Blotmembran

Die Nitrocellulosemembran wurde in den verschiedenen Lösungen unter leichter Bewegung auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Die Markierungen auf der getrockneten Membran wurden durch Scannen digital festgehalten.

Vorgang	verwendete Lösung	Dauer
1. Membran waschen	je 100 ml PBS	4 x 5 min
2. Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen	100 ml 3% BSA in PBS oder Roti-Block 1:10 verdünnt mit dH ₂ O	60 min
3. Membran waschen	je 100 ml PBS	4 x 5 min
4. Inkubation mit den primären Antikörpern	primäre Antikörper in 100 ml Blockpuffer (1% BSA in PBS) oder 1:10 mit dH ₂ O verdünntes Roti-Block 1:3 verd. mit PBS	über Nacht
5. Membran waschen	je 100 ml PBS	4 x 5 min
6. Inkubation mit den sekundären Antikörpern	sekundäre Antikörper in 100 ml Blockpuffer (1% BSA in PBS) oder 1:10 mit dH ₂ O verdünntes Roti-Block 1:3 verd. mit PBS	60 min
7. Membran waschen	je 100 ml PBS	4 x 5 min
8. Färben	DAB-Lösung (Sigma)	1 - 5 min (Kontrollen bis zu 30 min)
9. Stoppen der Farbreaktion	100 ml PBS	
10. Trocknen der Membran		

2.16.2 Fluoreszenzmarkierung

Bei der Fluoreszenzmarkierung binden spezifische Primärantikörper an ihre Antigene in Zellen oder Gewebeschnitten. Die dann eingesetzten sekundären Antikörper sind gegen die primären gerichtet und tragen fluoreszierende Gruppen. Über diese wird die Lage der Antigene/Proteine, an welche die Primärantikörper gebunden haben, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die Fluoreszenzmarkierung wurde zur Lokalisierung von PK,

GAPDH und Acrosin an ejakulierten Eberspermien sowie an Kryostatschnitten aus Eberhoden durchgeführt.

2.16.2.1 Ausstriche von Eberspermien mit oder ohne deren nachträgliche Fixierung/Permeabilisierung

Ebersperma wurde 1:10 mit BTS verdünnt. Je 5 µl der Spermien suspension wurden vorsichtig mit Hilfe eines zweiten Deckgläschens auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgestrichen und trocknen gelassen. Ein Teil der Spermien wurde unfixiert fluoreszenzmarkiert. Diese Spermien wurden wiederum teilweise zuvor bei RT für 5 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Der andere Teil der Spermien wurde vor der Fluoreszenzmarkierung auf unterschiedlichen Wegen fixiert. Zur Fixierung wurden das quervernetzende Reagens Paraformaldehyd (PFA) sowie organische Lösungsmittel wie Aceton und Methanol, welche zur Ausfällung der Proteine führen, verwendet. Es wurde mit einem Reagenz oder mit einer Kombination zweier Reagenzien fixiert. Die Ausstriche wurden, mit Ausnahme der Methanol- und/oder Aceton-behandelten, mit einem speziellen Stift (PAP-Pen) mit einer hydrophoben Barriere umrandet, um ein Auslaufen der Lösungen zur Fixierung und Fluoreszenzmarkierung zu verhindern. Im Vergleich zur Fixierung mit 2% PFA in PBS (2 min, bei RT) wurde der PFA-Fixierung noch eine 1-minütige Inkubation in Aceton bei -20°C angefügt. Außerdem wurden 1-minütig PFA-fixierte Spermien auch mit Triton permeabilisiert (0,1% Triton X-100 in PBS, 5 min bei RT). Des Weiteren wurden die Spermien nur mit Aceton fixiert und permeabilisiert (4 min bei -20°C) oder über eine Kombination aus Methanol (6 min bei -20°C) und Aceton (1 min bei -20°C). Da der hydrophobe Film bei Behandlung mit organischen Lösungsmitteln aufgelöst wird, wurden die mit Methanol und/oder Aceton behandelten Spermien getrocknet und erst dann hydrophob umrandet. Die Deckgläschen wurden dann in kleinen, nummerierten, feuchten Kammern platziert. Es folgte die Fluoreszenzmarkierung (Unterabschnitt 2.16.2.7).

2.16.2.2 Hodenpräparation

Von dem Hoden eines 1½ Jahre alten Zuchtebers wurde zuerst auf der gegenüberliegenden Seite zum Nebenhoden parallel zum Mediastinum testis nahe der Tunica albuginea eine dünne Scheibe abgeschnitten. Dann wurden mit weiteren gleichgerichteten Schnitten jeweils etwa 2 cm dicke Scheiben vom Eberhoden abgetrennt. Aus dem Hodenparenchym wurden mit einer Rasierklinge Gewebewürfel in Spielwürfelgröße herausgeschnitten. Diese wurden später so orientiert, dass gleichgerichtete Kryostatschnitte zu der Schnittfläche angefertigt werden konnten, die in gleicher Ebene zur Hodenoberfläche gerichtet war und der Tunica albuginea näher lag. So sollte gewährleistet werden, dass

Querschnitte der Hodenkanälchen mit aktiver Spermatogenese für die Fluoreszenzmarkierung erhalten werden.

2.16.2.3 Gewebefixierung für Kryoeinbettung

Die Hälfte der Gewebewürfel wurde für 2 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung (3% PFA in PBS, pH 7,3) gelegt und dann 1 h in PBS gewaschen (5-maliger PBS-Austausch). Danach wurden die Würfel langsam von einer 10%igen bis zu einer 30%igen Saccharoselösung (in PBS) überführt. Die Saccharose dient dem Gefrierschutz bei der Kryoeinbettung. Die Würfel wurden jeweils erst in die nächste Saccharoselösung überführt, wenn sie in der aktuellen Lösung abgesunken waren. Nach einer etwa 30-minütigen Inkubation in 10%iger Saccharoselösung und zweimaliger Inkubation in 20%iger Saccharoselösung bei Raumtemperatur (jeweils etwa 30 min) folgte eine Inkubation in 30%iger Saccharoselösung über Nacht (12 h). Dann wurde erneut in 30%iger Saccharoselösung für etwa 24 h inkubiert. Vor der Kryoeinbettung des fixierten Gewebes wurde die Saccharose von den Würfeln abgetupft. Die Würfel wurden dann in dem Einbettmedium Tissue tec „gewaschen“, um den Zucker zu entfernen.

2.16.2.4 Kryoeinbettung von fixiertem oder unfixiertem Gewebe

Ein kleiner Plastikbecher wurde mit Isopentan befüllt und in einer Styroporbox mit flüssigem Stickstoff festgeklemmt. In der geschlossenen Styroporbox wurde das Isopentan gefroren (Gefrierpunkt: -160°C). Währenddessen wurde der Eberhoden präpariert. Die hieraus gewonnenen Hodenparenchymwürfel wurden zur Hälfte in Fixierlösung gegeben, die andere Hälfte wurde unfixiert eingebettet. Hierzu wurde von den frischen Gewebewürfeln das Blut abgetupft und die Würfel für 1-2 min im Einbettmedium Tissue tec gewendet. Auf ein zuvor zugeschnittenes Styroporplättchen wurde ein Tropfen Tissue tec gegeben, dann wurde der Gewebewürfel darauf gesetzt. Der Würfel wurde so orientiert, dass die Schnittfläche, die in gleicher Ebene zur Hodenoberfläche gerichtet war und dem Mediastinum testis näher lag, auf das Styroporplättchen aufgelegt wurde. Mit einem Metallstab wurde das Isopentan geschmolzen. Der Gewebewürfel wurde nochmals mit Tissue tec bedeckt und dann umgedreht (d.h. Gewebewürfel unten) in das geschmolzene Isopentan fallen gelassen. Nach 30 sec wurde der Würfel in flüssigen Stickstoff überführt. Die Gewebe-(+Styropor)würfel wurden in Falcon-Röhrchen, die zuvor im Flüssigstickstoff heruntergekühlt worden waren, bis zur Anfertigung von Kryostatschnitten bei -80°C gelagert. Die Kryoeinbettung der fixierten Gewebewürfel wurde gleichermaßen durchgeführt.

2.16.2.5 Anfertigung von Kryostatschnitten

Die gefrorenen Gewebewürfel wurden bei -20°C an einem Mikrotom (Microm HM 560) geschnitten. Die Schnittdicke betrug $10\ \mu\text{m}$. Die Schnitte wurden vorsichtig auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen aufgenommen und nach dem Trocknen mikroskopisch betrachtet. Unversehrte Schnitte wurden mit einem PAP-Pen hydrophob umrandet und anschließend fluoreszenzmarkiert.

2.16.2.6 Fixierung/Permeabilisierung von Schnitten aus unfixiertem Hodengewebe

Ein Teil der Schnitte aus unfixiertem Hodengewebe wurde nachträglich auf dem Deckgläschen fixiert und/oder permeabilisiert. Wie schon bei den Spermienausstrichen wurden hierzu die organischen Lösungsmittel Methanol und Aceton und der Quervernetzer PFA sowie das Detergenz Triton X-100 eingesetzt. So wurden Schnitte mit Aceton (4 min bei -20°C) oder mit Methanol und Aceton (6 min und 1 min bei -20°C) fixiert und permeabilisiert. Einer Fixierung mit PFA folgte vergleichsweise entweder eine Permeabilisierung mit Triton (1 min 2% PFA und 5 min 0,1% Triton X-100, jeweils in PBS und bei RT) oder eine Inkubation mit Aceton (1,5 min 2% PFA in PBS bei RT und 1 min Aceton bei -20°C). Die mit Methanol und/oder Aceton behandelten Schnitte wurden, wie zuvor bei den Spermien, getrocknet und dann hydrophob umrandet. Es folgte die Fluoreszenzmarkierung (Unterabschnitt 2.16.2.7).

2.16.2.7 Ablauf der Fluoreszenzmarkierung

Zur Reduktion der Oberflächenspannung wurden die Gewebeschnitte zuerst mit jeweils $100\ \mu\text{l}$ 0,01% Tween 20 in PBS vorsichtig überschichtet und für 10 min inkubiert. Nach vorsichtigem Absaugen der Inkubationslösung wurden die Schnitte 5 min durch Überschichten mit je $100\ \mu\text{l}$ PBS gewaschen. Handelte es sich um fixiertes Gewebe, wurde nach der Inkubation mit Tween 20 ein weiterer Inkubationsschritt eingefügt: Zur Absättigung freier NH_2 -Gruppen wurden die Schnitte für 10 min mit 50 mM NH_4Cl in PBS (je $100\ \mu\text{l}$) inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte folgte das 2-stündige Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Blocklösung (0,1% Ovalbumin sowie 0,5% Kaltwasserfischgelatine in PBS; je $50\ \mu\text{l}$) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gewebeschnitte über Nacht mit den jeweiligen, in Blocklösung verdünnten Primärantikörpern [Anti-Kaninchenmuskel-PK, Antiserum und immungereinigte Antikörper gegen die strukturegebundene Eberspermien-PK, Anti-somatische GAPDH, Antiserum gegen die gereinigte strukturegebundene Eberspermien-GAPDH (von Dr. D. Westhoff), Anti-Acrosin; je $60\ \mu\text{l}$] bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde nach 3-maligem Waschen mit PBS (30 min und 2 x 5 min; je $100\ \mu\text{l}$) mit den

jeweiligen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Anti-Ziegen-IgG, Alexa Fluor 546; Anti-Kaninchen-IgG, Alexa Fluor 568; Anti-Maus-IgG, Alexa Fluor 488; je 50 µl) für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Sekundärantikörper waren 1:400 mit PBS verdünnt. Dem PBS war zuvor das blau fluoreszierende 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) beigemischt worden (1:8000 Verdünnung). DAPI bildet fluoreszierende Komplexe mit DNA, (bevorzugt mit doppelsträngiger) und wurde zur Anfärbung der Zellkerne eingesetzt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte 3 Mal mit PBS sowie 1 Mal mit ddH₂O gewaschen (je 100 µl und 10 min). Nach dem Absaugen des ddH₂O wurde ein Tropfen Mowiol 4.88 auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit dem Gewebeschnitt nach unten vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen auf den Mowiol-Tropfen gelegt. Die eingebetteten Gewebeschnitte wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung dunkel und bei 4°C gelagert.

2.16.2.8 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Fluoreszenzmarkierung der Gewebeschnitte wurde mit einem Leica DM RP-Mikroskop ausgewertet. Bildausschnitte, die präparattypische Gegebenheiten widerspiegeln, wurden mit einer Hamamatsu ORCA ER CCD (charge coupled device)-Kamera festgehalten. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop 7 bearbeitet und kombiniert.

2.16.3 Immunogoldmarkierung

Die Immunogoldmarkierung von Enzymen in Säugerspermienschnitten wurde nach dem Post-embedding-Verfahren durchgeführt. Im Gegensatz zum Pre-embedding-Verfahren werden die primären Antikörper erst nach der Einbettung der Zellen oder Gewebe in das gewählte Harz und dem Ultradünnschnitt des Präparates an ihre Antigene gebunden. Die dann eingesetzten sekundären Antikörper sind gegen die primären Antikörper gerichtet und tragen über eine nichtkovalente, aber dennoch feste Bindung kolloidale Goldpartikel. Durch dieses Verfahren können Proteine spezifisch in Zell- oder Gewebepreparaten lokalisiert und mikroskopisch (in diesem Fall: Elektronenmikroskopie) sichtbar gemacht werden.

2.16.3.1 Durchführung der Immunogoldmarkierung

Die Immunogoldmarkierung wurde an Spermien verschiedener Säuger durchgeführt. Es wurden Ultradünnschnitte (Dicke: ca. 60 nm) von Eber-, Bullen- und Humanspermien, welche ca. 1995 in L. R. White eingebettet worden waren, durch Frau Elisabeth Sehn (technische Angestellte der AG von Professor Wolfrum) angefertigt und auf Formvar-befilmte Nickelnetzchen (Typ: hexagonal 150 bzw. 200 mesh) gelegt.

Zunächst wurde die Immunogoldmarkierung in Anlehnung an WESTHOFF (1996; Tabelle 6) durchgeführt. Schritt für Schritt wurde das Protokoll modifiziert und so den Anforderungen angepasst.

Tabelle 6: Ablauf der Immunogoldmarkierung in Anlehnung an WESTHOFF (1996)

Vorgang	verwendete Lösung	Dauer [min]
1. Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen	Blocklösung (1% BSA in PBS)	60
2. Inkubation mit den primären Antikörpern	primäre Antikörper in Blocklösung	60
3. 3x Waschen	Blocklösung	je 1
4. Inkubation mit den sekundären Antikörpern	sekundäre Antikörper in Blocklösung	60
5. 3x Waschen	Blocklösung	je 1
6. 3x Waschen	ddH ₂ O	je 1
7. Kontrastieren	2%iges wässriges Uranylacetat	5
8. 5x Waschen	ddH ₂ O	je 1
9. Trocknen		5

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden verschiedene Lösungen eingesetzt. Anfangs wurde gemäß WESTHOFF 1% BSA in PBS verwendet, dann zu 5% BSA in PBS übergegangen. Es wurde das Blockierungsreagenz Roti-Block der Carl Roth GmbH und Co. (76185 Karlsruhe) sowie schließlich eine Blocklösung mit 0,1% Ovalbumin sowie 0,5% Kaltwasserfischgelatine in PBS getestet. Zudem wurde die Dauer der Blockierung zwischen 1 und 2,5 h variiert. Auch die Blocklösung, mit welcher die Antikörper verdünnt wurden, wurde entsprechend variiert. Der sekundäre Antikörper wurde in späteren Versuchen mit Immunogold-Puffer (0,1% Ovalbumin, 0,5% Kaltwasserfischgelatine, 0,01% Tween 20 und 0,5 M NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3) verdünnt, um eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper am Schnitt zu verhindern.

Es wurden primäre Antikörper gegen somatische PK (Ziegen-IgG), GAPDH (Maus-IgG₁) und Acrosin (Maus-IgG₁) eingesetzt sowie ein gegen gereinigtes Spermien-PK produziertes Antiserum aus Kaninchen und hieraus immungereinigte Antikörper, welche gegen eine für die Spermien-PK spezifische Peptidsequenz gerichtet sind (Teile 2.10 bis 2.14). Zudem stand das von Dr. D. Westhoff aus Kaninchen gewonnene Antiserum gegen Spermien-GAPDH zur Verfügung. Die Inkubationsdauer der Primärantikörper wurde variiert (anfangs 1 h bei Zimmertemperatur, später bis zu 70 h bei 4°C). Die sekundären Antikörper waren an die primären Antikörper angepasst (Anti-Ziegen-IgG aus Kaninchen, Anti-Maus-IgG aus Ziege oder Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, alle gold-gekoppelt, Goldpartikelgröße:

10 nm). Primäre und sekundäre Antikörper wurden in verschiedenen Verdünnungen zur Immunogoldmarkierung eingesetzt, um die optimalen Antikörperverdünnungen zu ermitteln. Ziel hierbei war es, die Antikörperkonzentrationen so hoch zu wählen, dass die Markierung gut sichtbar und möglichst eindeutig ist, jedoch auch so niedrig, dass die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Antikörperbindung minimiert ist. Die Spermienschnitte wurden 1 oder 2 h mit den Sekundärantikörpern inkubiert.

Im Gegensatz zum Versuchsablauf bei WESTHOFF (1996) wurde in späteren Versuchen eine Vorbehandlung der Spermienschnitte gemäß WOLFRUM und SCHMITT (2000) durchgeführt. Die Vorbehandlung umfasste das Anätzen der Schnitte mit Hilfe einer gesättigten Natrium-Periodat-Lösung, das Reduzieren der Oberflächenspannung mit 0,1% Tween 20 in PBS sowie das Absättigen freier NH₂-Gruppen mit 50 mM NH₄Cl in PBS.

Außerdem wurde versucht, die Kontrastierung zu optimieren. Es wurden verschiedene Lösungen verwendet. 2%iges Uranylacetat wurde in wässriger oder ethanolischer (bis zu 50% Ethanol) eingesetzt. Des Weiteren wurde mit einer Bleicitratlösung nach HANAICHI et al. (1986) kontrastiert. Die Lösungen wurden verschieden kombiniert und die Dauer der Kontrastierung mit Uranylacetat variiert (5-30 min).

Im Resultat der Modifizierungsversuche wurde die Immunogoldmarkierung in Anlehnung an WOLFRUM und SCHMITT (2000) (Tabelle 7) durchgeführt.

Tabelle 7: Ablauf der Immunogoldmarkierung in Anlehnung an WOLFRUM und SCHMITT (2000)

Die Antikörper wurden wie folgt verdünnt:

Primärantikörper: Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1): 1:10000; immungereinigte Antikörper gegen die strukturgebundene Spermien-PK (Anti-PK-S): 1:5; Antiserum gegen die gereinigte strukturgebundene Eberspermien-PK und zugehöriges Präimmenserum: 1:1000; Anti-somatische GAPDH: 1:100 - 1:10; Antiserum gegen die gereinigte strukturgebundene Eberspermien-GAPDH (Anti-GAPDH-S): 1:3000; Anti-Acosin: 1:250 - 1:50

Sekundärantikörper: Anti-Ziegen-IgG 1:15; Anti-Kaninchen-IgG 1:28 und Anti-Maus-IgG 1:23

Vorgang	verwendete Lösung	Dauer
1. Anätzen der Schnitte	Natrium-Perjodat in ddH ₂ O, gesättigte Lösung	2 min
2. 2x Waschen	ddH ₂ O	5 min
3. Reduzieren der Oberflächenspannung	0,1% Tween 20 in PBS	10 min
4. Absättigen freier NH ₂ -Gruppen	50 mM NH ₄ Cl in PBS	10 min
5. 1x Waschen	PBS	5 min
6. Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen	Blocklösung (0,5% Kaltwasserfischgelatine, 0,1% Ovalbumin in PBS)	1,5-3 h
7. Inkubation mit primären Antikörpern	Primäre Antikörper in Blocklösung	40-70 h bei 4°C
8. Jet-wash (vorsichtiges Abspritzen der Schnitte)	PBS	
9. 2x Waschen	PBS	5 min
10. Vorbereitung auf Inkubation mit sekundären Antikörpern, 2x Waschen	Immunogold-Puffer (0,5% Kaltwasserfischgelatine, 0,1% Ovalbumin, 0,01% Tween 20, 0,5 M NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3)	5 min
11. Inkubation mit sekundären, Goldpartikel-gekoppelten Antikörpern	Sekundäre Antikörper in Immunogold-Puffer	2 h, bei RT
12. Abstoppen der Inkubation	PBS	
13. Jet-wash und 2x Waschen	PBS	
14. Fixieren der Antikörper	1% Glutaraldehyd in PBS	5 min
15. 2x Waschen, dazwischen in Becherglas mit ddH ₂ O tauchen	ddH ₂ O	
16. Trocknen		mind. 30 min
17. Kontrastieren	2%iges wäßriges Uranylacetat	10-20 min
18. 3x Waschen durch Eintauchen in ddH ₂ O	ddH ₂ O	
19. Kontrastieren	Bleicitrat-Lösung	2 min
20. 3x Waschen durch Eintauchen in ddH ₂ O	ddH ₂ O	
21. Trocknen		

Es wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, um unspezifische Bindung von Antikörpern aufzuspüren:

- a) Anstelle der in Blocklösung verdünnten Primärantikörper wurde PBS in Blocklösung eingesetzt. So wurde geprüft, ob die verwendeten Sekundärantikörper unspezifisch an die Spermienschnitte binden.
- b) Die Primärantikörper wurden vor dem Einsatz zur Immunogoldmarkierung mit ihrem Antigen präinkubiert, sofern dieses vorlag. Hierzu wurden die Antikörper mit dem jeweiligen Protein bzw. Peptid in unterschiedlichem Verhältnis gemischt und 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken sowie weitere 2 h bei 4°C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden dann abzentrifugiert (15 min, 10000 x g, 4°C) und der Überstand zur Immunogoldmarkierung eingesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Antikörper im gleichen Verhältnis mit der Blocklösung verdünnt wurden, wie bei der zu kontrollierenden Markierung des entsprechenden Proteins. So sollte geprüft werden, ob die Markierung allein auf die Bindung der Antikörper an das spezifische Antigen zurückzuführen ist.

Die Antikörper gegen Kaninchenmuskel-PK wurden mit Kaninchenmuskel-PK (160 µg PK/µg Anti-PK) präinkubiert/präabsorbiert, die immungereinigten Antikörper gegen die für die Spermien-PK spezifische Peptidsequenz mit dem entsprechenden synthetisierten Peptid (100 µg Peptid/6 µl immungereinigte Antikörper).

- c) Wenn vorhanden, wurde das zugehörige Präimmenserum im Vergleich zum verwendeten Antiserum in gleicher Verdünnung zur Markierung eingesetzt. Hierdurch sollte geprüft werden, ob die Markierung durch das Antiserum auf das zur Immunisierung verwendete Antigen zurückzuführen ist oder ob sich im Präimmenserum bereits Antikörper befanden, die zu einer unspezifischen (Hintergrund-)Markierung führen.

2.16.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Immunogoldmarkierung der Ultradünnschnitte wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop Tecnai 12 Biotwin von FEI Company (5600 KA Eindhoven, Niederlande) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV ausgewertet. Bildausschnitte, die präparattypische Gegebenheiten widerspiegeln, wurden digital festgehalten.

2.16.3.3 Auswertung der Goldmarkierung

Da die Goldmarkierung meist eindeutige Ergebnisse lieferte, wurde von einer Auszählung der Goldpartikel/Fläche einer bestimmten Spermienstruktur meist abgesehen. Nur

im Falle der Markierung mit den immungereinigten Antikörpern gegen die strukturegebundene Spermien-PK (Anti-PK-S) wurde die Dichte der Goldpartikel an der fibrösen Scheide bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Die Oberfläche der angeschnittenen fibrösen Scheide wurde über die Anzahl der Bildpixel, die ihr zugeschrieben werden konnten, bestimmt. Hierzu wurde zuerst die Fläche eines Pixels anhand des jeweiligen Maßstabs bestimmt und die fibröse Scheide weiß eingefärbt. Über die Anzahl der weißen Pixel konnte dann die Oberfläche der fibrösen Scheide berechnet werden. Alle Goldpartikel, die an diese Fläche gebunden waren, wurden gezählt. Die Markierungsdichte wird im Folgenden als Anzahl von Goldpartikeln/ μm^2 fibröser Scheide angegeben. Die Werte basieren auf jeweils 4 voneinander unabhängigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten, die mit Anti-PK-S behandelt waren (Gesamtfläche der fibrösen Scheide $0,98 \mu\text{m}^2$) sowie von Schnitten, die zur Kontrolle mit der präabsorbierten Anti-PK-S behandelt waren (Gesamtfläche der fibrösen Scheide $1,14 \mu\text{m}^2$). Die angegebenen Werte zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Student's *t*-test überprüft, wobei die Ergebnisse bei $p < 0,05$ als signifikant erachtet wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Extraktion von PK aus Eberspermien

Nach dem Aufschließen der Spermien mittels Ultraschall in Natriumphosphatpuffer (25 mM; pH 7,3) verblieben nach Zentrifugation (100000 x g, 1 h) des Homogenates mindestens 60% der Gesamt-PK-Aktivität ($0,41 \pm 0,14 \mu\text{mol}/\text{min}$ in 10^8 Spermien bei 25°C , $n=8$) im Sediment. Auch durch mehrmaliges Waschen mit Phosphatpuffer (Teil 2.3) war diese nicht von den Spermienstrukturen ablösbar. Der Anteil an löslicher und strukturgebundener PK-Aktivität stand also nicht im Gleichgewicht, was darauf hindeutet, dass in Eberspermien zwei Formen der PK existieren. Neben der löslichen PK zeigte sich eine ungewöhnlich fest an Strukturen gebundene Form, die im Folgenden zur besseren Unterscheidung als PK-S bezeichnet wird. Ein Ablösen der PK-S mit Hilfe des elektrisch neutralen, nicht-denaturierenden Detergenz Triton X-100 war nicht möglich. Die Triton-Behandlung des Spermisendiments führte jedoch zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung ($> 50\%$) der PK-S, wohingegen die Aktivität der löslichen Spermien-PK von dem Detergenz nicht beeinflusst wurde. Durch kurze Behandlung der sedimentierten Spermienstrukturen mit der Protease Trypsin wurde katalytisch aktive PK-S abgelöst. Trypsin (3 mg/g Spermiennassgewicht) löste in 5 min bei Raumtemperatur rund 80% der PK-S ohne Verlust an katalytischer Aktivität.

Die feste Strukturbindung konnte genutzt werden, um die PK-S durch Zentrifugation der Zellfragmente von löslichen Proteinen zu trennen. Auch die tryptische Ablösung der PK-S von den zellulären Strukturen stellte einen effizienten Schritt im Reinigungsablauf dar (Tabelle 8). Neben der PK-S wurden aber noch weitere Proteine, v.a. die strukturgebundene GAPDH (im Folgenden als GAPDH-S bezeichnet), von den Strukturen abgelöst. Über chromatographische Verfahren sollten diese von der PK-S abgetrennt werden.

3.2 Reinigung der PK-S aus Eberspermien

Im Rahmen der Diplomarbeit war bereits eine Anreicherung der von den Spermienstrukturen abgelösten PK-S über das hydrophobe Säulenmaterial Resource Phe von Pharmacia Biotech erreicht worden (höchste spezifische Aktivität: 45,7 U/mg Protein). Die PK-S wurde bei 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ an das Säulenmaterial gebunden und mit Hilfe eines abfallenden linearen oder gestuften $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten eluiert. Das erhaltene PK-S-Präparat enthielt nach diesem Verfahren jedoch noch deutliche Verunreinigungen, vor allem durch GAPDH-S (Verhältnis von PK- zu GAPDH-Aktivität von 13 in der Fraktion mit

höchster spezifischer und PK-Aktivität). Für die Gewinnung von Antikörpern gegen die Eberspermien-PK-S waren diese Verunreinigungen zu hoch, so dass das Reinigungsverfahren optimiert wurde.

Während der Chromatographie über Resource Phe kam es zu einem Aktivitätsverlust der PK-S, welcher mit zunehmender Dauer der Reinigungsprozedur anstieg. Für die nachfolgenden Vorhaben und hier besonders für die kinetischen Untersuchungen der PK-S war jedoch eine ausreichende Enzymaktivität notwendig. Aus diesem Grund sollte die PK-Aktivität während und nach der Reinigung stabilisiert werden. Durch 10% Glycerin in den Chromatographiepuffern wurde eine deutliche Stabilisierung der PK-S erreicht. Hierdurch wurden allerdings auch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Säulenmaterial vermindert. Durch Verschiebung des Elutionsprogrammes zu höheren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen im Puffer konnte ein ähnliches Reinigungsergebnis wie ohne Glycerin im Puffer erreicht werden.

Im Folgenden wurde die Menge des auf die Säule aufgetragenen Proteins erhöht, um zu prüfen, ob mit dieser Chromatographiesäule ausreichende PK-S-Mengen, vor allem für die Antikörperproduktion, gereinigt werden können. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Auftragemenge ebenfalls die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Säulenmaterial beeinflusst. Auch hier konnte durch Verschiebung des Elutionsprogrammes zu höheren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen im Puffer ein ähnliches Reinigungsergebnis wie beim Endstand der Diplomarbeit erreicht werden. Jedoch wurden durch das geringe Säulenvolumen (1 ml) nur geringe Mengen an gereinigter PK-S erhalten und das Reinigungsergebnis konnte, im Vergleich zum Endstand der Diplomarbeit, bei Erhöhung der Auftragemenge nicht verbessert werden: Das Verhältnis der PK- zur GAPDH-Aktivität blieb unverändert, die spezifische Aktivität lag geringfügig niedriger als zuvor und die Ausbeute war deutlich gesunken. Auch leichte Modifikationen der Hydrophobizitätschromatographie über Phenyl-Sepharose führten zu keinem besseren Ergebnis. Es boten sich zwei Möglichkeiten, um die Menge an gereinigtem Protein zu erhöhen: die Verwendung einer größeren Resource Phe-Säule oder eines anderen hydrophoben Säulenmaterials. Da anderes hydrophobes Säulenmaterial zur Verfügung stand, eine größere Resource Phe-Säule jedoch nicht, wurden im Folgenden die Säulenmaterialien Fractogel EMD Phenyl (S) und Fractogel EMD Propyl (S) von Merck getestet. Es zeigte sich, dass bei einer Reinigung über die FPLC Fractogel EMD Propyl (S) das beste Reinigungsergebnis erzielt werden konnte. Die GAPDH-S und PK-S wurden bei ca. 20% bzw. 14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert, wodurch eine Trennung der beiden Enzyme möglich erschien. Von diesem Säulenmaterial stand überdies eine größere Menge zur

Verfügung. Da die Hydrophobizitätschromatographie jedoch noch keine ausreichende Reinheit für die Antikörperproduktion lieferte, wurden weitere Verfahren geprüft.

Es wurde getestet, ob und wie gut sich die PK-S mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie anreichern lässt. Hierzu wurden zwei Säulenmaterialien verwendet: der Anionenaustauscher Resource Q von Pharmacia Biotech und der Kationenaustauscher Fractogel EMD SO_3^- (S) von Merck. Für die Anionenaustauschchromatographie wurden vereinigte Fraktionen nach Chromatographie über Resource Phe verwendet, welche mit Glycerin stabilisierte PK-S und GAPDH-S enthielten. Die gegen Laufpuffer (20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% Glycerin, pH variiert) dialysierte Probe wurde bei verschiedenen pH-Werten (zwischen pH 7,6 und 8,6) auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule bei dem entsprechenden pH-Wert erfolgte die Proteinelution über eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Puffer. Bei dieser Versuchsserie konnte über Enzymaktivitätsmessungen sowie Proteinauftrennung durch SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgender Proteinanfärbung über Silberimprägnierung gezeigt werden, dass bei einem pH von 7,6 die GAPDH-S und die PK-S nicht an das Säulenmaterial binden, d.h., dass beide Enzyme bei diesem pH-Wert nicht ausreichend geladen sind. Bei pH 8,1 bindet die GAPDH-S teilweise, die PK-S aber nicht, d.h., die GAPDH-S ist fast und die PK-S nicht ausreichend geladen. Bei pH 8,3 bindet die GAPDH-S nahezu vollständig an das Säulenmaterial, die PK-S ist nicht ausreichend geladen und bindet dementsprechend nicht. Die Versuchsserie wies also auf unterschiedliche isoelektrische Punkte der beiden Enzyme hin, auf deren Grundlage die Abtrennung der GAPDH-S von der PK-S möglich erschien. Jedoch lag der für die Trennung zu wählende pH in einem für die Enzymaktivitäten ungünstigen Bereich. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Kationenaustauscher [Fractogel EMD SO_3^- (S)] zur Anreicherung der PK-S aus Überstand nach Trypsinbehandlung des Spermien-Sediments verwendet. Es wurde zuerst mit Hilfe eines pH-Gradienten herausgefunden, bei welchem pH-Wert die PK-S gerade noch am Säulenmaterial bindet. Bei diesem pH von 7,15 wurde die Probe dann auf die Säule aufgetragen. So wurde die Menge an Fremdproteinen, die bei diesem pH noch keine ausreichende Ladung besitzen, um an das Säulenmaterial zu binden, maximiert. Nach dem Probenauftrag wurde mit einem Gradienten von 10 mM bis 250 mM Phosphatpuffer (Abschnitt 2.4.2) eluiert. Es zeigte sich, dass nur ein kleiner Teil der GAPDH-S abgetrennt werden konnte. Die isoelektrischen Punkte der beiden Enzyme lagen nicht weit genug voneinander entfernt, um eine Trennung zu ermöglichen. Dennoch war die Anreicherung der PK-S über den Kationenaustauscher zufriedenstellend: Es wurde eine spezifische Aktivität von 22 U/mg Protein erreicht und die Ausbeute lag bei rund 84% der aufgetragenen PK-S.

Auch aufgrund der hohen Bindungsaffinität des Kationenaustauschmaterials wurde dieses Reinigungsverfahren im Folgenden zur ersten Anreicherung der PK-S aus Überstand nach Trypsinbehandlung gewählt. Die Abtrennung der GAPDH-S sollte über die hydrophobe Chromatographie erfolgen.

3.2.1 Optimierte Reinigung der PK-S über die Kombination von Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie

Für die finale Reinigung einer größeren Menge PK-S wurden 88 g Eberspermien mit Ultraschall aufgeschlossen. Die PK-S wurde von den gewaschenen und nach Zentrifugation sedimentierten Spermienstrukturen mit Trypsin abgelöst (Teil 2.3 und Abschnitt 2.4.3). Sie befand sich nach Zentrifugation im Überstand. Dieser wurde auf eine Säule mit Fractogel EMD SO_3^- (S) aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Stufengradienten (15, 38 und 50 mM Phosphatpuffer), wobei sich der Hauptanteil der PK-S bei 38 mM Phosphatpuffer vom Säulenmaterial löste (Abbildung 9). Die Ionenaustauschchromatographie führte zu einem etwa 7-fachen Anstieg der spezifischen Aktivität (Tabelle 8), die GAPDH-S wurde jedoch nicht abgetrennt. Die PK-S-enthaltenden Fraktionen wurden dann vereinigt, auf pH 7,3 eingestellt und auf 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebracht. Dann wurden sie auf die Fractogel EMD Propyl (S)-Säule aufgetragen. Durch Proteinelution über einen Stufengradienten wurde die PK-S weitgehend von der GAPDH-S getrennt (Abbildung 10). Der Hauptanteil der PK-S wurde erst bei 14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert, wogegen sich die GAPDH-S zum Großteil schon bei 20,5% von der Säule löste. In 6 Fraktionen des PK-S-Peaks nach der zweiten Säule wurde eine hohe spezifische Aktivität von durchschnittlich 116,7 U/mg Protein erreicht, wobei die Ausbeute bei 34% der PK-S lag. Mit rund 2 mg gereinigter PK-S stand genügend Material für die Antikörperproduktion bereit. Die GAPDH-Aktivität im PK-Präparat war deutlich reduziert (Tabelle 8).

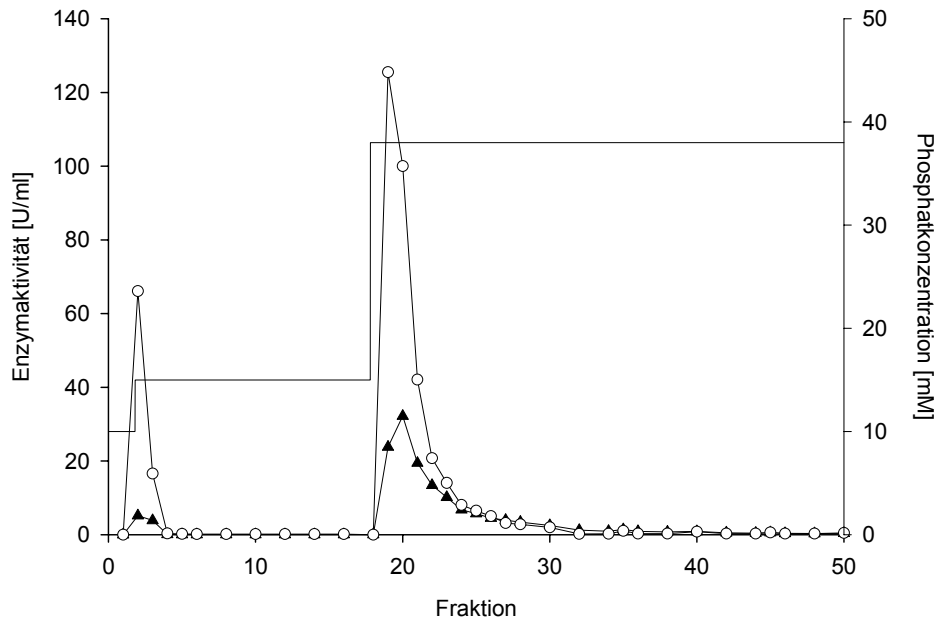


Abbildung 9: Ionenaustauschchromatographie von Extrakten nach Trypsinbehandlung der Zentrifugationsedimente homogener Eberspermien. Elution der Aktivitäten von PK-S und GAPDH-S mit einem gestuften Gradienten bei pH 7,15

Extrakt trypsinbehandelter Spermienfragmente, welcher abgelöste PK-S und GAPDH-S enthielt, wurde auf eine Fractogel EMD SO_3^- (S)-FPLC-Säule aufgetragen. Gebundene Proteine wurden mit Stufen bei 15 und 38 mM Phosphatpuffer eluiert. Es wurden unterschiedliche Volumina pro Fraktion aufgefangen (Fr. 1-16: je 5 ml, Fr. 17-50: je 3 ml). Die Messungen der Enzymaktivitäten in den Fraktionen wurden mit dem Multiskan und/oder dem Photometer durchgeführt.

Der Hauptteil der PK-S (-▲-) wurde bei der Stufe bei 38 mM Phosphatpuffer gemeinsam mit GAPDH-S (-○-) eluiert.

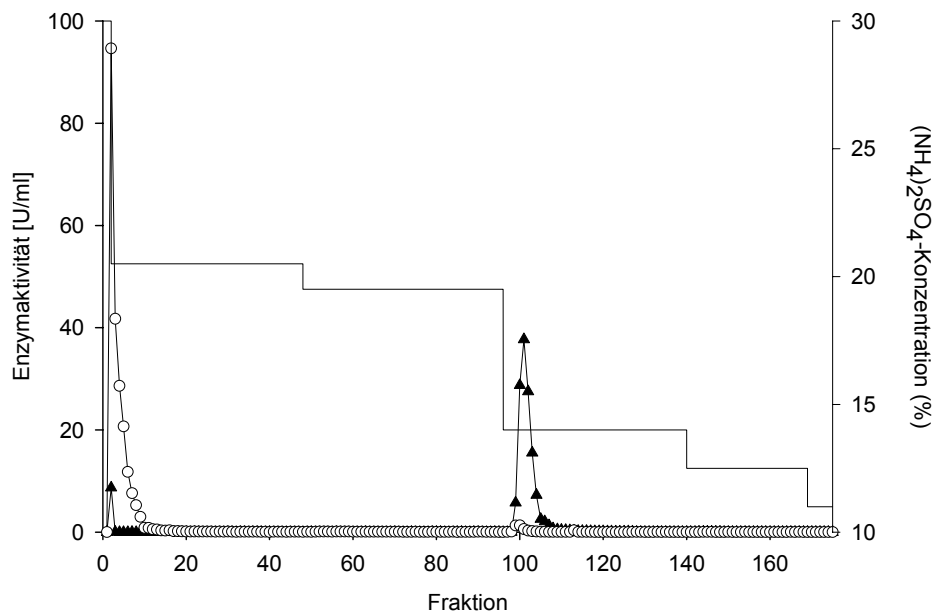


Abbildung 10: Hydrophobizitätschromatographie vereinigter, von Fractogel EMD SO_3^- (S) eluierter Fraktionen. Elution der Aktivitäten von PK-S und GAPDH-S mit einem gestuften Gradienten bei pH 7,3

PK-S- und GAPDH-S-haltige Fraktionen, die bei 38 mM Phosphatpuffer von Fractogel EMD SO_3^- (S) eluiert worden waren, wurden inkl. 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und mit pH 7,3 auf eine Fractogel EMD Propyl (S)-FPLC-Säule aufgetragen. Gebundene Proteine wurden mit Stufen bei 20,5%, 19,5%, 14%, 12,5% und 11% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert. Es wurden unterschiedliche Volumina pro Fraktion aufgefangen (Fr. 1-46: je 5 ml, Fr. 47-175: je 2 ml). Die Messungen der Enzymaktivitäten in den Fraktionen wurden mit dem Multiskan und/oder dem Photometer durchgeführt.

Nahezu die gesamte GAPDH-S (-○-) wurde bei 20,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert, die meiste PK-S-Aktivität (-▲-) hingegen in einem engen Peak bei 14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tabelle 8: Reinigung der PK-S aus Eberspermien.

PK-S wurde aus Eberspermien (88 g Nassgewicht) über Ultraschall- und Trypsinbehandlung des Spermisendiments (S4, Abbildung 8) extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand nach Trypsinbehandlung einer Ionenaustauschchromatographie [FPLC über Fractogel EMD SO_3^- (S)] unterzogen. Die Fraktionen des PK-Hauptpeaks wurden anschließend vereinigt, auf pH 7,3 eingestellt und auf 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebracht. Die vereinigten Fraktionen wurden dann einer Hydrophobizitätschromatographie [FPLC über Fractogel EMD Propyl (S)] unterzogen. In 6 resultierenden Fraktionen des PK-S-Peaks konnte im Durchschnitt eine gute Reinigung der PK-S gezeigt werden.

	Volumen [ml]	Protein [mg]	Pyruvatkinase-Aktivität [U]			Reini- gungs- faktor	PK/ GAPDH- Verhältnis
			Insgesamt	Pro mg Protein	Ausbeute (%) an PK-S		
Spermienhomogenat	720	9415	1085	0,12			
Überstand nach Trypsinbehandlung	390	243	720	2,96	100	24,7	
PK-S-Fraktionen nach Ionenaustausch- chromatographie (SO_3^-)	198	22,7	461	20,3	64	169,2	0,2
PK-S-Fraktionen nach Hydrophobizitäts- chromatographie (Propyl)	12	2,1	245	116,7	34	972,5	32,1

Die 4 Fraktionen mit bester Reinigung der PK-S nach Hydrophobizitätschromatographie wurden vereinigt und einer SDS-PAGE mit anschließender Proteinfärbung und Western-Blotting unterzogen (Abbildung 11). Nach der Anfärbung der Proteine im SDS-Gel mit Coomassie zeigte sich eine Hauptbande bei $64,5 \times 10^3$, welche im Blot von der Anti-Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) erkannt wurde. Daneben wurden im SDS-Gel zwei nur sehr schwache Nebenbanden bei ca. 99 und $42,4 \times 10^3$ beobachtet. Die Bande bei $42,4 \times 10^3$ ist vermutlich auf geringe Mengen an GAPDH zurückzuführen, welche bereits über die Aktivität gezeigt worden waren.

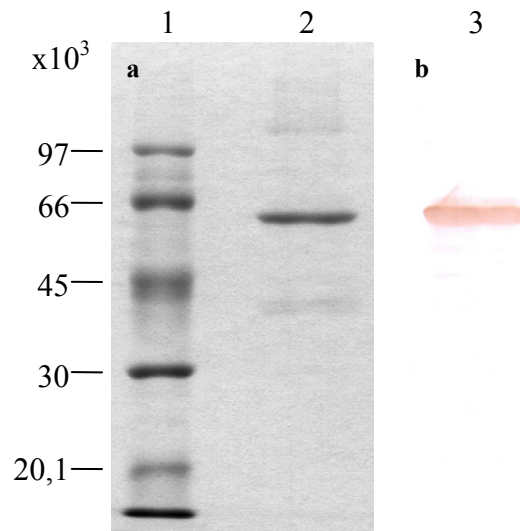


Abbildung 11: SDS-PAGE und Immunoblot der gereinigten PK-S aus Eberspermien

a: SDS-Gel mit Proteinfärbung durch Coomassie; **b:** Western-Blot mit Antikörperfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1), Verdünnung 1:12500

Bahn 1: 3,5 μ l LMW-Standard; **Bahn 2 und 3:** gereinigte PK-S [4 beste Fraktionen nach Fractogel EMD Propyl (S); je 3 μ g Protein]. Die Proteine waren in dem SDS-Probenpuffer Roti-Load 1 gelöst. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Standardproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnung der Anti-PK-M1 und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Ziegen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug 2 min.

Das PK-S-Präparat zeigt nach Proteinfärbung eine Hauptbande bei $64,5 \times 10^3$, welche im Western-Blot mit Anti-PK-M1 angefärbt wurde. Im SDS-Gel sind nur zwei sehr schwache Nebenseiten zu erkennen. Eine hiervon (bei ca. $42,4 \times 10^3$) zeigt vermutlich die GAPDH-S, welche in geringer Menge bereits über die Aktivität gezeigt worden war.

Das Präparat mit der gereinigten PK-S (Abbildung 11) wurde im Folgenden zur Produktion von Antikörpern eingesetzt. Zudem wurde PK-S nach Western-Blotting aus einer PVDF-Membran geschnitten und N-terminal ansequenziert. Für kinetische Untersuchungen wurden PK-S-Fractionen nach alleiniger Hydrophobizitätschromatographie eingesetzt. Störende Metabolite und Enzyme (z.B. Adenylatkinase) waren hier bereits ausreichend abgetrennt.

3.3 Anreicherung der löslichen PK aus Eberspermien

Die lösliche PK sollte angereichert werden, um im Immunoblot zu überprüfen, ob diese Form sich immunologisch von der strukturegebundenen Form PK-S unterscheidet. Sie wurde, ähnlich wie die PK-S, über Ionenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie angereichert.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede sowohl beim Anbindungs- und Ablösungsverhalten an Fractogel EMD SO_3^- (S), als auch an Fractogel EMD Propyl (S) beobachtet werden. Nach der Ionenaustauschchromatographie wurde eine höchste spezifische

Aktivität von 9,3 U/mg Protein erreicht. Nach der anschließenden Hydrophobizitätschromatographie lag die spezifische Aktivität bei 24,2 U/mg Protein. Diese Anreicherung reichte aus, um gleiche Mengen (spezifische Aktivitäten) von löslicher PK und PK-S in einem SDS-Gel aufzutragen und im Western-Blot die Erkennung durch Antikörper prüfen zu können (Abschnitt 3.6.4).

3.4 Kinetische Eigenschaften von PK aus Eberspermien

Über die kinetischen Eigenschaften der Pyruvatkinase von Säugerspermien ist nur wenig bekannt. STOREY und KAYNE (1975, 1980) untersuchten die Pyruvatkinase hypotonisch behandelte reife Nebenhodenspermien von Kaninchen und beschreiben, dass ihr kinetisches Verhalten dem der Muskel-PK (PK-M1) ähnlich ist. MEDRANO et al. (2006b) zeigten eine hohe Affinität für PEP und ADP für lösliche und strukturgebundene PK aus Eberspermien.

Die kinetischen Untersuchungen wurden mit PK-Proben aus Eberspermien durchgeführt, die keine den Enzymtest störenden Metabolite und Enzymaktivitäten (z.B. Adenylatkinase) aufwiesen. Es wurde sowohl die lösliche Spermien-PK (aus Überstand 1), als auch die PK-S untersucht. Die PK-S wurde hierzu abgelöst und über Hydrophobizitätschromatographie angereichert, sie wurde aber auch in noch strukturgebundenem Zustand (an S4-Suspension, Abbildung 8) untersucht. Neben der Wirkung variabler Substratkonzentrationen (PEP und ADP) und von bekannten PK-Effektoren [wie Fruktose 1,6-bisphosphat (F1,6P₂), L-Alanin und MgATP] wurde auch die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert sowie zusätzlich der Effekt von MgCitrat geprüft. So war es möglich, die Eigenschaften der Spermien-Pyruvatkinasen mit denen der bekannten PK-Isozyme sowie untereinander zu vergleichen.

Bekannte Isozyme der Pyruvatkinase aus Säugetiergeweben unterscheiden sich, neben ihrer Aminosäuresequenz, auch in ihren kinetischen Eigenschaften (Tabelle 9). So ist das in Muskeln und Gehirn mehrheitlich auftretende Isozym PK-M1 charakterisiert durch seine hohe Affinität für das Substrat PEP. Außerdem wird es, mit wenigen Ausnahmen, weder durch F1,6P₂ aktiviert, noch durch L-Alanin inhibiert, zwei Eigenschaften, die für die drei anderen PK-Isozyme PK-L, PK-R und PK-M2 typisch sind.

Die an Eberspermienstrukturen gebundene PK-S zeigte mit ihrer hohen Affinität für PEP sowie fehlender Aktivierbarkeit durch F1,6P₂ und Hemmung durch L-Alanin ein ähnliches kinetisches Verhalten wie die PK-M1 (Tabelle 9). Die Ablösung der PK-S mit Hilfe von Trypsin führte zu keiner signifikanten Veränderung ihrer kinetischen Eigenschaften, was darauf hinweist, dass die Bindung an Strukturen das kinetische Verhalten der Eberspermien-PK-S nicht beeinflusst. Die lösliche Spermien-PK zeigte ebenfalls ähnliche kinetische

Eigenschaften wie die der PK-S und der PK-M1. Parallel zu den kinetischen Untersuchungen der Spermien-PK wurden auch Kontrollexperimente mit PK-L und PK-M1 unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Für die PK-L, die aus Mäuseleber extrahiert worden war, wurde eine Aktivitätssteigerung um 87,5% durch 0,2 mM F1,6P₂ bei 0,1 mM PEP (sonstige Testkonzentrationen wie in Unterabschnitt 2.6.2.3) sowie eine Hemmung der Aktivität um 34% durch 1 mM L-Alanin (Testkonzentrationen wie in Unterabschnitt 2.6.2.3) gezeigt. Hingegen veränderten gleiche Konzentrationen an F1,6P₂ und L-Alanin die Aktivität von PK-M1 aus Kaninchenmuskel nicht. Die Ergebnisse der Kontrollexperimente standen also im Einklang mit den von HALL und COTTAM (1978) beschriebenen kinetischen Eigenschaften der PK-L und PK-M1 (Tabelle 9).

Tabelle 9: Kinetische Eigenschaften und relative molekulare Masse der PK-S (strukturegebunden und mit Trypsin abgelöst) und der löslichen PK aus Eberspermien im Vergleich mit somatischen Pyruvatkinasen

Die Aktivitäten der PK wurden in einem gekoppelten Enzymtest (Unterabschnitt 2.6.2.3) gemessen. Um die K_m-Werte zu erhalten, wurden die Konzentrationen der entsprechenden Substrate (PEP und ADP) variiert. Die Effekte von 0,2 mM F1,6P₂ bei 0,1 mM PEP und von 1 mM L-Alanin bei 1 mM PEP auf die PK-Aktivität wurden geprüft. In Kontrollexperimenten wurde unter gleichen Versuchsbedingungen eine Aktivierung von PK-L aus Mäuseleber durch F1,6P₂ sowie eine Inhibition durch L-Alanin erhalten. Hingegen hatten F1,6P₂ und L-Alanin keinen Effekt auf PK-M1 aus Kaninchenmuskel. Die kinetischen Eigenschaften der noch strukturegebundenen PK-S wurden durch die tryptische Ablösung der PK-S nicht signifikant verändert und waren denen der löslichen Spermien-PK sowie der PK-M1 ähnlich, unterschieden sich aber von denen der PK-L, PK-R, and PK-M2 (* Daten aus HALL und COTTAM, 1978).

Isozym	PK-S		PK-M1?	PK-M1*	PK-L*	PK-R*	PK-M2 (-A)*
	struktur-gebunden	abgelöst mit Trypsin	löslich				
Herkunft	Eberspermien			adulter Skelettmuskel, Herzmuskel, Gehirn	Leber (parenchymale Zellen)	Erythrozyten	Niere, Lunge, Leukozyten, Fettgewebe, Leber (stromale Zellen), fötale Gewebe
Relative molekulare Masse/Untereinheit (x10 ⁻³)		64,4 ± 0,5 (n=4)	63,4				
Molekulargewicht/Untereinheit [kDa]				52,5-62,5	50-60	50-60	47,5-62,5
K _m (PEP) [mM]	0,02-0,05	0,02-0,03	0,04-0,05	0,04-0,09	0,3-1,0	0,5-0,6	0,2-0,4
K _m (ADP) [mM]	0,52-0,56	0,46	0,42	0,3-0,4	0,1-0,4	0,4-0,6	0,2-0,4
Aktivierung durch F1,6P ₂	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
Hemmung durch L-Alanin	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja

Zu den in Tabelle 9 aufgeführten Kriterien zur Unterscheidung der PK-Isozyme, könnten entsprechend den Angaben von HALL und COTTAM (1978) weitere Merkmale herangezogen werden. Für die Mehrheit der PK-M1 wird beispielsweise ein hyperbolischer Kurvenverlauf

der PEP-Kinetik beschrieben (Hill-Koeffizient: 1), während PK-L und PK-R einen sigmoidalen Verlauf (Hill-Koeffizient für PK-L: 1,6-2,9; für PK-R: 1,2-1,6) zeigen. Neben PK-L und PK-R wird auch die PK-M2 als allosterisch beschrieben, wobei der Kurvenverlauf der PEP-Kinetik nicht eindeutig ist (Hill-Koeffizient: 1,06-1,5), d.h. je nach Literaturquelle als hyperbolisch oder sigmoidal beschrieben ist. Die gebundene und abgelöste PK-S sowie die lösliche PK aus Eberspermien scheinen einen ähnlichen hyperbolischen Kurvenverlauf der PEP-Kinetik aufzuweisen (Hill-Koeffizienten jeweils etwa 1), wie für PK-M1 beschrieben. Bei der Beurteilung des Kurvenverlaufs blieb jedoch der Bereich $< 0,0025$ mM PEP aus methodischen Gründen außer Acht. Ein weiterer Unterschied zwischen den PK-Isoformen scheint in der Hemmbarkeit durch ATP zu liegen. Während die K_i (ATP) für PK-M1 mit 3-4 mM und für PK-M2 mit 2,5 mM angegeben ist, liegt sie bei der PK-L nur bei 0,1-0,2 mM. Für die PK-R wurden in HALL und COTTAM (1978) keine Angaben gemacht. Auch an der löslichen PK sowie der gebundenen und abgelösten PK-S aus Eberspermien wurde der Effekt von MgATP auf die Enzymaktivität im Vergleich zur PK-M1 aus Kaninchenmuskel überprüft. Bei einer PEP-Konzentration von 0,1 mM wurden die Konzentration an Mg-ATP variiert (0, 2, 5, 10 und 15 mM). Die lösliche PK sowie die noch gebundene und die tryptisch abgelöste PK-S wurden in ähnlichem Ausmaß durch MgATP gehemmt. 2 mM MgATP senkte die PK-Aktivität um 15,2-16,3%, 5 mM MgATP um 30-37,9%, 10 mM um 43,2-56,7% sowie 15 mM um 58,3-68,5%. Die Aktivität der PK-M1 wurde ähnlich stark durch MgATP gehemmt (2 mM: 28,4% Aktivitätsverlust; 5 mM: 40,1%; 10 mM: 55,7%). Lediglich bei der MgATP-Konzentration von 15 mM wich der Wert für die Aktivitätssenkung mit 99,4% deutlich von den Werten für die Spermien-Pyruvatkinasen ab. Hier sei aber darauf hingewiesen, dass es sich bei der PK-M1 um die Werte von Einzelmessungen handelt.

Neben den o.g. Kriterien zur Unterscheidung der PK-Isozyme wurden weitere kinetische Eigenschaften der Spermien-Pyruvatkinasen (gebundene und abgelöste PK-S sowie lösliche PK) vergleichend untersucht. Das pH-Optimum der von Strukturen abgelösten PK-S liegt bei einem geringfügig niedrigeren pH-Wert ($6,84 \pm 0,05$; $n=3$) als die Optima der noch gebundenen PK-S ($7,13 \pm 0,04$; $n=2$) und der löslichen PK ($7,12 \pm 0,23$; $n=2$) (Abbildung 12). Davon abgesehen, besitzen die Aktivitätskurven eine ähnliche Gestalt (Peakbreite). Der Grund für die leicht unterschiedlichen pH-Optima gebundener und abgelöster PK-S könnte in der unterschiedlichen Enzymumgebung liegen.

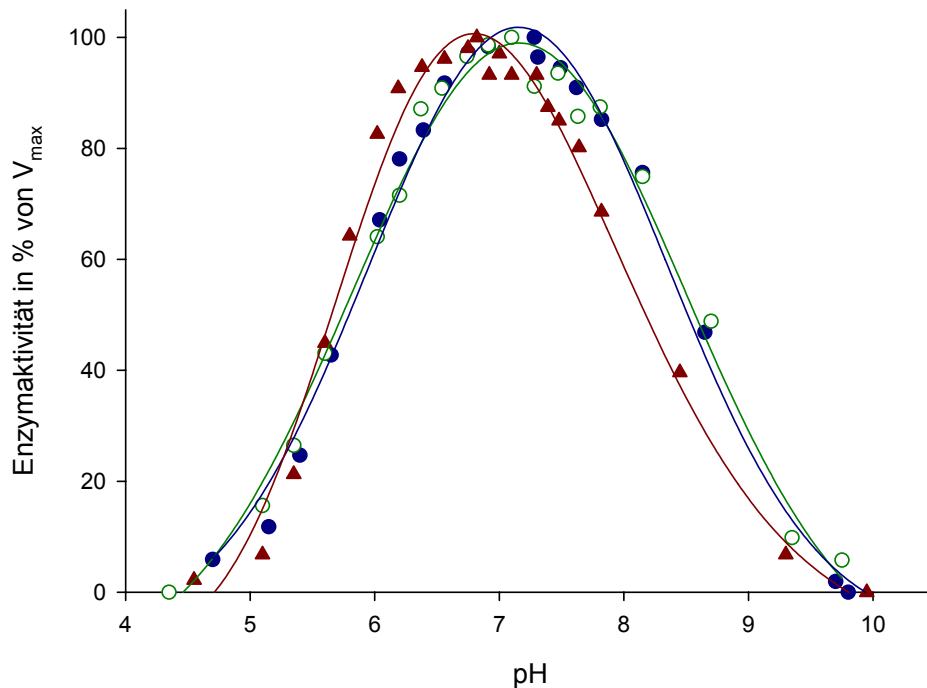


Abbildung 12: Aktivität löslicher PK sowie strukturebundener und tryptisch abgelöster PK-S aus Eberspermien in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Aktivitäten der PK (-●- lösliche Spermien-PK; -○- strukturebundene PK-S; -▲- tryptisch abgelöste PK-S) wurden in einem gekoppelten Enzymtest (Unterabschnitt 2.6.2.3) gemessen. Der pH wurde mit Hilfe eines MES/HEPES/CAPS-Puffers (Testkonzentration je 50 mM) zwischen pH 4 und pH 10 variiert. Nach der jeweiligen Messung wurde der exakte pH-Wert im Testansatz gemessen.

Im vorliegenden Fall lag das pH-Optimum der löslichen Spermien-PK und der strukturebundenen PK-S bei rund 7,2, während das der abgelösten PK-S bei 6,8 lag. Der Verlauf der Kurven ist ähnlich.

Neben der Wirkung des pH-Wertes auf die PK-Aktivität, wurde die von MgCitrat getestet. Dieses führte konzentrationsabhängig zu einer Senkung der PK-Aktivität von löslicher PK und PK-S aus Eberspermien sowie von PK-M1 aus Kaninchenmuskel. Bei 0,1 mM PEP hemmte das MgCitrat die Aktivität der Spermien-Pyruvatkinasen um 0-6% (bei 2 mM MgCitrat), um 9,9-14,1% (bei 5 mM), um 21,9-27,1% (bei 10 mM) oder um 24,3-36,4% (15 mM). Die Aktivität der PK-M1 wurde ähnlich stark gesenkt (12,1% bei 2 mM MgCitrat; 12,1% bei 5 mM; 23,7% bei 10 mM und 43,2% bei 15 mM; Einzelwerte).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass, im Vergleich mit den bekannten PK-Isoformen, sowohl die lösliche, als auch die strukturebundene PK aus Eberspermien große Ähnlichkeit mit der M1-Form besitzt. Abgesehen von der leichten Verschiebung des pH-Optimums, wurden bei den untersuchten kinetischen Eigenschaften keine signifikanten Unterschiede zwischen der noch an Strukturen gebundenen und der abgelösten PK-S festgestellt. Die Hemmbarkeit der Spermien-Pyruvatkinasen durch Citrat könnte der Anpassung der ATP-Produktion an veränderte Situationen von Spermien dienen.

3.5 Teilsequenzierung der gereinigten PK-S

Es wurden Nukleotidsequenzen (cDNA/mRNA und genomische DNA) gefunden (WELCH et al., 1992, 2000, 2006), welche eine spermien-spezifische, N-terminal verlängerte GAPDH (GAPDH-S) in Maus, Mensch und Ratte codieren. Diese Verlängerung wird für die Bindung an Zellstrukturen verantwortlich gemacht. Es stellte sich die Frage, ob die PK-S ebenfalls über eine spermien-spezifische Verlängerung an Zellstrukturen gebunden ist. Da Sequenzen spermien-spezifischer PK auch nach umfangreicher Literaturrecherche nicht gefunden wurden, die Sequenzen von Pyruvatkinasen anderer Herkunft aber vorliegen, habe ich eine N-terminale Teilsequenzierung der von mir gereinigten PK-S aus Eberspermien durchführen lassen.

Die Teilsequenzierung durch Edman-Abbau wurde am Theodor-Boveri-Institut der Universität Würzburg durchgeführt. Hierzu wurde die gereinigte PK-S nach SDS-Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran geblottet und die Hauptbande der PK-S bei $64,5 \times 10^3$ aus der Membran geschnitten.

Es konnten 18 der ersten 19 Aminosäuren des Aminoterminus bestimmt werden. Die erhaltene Aminosäuresequenz lautete



Für die nicht ganz eindeutig bestimmbareren Aminosäuren wurde jeweils die wahrscheinlichere angegeben. Die nicht bestimmte Aminosäure wurde als „X“ angegeben.

Die Teilsequenz wurde auf der Grundlage der HPLC-Elutionsprofile für jeden Aminosäureabspaltungsschritt bestimmt. Je weiter die Aminosäure vom Aminoterminus entfernt lag, d.h., je später sie abgespalten wurde, desto schwieriger war es, sie zu bestimmen, was an der üblichen Abnahme der Peakhöhe sowie einer Zunahme der Hintergrundpeaks („Schleichen der Peaks“) lag. Gewöhnlich liegt die Ausbeute an PTH-Aminosäuren nach jedem Edman-Zyklus bei 90 bis 99%. Nicht rechtzeitig abgespaltene Aminosäuren führen zu Hintergrundpeaks („carryover“, „lag“) in den nachfolgenden Zyklen. Folglich nimmt der Hintergrund mit der Anzahl der Zyklen zu. So war die Sequenz ab der Aminosäure 12 als etwas weniger sicher zu beurteilen. Bei der 6. und 12. abgespaltenen Aminosäure zeigten sich im HPLC-Elutionsprofil, neben den deutlich angestiegenen Peaks für Prolin (P; Nr. 6) und Alanin (A; Nr. 12), auch ein etwas geringerer Anstieg des Arginin (R; Nr. 6)- bzw. Aspartat (D; Nr. 12)-Peaks. Beim Durchgang Nr. 8 war die Peakhöhe für Alanin (A) zwar deutlich angestiegen, jedoch verhältnismäßig (zu) gering. Die Aminosäure Nr. 14 konnte nicht

eindeutig bestimmt werden. Hier waren unverhältnismäßig geringe Anstiege der Peaks für Serin (S) und Threonin (T) zu verzeichnen, weshalb es sich prinzipiell auch um Cystein (C) als abgespaltene Aminosäure handeln kann, da das Cystein vor der Sequenzierung nicht modifiziert worden war. Um Cystein bestimmen zu können, muss es vor der Sequenzierung modifiziert (Reduktion und Alkylierung) werden. Unmodifiziertes Cystein wird bei N-terminaler Proteinsequenzierung zerstört und ist somit im HPLC-Elutionsprofil nicht zu sehen. So kann nur über Negativergebnisse für die anderen Aminosäuren auf Cystein als abgespaltene Aminosäure geschlossen werden. Beim Abspaltungsschritt Nr. 20 konnte keine Aminosäure mehr eindeutig von den Hintergrundpeaks unterschieden werden. Mehrere Peaks zeigten im letzten Elutionsprofil einen geringen Anstieg gegenüber dem vorangegangenen.

Vergleicht man den N-terminalen Sequenzabschnitt der tryptisch von Eberspermien gelösten PK-S mit Sequenzen diverser Proteine aus Datenbanken (Swiss-Prot und TrEMBL), so zeigt sich die größte Ähnlichkeit mit Pyruvatkinasen der M-Isoformen. Diese Ähnlichkeit liegt hauptsächlich im C-Terminus (Position 79-83, Abbildung 13) des ermittelten Sequenzabschnittes begründet, welcher vollständig mit einem Sequenzabschnitt meist nahe dem N-Terminus der M-Pyruvatkinasen übereinstimmt. Es folgen zum N-Terminus hin 9 Aminosäuren (Position 69-77, Abbildung 13), die nur teilweise mit den Sequenzen für PK-M übereinstimmen. Die meisten M-Isoformen der PK mit großer Ähnlichkeit zum ermittelten Sequenzabschnitt der PK-S enden hier mit Methionin (M). Zwei Sequenzen weisen jedoch wie die PK-S einen verlängerten N-Terminus auf. Eine PK-M2-Sequenz (Q4V9L8), die von einer cDNA-Sequenz aus humanen Chondrosarcoma Lungenmetastasen abgeleitet wurde, zeigt eine 68%ige Übereinstimmung (13 von 19 Aminosäuren) mit dem ermittelten Sequenzabschnitt der tryptisch von Eberspermienstrukturen gelösten PK-S. Sie stimmt in 3 der 4 N-terminalen Aminosäuren der PK-S überein ($\text{NH}_2\text{-TSAA-COOH} \leftrightarrow \text{NH}_2\text{-TSEA-COOH}$). Die größte Übereinstimmung (78%; 15 von 19 Aminosäuren) mit der Sequenz der PK-S aus Eberspermien wies jedoch ein „hypothetisches“ Rinderprotein (Q3ZC87) auf, dessen Sequenz aus einer Nukleotidsequenz aus Dünndarm (Ileum) abgeleitet war. Bei diesem Protein kann anhand der weitgehend übereinstimmenden Sequenz davon ausgegangen werden, dass es sich um eine PK-M1 oder PK-M2 handelt, welche eine N-terminale Verlängerung besitzt. Es handelt sich hierbei um die einzige Sequenz, deren N-terminale Verlängerung, wie bei der PK-S, mit $\text{NH}_2\text{-TSEA(M)-COOH}$ beginnt. Zudem folgt dem Threonin (T) ein Lysin (K), was im Einklang mit der Abspaltung der PK-S durch Trypsin an dieser Sequenzstelle steht.

Es wurden dann die Computerprogramme ClustalX und Jalview genutzt, um die Sequenz von Pyruvatkinasen verschiedener Herkunft und verschiedener Isotypen mit der für die PK-S aus Eberspermen erhaltenen Teilsequenz zu vergleichen. Während nur zwei PK-Sequenzen vom Protein bestimmt wurden, sind die meisten von Nukleotidsequenzen abgeleitet. In Abbildung 13 sieht man, dass die erhaltene Teilsequenz auch hier die größte Ähnlichkeit mit den M-Isoformen der Pyruvatkinase (PK-M1 und -M2) besitzt. Die Sequenzen von PK-M1 und -M2 sind bis auf einen internen Sequenzbereich weitgehend homolog. Der N-Terminus scheint aber etwas weniger konserviert zu sein. Auch PK-L und PK-R weisen weitreichende Homologien auf, wobei auch hier der im Vergleich zur PK-M verlängerte N-Terminus weniger konserviert zu sein scheint. Die 7 bestimmten Aminosäuren am C-terminalen Ende der PK-S-Teilsequenz sind eindeutig homolog angeordnet zu einem meist nahe dem N-Terminus gelegenen Sequenzabschnitt der M-Isoformen (Abbildung 13, Position 76-83). Dieser Sequenzabschnitt unterscheidet sich von dem der L/R-Isoformen [AG(T/S)AFIQT ↔ LG(T)AFFQQ]. Bei der nicht bestimmten Aminosäure der Teilsequenz (X, Position 78) handelt es sich vermutlich, homolog zu den M-Isoformen, um T oder S. Für beide Aminosäuren waren im HPLC-Elutionsprofil nach Schritt 14 des Edman-Abbaus geringe Anstiege der Peaks beobachtet worden. Auf die 7 bestimmten C-terminalen Aminosäuren folgen 6 Aminosäuren, die nur teilweise (0-4 von 6 Aminosäuren, meist 2) mit den M-Isoformen übereinstimmen. Während die M1-Isoformen mit diesem Sequenzabschnitt enden, weisen die Sequenzen für PK-M2 meist zusätzlich ein Methionin (M) am N-Terminus auf. Nur zwei Sequenzen besitzen, wie schon beschrieben, eine N-terminale Verlängerung im Vergleich zu den anderen PK-M-Sequenzen. Der Beginn der Verlängerung ähnelt oder ist identisch mit dem N-terminalen Sequenzabschnitt der tryptisch abgelösten PK-S [NH₂-TSEA(M)-COOH].

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
075758 PK-L Homo									
Q16716 PK-L Homo									
Q30EH4 PK-L/R Mus									
P53657 PK-L/R Mus									
P12928 PK-L/R Rattus									
P30613 PK-L/R Homo									
Q40X10 PK-L/R Homo									
Q16715 PK-R fragment Homo									
Q50VM0 PK-M1 Pongo									
P11980 PK-M1/M2 Rattus									
P11974 PK-M1/M2 oryctolagus									
P00548 PK muscle Gallus									
Q28HE2 PK muscle Xenopus									
Q40C20 PK 3 Mus									
Q536K4 PK 3 fragment Homo									
P52480 PK-M2 Mus									
Q6P750 PK-M2 Rattus									
Q50403 PK-M2 Homo									
Q29582 PK-M2 fragment Sus									
Q409L8 PK-M2 Homo									
Q32C87 Hypoth. protein fragment Bos									
New PK-S Sus									
P11979 PK-M1 Felis									
P14618 PK-M1 Homo									

Abbildung 13: Vergleich des N-Terminus der tryptisch abgelösten PK-S aus Eberspermen mit N-Termini somatischer Pyruvatkinasen

Sequenzen verschiedener somatischer Pyruvatkinasen, die über die Datenbanken Swiss-Prot und TrEMBL erhalten wurden, werden mit der N-terminalen Sequenz gereinigter PK-S (New|PK-S|Sus, X=nicht bestimmte Aminosäure) verglichen. Es ist jeweils ihre Eintragsnummer, die PK-Isoform (Vorkommen von PK-L, -R, -M1, -M2 s. Tabelle 9) sowie die Herkunft der PK angegeben. Die Sequenzen der somatischen Pyruvatkinasen oberhalb der PK-S sind jeweils aus einer Nukleotidsequenz abgeleitet, wohingegen die unterhalb der PK-S, sowie die PK-S selbst, über Proteinsequenzierung erhalten wurden. Der Sequenzabschnitt der PK-S zeigt die größte Übereinstimmung mit den M-Isoformen der PK. In den Positionen 70-83 stimmen 7-11 Aminosäuren überein (50-78%), im Vergleich mit PK-L/R nur 4 Aminosäuren (28%). Die Sequenz NH₂-AFIQT-COOH (Position 79-83, grau unterlegt), die in allen PK-M, aber nicht in PK-L oder PK-R auftritt, ist auch bei der PK-S vorhanden. Zwei aus cDNA abgeleitete PK-M-Sequenzen zeigen ein ähnliches Peptid an gleicher Position (65-69) wie die Verlängerung der PK-S (gleiche Aminosäuren grau unterlegt). Die zwei über Proteinsequenzierung erhaltenen Sequenzen für PK-M1 weisen keine N-terminale Verlängerung auf.

Die zwei Sequenzen für PK-M1 [PK-M1 aus Katzenmuskel (P11979) sowie N-Terminus der PK-M1 aus humanen Blutplättchen (P14618)], welche über Proteinsequenzierung erhalten wurden, besitzen im Gegensatz zu der aus gereinigtem Protein erhaltenen PK-S-Sequenz keine N-terminale Verlängerung. Auch ein N-terminales Methionin ist in den Sequenzen nicht

vorhanden. Hingegen ist auf der Nukleotidebene für die humane PK-M (M23725) eine der exprimierten PK vorangehende Sequenz (NH₂-TSAAM-COOH) codiert.

Um zu sehen, ob auch in anderen Nukleotidsequenzen von PK-M-Formen vor dem Methionin (Abbildung 13, Position 69) Informationen für eine N-terminale Verlängerung codiert sind, wie für die PK-S aus Eberspermien erhalten, wurden die Nukleotidsequenzen von PK-M in den Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ und PDB daraufhin geprüft. Die meisten aus Nukleotidsequenzen hergeleiteten Proteine in Abbildung 13 beginnen mit dem Methionin in Position 69. Die ungekürzt übersetzten Nukleotidsequenzen zeigen meist eine der N-terminalen PK-S-Sequenz TSEA(M) gleiche oder ähnliche Sequenz [oft TSAA(M) oder TSGT(M), selten ISET(M)] am 5'-Ende des meist vorhergesagten Startcodons AUG. Um zusätzliche Informationen zu den N-Termini der in Abbildung 13 gezeigten Proteinsequenzen für PK-M zu erhalten, wurden die zugehörigen Nukleotidsequenzen komplett übersetzt (mit dem Translate Tool von www.expasy.org) und ungekürzt miteinander sowie mit der Teilsequenz der Spermien-PK-S verglichen. Wie in Abbildung 14 zu sehen, zeigt auch hier die Mehrzahl der Sequenzen (20 von 27) eine dem TSEA(M)-ähnliche Sequenz (Position 93-97). Zudem gehen dieser Sequenz in Position 92 oft die Aminosäuren Arginin (R; 17 der 20) oder Lysin (K; 1 der 20) voraus, welche als Spaltungsorte für Trypsin bekannt sind. Da die Translation bei Eukaryoten gewöhnlich mit dem am nächsten zum 5'-Ende der mRNA gelegenen AUG-Codon, das für Methionin codiert, beginnt und bei den meisten Sequenzen dieses erst in Position 97 (Abbildung 14) nach der TSEA-ähnlichen Sequenz auftritt, ist diese Sequenz in den abgeleiteten Proteinsequenzen meist nicht mehr zu finden. Auch eine PK-M2 (Q504U3), die aus einer cDNA-Sequenz aus Testis (BC094767) abgeleitet ist, zeigt keine N-terminale Verlängerung, da dem vorhergesagten AUG-Startcodon, welches das Methionin in Position 97 (Abbildung 14) codiert, kein weiteres AUG in 5'-Richtung vorausgeht. Nur die Nukleotidsequenz aus humanen Chondrosarcoma Lungenmetastasen (BC096823), welche für die PK-M2 (Q4V9L8) codiert, enthält in 5'-Richtung zum meist vorhergesagten Startcodon ein zusätzliches Startcodon (codiert Methionin in Position 62, Abbildung 14), so dass hier in der abgeleiteten Proteinsequenz eine N-terminale Verlängerung [mit NH₂-TSAA(M)-COOH] erscheint. Die Nukleotidsequenz aus Rinderdünndarm (BC102826), welche eine PK-M (Q3ZC87) codiert, enthält N-terminal zum codierten NH₂-TSEAM-COOH offenbar kein weiteres AUG, so dass nicht klar ist, wieso eine N-terminale Verlängerung im Vergleich zu den M-Isoformen in der abgeleiteten Proteinsequenz erscheinen soll. Eventuell wurde vermutet, dass es sich hier um ein Fragment der Nukleotidsequenz handelt, was auch bei der Proteinbenennung kenntlich gemacht wurde.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
CR861086 (Q5NWN0 PK-M1 Pongo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CR925988 (Q5NWN0 PK-M1 Pongo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X15800 (P11980 PK-M1 Rattus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
U09028 (P11974 PK-M1 Oryctolagus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
U44751 (P11974 PK-M1 Oryctolagus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
J00903 (P00548 PK muscle Gallus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CR760921 (Q28HR2 PK muscle Xenopus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC094663 (Q4VC20 PK 3 Mus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AK168943 (Q4VC20 PK 3 Mus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AK135397 (Q4VC20 PK 3 Mus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AK222927 (Q53GR4 PK 3 fragment Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AF032389 (P11974 PK-M2 Oryctolagus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M23725 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M26252 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC000481 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC007640 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC007952 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC012811 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC035198 (P14618 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D38379 (P52480 PK-M2 Mus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X97047 (P52480 PK-M2 Mus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC016619 (P52480 PK-M2 Mus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC061541 (Q6P750 PK-M2 Rattus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC094767 (Q504U3 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F14645 (Q29582 PK-M2 fragment Sus)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC096823 (Q4V9L8 PK-M2 Homo)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BC102826 (Q3ZC87 Hypo. protein frg Bos)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
New PK-S Sus	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abbildung 14: N-Terminus tryptisch abgelöster PK-S aus Eberspermen verglichen mit ungekürzt in Aminosäuresequenzen übersetzten PKM mRNAs

Die mRNA-Sequenzen, aus denen die Aminosäuresequenzen für PK-M in Abbildung 13 abgeleitet worden waren, wurden komplett in Aminosäuren übersetzt und ungekürzt verglichen. Angegeben ist jeweils die Nukleotidnummer sowie in Klammern das hieraus abgeleitete Protein (entsprechend Abbildung 13). Sequenzorte, an welchen sich ein Stopcodon befand, sind als X, sowie das jeweils erste 5'-gelegene potentielle AUG-Startcodon übersetzt als M angegeben. Die über Proteinsequenzierung der tryptisch von Eberspermenstrukturen gelösten PK-S erhaltene Aminosäuresequenz (New | PK-S | Sus) ist im Vergleich zu den übersetzten Nukleotidsequenzen unten dargestellt (X= nicht bestimmte Aminosäure). PKM mRNAs besitzen in 5'-Richtung vor dem vorhergesagten Startcodon oft Nukleotidsequenzen ähnlich der Verlängerung der PK-S codieren (Positionen 93-96, grau unterlegt). Im Fall der PK-M1 beginnt die Translation vermutlich an dem gewöhnlich vorhergesagten Startcodon AUG für Methionin an Position 97 (s. native PK-M1 in Abbildung 13; P11979 und P14618). Dagegen müsste zur Produktion der PK-S ein anderes, weiter 5' gelegenes Startcodon verwendet werden. Die Sequenz NH₂-AFIQT-COOH ist in allen PK-Ms und in der PK-S zu finden (Positionen 107-111; grau unterlegt).

Die zwei Sequenzen für PK-M1, die über Proteinsequenzierung erhalten wurden, zeigen deutlich an, dass das Protein PK-M1 N-terminal um 5 Aminosäuren kürzer ist als die abgelöste PK-S. Die Bezeichnung der strukturgebundenen PK aus Eberspermien als PK-S ist somit gerechtfertigt. Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass es sich bei der PK-S um eine neue Form der PK in Spermien handelt, welche eine N-terminale Verlängerung besitzt, die der Anbindung an die Spermienstrukturen dienen könnte.

Im Vergleich zu den bekannten Verlängerungen der GAPDH-S aus Maus, Mensch und Ratte (WELCH et al., 1992, 2000, 2006) konnte, auch aufgrund der kurzen bekannten Sequenz der N-terminalen PK-Verlängerung, keine Homologie entdeckt werden. Auch unter der Annahme, dass die komplette N-terminale Sequenz (ohne tryptische Spaltung) den N-terminalen Verlängerungen der Rinder- oder der humanen PK-M gleicht, wurde keine Ähnlichkeit zur Verlängerung der GAPDH-S oder zu anderen Proteinsequenzen gefunden. Es gibt keine Anhaltspunkte für Prolin- oder Cystein-reiche Sequenzabschnitte, wie sie für die GAPDH-S beschrieben sind. Zudem ist bislang unklar, ob die N-terminale Verlängerung der GAPDH-S vollständig im nativen Protein enthalten ist.

3.6 Gewinnung spezifischer Antikörper gegen die PK-S

Mit dem Ziel die PK-S in Säugerspermien zu lokalisieren, wurde versucht, spezifische Antikörper gegen sie zu produzieren. Es wurde zuerst ein Kaninchen mit der gereinigten PK-S aus Eberspermien immunisiert. Zusätzlich wurde ein Teil der über Edman-Abbau erhaltenen Teilsequenz der PK-S synthetisiert und ebenfalls zur Produktion von Antikörpern in Kaninchen eingesetzt. Zur Immunreinigung von Antikörpern wurde Sepharose verwendet, an welche das synthetisierte Peptid gekoppelt war. So konnten aus dem Antiserum gegen die gereinigte PK-S Antikörper gereinigt werden, die spezifisch gegen die PK-S gerichtet waren.

3.6.1 Produktion und Charakterisierung des Antiserums gegen die gereinigte PK-S

Die gereinigte und lyophilisierte Eberspermien-PK-S wurde zur Produktion von Antikörpern in einem Kaninchen eingesetzt. Vor der Immunisierung wurden die Präimmunsereen zweier Kaninchen sowie die sekundären Antikörper gegen Kaninchen-IgG auf unspezifische Proteindetektion hin untersucht. Hierzu wurden, neben Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH, lösliche und strukturgebundene Eberspermienproteine (Überstand 1, Überstand nach Trypsinbehandlung und vereinigte PK-S- und GAPDH-S-enthaltende Fraktionen nach chromatographischer Anreicherung) SDS-gelelektrophoretisch getrennt. Das

Immunoblotting wurde mit unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörper bzw. Präimmunseren durchgeführt. Es zeigte sich, dass die sekundären Antikörper bei einer Verdünnung von 1:10000, selbst nach 25-minütiger Einwirkung des Färbereagenzes DAB, keines der aufgetragenen Proteine binden und somit für die Untersuchungen sehr gut geeignet sind. Die Präimmunseren der beiden Kaninchen wurden im Vergleich jeweils 1:2000 und 1:200 eingesetzt (Abbildung 15). Hierbei stellte sich heraus, dass bei einem der beiden Seren schon bei der Verdünnung von 1:2000 mehrere Proteine unspezifisch angefärbt wurden (Abbildung 15b). Besonders durch die Bindung an die Kaninchenmuskel-PK und die Spermien-PK-S sowie an ein anderes proteolytisch von Spermienstrukturen ablösbares Protein war dieses Kaninchen für die Immunisierung ungeeignet. Das andere Präimmunserum führte beim Einsatz von 1:2000 nicht zu unspezifischer Proteinfärbung (Abbildung 15c), beim Einsatz von 1:200 wurden jedoch auch hier Proteine unspezifisch angefärbt (Abbildung 15e), jedoch deutlich schwächer als beim 1:200 eingesetzten ersten Präimmunserum (Abbildung 15d). Da in ähnlichen Versuchen in der Literatur sowie in eigenen Versuchen mit Kaninchen-Antiserum gegen die GAPDH-S aus Eberspermien ein Einsatz des Antiserums von weniger als 1:2000 sowohl für die Immunfärbung von Western-Blots als auch für die Immunogoldmarkierung von Proteinen ausreichte, wurde das Kaninchen mit dem zweiten Präimmunserum als geeignet erachtet.

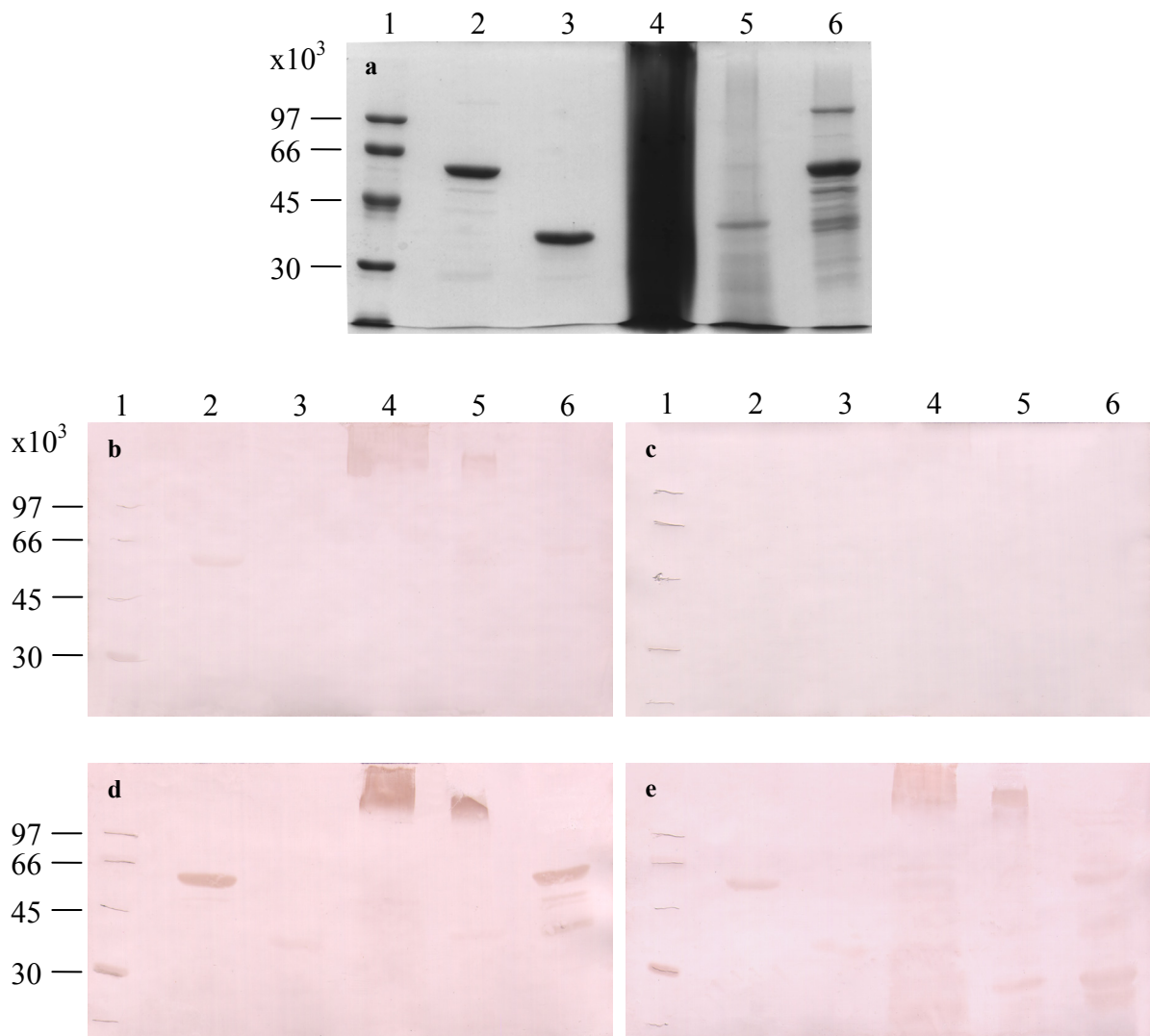


Abbildung 15: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturegebundenen Proteinen aus Eberspermien. Prüfung der unspezifischen Proteinbindung durch Präimmunsereen zweier Kaninchen

a: SDS-Gel mit Proteinanfärbung; **b-e:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung zweier Präimmunsereen in jeweils zwei Verdünnungen

b: Präimmunserum 1, Verdünnung 1:2000; **c:** Präimmunserum 2, Verdünnung 1:2000; **d:** Präimmunserum 1, Verdünnung 1:200; **e:** Präimmunserum 2, Verdünnung 1:200

Bahn 1: 4 µl LMW-Standard; **Bahn 2:** 4 µg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 4 µg Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 250 µg Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung Ünt (strukturegebundene, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 40 µg Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 15 µg Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnungen der Präimmunsereen und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei Membran b und c jeweils 25 min, bei Membran d und e jeweils 10 min. Das Kaninchen mit dem Präimmunserum 2 führte bei einer für den späteren Einsatz realistischen Verdünnung von 1:2000 nicht zu unspezifischer Proteinanfärbung. Es wurde mit der gereinigten PK-S immunisiert.

Das ausgewählte Kaninchen wurde immunisiert. Als Antigen wurden 4x 100 µg gereinigte und lyophilisierte PK-S (Abbildung 11) injiziert.

Um die PK-S durch Immunogoldmarkierung sicher lokalisieren zu können, musste die Spezifität der produzierten Antikörper überprüft werden. Nur wenn die Antikörper eine ausreichende Spezifität für die PK-S aus Säugerspermien besitzen, können mit Hilfe der Fluoreszenz- und Immunogoldmarkierung Aussagen zur Lage der PK-S sowie zum Vorliegen verschiedener PK-Formen in Säugerspermien gemacht werden. Zur Prüfung der Spezifität wurden die gleichen Proteinproben verwendet, wie bei der Untersuchung der Präimmunseren. Das Immunoblotting wurde mit unterschiedlichen Verdünnungen der verschiedenen Testseren sowie des Endserums durchgeführt.

Erste Versuche mit dem Antiserum vom Tag 53 zeigten, dass die Immunfärbung der Western-Blots bei den Bahnen mit Spermienproteinen zu einer starken Hintergrundfärbung führte. Im Bereich der PK-S-Hauptbande war die Färbung im Blot jedoch nur sehr schwach bzw. gar nicht zu erkennen, obwohl dieses Protein den Hauptteil der zur Immunisierung verwendeten Proteinprobe darstellte. Auch bei einigen Nebenbanden war dieses „Negativ“-Phänomen zu erkennen. Variationen der Antiserumverdünnung führten zu unterschiedlichen Farbtintensitäten, nicht jedoch zu einer Veränderung des „Negativ“-Phänomens (Abbildung 16).

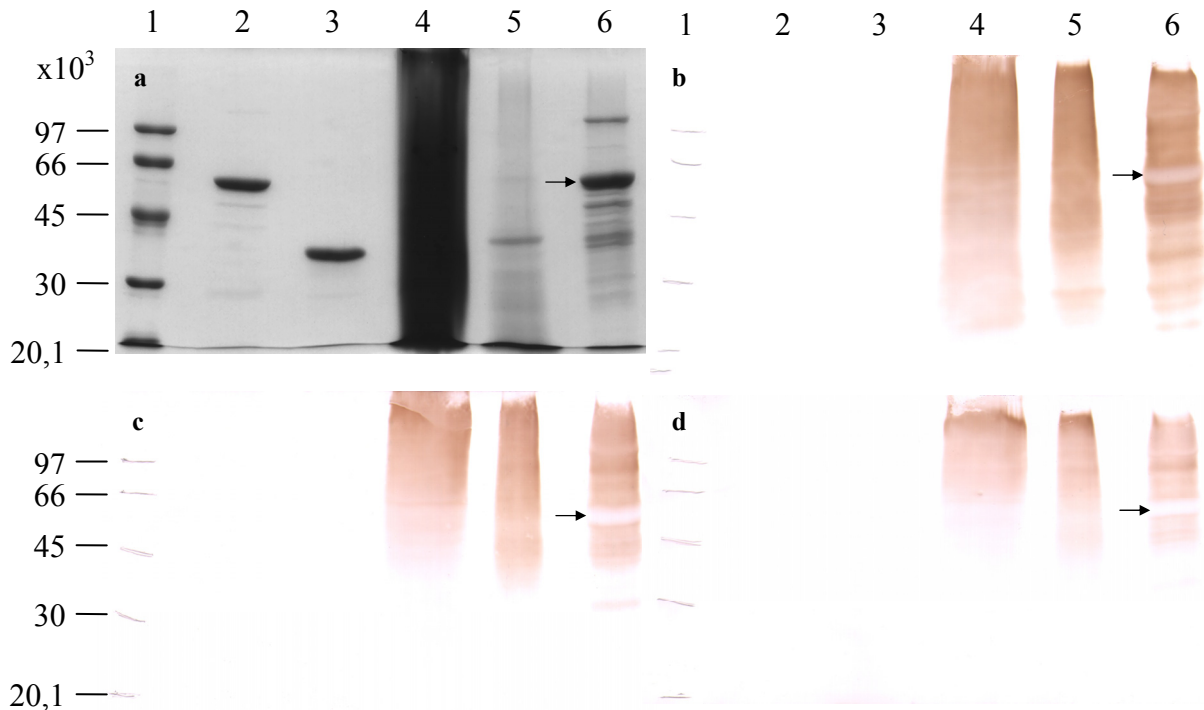


Abbildung 16: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturgebundenen Proteinen aus Eberspermien. „Negativ“-Phänomen bei der Prüfung der Spezifität des Antiserums vom Tag 53 gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien

a: SDS-Gel mit Proteinanfärbung; **b, c und d:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung des Antiserums vom Tag 53 in drei Verdünnungen

b: Verdünnung 1:6000; **c:** Verdünnung 1:20000; **d:** Verdünnung 1:60000

Bahn 1: 4 μ l LMW-Standard; **Bahn 2:** 4 μ g Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 4 μ g Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 250 μ g Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung Ü1T (strukturgebundene, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 40 μ g Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 15 μ g Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnungen des Antiserums und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug jeweils 1 min.

Das Antiserum führt bei den Bahnen mit Spermienproteinen zu einer starken Hintergrundfärbung. Im Bereich der Hauptbande der Spermien-PK-S (s. Pfeile) ist die Färbung im Blot jedoch nur sehr schwach bzw. gar nicht zu erkennen. Auch bei einigen Nebenbanden ist dieses „Negativ“-Phänomen zu erkennen.

Nachfolgende Versuche zeigten, dass der Grund für dieses Phänomen eine zu hohe Menge an eingesetztem Protein war. Es wurde für die drei Spermienprotein-Proben jeweils die maximal aufzutragende Proteinmenge bestimmt, bei welcher die Antikörper an ihr Antigen binden. Abbildung 17 zeigt diese Mengenermittlung am Beispiel eines Gemisches aus Spermien-PK-S und -GAPDH-S. Man sieht hier deutlich den Übergang von dem genannten „Negativ“-Phänomen zu „positiven“ Banden ab einer Proteinauftragsmenge von ≤ 2 μ g pro Bahn.

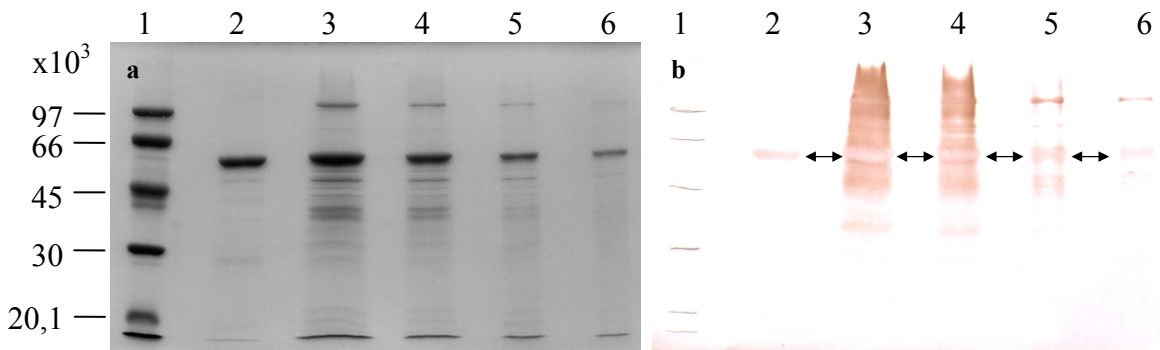


Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-Anreicherung über Fractogel EMD SO_3^- (S). Ermittlung der optimalen Proteinmenge zur Bindung der Antikörper an ihr Antigen

a: SDS-Gel mit Proteinfärbung; **b:** Western-Blot mit Antikörperfärbung unter Verwendung des Antiserums gegen die gereinigte PK-S vom Tag 74

Bahn 1: 4 μl LMW-Standard; **Bahn 2:** 2 μg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3-6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-S-Anreicherung über Fractogel EMD SO_3^- (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S); **Bahn 3:** 8 μg Protein; **Bahn 4:** 4 μg Protein; **Bahn 5:** 2 μg Protein; **Bahn 6:** 1 μg Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz von 1:25000 verdünntem Antiserum und von 1:25000 verdünnten Sekundärantikörpern (Anti-Kaninchen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug 7 min. Der Übergang vom genannten „Negativ“-Phänomen zu „positiven“ Banden bei einer Proteinauftragsmenge von 2 μg ist deutlich zu erkennen (s. Pfeile).

Nachdem die optimalen Proteinmengen ermittelt waren, wurde die Probenherstellung bzw. -behandlung sowie das Immunoblotting variiert, um methodisch bedingte Effekte aufzudecken. Im Vergleich zum bisher verwendeten Probenpuffer und zur BSA-Blocklösung wurde der reduzierende Proteinauftragspuffer Roti-Load 1 sowie die Blocklösung Roti-Block von der Carl Roth GmbH getestet. Das Resultat waren eine deutlich geringere Bandenzahl im Gel beim Einsatz gleicher Proteinproben (Abbildung 18) sowie eine geringere Hintergrundfärbung beim Immunoblotting. Im Gegensatz zum zuvor verwandten Probenpuffer, wurde durch Roti-Load 1 ein(e) Abbau/Fragmentierung der Proteine während des Erhitzens unterbunden. Laut Produktbeschreibung hält das Phosphat-Puffersystem von Roti-Load 1 den pH der Probe über einen weiten Temperaturbereich konstant und stabilisiert somit die empfindlichen Aspartyl-Prolyl-Peptidbindungen. Veränderungen der Hitzedenaturierung der Proteine bezüglich Temperatur (70°C, 95°C) und Dauer (3 min, 6 min, 12 min) hatten keinen Einfluss auf das Bandenmuster. Auch die Fällung von Spermienextraktproteinen durch Trichloressigsäure und Natriumdesoxycholat veränderte das Bandenmuster nicht. Zum Stoppen der Proteolyse durch Trypsin wurde PMSF mit Trypsin Inhibitor aus Sojabohnen verglichen. Auch hier zeigte sich im Bandenmuster der Spermienproteine im SDS-Gel kein Unterschied.

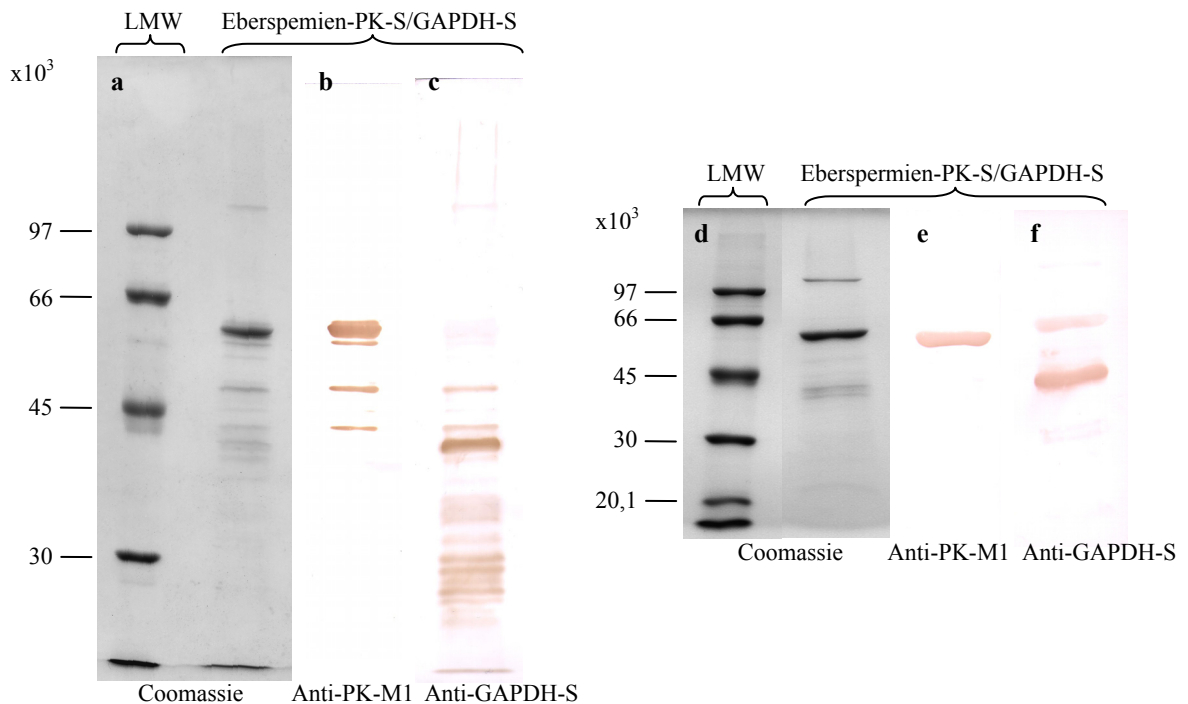


Abbildung 18: Bandenmuster einer elektrophoretisch aufgetrennten Proteinprobe in SDS-Gel und Immunoblot nach Einsatz von SDS-Probenpuffer nach LÄMMLI (1970; a-c) im Vergleich zu Roti-Load 1 (d-f)

a und d: SDS-Gele mit Proteinfärbung durch Coomassie; **b, c, e und f:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1; **b und e**), Verdünnung 1:10000 (**b**) oder 1:12500 (**e**) bzw. Antiserum gegen die GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S), Verdünnung 1:10000 (**c und f**)

Auf der ersten Bahn in **a** wurden 6 μ l, in **d** 3,5 μ l LMW-Standard aufgetragen. Auf allen anderen Bahnen wurde eine Probe aufgetragen, die nach Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie Eberspermien-PK-S und -GAPDH-S enthielt (in **a, b und c** je 10 μ g Protein, in **d, e und f** je 3 μ g Protein). Bei **a-c** wurde die SDS-PAGE in einem großen Gel durchgeführt, bei **d-f** in einem SDS-Minigel. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnungen der Primärantikörper und von 1:10000 verdünnten Sekundärantikörpern (**b und e**: Anti-Ziegen-IgG, **c und f**: Anti-Kaninchen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei **b und c** jeweils 1-2 min, bei **e und f** jeweils 5 min.

Vergleicht man das mit Roti-Load 1 erhaltene SDS-Gel und die Western-Blots mit vorangehenden Gelen, bei welchen SDS-Probenpuffer nach LÄMMLI verwendet wurde, so sieht man eine deutlich geringere Anzahl an Proteinbanden unter Verwendung von Roti-Load 1. Trotz der mehr als 3fachen Auftragemenge in Gel **a** ist die PK-Hauptbande in beiden Gelen (**a und d**) etwa gleich stark. Der verwendete SDS-Probenpuffer nach LÄMMLI führte aus unbekanntem Grund zu einer Fragmentierung der Proteine, weshalb im Folgenden nur noch Roti-Load 1 verwendet wurde.

Unter den optimierten Bedingungen wurden nun geeignete Mengen der Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH sowie von löslichen und strukturgebundenen Eberspermienproteinen SDS-gelelektrophoretisch getrennt (Abbildung 19a). Für den Immunoblot wurde das Endserum (Tag 88) benutzt. Abbildung 19b zeigt eine Anfärbung der mit Trypsin abgelösten PK-S, welche in Relation zur aufgetragenen Proteinmenge jedoch nur als schwach bis mittelstark zu bewerten ist. Außerdem wurde sowohl aus dem Überstand 1 als auch dem Überstand nach Trypsinbehandlung jeweils ein weiteres unbekanntes Protein (M_r

zwischen 139 und 146×10^3 bzw. zwischen 131 und 144×10^3) deutlich markiert. Ein Protein bei $98,4 \times 10^3$ wurde in den vereinigten Fraktionen nach chromatographischer PK-S-Anreicherung schwach angefärbt. Die PK-M1 aus Kaninchenmuskel wurde schwächer und langsamer angefärbt als die PK-S. Da es sich hier um ein Antiserum handelt und sich die Aminosäuresequenzen der beiden Pyruvatkinasen unterschiedlicher Herkunft wahrscheinlich sehr ähneln, war die Anfärbung der PK-M1 zu erwarten.

Das Immunoblotting wurde zum Vergleich auch mit dem gleichermaßen verdünnten Präimmunserum (Abbildung 19c) sowie mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1; Abbildung 19d) durchgeführt. Während das Präimmunserum keine Proteine markierte, band Anti-PK-M1 nur an die Kaninchenmuskel-PK ($61,6 \times 10^3$) und an die PK-S ($64,8 \times 10^3$). Zudem wurde die lösliche PK aus Eberspermien aufgrund einer sehr geringen Auftragemenge nur sehr schwach markiert.

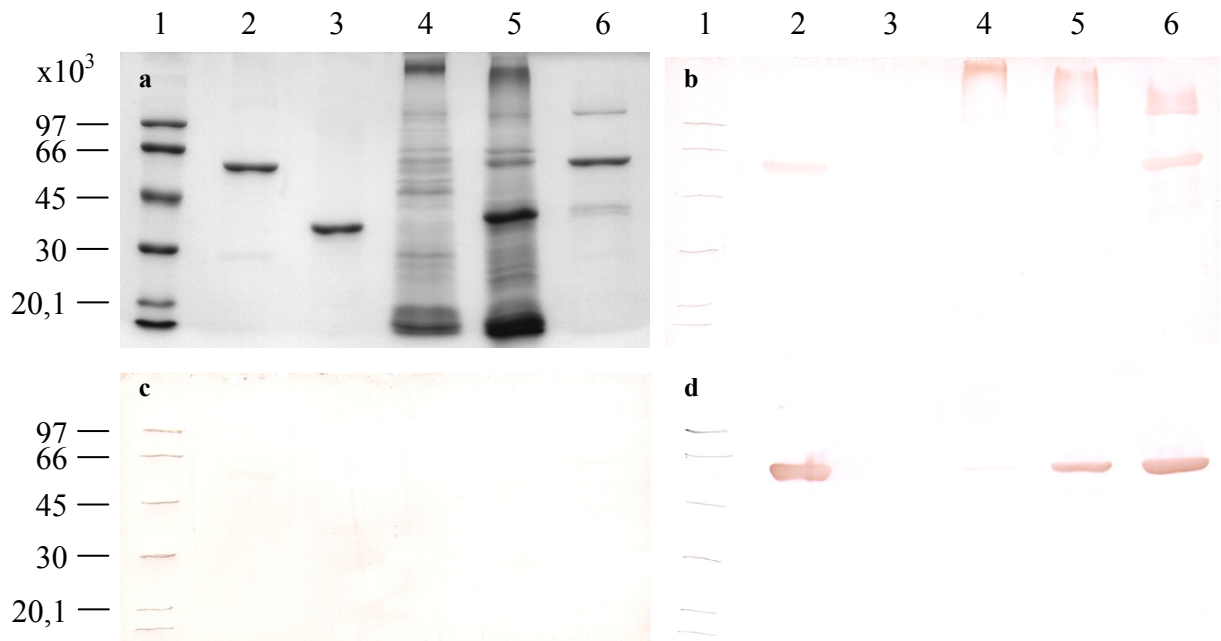


Abbildung 19: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturegebundenen Proteinen aus Eberspermien. Prüfung der Antikörperspezifität des Antiserums gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S sowie der von Antikörpern gegen die PK aus Kaninchenmuskel (Anti-PK-M1)

a: SDS-Gel mit Proteinanfärbung; **b, c** und **d:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung von **b:** Antiserum vom Tag 88 gegen die PK-S aus Eberspermien, Verdünnung 1:19000; **c:** Präimmunsereum zu **b**, Verdünnung 1:19000 bzw. **d:** Anti-PK-M1, Verdünnung 1:12500

Bahn 1: 3,5 µl LMW-Standard; **Bahn 2:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 12 µg Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung Ü1T (strukturegebundene, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 4,8 µg Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-S-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 2,4 µg Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnungen der Antiseren bzw. der Antikörper und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (b und c: Anti-Kaninchen-IgG, d: Anti-Ziegen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei (b) und (c) jeweils 5,5 min und bei (d) 3 min.

Mit dem Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien wurde diese im Verhältnis zur Auftragemenge schwach bis mittelstark markiert, zudem aber auch andere Spermienproteine sowie schwach die Kaninchenmuskel-PK. Das Präimmunsereum führte hingegen zu keiner Markierung. Anti-PK-M1 band nur an PK. Die Kaninchenmuskel-PK sowie die PK-S aus Eberspermien wurden deutlich markiert. Die Markierung der löslichen PK aus Eberspermien ist nur sehr schwach, was auf die geringe Auftragemenge zurückgeführt werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Antiserum, welches gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien produziert wurde, noch nicht ausreichend spezifisch war, um eindeutige Ergebnisse zur Lokalisierung der PK-S zu liefern. Durch Variation der Antiserumverdünnung und der -inkubationszeit können die unspezifischen Proteinbindungen zwar vermindert werden, aufgrund der verbleibenden unspezifischen Proteinbindung bleibt aber eine gewisse Unsicherheit bei der PK-Identifikation bestehen. Aus diesem Grund wurden zu einem späteren Zeitpunkt spezifische Antikörper gegen die PK-S aus dem Antiserum gereinigt (Abschnitt 3.6.4).

3.6.2 Synthese eines Peptids mit PK-S spezifischer Sequenz

Die Teilsequenzanalyse der PK-S aus Eberspermien ergab, dass dieses Enzym einen ungewöhnlichen N-terminalen Bereich (Position 65-69, Abbildung 13) besitzt, welcher bislang an nativen Pyruvatkinasen nicht gefunden wurde. Auch die in Aminosäuren übersetzten Nukleotidsequenzen für PK-M deuten darauf hin, dass die Translation meist erst nach dieser N-terminalen Verlängerung der PK-S beginnt. Der angrenzende Sequenzabschnitt (Position 70-76, Abbildung 13) der PK-S stimmt nur zum Teil mit dem N-Terminus der M-Isoformen der PK überein. Sollte diese Aminosäuresequenz der PK-S im Spermium einzigartig sein, so könnte mit Hilfe eines Antikörpers gegen sie oder einen charakteristischen Teil dieser Sequenz die PK-S spezifisch angesprochen und folglich über Fluoreszenz- und Immunogoldmarkierung in Spermien lokalisiert werden. Aus diesem Grund wurde, nach entsprechenden Voruntersuchungen, ein erfolgversprechendes Peptid aus der PK-S-Teilsequenz synthetisiert. Gegen dieses wurden nachfolgend Antikörper produziert.

Im Vergleich mit Sequenzen diverser Proteine aus Datenbanken (SwissProt und TrEMBL) zeigt der über Teilsequenzierung erhaltene Sequenzabschnitt der PK-S die größte Ähnlichkeit mit PK der M1- und M2-Isoformen. Der C-Terminus des ermittelten Sequenzabschnittes stimmt vollständig mit einem nahe dem N-Terminus gelegenen Sequenzabschnitt der M1- und M2-Isoformen der PK unterschiedlicher Herkunft überein (Teil 3.5 und Abbildung 13). Um die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens späterer Antikörper auf somatische PK zu verringern, fokussierte ich mich im Folgenden auf die 13 N-terminalen Aminosäuren, welche so nur bei der PK-S und ähnlich in zwei weiteren Pyruvatkinasen der Isoform M gefunden wurden. Von diesen wurde zuerst die N-terminale Verlängerung NH₂-TSEAM-COOH mit den Proteinen aus den zuvor genannten Datenbanken verglichen. Da speziell diese, für die PK-S besondere Sequenz zur Unterscheidung der PK-S von somatischer PK genutzt werden könnte, sollte dieser Teil der Sequenz auf jeden Fall mitsynthetisiert werden. Diese kurze Sequenz wurde jedoch in 135 anderen Proteinen gefunden. Daraufhin wurde nach und nach jeweils eine weitere Aminosäure an das Peptid angehängt und für jede Sequenz nach gleichen bzw. ähnlichen Sequenzen in den Proteindatenbanken gesucht. So konnte das Peptid mit der höchsten Spezifität gefunden werden. Es handelte sich hierbei um den ermittelten Sequenzabschnitt aus den 12 N-terminalen Aminosäuren.

Die komplette PK-S-Teilsequenz wurde an die französische Firma CovalAb weitergeleitet. Obwohl die ersten 5 Aminosäuren (TSEAM) für das Vorhaben als nicht ganz ideal befunden wurden, wurde auf Vorschlag von CovalAb die Sequenz aus den 13 N-terminalen Aminosäuren der gereinigten Eberspermien-PK-S synthetisiert. Sie wurde an

das Hämocyanin der Schlüssellochschnecke (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) als Trägerprotein über Cystein C-terminal gekoppelt. Die Sequenz lautete somit: TSEAMPKAHMDAG-C. Das synthetisierte Peptid hatte ein Molekulargewicht von 1448 g/mol und war zu etwa 75% rein.

3.6.3 Produktion und Charakterisierung der Antiseren gegen das synthetisierte Peptid

Vor der Immunisierung wurden die Präimmunsere von 4 Kaninchen, wie zuvor, auf unspezifische Proteindetektion hin untersucht. Alle 4 Präimmunsere wurden 1:2000fach verdünnt eingesetzt und die Immunoblots 15 Minuten mit DAB inkubiert. Im Gegensatz zu zwei Präimmunsere, die deutliche Kreuzreaktionen mit Proteinen aus Eberspermien zeigten (Immunoblots nicht dargestellt), waren die anderen beiden Kaninchen für die Antikörperproduktion geeignet. Zwar zeigten auch deren Präimmunsere bereits unspezifische Reaktionen (Abbildung 21c), die Kaninchen wurden aber auf der Grundlage als geeignet erachtet, dass spezifische Antikörper gegen das synthetisierte Peptid in jedem Fall aus dem Antiserum gereinigt werden sollten.

Die 2 ausgewählten Kaninchen sollten mit dem synthetisierten, Carrier-gekoppelten Peptid gemäß Standardimmunisierungsprotokoll immunisiert werden. Die Antikörperproduktion wurde über ELISA-Titration der Testseren kontrolliert. Aufgrund schlechter Immunantwort wurde vom Standardprotokoll abgewichen. Der Proteincarrier wurde gewechselt und die Immunisierungsdauer verlängert.

Die Ergebnisse der ELISA-Titration der Antiseren vom Tag 53 zeigten, dass die Immunantwort der beiden Kaninchen auf das KLH-gekoppelte Peptid noch äußerst gering war (Abbildung 20). Bei Einsatz der Antiseren im Immunoblotting war kein deutlicher Unterschied in der Verteilung der Proteinmarkierung im Vergleich zu den zugehörigen Präimmunsere zu erkennen.

Aufgrund der über ELISA-Titration der Antiseren gezeigten schlechten Immunantwort, wurde von CovalAb empfohlen, den Proteincarrier für das Peptid zu wechseln. So wurde bei der 4. Antigeninjektion statt KLH-gekoppeltes an Ovalbumin gekoppeltes Peptid verwendet. Dieser Carrierwechsel war erfolgreich. Die Ergebnisse der ELISA-Titration der Antiseren vom Tag 74 zeigten, dass die Immunantwort der beiden Kaninchen auf das synthetisierte, Ovalbumin-gekoppelte Peptid deutlich stärker war, als am Tag 53 (Abbildung 20). Jedoch war die Immunreaktivität des Antiserums immer noch vergleichsweise gering. Das Immunisierungsprotokoll wurde daraufhin verlängert und eine 5. und 6. Injektion des synthetisierten Peptids (d.h. eine 2. und 3. Injektion des an Ovalbumin gekoppelten Peptids)

angeschlossen. Die Ergebnisse der ELISA-Titration der Antiseren von den Tagen 95 und 116 zeigten allerdings einen Abfall des Antikörpertiters gegenüber den Seren vom Tag 74. Aus diesem Grund wurden die Antiseren vom Tag 74 eingesetzt, um hieraus Antikörper gegen das synthetisierte Peptid zu reinigen. Die Reinigung an dem an Sepharose gekoppelten PK-S-spezifischen Peptid wurde von CovalAb durchgeführt. Der Titer der immungereinigten Antikörper war mit 63 ng/ml gering. Beim Einsatz der immungereinigten Antikörper im Immunoblotting zeigte sich, abgesehen von der schnelleren Anfärbung der Proteine, kein überzeugender Unterschied der Antikörperfärbung im Vergleich zum Antiserum vom Tag 74 und zum Präimmunserum (Abbildung 21). Mit den Antiseren und Antikörpern zeigte sich neben der deutlichen Färbung der PK-S ($64,8 \times 10^3$) und der Färbung der Kaninchenmuskel-PK ($61,6 \times 10^3$), auch eine Markierung der GAPDH-S ($42,6 \times 10^3$) und der Kaninchenmuskel-GAPDH ($38,1 \times 10^3$). Zudem wurden noch 2 weitere strukturgebundene Spermienproteine ($65,3 \times 10^3$ und $71,5 \times 10^3$) im Überstand nach Trypsinbehandlung sowie ein weiteres in den vereinigten Fraktionen ($98,4 \times 10^3$) markiert. Beim Einsatz der Antiseren wurde keines der löslichen Spermienproteine angefärbt.

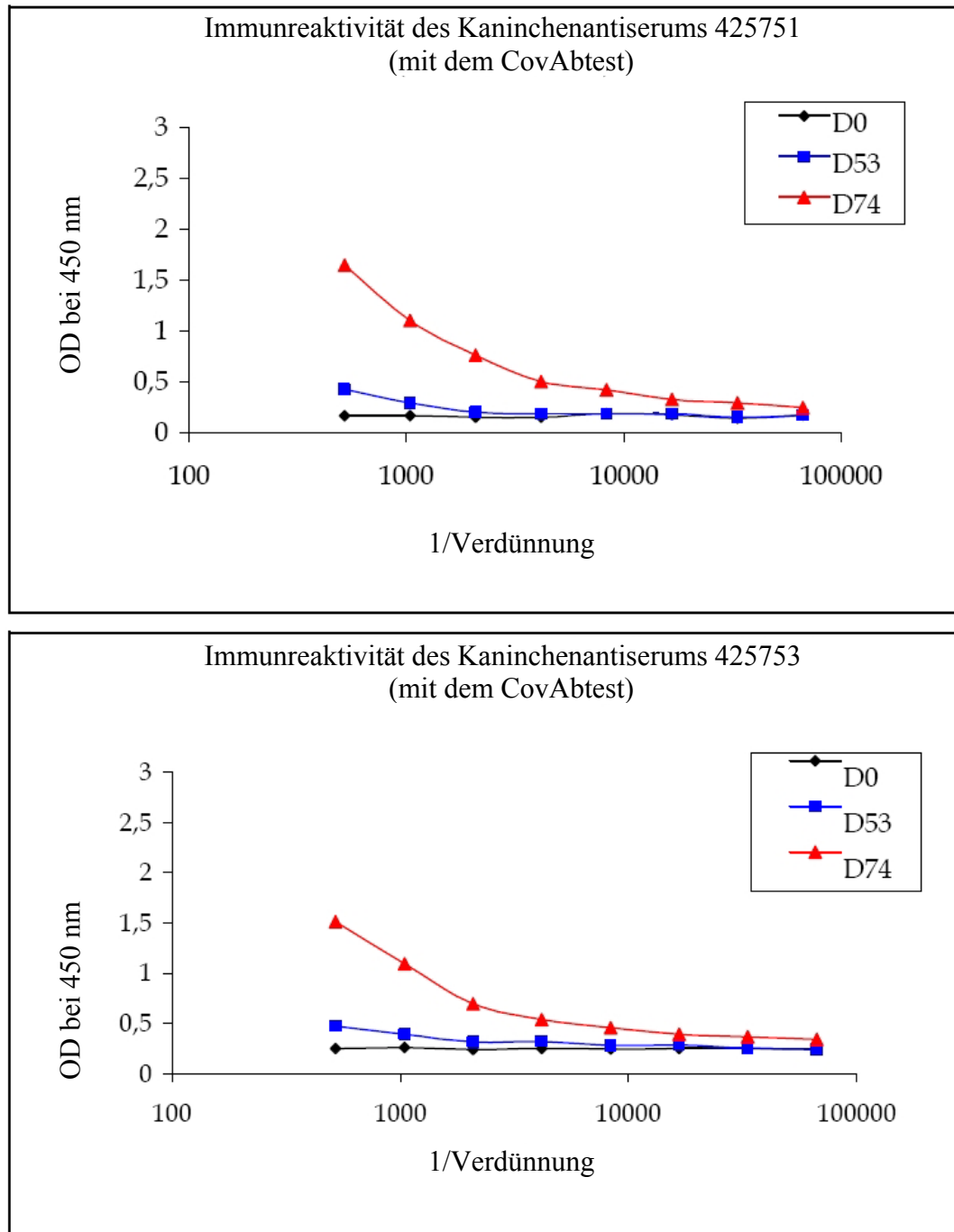


Abbildung 20: Immunreaktivität der Kaninchenantisera gegen das synthetisierte Peptid mit PK-S-spezifischer Sequenz vom Tag 53 und 74 der Immunisierung. Ergebnisse der ELISA-Titration durch die Firma CovalAb

Die ELISA-Titration wurde mit dem CovAbtest von der Firma CovalAb durchgeführt. Hierbei wurde das Peptid kovalent an 96well-Mikrotiterplatten gebunden. Es wurden jeweils 8 Verdünnungen der Seren von den Tagen 0, 53 und 74 (1/500 bis 1/64000) eingesetzt.

CovalAb bestimmt den Antikörpertiter willkürlich über die höchste Verdünnung des Serums, welche bei einer photometrischen Messung bei 450 nm zu einer Extinktion von 1 führt. Der Titer entspricht dann der Umkehrung der Verdünnung. Einen Titer von <500 bewertet CovalAb als keine Immunreaktivität. Bei den zwei mit dem synthetisierten, an KLH-gekoppelten Peptid immunisierten Kaninchen hat bis zum Tag 53 entsprechend noch keine Immunreaktion stattgefunden. Nach dem Wechsel zu Ovalbumin als Carrierprotein sieht man eine Steigerung des Antikörpertiters bei beiden Kaninchen. CovalAb spricht hier von einer geringen Immunreaktivität.

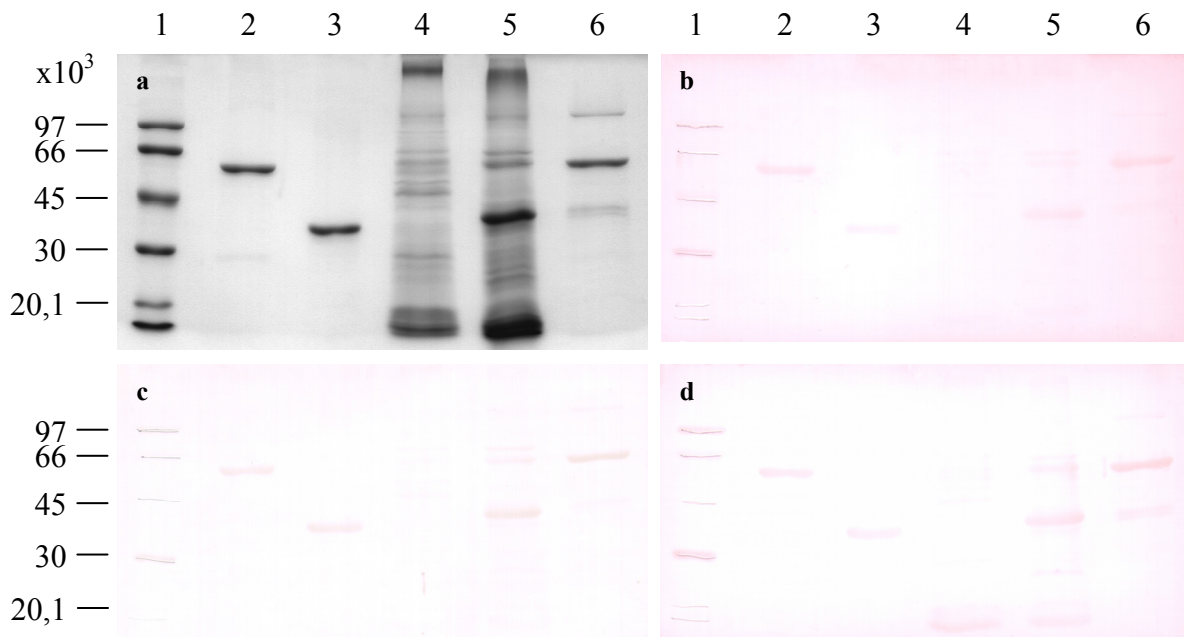


Abbildung 21: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturgebundenen Proteinen aus Eberspermien. Prüfung der Antikörperspezifität des Antiserums sowie der immungereinigten Antikörper gegen die synthetisierte Teilsequenz der Eberspermien-PK-S

a: SDS-Gel mit Proteinfärbung; **b, c und d:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung von **b:** Antiserum vom Tag 74 gegen das synthetisierte Peptid, Verdünnung 1:10000; **c:** Präimmenserum zu **b**, Verdünnung 1:10000 bzw. **d:** von CovalAb immungereinigten Antikörpern gegen das synthetisierte Peptid, Verdünnung 1:1000

Bahn 1: 3,5 µl LMW-Standard; **Bahn 2:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 12 µg Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung ÜnT (strukturgebundene, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 4,8 µg Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-S-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 2,4 µg Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnungen der Antiseren bzw. der Antikörper und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei (b) 10 min, bei (c) 3 min und bei (d) 6 min.

Weder unter Einsatz des Antiserums, noch der immungereinigten Antikörper wurde ein spezifisches und alleiniges Ansprechen der PK-S aus Eberspermien beobachtet. Sie wurde zwar deutlich angefärbt, jedoch zusätzlich auch die Eberspermien-GAPDH-S sowie Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH.

Über die Produktion von Antikörpern gegen das synthetisierte Peptid und nach deren Immunreinigung wurden keine spezifischen Antikörper gegen die PK-S aus Eberspermien erhalten. Aus diesem Grund wurde versucht, die mit dem synthetisierten Peptid beladene Immunoaffinitätssäule für die Reinigung spezifischer Antikörper gegen die PK-S aus dem Antiserum gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S zu nutzen.

3.6.4 Immunoaffinitätsreinigung von Antikörpern gegen PK-S aus dem Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien

Es wurde im Folgenden versucht, Antikörper, die gegen das synthetisierte PK-S-Peptid gerichtet sind, aus dem Antiserum gegen die tryptisch von Strukturen gelöste und gereinigte PK-S aus Eberspermien zu isolieren. Hierzu wurde die Sepharose verwendet, an welche das synthetisierte Peptid gekoppelt war.

Das Antiserum vom Tag 88 gegen die gereinigte PK-S wurde mit der Peptid-Sepharose inkubiert (Teil 2.14). Nach dem Auswaschen nichtgebundener Bestandteile wurden die gebundenen Antikörper mit einem Glycin-Stufengradient eluiert. Die Antikörper in den erhaltenen Fraktionen wurden im Immunoblot auf ihre spezifische Erkennung der PK-S getestet. Wie zuvor wurden, neben Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH, lösliche und strukturgebundene Eberspermienproteine (Überstand 1, Überstand nach Trypsinbehandlung und vereinigte PK-S- und GAPDH-S-enthaltende Fraktionen nach chromatographischer PK-S-Anreicherung) SDS-gelelektrophoretisch getrennt. Die mit 50% (v/v) Glycerin stabilisierten Antikörper wurden jeweils in einer 1:250-Verdünnung (d.h. 1:500-Verdünnung der Antikörperlösung vor Glycerinzugabe) eingesetzt. Eine Fraktion [bei 30% (v/v) Glycin (0,1 M; pH 2) in PBS eluiert] enthielt Antikörper, welche im Immunoblot zur deutlichen Anfärbung der PK-S im Überstand nach Trypsinbehandlung sowie in den vereinigten Fraktionen angereicherter PK-S führte (Abbildung 22). Im Gegensatz hierzu wurden die PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie die GAPDH-S nicht oder nur sehr schwach markiert, auch wenn die Proteinauftragemenge verhältnismäßig hoch war. Bei der GAPDH-S war eine sehr schwache Anfärbung nur bei einer hohen Proteinauftragemenge zu erkennen (Abbildung 22, Bahnen 5 und 6 sowie Abbildung 23, Bahn 4). Lösliche Spermienproteine wurden nicht markiert (Abbildung 22, Bahn 4). Diese immungereinigten Antikörper gegen die Eberspermien-PK-S werden im Folgenden als Anti-PK-S bezeichnet.

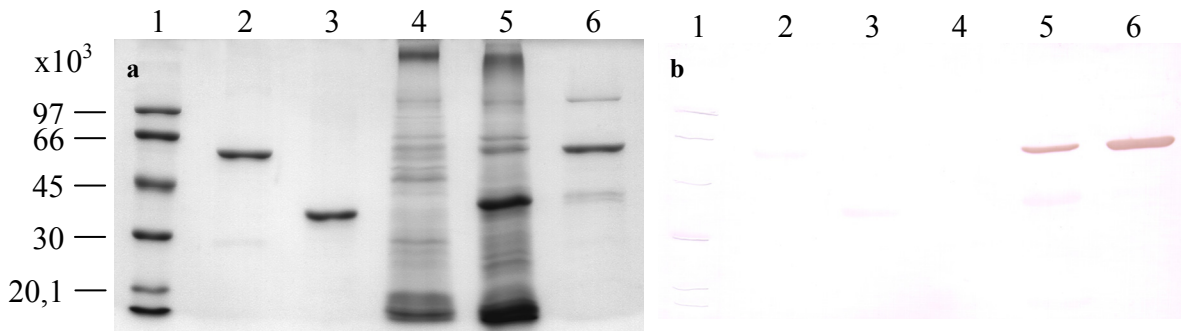


Abbildung 22: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturgebundenen Proteinen aus Eberspermien. Prüfung der Spezifität der immungereinigten Antikörper (Anti-PK-S) gegen das synthetisierte Peptid aus Antiserum gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S

a: SDS-Gel mit Proteinfärbung; **b:** Western-Blot mit Antikörperfärbung unter Verwendung von Anti-PK-S, Verdünnung 1:250

Bahn 1: 3,5 µl LMW-Standard; **Bahn 2:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 12 µg Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung ÜT (strukturgebundene, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 4,8 µg Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-S-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 2,4 µg Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnung der Primärantikörper und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug 3 min.

Die immungereinigten Antikörper führten zur deutlichen Anfärbung der PK-S aus Eberspermien.

Aufgrund der geringen Auftragemenge an löslicher PK aus Eberspermien konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die immungereinigten Antikörper auch diese PK-Form ansprechen. Aus diesem Grund wurde die lösliche PK aus Eberspermien angereichert (Teil 3.3), um sie in gleicher Menge wie die PK-S im Immunoblot einzusetzen. Die Anreicherung der löslichen PK über Ionenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie lieferte ein PK-Präparat mit einer spezifischen Aktivität von 24,2 U/mg Protein. So war es möglich, die gleiche Menge an spezifischer Aktivität (jeweils 0,27 U) pro Bahn im SDS-Gel für die lösliche PK und die PK-S aus Eberspermien einzusetzen (Abbildung 23a). Im SDS-Gel zeigten sich nach Proteinfärbung ähnlich starke Banden von löslicher PK und abgelöster PK-S. Im Immunoblot konnte dann gezeigt werden, dass Anti-PK-S nicht an die lösliche, sondern nur an die von Spermienstrukturen abgelöste PK-S bindet (Abbildung 23b). Hier zeigt sich neben der PK-S-Hauptbande bei $63,6 \times 10^3$ eine markierte Nebenbande mit etwas geringerem Molekulargewicht, wobei es sich vermutlich um ein kürzeres PK-S-Fragment handelt, welches die PK-S-spezifische Sequenz noch beinhaltet. Mit Anti-PK-M1 wurden sowohl die lösliche PK als auch die PK-S aus Eberspermien angefärbt (Abbildung 23c). Neben den PK-Hauptbanden wurden auch hier mehrere Nebenbanden markiert, wobei es sich vermutlich um PK-Fragmente handelt. Das Ergebnis weist insgesamt darauf hin, dass die

lösliche PK die Aminosäuresequenz, gegen welche die Antikörper gerichtet sind, nicht besitzt. Das Vorkommen von zwei PK-Isoformen in Eberspermien ist somit sehr wahrscheinlich.

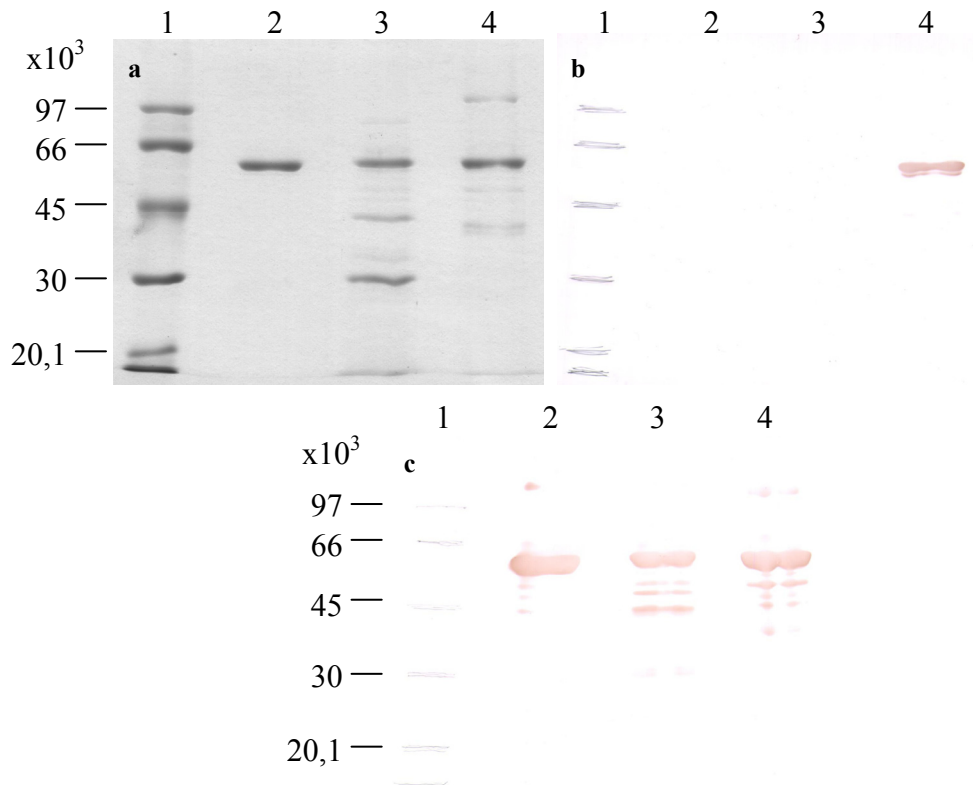


Abbildung 23: Elektrophoretische Auftrennung von löslicher und strukturegebendener PK aus Eberspermien. Prüfung der Spezifität von Anti-PK-S

a: SDS-Gel mit Proteinanfärbung; **b** und **c:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung **b:** von Anti-PK-S, Verdünnung 1:250 bzw. **c:** von Anti-PK-M1, Verdünnung 1:12500

Bahn 1: 3,5 μl LMW-Standard; **Bahn 2:** 1,6 μg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** Fraktion der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach Anreicherung der löslichen PK über Fractogel EMD SO_3^- (S) (angereicherte lösliche Eberspermien-PK), 11,3 μg Protein (entspricht 0,27 U); **Bahn 4:** vereinigte Fraktionen der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach Anreicherung der tryptisch von Strukturen gelösten PK-S über Fractogel EMD SO_3^- (S) (angereicherte Eberspermien-PK-S), 2,4 μg Protein (entspricht 0,27 U). Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnung der Primärantikörper und von 1:10000 verdünnten sekundären Antikörpern (b: Anti-Kaninchen-IgG bzw. c: Anti-Ziegen-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei (b) 3 min und bei (c) 2 min.

Während die PK-S aus Eberspermien (Hauptbande bei $63,6 \times 10^3$) durch Anti-PK-S deutlich markiert wurde, zeigten die lösliche PK (Hauptbande bei $63,4 \times 10^3$) aus Eberspermien sowie die Kaninchenmuskel-PK ($62,3 \times 10^3$) keine Färbung durch DAB. Alle drei Pyruvatkinasen wurden von Anti-PK-M1 erkannt.

Die immungereinigten Antikörper aus dem Antiserum gegen die gereinigte PK-S waren ausreichend spezifisch und wurden nun genutzt, um die PK-S in Eberspermien zu lokalisieren.

3.7 Prüfung der Spezifität von Antikörpern gegen GAPDH und Acrosin

Analog zur Lokalisierung der PK wurden auch Antikörper gegen die GAPDH eingesetzt, um dieses Enzym zu lokalisieren (Teile 3.8 und 3.9). Zuvor wurde deren Spezifität getestet. Von Dr. D. Westhoff wurde ein Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien bereitgestellt. Daneben wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen Kaninchenmuskel-GAPDH eingesetzt. Wie schon bei den Antikörpern gegen die PK wurde im Immunoblot überprüft, ob das Antiserum bzw. die Antikörper die GAPDH in Eberspermien spezifisch erkennen.

Das Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S zeigte bei einer Verdünnung von 1:10000 deutliche Reaktionen nicht nur mit der GAPDH-S, sondern auch mit der PK aus Eberspermien sowie mit mindestens einem weiteren strukturgebundenen Protein ($29,6 \times 10^3$) sowie 3 löslichen Spermienproteinen ($96,7$, $62,5$ und $55,4 \times 10^3$). Auch die Kaninchenmuskel-GAPDH wurde angefärbt sowie sehr schwach die Kaninchenmuskel-PK (Abbildung 24a und b). Bei der Bewertung dieses Antiserums muss jedoch die Relation zwischen aufgetragener Proteinmenge und Immunfärbung sowie die geringere Verdünnung des Antiserums im Vergleich zum Antiserum gegen die gereinigte PK auf jeden Fall berücksichtigt werden. So wird die verhältnismäßig schwache GAPDH-S-Bande sehr stark durch das Antiserum detektiert (Abbildung 24a und b, Bahn 6), die in größerer Menge vorliegende Kaninchenmuskel-GAPDH hingegen nur schwach. Die PK-S wird im Verhältnis zur aufgetragenen Proteinmenge schwach markiert, die Kaninchenmuskel-PK nur sehr schwach. Neben der GAPDH-S wird mindestens ein weiteres strukturgebundenes Spermien-Protein (GAPDH-Fragment[e]?) sowie ein lösliches Protein ($55,4 \times 10^3$) relativ stark markiert. Wenngleich die Antikörper im Serum eine hohe Affinität zur GAPDH-S haben, kann bei einer Verwendung des Serums nicht ausgeschlossen werden, dass andere Enzyme bei der Proteinlokalisierung detektiert werden.

Die monoklonalen Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH führten zu einer Anfärbung der Kaninchenmuskel-GAPDH sowie der Eberspermien-GAPDH-S. Im Verhältnis zur Auftragemenge wurde die Kaninchenmuskel-GAPDH aber stärker angefärbt als die Hauptbande der GAPDH-S bei $42,6 \times 10^3$. Letzgenannte wurde im Überstand nach Trypsinbehandlung schwach markiert. In den vereinigten Fraktionen nach chromatographischer PK-S-Anreicherung, welche nur 3% GAPDH-S enthielten, ist eine Anfärbung nicht zu ersehen. Dagegen wurde im Überstand nach Trypsinbehandlung eine schwächere Proteinbande bei $38,9 \times 10^3$, vermutlich ein Fragment der GAPDH-S, stark markiert. Die separat aufgetragene Kaninchenmuskel-GAPDH zeigte sich im Blot als Doppelbande. Auch hier handelt es sich wahrscheinlich um GAPDH-Fragmente. Die

Kaninchenmuskel-PK sowie andere Eberspermienproteine als die GAPDH-S wurden mit den Antikörpern nicht angefärbt (Abbildung 24a und c). Die Antikörper binden also spezifisch an GAPDH und können zur Lokalisierung dieser eingesetzt werden.

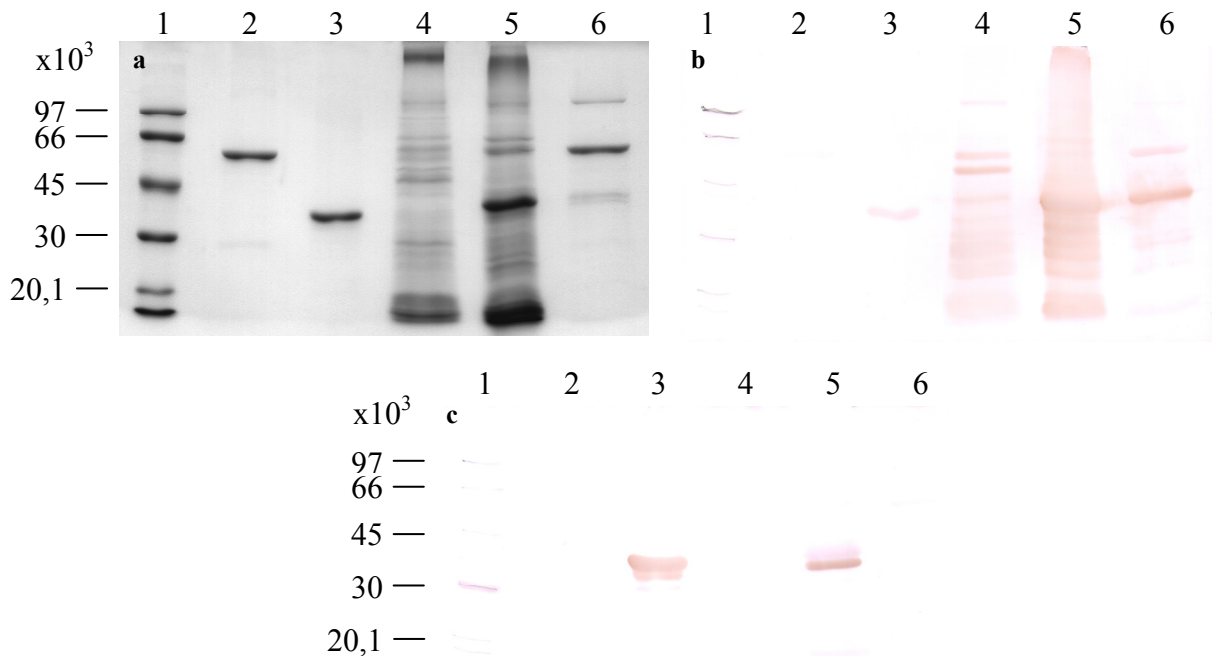


Abbildung 24: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturegebundenen Proteinen aus Eberspermien. Prüfung der Antikörperspezifität des Antiserums gegen die gereinigte Eberspermien-GAPDH-S sowie von Antikörpern gegen somatische GAPDH

a: SDS-Gel mit Proteinanfärbung; **b** und **c:** Western-Blots mit Antikörperfärbung unter Verwendung von **b:** Antiserum gegen die GAPDH-S aus Eberspermien (von Dr. D. Westhoff), Verdünnung 1:10000 und **c:** Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-GAPDH, Verdünnung 1:3200

Bahn 1: 3,5 μ l LMW-Standard; **Bahn 2:** 1,6 μ g Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 1,6 μ g Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 12 μ g Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung Ü1T (strukturegebundene, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 4,8 μ g Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-S-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 2,4 μ g Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnung des Antiserums/der Antikörper und von 1:10000 verdünnten Antikörpern gegen Kaninchen-IgG (**b**) oder 1:7000 verdünnten gegen Maus-IgG (**c**). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei (**b**) 3 min und bei (**c**) 1,75 min.

Bei der gewählten Verdünnung binden die Antikörper des Serums gegen die gereinigte GAPDH-S neben der GAPDH-S (Hauptbande bei 42,6 $\times 10^3$) unspezifisch an mehrere andere Spermienproteine sowie an die Kaninchenmuskel-GAPDH (Hauptbande bei 38,1 $\times 10^3$). Die GAPDH-S wird jedoch in Bahn 6 in Anbetracht der geringen Auftragemenge verhältnismäßig sehr stark markiert. Die monoklonalen Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH binden hingegen nur an die Kaninchenmuskel-GAPDH (Doppelbande) sowie an die GAPDH-S (Doppelbande) im Überstand nach Trypsinbehandlung.

Neben den beiden glykolytischen Enzymen wurde auch Acrosin in Säugerspermien und Eberhodenschnitten lokalisiert (Teile 3.8 und 3.9). Von diesem Protein ist u.a. bekannt, dass es im Laufe der Spermatogenese erst in frühen haploiden Spermatischen als enzymatisch inaktives Zymogen, dem Proacrosin, hergestellt wird (Unterabschnitt 1.2.1.2). Die Detektion

des Acrosins in den Hodenschnitten sollte helfen, die Zonen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden, Spermien) besser einzugrenzen. Weiterhin diene die Detektion des Acrosins in ausgereiften Spermien zur Abgrenzung des Akrosoms im Kopfbereich. Zuvor wurde auch hier die Spezifität der Antikörper im Blot überprüft.

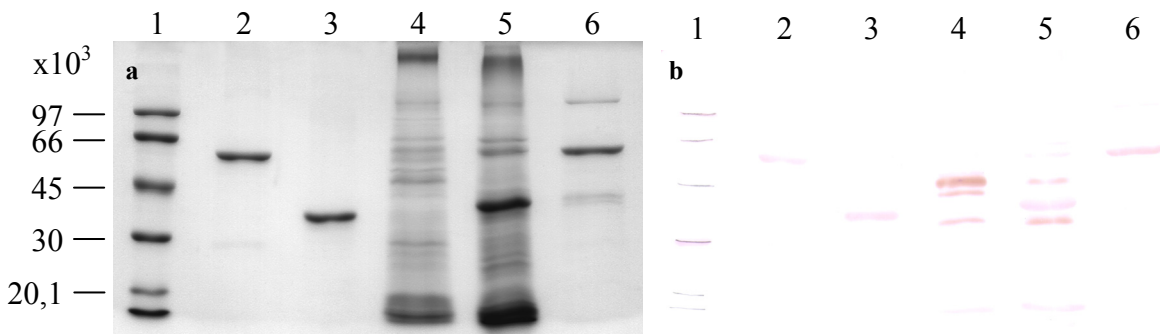


Abbildung 25: Elektrophoretische Auftrennung von PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel sowie von löslichen und strukturebenen Proteinen aus Eberspermien. Prüfung der Spezifität der Antikörper gegen Acrosin aus Eberspermien (Anti-Acrosin)

a: SDS-Gel mit Proteinfärbung; **b:** Western-Blot mit Antikörperfärbung unter Verwendung von Anti-Acrosin, Verdünnung 1:3200

Bahn 1: 3,5 µl LMW-Standard; **Bahn 2:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-PK; **Bahn 3:** 1,6 µg Kaninchenmuskel-GAPDH; **Bahn 4:** Überstand Ü1 (lösliche Eberspermienproteine), 12 µg Protein; **Bahn 5:** Überstand nach Trypsinbehandlung ÜT (strukturebenen, mit Trypsin abgelöste Spermienproteine), 4,8 µg Protein; **Bahn 6:** Fraktionen 99-104 der Fractogel EMD Propyl (S)-Reinigung nach PK-S-Anreicherung über Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (enthält PK-S aus Eberspermien und 3% GAPDH-S), 2,4 µg Protein. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde jeweils durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Markerproteine mit einem weichen Bleistift markiert. Das Immunoblotting erfolgte unter Einsatz der o.g. Verdünnung der Antikörper und von 1:7000 verdünnten Sekundärantikörpern (Anti-Maus-IgG). Die Einwirkzeit des Nachweisreagenzes DAB betrug bei 4 min.

Anti-Acrosin markiert deutlich verschiedene Formen des Proteins bei ca. 50,8, 46 und 36,7 x10³. Bei der gewählten Einwirkzeit des DAB wird aber auch eine unspezifische Bindung an Kaninchenmuskel-PK und -GAPDH sowie an Spermien-PK-S und -GAPDH-S sichtbar. Im Verhältnis zur Proteinauftragmenge ist diese unspezifische Bindung jedoch sehr schwach.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, banden die Antikörper an verschiedene Formen des Acrosins. So zeigten sich unter den löslichen Eberspermienproteinen eine stark markierte Bande bei 50,8 x10³ sowie zwei weitere, etwas schwächer markierte Banden bei 46 und 36,7 x10³. Im Überstand nach Trypsinbehandlung von Spermienfragmenten wurden eine Bande bei 50,8 x10³ schwach sowie eine bei 36,7 x10³ etwas stärker gefärbt. Die Ergebnisse decken sich mit geringer Abweichung mit den Angaben im Datenblatt der Antikörper. Hier wird darauf hingewiesen, dass die Antikörper mit verschiedenen Formen des Eberacrosins (bei 55, 53, 45 und 35 kDa) reagieren. Neben dem Acrosin binden die Antikörper unter den gewählten Bedingungen aber bereits unspezifisch an Kaninchenmuskel- und Spermien-PK und -GAPDH, wobei diese unspezifische Bindung im Verhältnis zur Menge an aufgetragenem Protein sehr schwach ist.

3.8 Lokalisierung von PK und GAPDH sowie Acrosin in Spermien verschiedener Säuger

Mit den vorliegenden Antikörpern wurde versucht, sowohl die glykolytischen Enzyme PK und GAPDH sowie das spermienpezifische Protein Acrosin in Säugerspermien zu lokalisieren. Neben den Antikörpern/-seren gegen die Eberspermien-PK-S und -GAPDH-S wurden auch die Antikörper gegen die somatischen Enzyme eingesetzt. Der Lokalisierung der Enzyme an ejakulierten Eberspermien über Fluoreszenzmarkierung folgte die ultrastrukturelle Lokalisierung über Immunogoldmarkierung mit anschließender elektronenmikroskopischer Betrachtung. Die Goldmarkierung wurde an Ultradünnschnitten von Eberspermien, aber auch von Spermien anderer Säuger (Bulle, Mensch) durchgeführt.

3.8.1 Fluoreszenzmarkierung an ejakulierten Eberspermien

Die Fluoreszenzmarkierung wurde an ausgestrichenen, ejakulierten Eberspermien durchgeführt. Markiert wurde mit den Antikörpern gegen die somatische PK und GAPDH sowie mit den immungereinigten Anti-PK-S. Außerdem wurden die Antiseren gegen die PK-S und GAPDH-S sowie die Antikörper gegen Acrosin eingesetzt.

Zunächst wurde geprüft, welchen Einfluß die Vorbehandlung der ausgestrichenen, getrockneten Spermien auf die Fluoreszenzmarkierung hat. Neben unbehandelten wurden unterschiedlich fixierte und/oder permeabilisierte Spermien eingesetzt. Zur Fixierung der Spermien wurden die organischen Lösungsmittel Methanol und Aceton sowie der Quervernetzer PFA verwendet. Permeabilisiert wurde mit Hilfe von Triton X-100. Auch durch unterschiedliche Kombination von Fixierung und Permeabilisierung sollte eine optimale Zugänglichkeit und Erhaltung der Antigene für die Antikörper sowie bestenfalls die Fixierung aller zu lokalisierenden Proteine in den Spermien erreicht werden. Da von den Antiseren gegen PK-S und GAPDH-S eine ausreichende Menge zur Verfügung stand, wurde die Fluoreszenzmarkierung hiermit an den unterschiedlich vorbehandelten Spermien durchgeführt. Weil es sich um einen Vorversuch handelte, wurden zunächst keine Kontrollen (ohne Primärantikörper) durchgeführt.

Sowohl mit dem Antiserum gegen die PK-S als auch mit dem gegen die GAPDH-S zeigte sich deutlich, dass bei den mit Triton X-100 permeabilisierten Spermien (5 min mit 0,1% Triton X-100 oder 1 min mit 2% PFA + 5 min mit 0,1% Triton X-100) das Hauptstück des Flagellums sowie der Akrosombereich fluoreszierten, wogegen das Mittelstück und der hintere Akrosom-freie Kopfbereich im Verhältnis dazu kaum oder keine Fluoreszenz zeigten. Bei allen anderen Vorbehandlungen (4 min mit Aceton oder 6 min mit Methanol + 1 min mit Aceton oder 2 min mit 2% PFA oder 2 min mit 2% PFA + 1 min mit Aceton) sowie den nicht

vorbehandelten Spermien war eine derart deutliche Fluoreszenz im Bereich der Flagellen nicht zu beobachten. Eine deutliche Fluoreszenz des Hauptstücks der Flagellen war bei PFA-fixierten Spermien nur nach Triton-Behandlung zu beobachten. Die Fixierung der Spermien mit Hilfe organischer Lösungsmittel führte zu einer klaren Fluoreszenz im Akrosombereich, wobei der Effekt bei der Methanol-Aceton- gegenüber der Aceton-Fixierung noch verstärkt war. PFA-fixierte Spermien zeigten meist keine überzeugende Markierung des Akrosombereichs, wenn sie nicht mit Aceton (1 min) oder Triton X-100 (5 min) nachbehandelt wurden. Unter Einsatz des Antiserums gegen die GAPDH-S waren im Cytoplasmatropfen deutliche Markierungen in allen verschiedenen vorbehandelten Spermien zu sehen. Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass eine Permeabilisierung von unfixierten oder fixierten Spermien mit Triton X-100 zu einer besseren Zugänglichkeit der Antigene/Epitope besonders im Hauptstück des Flagellums, aber auch im Akrosombereich führt. Eine Detektion im Cytoplasmatropfen scheint eine solche Vorbehandlung nicht zu erfordern.

Die eindeutigsten Fluoreszenzmarkierungen wurden an unfixierten und an mit PFA fixierten (1 min mit 2% PFA) Spermien erhalten, die jeweils vor der Markierung mit Triton X-100 permeabilisiert (5 min mit 0,1% Triton) worden waren. Sie werden im Folgenden (Abbildung 26 bis Abbildung 31) gezeigt. Parallel zu den Markierungen mit den verschiedenen Antikörpern/-seren wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen die Spermien nicht mit den primären Antikörpern inkubiert wurden. Die Kontrollen wurden in allen anderen Bedingungen (Vorbehandlung der Spermien, Behandlung bei der Fluoreszenzmarkierung, Sekundärantikörper sowie Parameter bei der Bildaufnahme und -bearbeitung) gleich behandelt. Die Markierungen sind immer im Vergleich mit der zugehörigen Kontrolle zu beurteilen. Nur so kann eine Fehldeutung von Autofluoreszenz und/oder unspezifischer Fluoreszenzmarkierung durch die Sekundärantikörper ausgeschlossen werden. Um die durch die Primärantikörper hervorgerufene Fluoreszenz zu beurteilen, muss zuvor also immer die Fluoreszenz der Kontrolle abgezogen werden. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität von Bildern verschiedener Primär- und Sekundärantikörper ist nur unter Berücksichtigung aller genannten experimentellen Bedingungen wie auch Bildaufnahme-/bearbeitungsparameter (Belichtungszeit, Kontrastverstärkung und Tonwertkorrektur) möglich.

Die Fluoreszenzmarkierungen im Akrosombereich fallen nach PFA-Fixierung permeabilisierter Spermien im Vergleich zu unfixierten permeabilisierten Spermien deutlich stärker aus. Diese Vorbehandlung führt aber auch zu einer vergleichsweise stärkeren Fluoreszenz in der Kontrolle bei gleicher Belichtungszeit (nicht gezeigt). Zieht man die Fluoreszenz der zugehörigen Kontrollen von den Markierungen mit den Primärantikörpern ab,

so erhält man Proteinlokalisierungsmuster, die weitgehend unabhängig von der Vorbehandlung der Spermien sind.

Der Einsatz von Antikörpern gegen die Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) führte zu einer Fluoreszenzmarkierung im Bereich des Akrosoms sowie des gesamten Flagellums (Abbildung 26 und Abbildung 27, jeweils a und c). Auch im postakrosomalen Bereich zeigte sich eine geringe Fluoreszenz. Die immungereinigten Anti-PK-S führten hingegen zu einer deutlichen Markierung des Hauptstücks sowie einer etwas geringeren im Akrosombereich (Abbildung 26 und Abbildung 27, jeweils e und g). Zusätzlich wurde der Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück markiert, wogegen das Mittelstück und das Endstück nur äußerst schwach oder gar nicht markiert waren (Endstücke in Abbildung 26e und Abbildung 27e wurden vergrößert betrachtet). Cytoplasmotropfen wurden weder mit Anti-PK-M1 noch mit Anti-PK-S deutlich markiert (nicht abgebildet).

Beim Einsatz der verschiedenen Antikörper gegen die GAPDH zeigten sich ähnliche Fluoreszenzbilder wie für die PK, mit Ausnahme des Cytoplasmatropfens. Die Antikörper gegen die somatische GAPDH führten bei den unfixierten Spermien zu einer Markierung im Bereich des Akrosoms sowie einer geringeren im postakrosomalen Bereich und des gesamten Flagellums (Abbildung 28a und c). Bei den mit PFA fixierten Spermien dominierte auch nach Abzug der Kontrollfluoreszenz die Markierung im Akrosombereich (Abbildung 29a bis d). Das Antiserum gegen die GAPDH-S (Anti-GAPDH-S) führte ebenfalls zu einer deutlichen Markierung des Akrosombereichs. Im Flagellum waren aber Mittel- und Endstück praktisch nicht markiert, sondern ausschließlich das Hauptstück (Abbildung 28 und Abbildung 29, jeweils e und g). Der Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück zeigte ebenfalls eine schwache Fluoreszenz. Sowohl mit den Antikörpern gegen die somatische GAPDH als auch mit Anti-GAPDH-S wurden die Cytoplasmotropfen deutlich markiert (nicht abgebildet).

Das Anti-Acrosin färbte in unfixierten und PFA-fixierten Spermien, die jeweils mit Triton permeabilisiert wurden, den Akrosombereich an. Während bei den unfixierten Spermien zusätzlich im postakrosomalen Bereich, im Verbindungsstück zwischen Kopf und Flagellum sowie an den Flagellen schwache Markierungen erkennbar sind (Abbildung 30), ist in den PFA-fixierten Spermien nur das Akrosom klar begrenzt markiert (Abbildung 31).

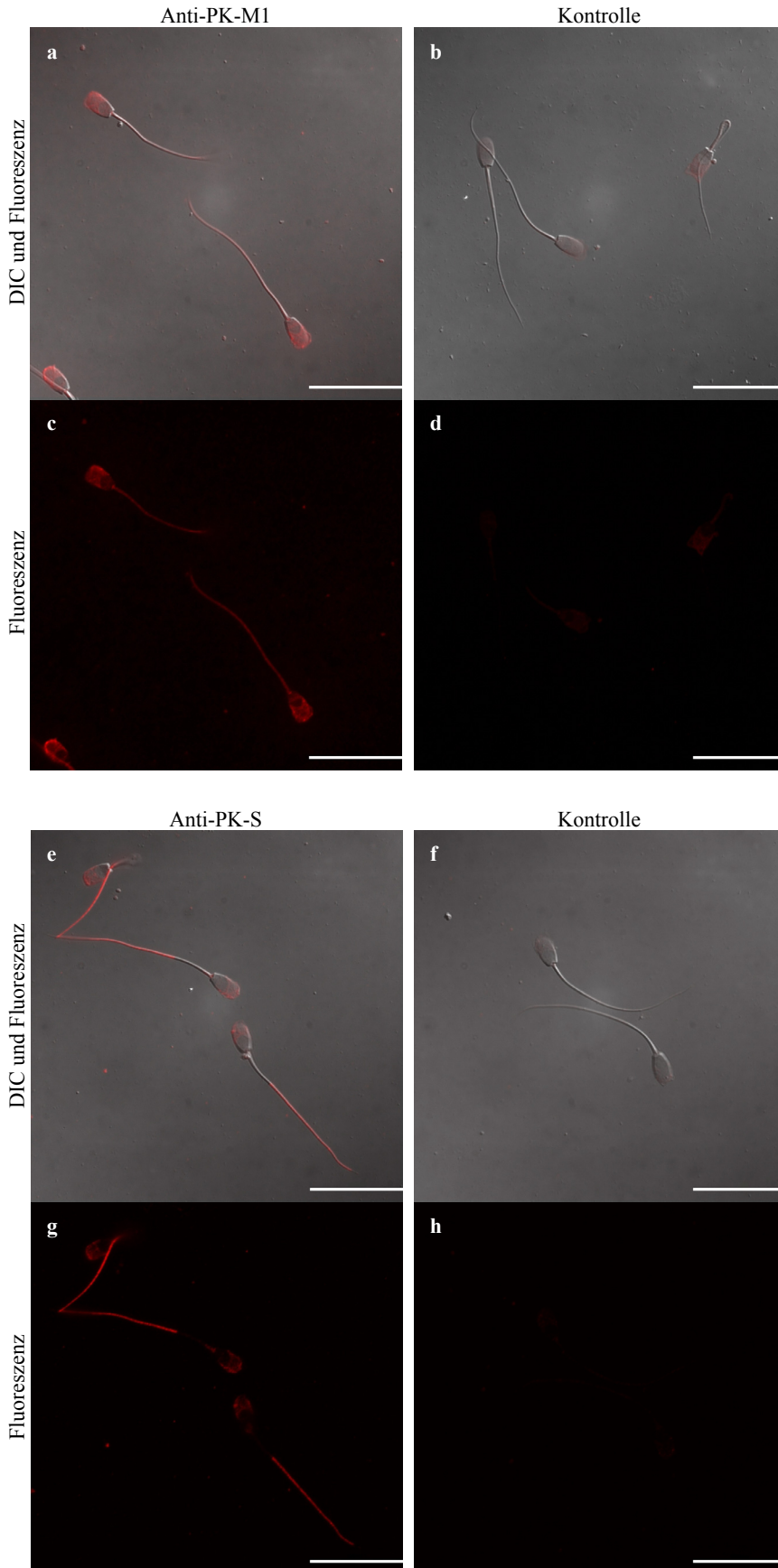


Abbildung 26:
Fluoreszenzmarkierung an ejakulierten Eberspermien nach deren Permeabilisierung mit Triton X-100. Einsatz von Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1; a und c) im Vergleich zu immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S; e und g)

Eberejakulat wurde nach Verdünnung in BTS auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgestrichen. Nach dem Trocknen der Spermien, wurden sie mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). Anschließend wurde die Fluoreszenzmarkierung gemäß Protokoll (Unterabschnitt 2.16.2.7) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils ein übereinander gelagertes Bild aus dem DIC- und dem Fluoreszenzbild (a, b, e und f) sowie das Fluoreszenzbild (c, d, g und h) für die Proteinmarkierung (a, c, e und g) sowie die zugehörige Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper (b, d, f und h).

a-d:
 Für die Markierung (a und c) wurden 1:10000 verdünnte Anti-PK-M1 sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Ziegen-IgG) eingesetzt. Anstelle der Primärantikörper in Blocklösung wurde bei der Kontrolle (b und d) nur Blocklösung eingesetzt.

e-h:
 Für die Markierung (e und g) wurden 1:5 verdünnte Anti-PK-S sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Die Kontrolle ohne Primärantikörper ist in Bild f und h gezeigt.

Maßstab: jeweils 16,5 µm

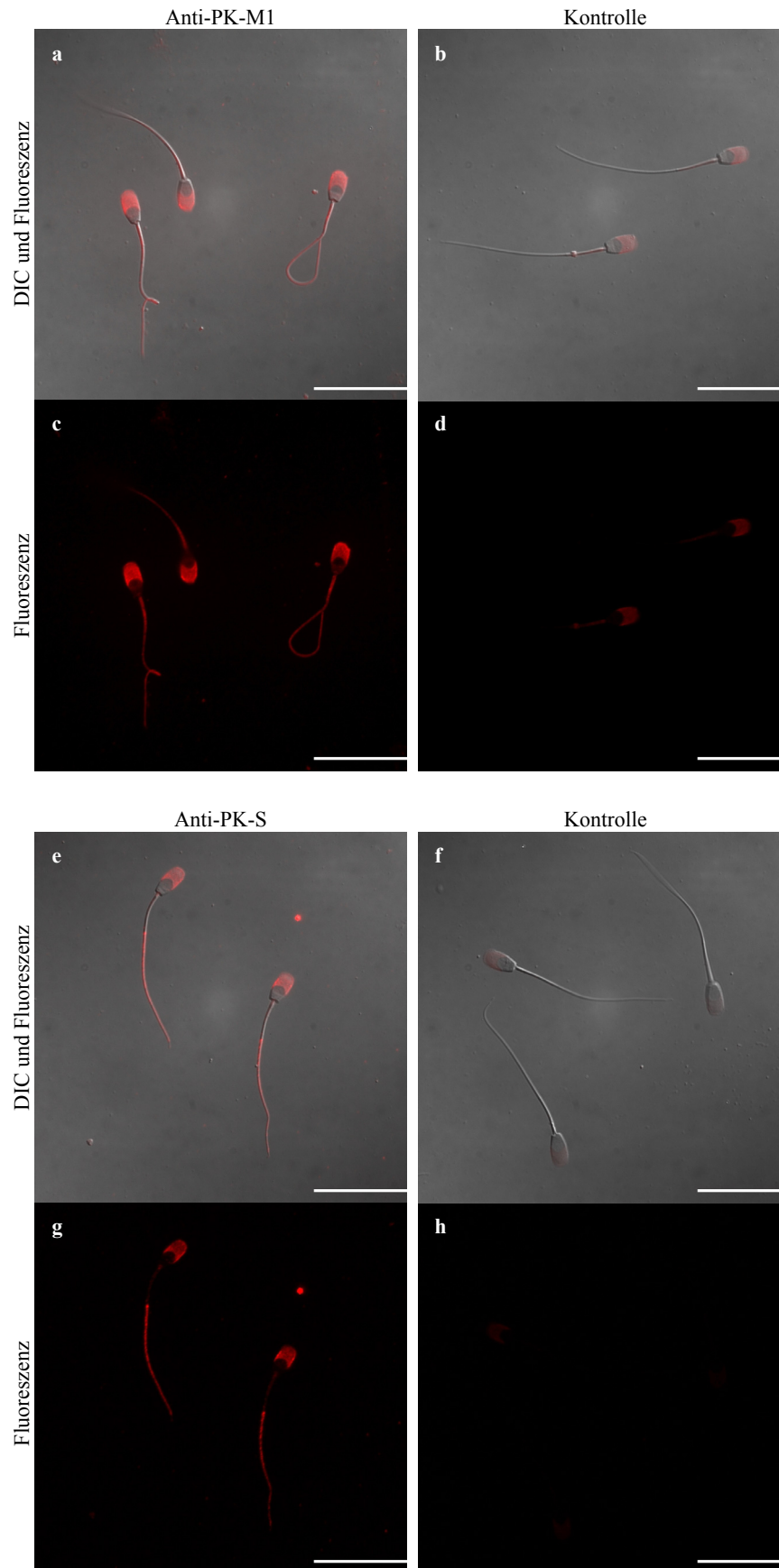


Abbildung 27:
Fluoreszenzmarkierung an ejakulierten Eberspermien nach deren Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100. Einsatz von Anti-PK-M1 (a und c) im Vergleich zu Anti-PK-S (e und g)

Versuchsdurchführung s. Abbildung 26. Die getrockneten Spermien wurden mit 2% PFA fixiert (1 min bei RT) sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). Die Bilder a, b, e und f zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern. In c, d, g und h sind die Fluoreszenzbilder separat gezeigt.

a-d:

Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-M1 ist in den Bildern a und c gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 26a-d), die zugehörige Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper in den Bildern b und d.

e-h:

Die Bilder e und g zeigen die Markierung mit Anti-PK-S (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 26e-h). Die Kontrolle ohne Primärantikörper ist in den Bildern f und h gezeigt.

Maßstab: jeweils 16,5 µm

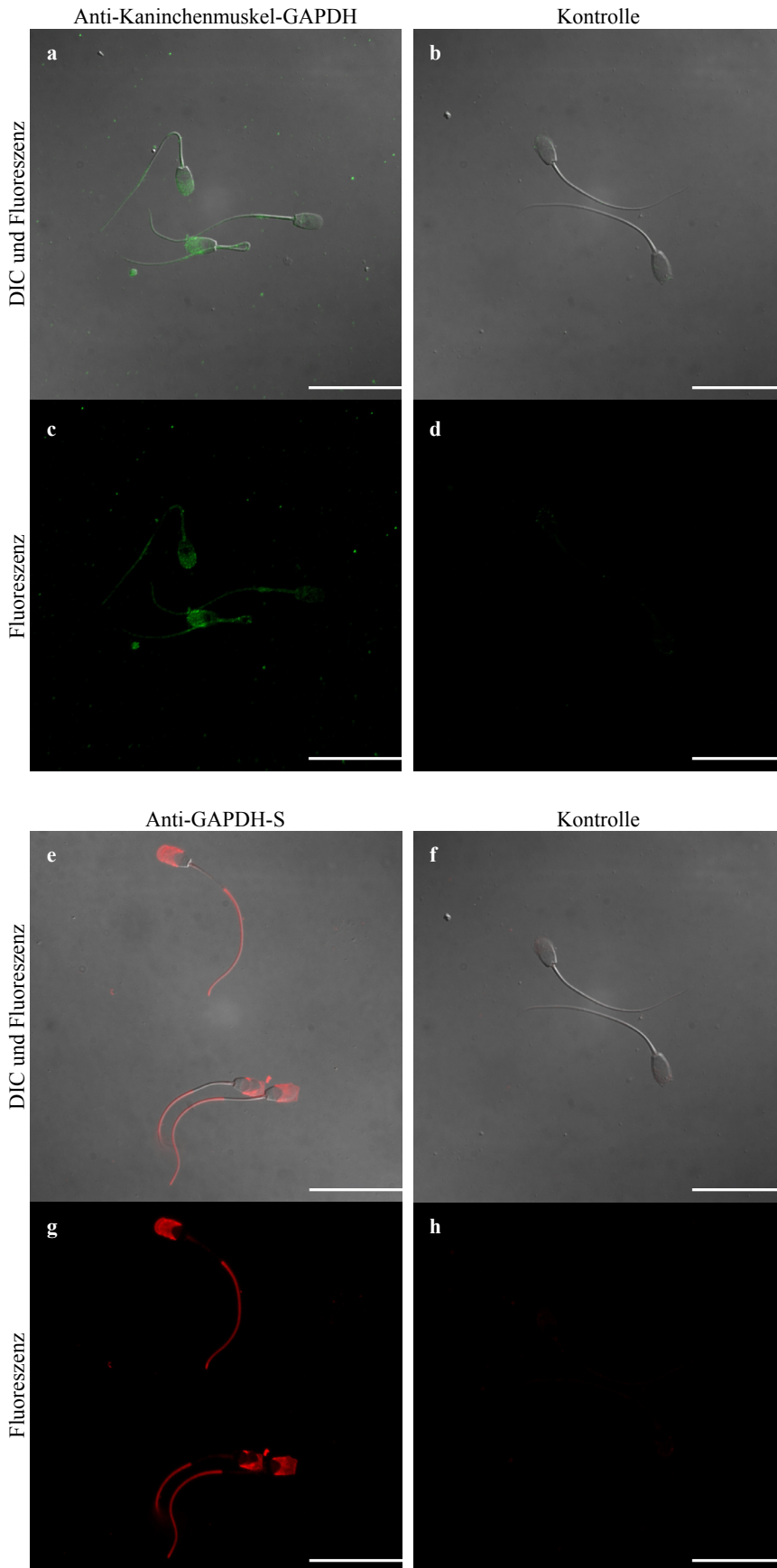


Abbildung 28:
Fluoreszenzmarkierung an ejakulierten Eberspermien nach deren Permeabilisierung mit Triton X-100. Einsatz von Antikörpern gegen somatische GAPDH (Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH; a und c) im Vergleich zu Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S; e und g)

Versuchsdurchführung s. Abbildung 26. Die Bilder a, b, e und f zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern. In c, d, g und h sind die Fluoreszenzbilder separat gezeigt.

a-d:
 Für die Markierung (a und c) wurden 1:100 verdünnte Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgG) eingesetzt. Anstelle der Primärantikörper in Blocklösung wurde bei der Kontrolle (b und d) nur (PBS in) Blocklösung eingesetzt.

e-h:
 Für die Markierung (e und g) wurden 1:3000 verdünntes Antiserum Anti-GAPDH-S sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Die Kontrolle ohne Anti-GAPDH-S ist in Bild f und h gezeigt.

Maßstab: jeweils 16,5 µm

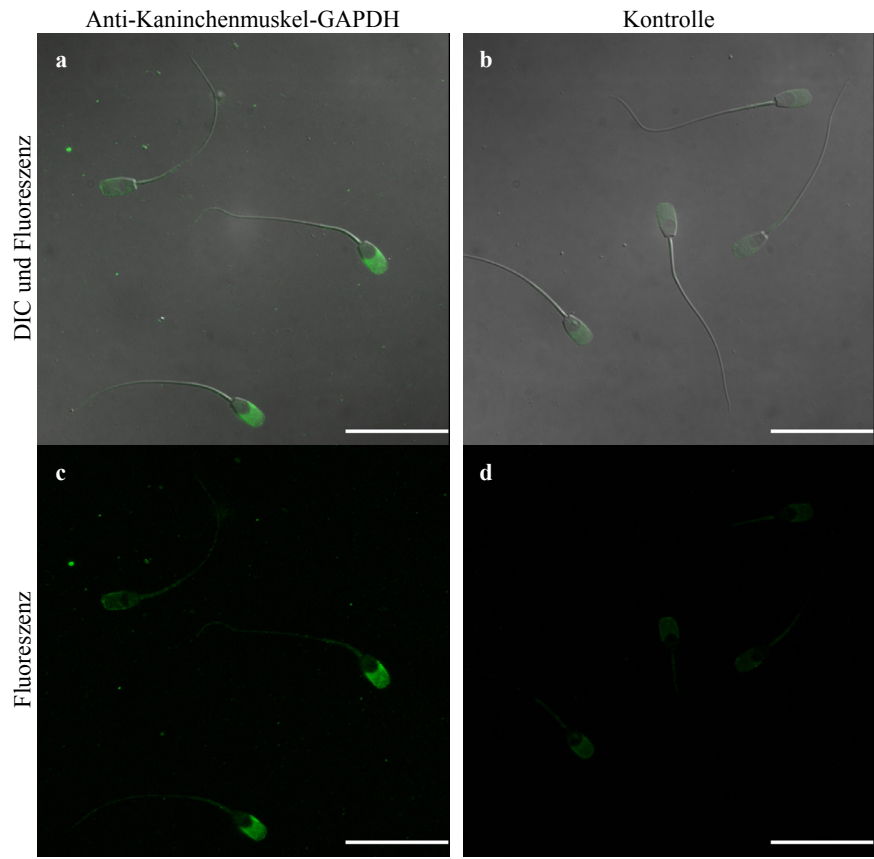
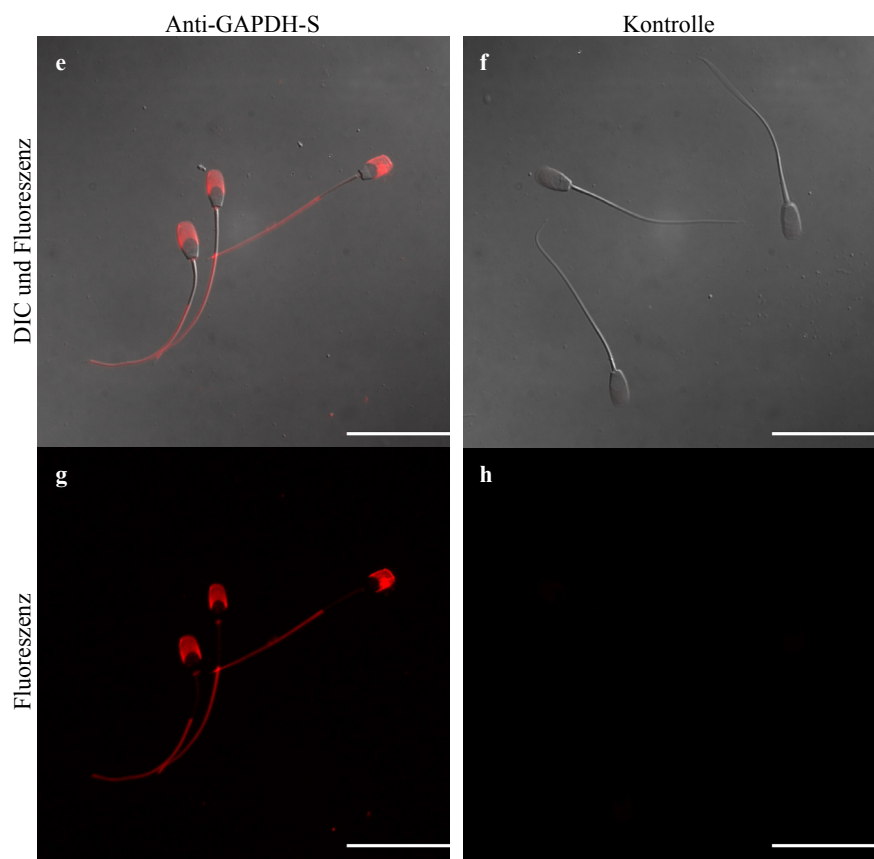


Abbildung 29:
Fluoreszenzmarkierung an ejakulierten Eberspermien nach deren Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100. Einsatz von Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH (a und c) im Vergleich zu Anti-GAPDH-S (e und g) Versuchsdurchführung s. Abbildung 27. Die Bilder a, b, e und f zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern. In c, d, g und h sind die Fluoreszenzbilder separat gezeigt.

a-d:
 Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH ist in den Bildern a und c gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 28a-d), die zugehörige Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper in den Bildern b und d.



e-h:
 Die Bilder e und g zeigen die Markierung mit Anti-GAPDH-S (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 28e-h). Die Kontrolle ohne Primärantikörper ist in den Bildern f und h gezeigt.

Maßstab: a-d jeweils 16,4 µm, e-h jeweils 16,5 µm

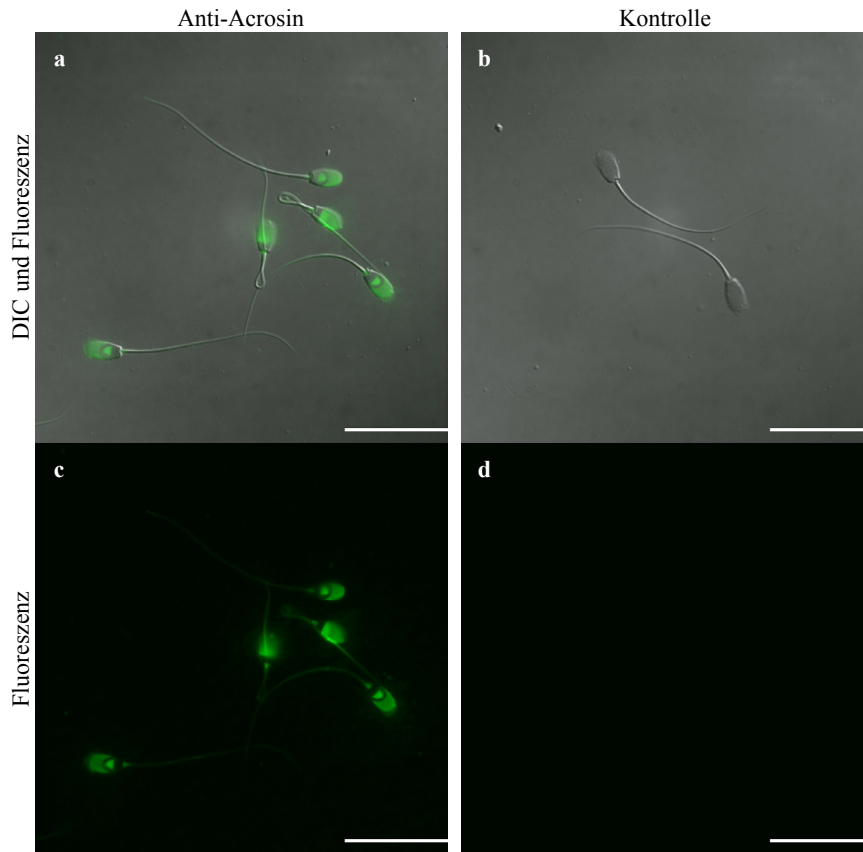


Abbildung 30:
Fluoreszenzmarkierung mit
Antikörpern gegen Acrosin
an ejakulierten
Eberspermien nach deren
Permeabilisierung mit
Triton X-100

Versuchsdurchführung s. Abbildung 26. Die Bilder a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern. In c und d sind die Fluoreszenzbilder separat gezeigt.

Für die Markierung (a und c) wurden 1:67 verdünntes Anti-Acrosin sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper (Anti-Maus-IgG) eingesetzt. Anstelle der Primäntikörper in Blocklösung wurde bei der Kontrolle (b und d) nur (PBS in) Blocklösung eingesetzt.

Maßstab: jeweils 16,5 µm

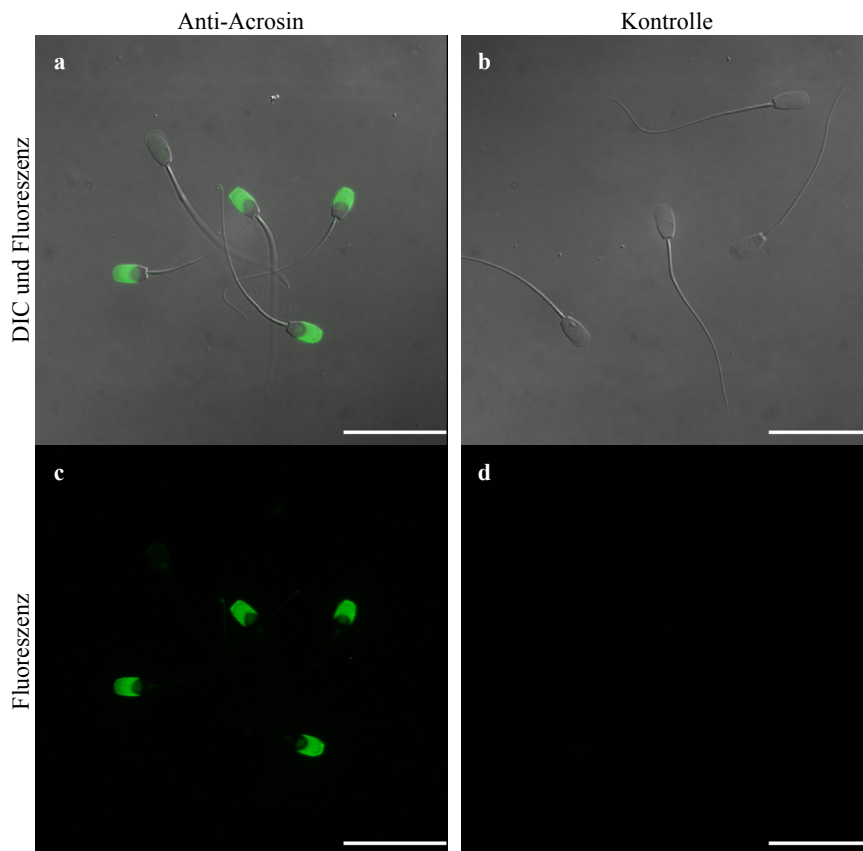


Abbildung 31:
Fluoreszenzmarkierung mit
Antikörpern gegen Acrosin
an ejakulierten
Eberspermien nach deren
Fixierung mit PFA und
Permeabilisierung mit
Triton X-100

Versuchsdurchführung s. Abbildung 27. Die Bilder a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern. In c und d sind die Fluoreszenzbilder separat gezeigt.

Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Acrosin ist in den Bildern a und c gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 30). Die Kontrolle ohne Primäntikörper ist in den Bildern b und d gezeigt.

Maßstab: jeweils 16,4 µm

Insgesamt betrachtet wurden mit den Antikörpern gegen somatische PK und GAPDH praktisch alle Bereiche der Spermien schwach markiert, wobei die Fluoreszenz im Akrosombereich durchweg dominierte. Hingegen markierten die Antikörper bzw. Antiseren gegen PK-S und GAPDH-S vor allem den Akrosombereich und das Hauptstück der Flagellen deutlich, während der postakrosomale Bereich sowie Mittel- und Endstück der Flagellen im Verhältnis nur sehr schwach oder nicht fluoreszierten. Eine deutliche Fluoreszenz der Cytoplasmotropfen wurde beim Einsatz der Antikörper gegen GAPDH, nicht aber denen gegen PK beobachtet. Mit den Antikörpern gegen Acrosin konnte die Lage des Akrosoms im Kopfbereich der Spermien klar abgegrenzt dargestellt werden.

3.8.2 Immunogoldmarkierung an ejakulierten Eberspermien

Um die PK, die GAPDH und das Acrosin in Eberspermien genauer zu lokalisieren, wurde eine Immunogoldmarkierung der Proteine an Ultradünnschnitten mit anschließender elektronenmikroskopischer Betrachtung versucht. Es wurden, wie schon zur Fluoreszenzmarkierung, Anti-PK-M1 sowie Antiserum und immungereinigte Antikörper gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S eingesetzt. Ebenso wurde versucht, die GAPDH mit Hilfe von Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH sowie mit dem Antiserum gegen gereinigte Eberspermien-GAPDH-S zu lokalisieren.

Zu Beginn wurde die Immunogoldmarkierung in Anlehnung an WESTHOFF (1996) durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass unspezifische Bindungsstellen nicht ausreichend abgesättigt waren. Auch 5% BSA und Roti-Block konnten die unspezifische Bindung verschiedener Antikörper nicht verhindern. Besonders deutlich war sie im Kernbereich sowie an den dicken Filamenten zu beobachten. Es wurden dann als Blocklösung sowie zur Verdünnung der Primärantikörper 0,5% Kaltwasserfischgelatine und 0,1% Ovalbumin in PBS und zur Verdünnung der Sekundärantikörper Immunogold-Puffer (0,5% Kaltwasserfischgelatine, 0,1% Ovalbumin, 0,01% Tween 20, 0,5 M NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3) nach WOLFRUM und SCHMITT (2000) verwendet. Außerdem wurden die Schnitte, u.a. zur Absättigung freier NH₂-Gruppen, wie in WOLFRUM und SCHMITT vorbehandelt. Auf diese Weise konnte eine unspezifische Bindung der Antikörper minimiert werden. Alle Kontrollmarkierungen ohne Primärantikörper (d.h. nur Sekundärantikörper) waren, im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen, komplett frei von Goldpartikeln.

Die anfängliche Inkubationsdauer von 1 h für die Primär- und die Sekundärantikörper erwies sich bei den gewählten Antikörperverdünnungen als zu kurz. Eine deutliche Markierung konnte bei Inkubationszeiten zwischen 40 und 70 h bei 4°C für die Primär- und

2 h bei RT für die Sekundärantikörper erreicht werden. Hierbei wurden je nach Antikörper verschiedene Verdünnungen getestet. Im Endergebnis wurden die Primärantikörper in ähnlicher Verdünnung wie zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. Die goldmarkierten Sekundärantikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen verwendet (Tabelle 7).

Nach der Immunogoldmarkierung wurde versucht, die Kontrastierung zu optimieren. Die Kontrastierung der Strukturen in Anlehnung an WESTHOFF (1996) mit 2%igem wässrigen Uranylacetat über 5 min führte zu einem schwachen Kontrast. Die Dauer der Kontrastierung wurde auf bis zu 30 min verlängert, was den Kontrast verstärkte. Außerdem wurde 2%iges ethanolisches (50%) Uranylacetat zur Kontrastierung verwendet. Dieses führte zwar zu einer deutlichen Kontrastverbesserung, jedoch auch zu einer Bildung von zahlreichen Falten im Schnitt. Schließlich wurde der Kontrastierung mit 2%igem wässrigen Uranylacetat (10-20 min) eine 2-minütige Kontrastierung mit Bleicitrat nach HANAICHI et al. (1986) angefügt. Diese Kontrastierung lieferte den besten Kontrast unter Vermeidung von Falten im Schnitt.

Die Immunogoldmarkierung wurde im Folgenden in Anlehnung an WOLFRUM und SCHMITT (2000; Tabelle 7) durchgeführt.

Anti-PK-M1 markierte die fibröse Scheide im Hauptstück der Flagellen (Abbildung 32). Axial- und dicke Filamente wurden kaum markiert. Auch die Mitochondrien im Mittelstück zeigten nahezu keine Markierung. Der Spermienkopf wies vor allem Markierungen im akrosomalen Bereich auf, aber auch an der postakrosomalen Substanz sowie im Kernbereich waren einige Goldpartikel gebunden. Daneben zeigten auch Cytoplasmotropfen Markierungen (nicht abgebildet). Bei Verwendung der mit Kaninchenmuskel-PK präinkubierten Antikörper banden nahezu keine Goldpartikel am Schnitt (Abbildung 32c und e). Weder die fibrösen Scheiden noch Spermienköpfe oder Cytoplasmotropfen (nicht abgebildet) zeigten Markierungen.

Wurden die immungereinigten Antikörper gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S (Anti-PK-S) zur Immunogoldmarkierung eingesetzt, so befand sich der Hauptanteil der Goldpartikel im Spermienkopf. Der akrosomale Bereich zeigte deutliche Markierungen (Abbildung 33a, b und e), wohingegen die postakrosomale Substanz (Abbildung 33a und d) und der Zellkern nahezu keine zeigte. Die meisten Goldpartikel sind ihrer Lage zufolge vermutlich dem Akrosom, und nicht der darunter liegenden subakrosomalen Substanz, zuzuordnen. Die fibröse Scheide im Hauptstück des Flagellums war schwach und alle anderen Strukturen (Mitochondrien, dicke Filamente, Axialfilament, Cytoplasmotropfen) nur sporadisch markiert (Abbildung 33). Zur Kontrolle wurde die Anti-PK-S mit ihrem Antigen, dem synthetisierten Peptid mit PK-S-spezifischer Sequenz, präinkubiert und anschließend zur

Immunogoldmarkierung eingesetzt. In dieser Kontrolle zeigten sich nur sehr wenige oder keine Markierungen im Akrosombereich der Eberspermien (Abbildung 33c). Auch die fibröse Scheide wies nur wenige Goldmarkierungen auf (Abbildung 33g). Da der Unterschied zwischen der Markierung der fibrösen Scheide und der zugehörigen Kontrolle augenscheinlich nicht überzeugend war, wurde die Markierungsdichte für diese Struktur bestimmt (Unterabschnitt 2.16.3.3). Sie lag bei 66 ± 27 bei Verwendung von Anti-PK-S gegenüber 26 ± 5 bei der Kontrolle mit den präinkubierten Anti-PK-S. Die Markierungsdichte der fibrösen Scheide war mit Anti-PK-S signifikant höher als bei der Kontrolle.

Das Antiserum gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S, aus welchem die zuvor verwendeten Antikörper (Anti-PK-S) gereinigt worden waren, führte ebenfalls zu einer deutlichen Markierung im Akrosombereich. Auch hier wies die subakrosomale Substanz nur wenige Goldpartikel auf (Abbildung 34a bis d). Die postakrosomale Substanz (Abbildung 34a) und der Kern sowie alle anderen Spermienstrukturen waren praktisch frei von Goldpartikeln (Abbildung 34). Cytoplasmotropfen zeigten zum Teil eine leichte Markierung (Abbildung 34h). Wurde als Kontrolle das Präimmunserum eingesetzt, so waren nur sehr wenige, sporadisch auftretende Goldpartikel zu beobachten (Abbildung 34e und i).

Das Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (von WESTHOFF, 1996) führte zu einer ähnlich starken Markierung im Bereich des Akrosoms wie das Antiserum gegen die gereinigte PK-S. Die postakrosomale Substanz und der Kern waren auch hier frei von Goldpartikeln (Abbildung 35a und b). Ebenso wiesen die Mitochondrien sowie die Axial- und die dicken Filamente fast keine Markierungen auf (Abbildung 35d und e). Das Antiserum führte aber, im Gegensatz zum Antiserum gegen die PK-S, zu einer deutlichen Markierung der fibrösen Scheide (Abbildung 35e und f). Auch die Cytoplasmotropfen wurden deutlich markiert (Abbildung 35e). Da das zugehörige Präimmunserum sowie gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien nicht zur Verfügung standen, konnte hier nur die Immunogoldmarkierung ohne Primärantikörper zur Kontrolle herangezogen werden. Bei alleinigem Einsatz der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG wurden die Spermienstrukturen nicht markiert (Abbildung 35c).

Der Einsatz der Antikörper gegen die somatische GAPDH sowie der gegen das Acrosin lieferten keine aussagekräftigen Markierungen. Während die Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH zu sporadisch auftretenden Goldpartikelansammlungen führte, reagierte das Anti-Acrosin sehr unspezifisch (beides nicht abgebildet). Das Anti-Acrosin band in allen eingesetzten Verdünnungen an alle Spermienstrukturen, besonders stark jedoch im Kernbereich. Bei einer Verdünnung der Antikörper von 1:50 waren im Akrosombereich nur

sehr wenige Goldpartikel im Vergleich zur Markierung der anderen Strukturen zu finden. Bei einer Verdünnung von 1:250 waren die Akrosomen, im Gegensatz zu den restlichen Strukturen, praktisch unmarkiert. Die beiden Antikörper waren also bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht zur Lokalisierung von GAPDH und Acrosin über Immunogoldmarkierung geeignet.

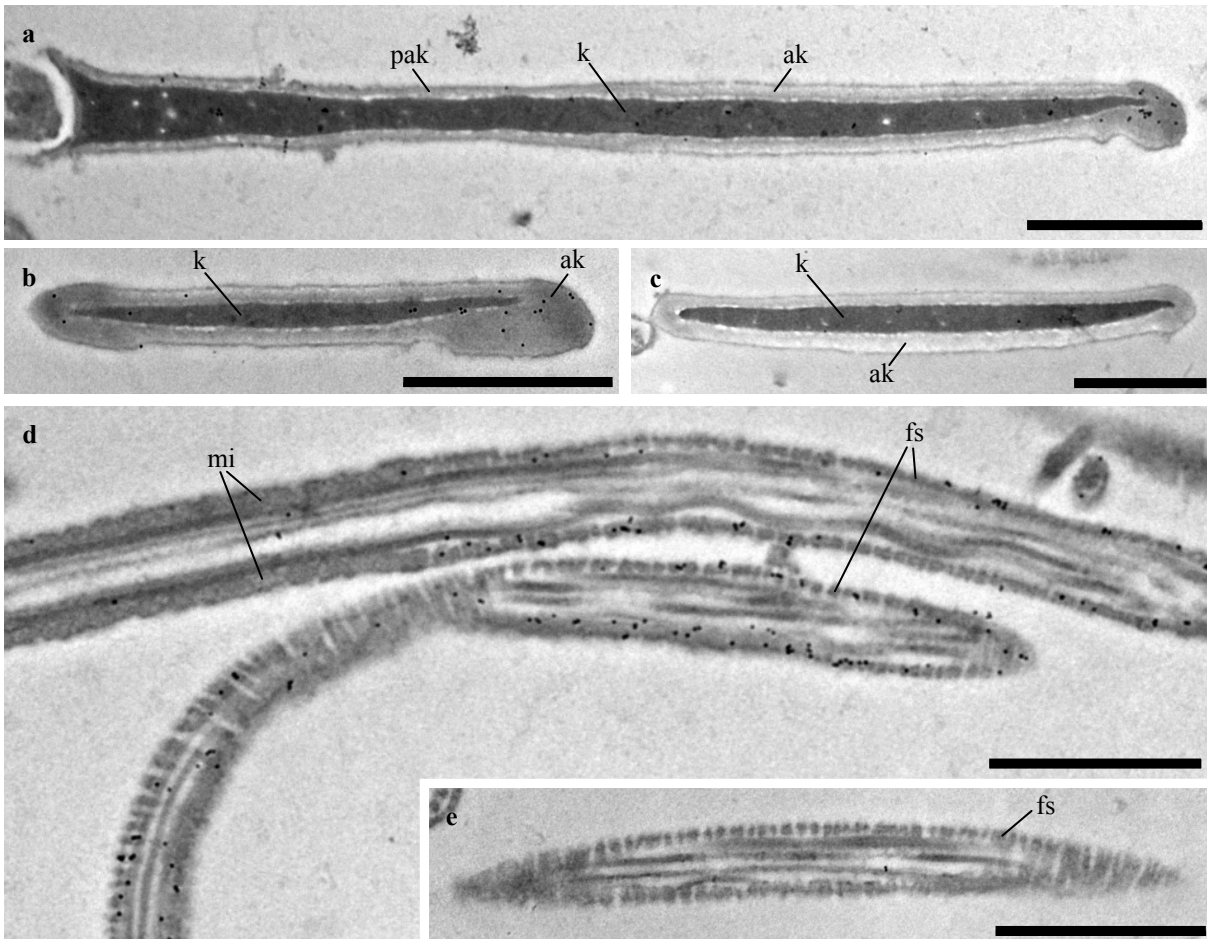


Abbildung 32: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Eberspermien mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1)

In LR White eingebettete Eberspermien wurden ultradünn (ca. 60 nm) geschnitten und auf Formvar-befilmte Nickelnetzchen gelegt. Die Immunogoldmarkierung wurde gemäß Protokoll (Tabelle 7) durchgeführt.

Anti-PK-M1 wurde 1:10000 verdünnt sowie die goldkonjugierten Sekundäntikörper (Anti-Ziegen-IgG)

1:15 verdünnt eingesetzt. Zur Kontrolle wurde Anti-PK-M1 eingesetzt, welche zuvor mit Kaninchenmuskel-PK präinkubiert worden war (c und e). Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 µm an.

Abkürzungen s. Abbildung 3

a: Längsschnitt durch den Kopf eines Eberspermiums; **b:** schräger Anschnitt im vorderen Bereich eines Spermienkopfes; **c:** Querschnitt im vorderen Bereich eines Spermienkopfes; **d:** mittiger Längsschnitt durch Mittel- (links) und Hauptstück (rechts) eines Spermienflagellums (oben) sowie teilweise weiter außen gelegener Längsschnitt durch ein Hauptstück (unten); **e:** Längsschnitt durch das Hauptstück eines Flagellums, der an beiden Seiten zur Oberfläche ausläuft; **f:** Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück von Spermienflagellen

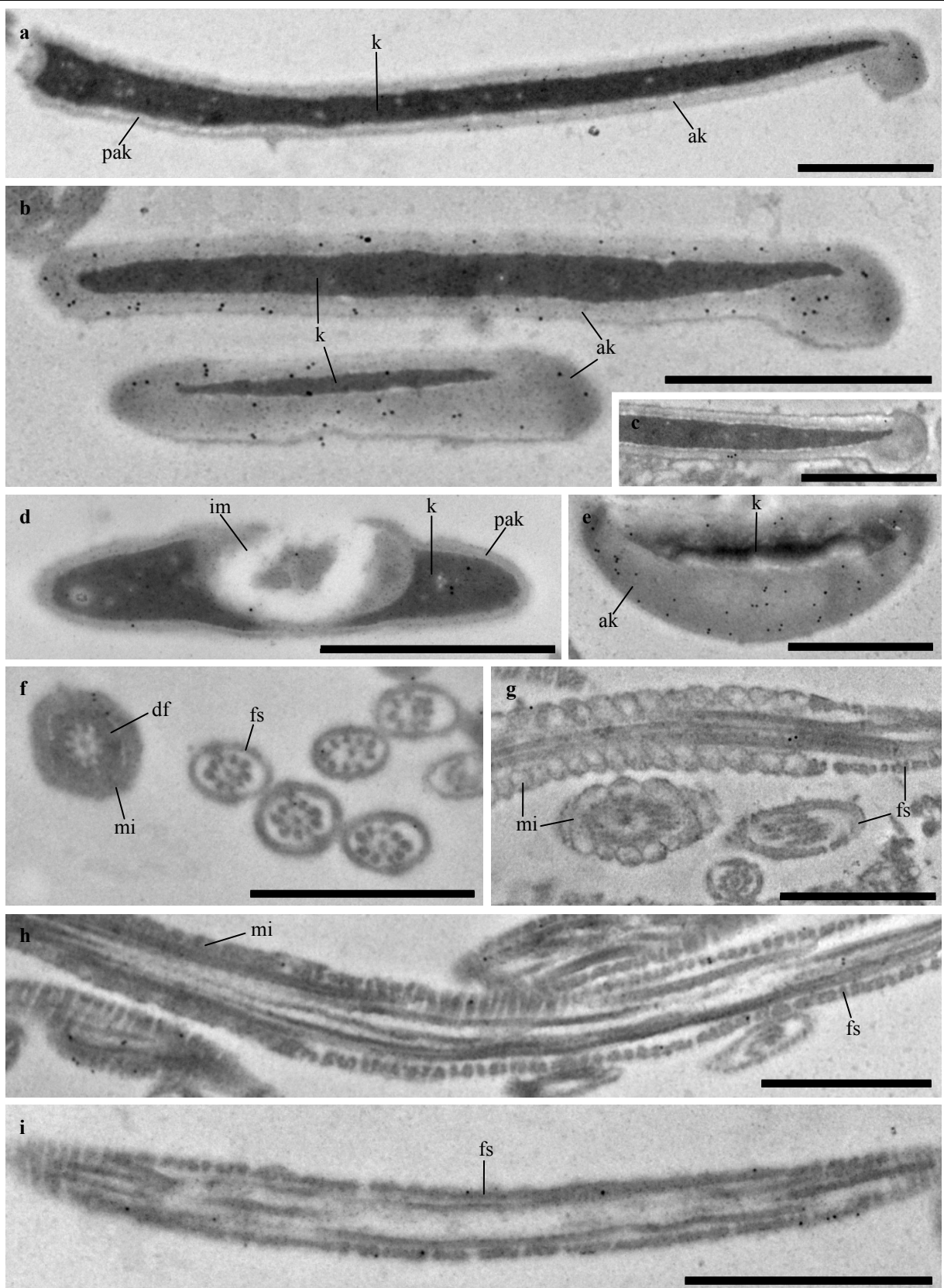


Abbildung 33: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Eberspermien mit immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S)

Durchführung gemäß Abbildung 32. Es wurden 1:5 verdünnte Anti-PK-S sowie 1:28 verdünnte goldkonjugierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Zur Kontrolle wurden die Primärantikörper mit dem synthetisierten Spermien-PK-Peptid präinkubiert und zur Immunogoldmarkierung eingesetzt (c und g). Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 µm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a: Längsschnitt durch den Kopf eines Eberspermiums; **b:** Anschnitte im vorderen Kopfbereich; **c:** Längsschnitt durch den vorderen Bereich eines Kopfes; **d:** Querschnitt im Übergangsbereich zwischen Kopf und Flagellum; **e:** Schnitt im vorderen Bereich eines Kopfes an dem akrosomalen Wulst; **f:** Querschnitte durch Mittel- (links) und Hauptstück (rechts) von Flagellen; **g:** Längsschnitt (oben) sowie Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück; **h:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums; **i:** Längsschnitt durch das Hauptstück eines Flagellums, der an beiden Seiten zur Oberfläche ausläuft

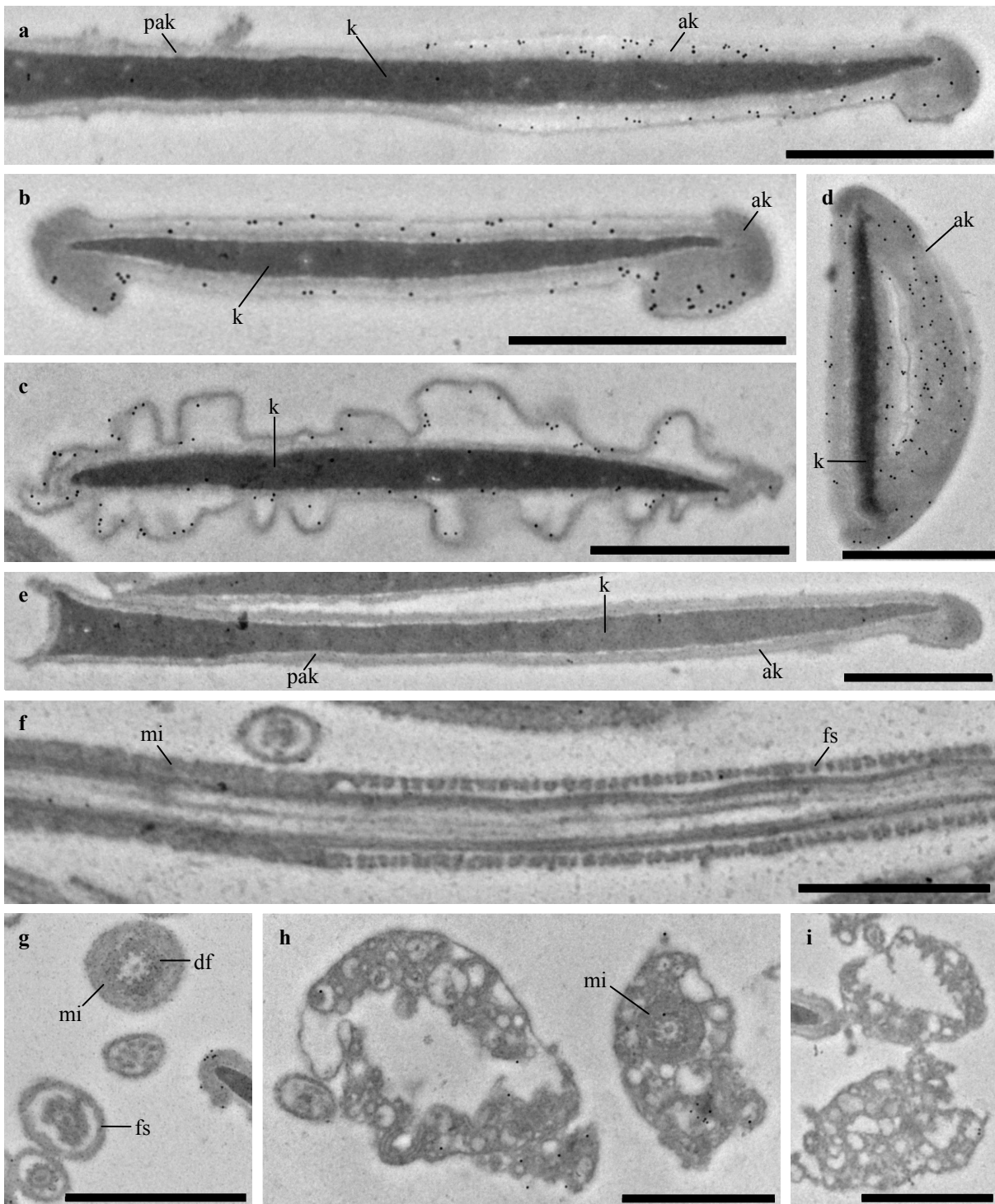


Abbildung 34: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Eberspermien mit Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien

Durchführung gemäß Abbildung 32. Es wurden 1:1000 verdünntes Antiserum gegen die PK-S sowie 1:28 verdünnte goldkonjugierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Als Kontrolle wurde 1:1000 verdünntes Präimmunsereum zur Immunogoldmarkierung eingesetzt (e und i). Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 µm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a: Längsschnitt durch den Kopf eines Eberspermiums; **b:** Querschnitt im vorderen Kopfbereich; **c:** Querschnitt im vorderen Kopfbereich mit partiell abgelöstem Akrosom; **d:** Schnitt im vorderen Kopfbereich an dem akrosomalen Wulst; **e:** Längsschnitt durch einen Kopf; **f:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums; **g:** Querschnitte durch Mittel- (oben) und Hauptstück (unten) von Flagellen; **h** und **i:** Cytoplasmotropfen

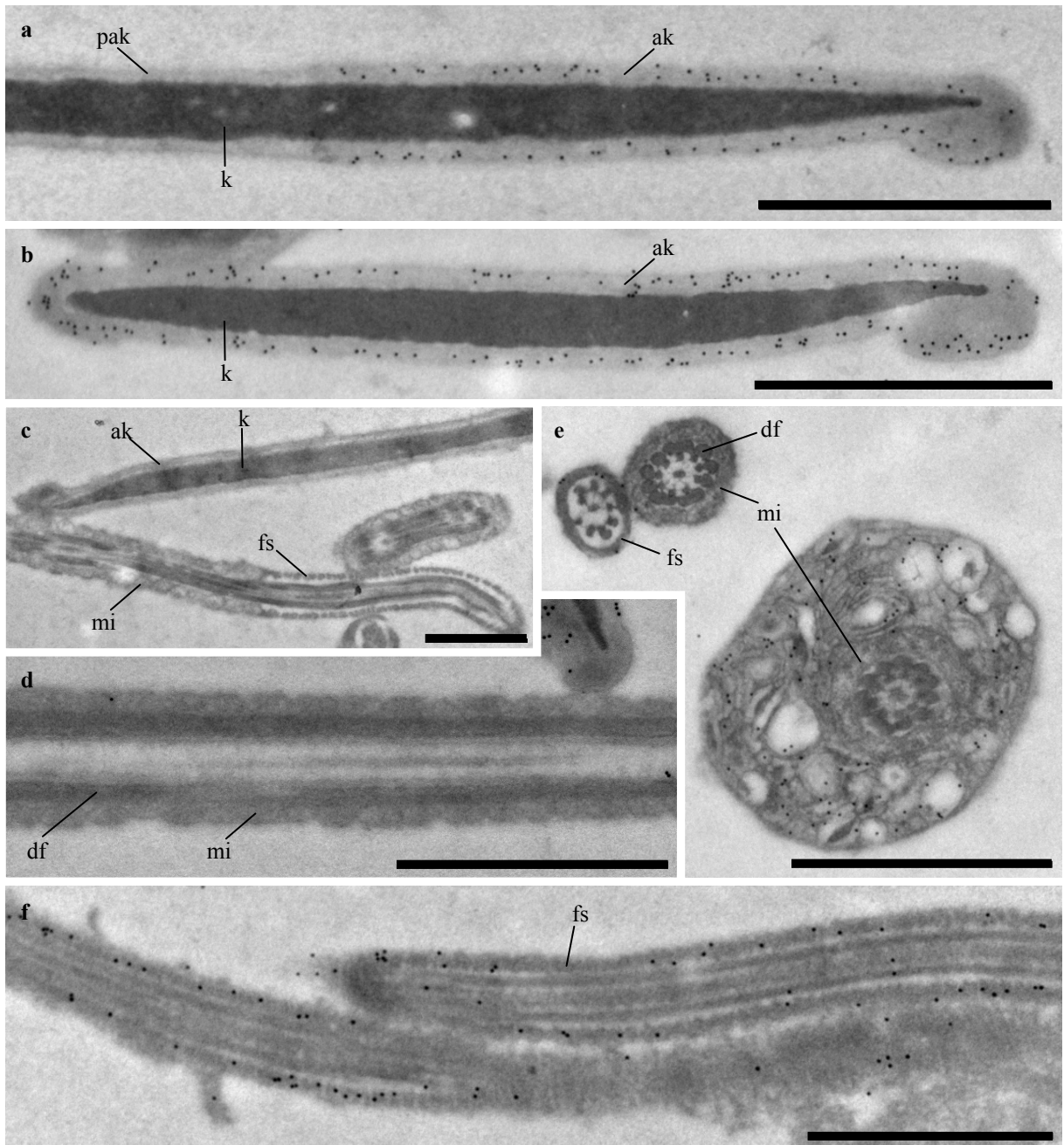


Abbildung 35: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Eberspermien mit Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S)

Durchführung gemäß Abbildung 32. Es wurden 1:3000 verdünnte Anti-GAPDH-S sowie 1:28 verdünnte goldkonjugierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Da das zugehörige Präimmunserum nicht zur Verfügung stand, ist zum Vergleich die Kontrolle ohne Primärantikörper gezeigt (c). Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 µm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a: Längsschnitt durch den Kopf eines Eberspermiums; **b:** schräger Anschnitt im vorderen Bereich eines Kopfes; **c:** Längsschnitt durch einen Kopf (Mitte links bis oben rechts) sowie durch ein Flagellum (Mitte links bis unten rechts); **d:** Längsschnitt durch ein Mittelstück; **e:** Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück von Flagellen sowie durch ein mit Cytoplasmatropfen umgebenes Mittelstück; **f:** Längsschnitte durch Hauptstücke von Flagellen

3.8.3 Immunogoldmarkierung an Spermien anderer Säuger

Die Antikörper, welche an Eberspermien zu klaren Markierungen geführt hatten, wurden nun zur Immunogoldmarkierung an Bullen- und Humanspermien eingesetzt. Es sollte überprüft werden, ob sie bei den Spermien anderer Säuger eine gleiche oder ähnliche Verteilung der Proteine zeigten. Es interessierte weiterhin, ob die Antiseren und die immungereinigten Antikörper gegen glykolytische Enzyme aus Eberspermien auch an Bullen- und Humanspermien zu einer spezifischen Proteinmarkierung führen, d.h., ob die Sequenzen der Eberspermienproteine, gegen welche die Antikörper gerichtet sind, auch in Bullen- und Humanspermien vorkommen.

Wie schon für die Eberspermien gezeigt, führten die Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) auch bei Bullenspermien zu einer deutlichen Markierung der fibrösen Scheide (Abbildung 36c, d und e). Die Mitochondrien (Abbildung 36c und e) sowie die Cytoplasmatropfen (nicht abgebildet) waren hingegen kaum markiert. Auch an den dicken Filamenten und am Axonem waren nahezu keine Goldpartikel gebunden. In den Spermienköpfen waren einige Goldmarkierungen zu beobachten. Diese beschränkten sich allerdings nicht auf einen bestimmten Bereich des Kopfes, sondern waren vereinzelt im Kern sowie in der kompletten den Kern umgebenden Substanz zu finden (Abbildung 36a). Die mit Kaninchenmuskel-PK präinkubierten Antikörper führten weder an der fibrösen Scheide noch im Kopfbereich oder anderen Spermienstrukturen zur Goldmarkierung (Abbildung 36b, f und g).

Die immungereinigten Antikörper gegen die PK-S (Anti-PK-S) aus Eberspermien lieferten hauptsächlich Markierungen im Akrosombereich der Bullenspermien (Abbildung 37a und b). An der fibrösen Scheide konnten nur wenige Goldpartikel gefunden werden. Alle anderen Strukturen waren nahezu markierungsfrei. Es zeigten sich jedoch auch in der Kontrolle (mit Peptid präinkubierte Antikörper) deutliche Markierungen im Akrosombereich (Abbildung 37c). Die Kontrolle ohne Primärantikörper wies keine Goldmarkierungen auf (Abbildung 37d).

Auch unter Einsatz des Antiserums gegen die gereinigte Eberspermien-PK-S dominierten die Markierungen im Kopfbereich der Bullenspermien (Abbildung 38a und b). Daneben waren die fibröse Scheide (Abbildung 38d und e) und die Cytoplasmatropfen (nicht abgebildet) schwach markiert. Mitochondrien, Axial- und dicke Filamente hingegen waren praktisch nicht markiert (Abbildung 38c, d und e). Im Spermienkopf waren die Goldpartikel vorwiegend im Akrosombereich zu finden, aber zusätzlich war der Kernbereich schwach markiert. Die postakrosomale Substanz wies nahezu keine Markierung auf. Die

Kontrollmarkierung mit dem Präimmunserum führte zu sehr wenigen Markierungen im Spermienkopf, die oft auch im Kernbereich zu finden waren. An der fibrösen Scheide waren nahezu keine Goldpartikel gebunden. Cytoplasmatropfen zeigten auch in der Kontrolle eine schwache Markierung (Abbildung 38f).

Das Antiserum gegen die gereinigte Eberspermien-GAPDH-S (Anti-GAPDH-S) führte wie an den Eberspermien, zu einer klaren Goldmarkierung der fibrösen Scheide sowie im Akrosombereich der Bullenspermien. Die Mitochondrien, die dicken Filamente und das Axonem sowie der Zellkern und die postakrosomale Substanz waren nahezu frei von Markierungen (Abbildung 39). Entgegen der Markierung am Eberspermienpräparat, wurden an den Schnitten mit Bullenspermien die Cytoplasmatropfen praktisch nicht markiert (Abbildung 39i). In der Kontrolle ohne Primärantikörper waren weder die fibröse Scheide (Abbildung 39g) noch der Akrosombereich (Abbildung 39d) markiert.

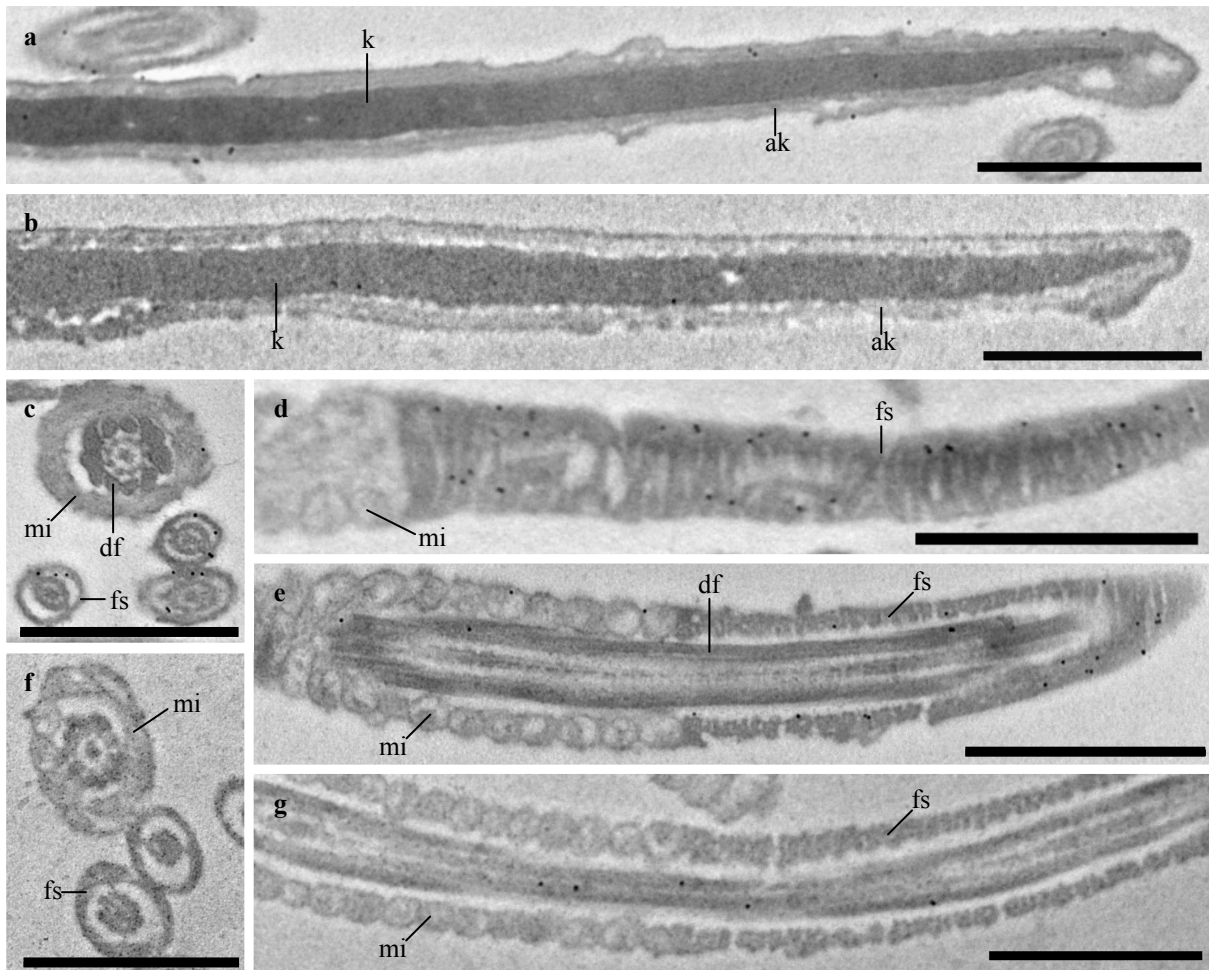


Abbildung 36: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Bullenspermien mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1)

Durchführung gemäß Abbildung 32 an Bullenspermien. Die Bilder b, f und g zeigen die Kontrolle mit den präinkubierten Antikörpern. Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 µm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a und b: jeweils Längsschnitt durch den vorderen Kopfbereich eines Bullenspermiums; **c:** Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück von Flagellen; **d:** oberflächennaher Längsschnitt durch ein Hauptstück im Bereich der fibrösen Scheide; **e:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums, der an beiden Seiten zur Oberfläche ausläuft; **f:** Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück; **g:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums

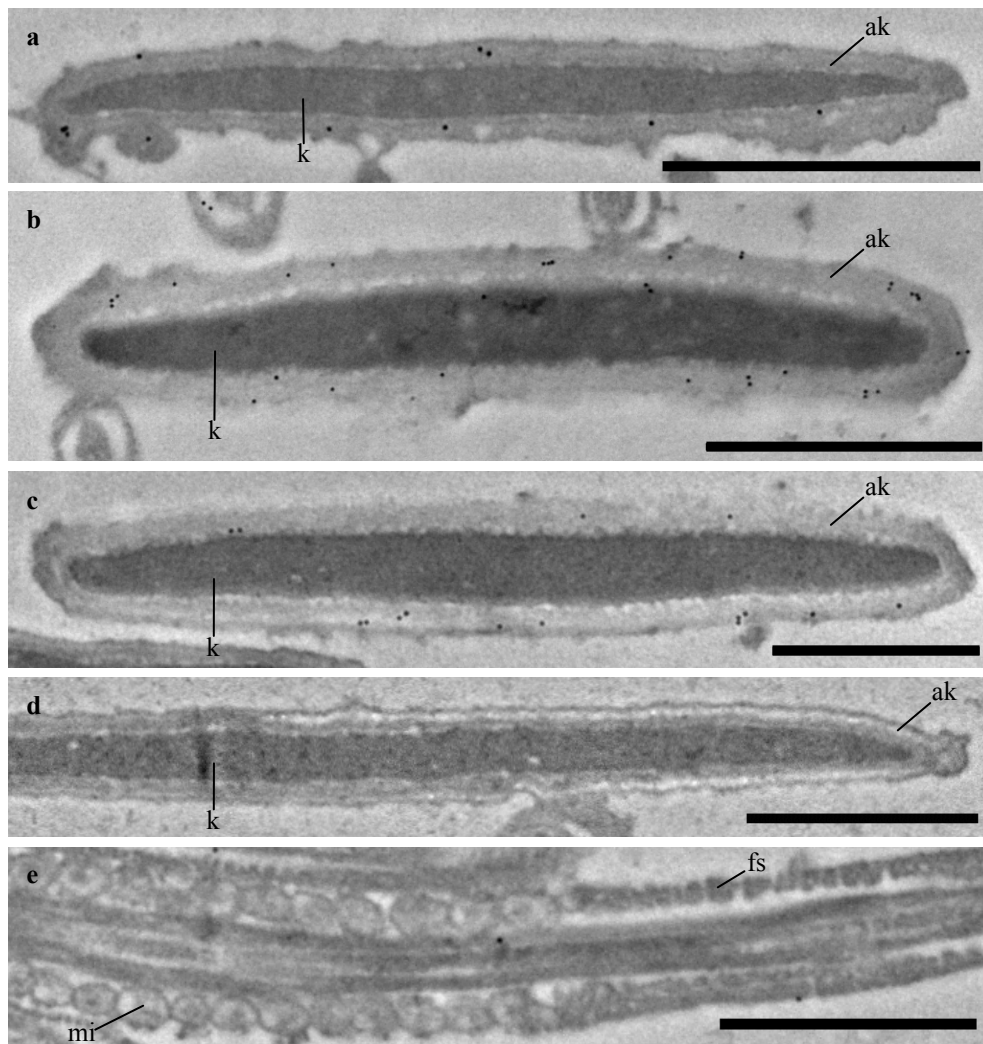


Abbildung 37: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Bullenspermien mit immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S)

Durchführung gemäß Abbildung 33 an Bullenspermien. Bild c zeigt die Kontrolle mit den präinkubierten Antikörpern, Bild d die Kontrolle ohne Primärantikörper. Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 µm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a bis d: Anschnitte im vorderen, Akrosom-tragenden Bereich von Bullenspermienköpfen; **e:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums

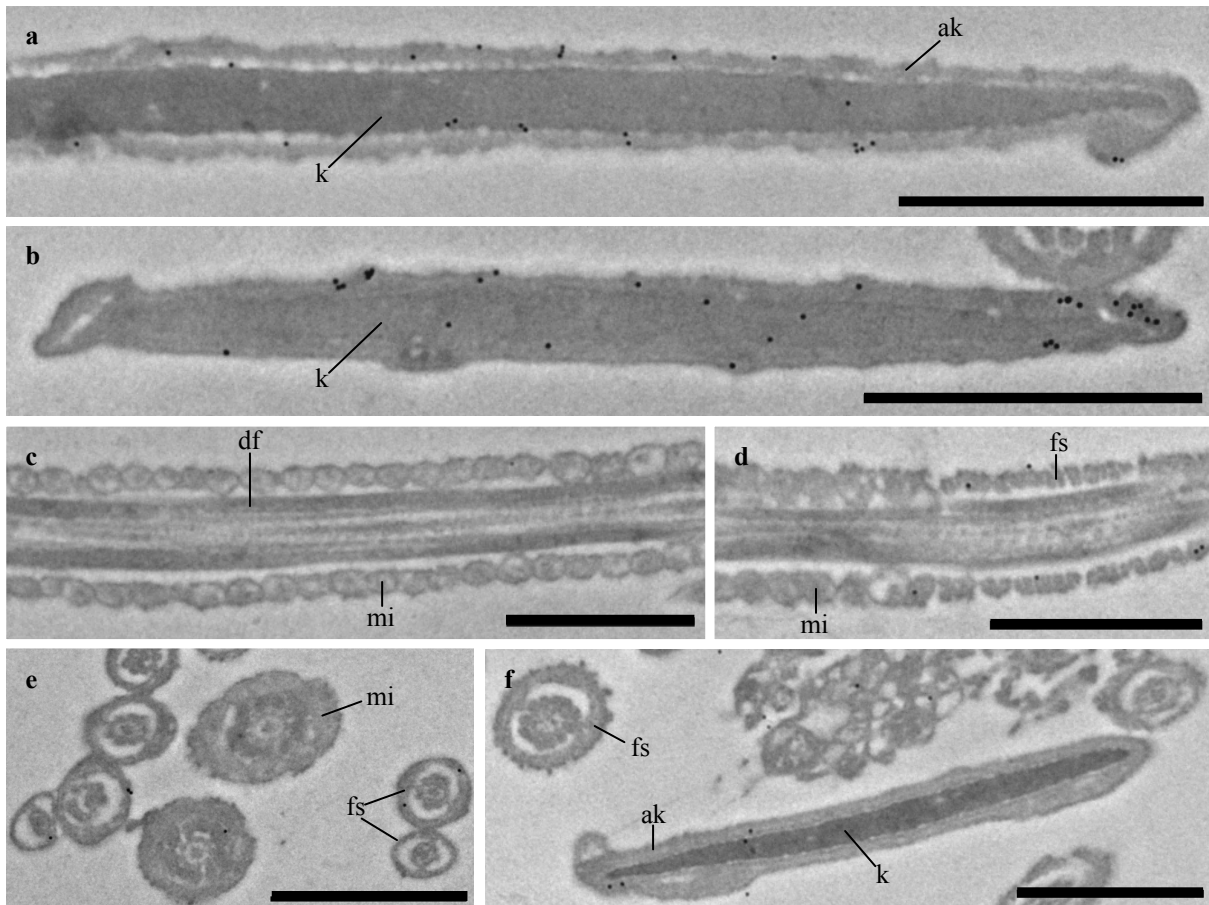
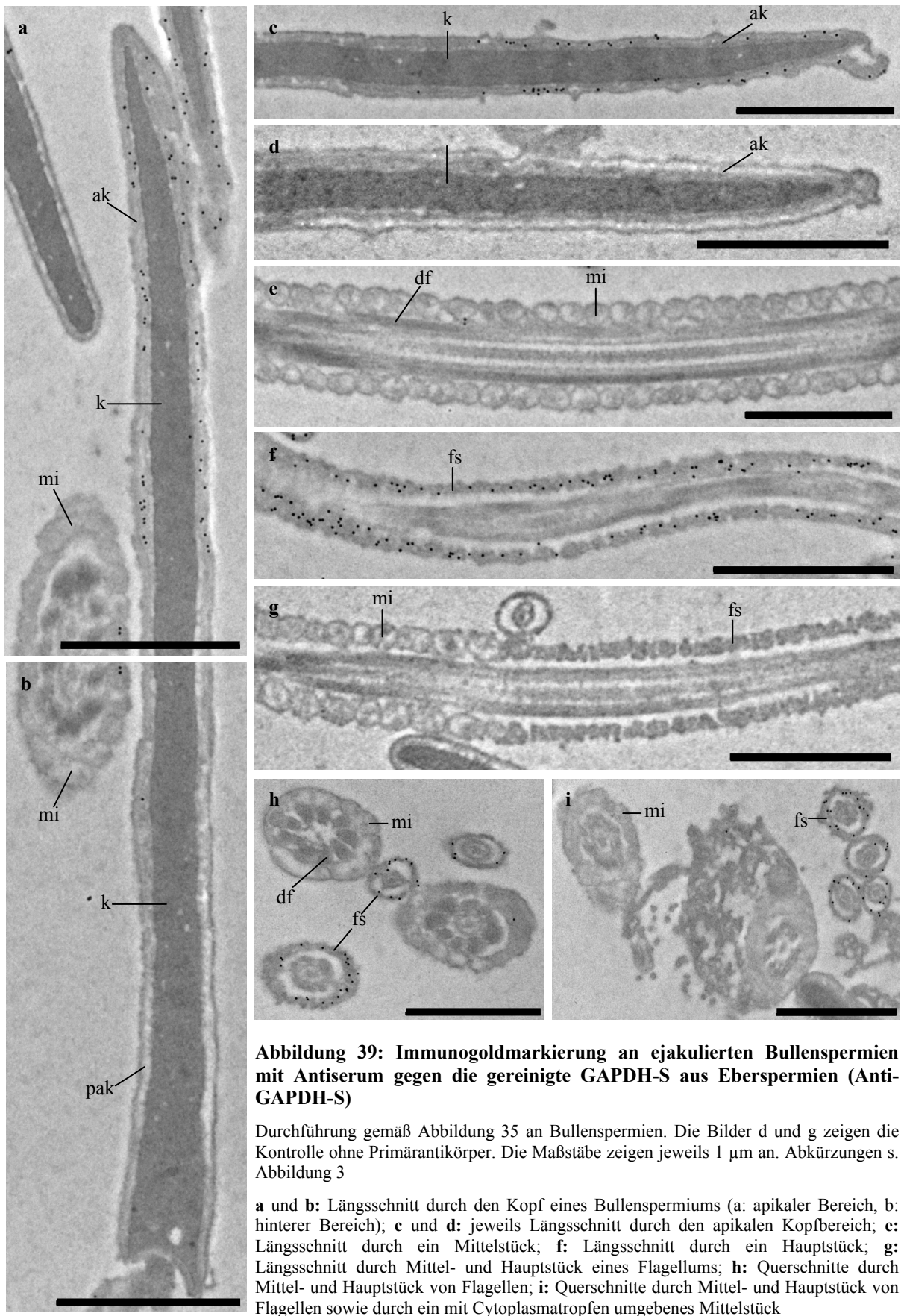


Abbildung 38: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Bullenspermien mit Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien

Durchführung gemäß Abbildung 34 an Bullenspermien. Bild f zeigt die Kontrollmarkierung mit dem Präimmunserum. Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 μm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a: Längsschnitt durch den vorderen Kopfbereich eines Bullenspermiums; **b:** Anschnitt im vorderen, Akrosom-tragenden Bereich eines Kopfes; **c:** Längsschnitt durch ein Mittelstück; **d:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums; **e:** Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück von Flagellen; **f:** Anschnitt im vorderen, Akrosom-tragenden Bereich eines Kopfes und Querschnitte durch Hauptstücke sowie ein angeschnittener Cytoplasmotropfen



Auch an Humanspermien wurde die Immunogoldmarkierung mit den verschiedenen Antikörpern versucht. Anti-PK-M1 führte hier fast ausschließlich zur deutlichen Goldmarkierung der fibrösen Scheide (Abbildung 40). Nur im Kernbereich waren zudem einige Goldpartikel gebunden. Mit den Antikörpern, die mit Kaninchenmuskel-PK präinkubiert worden waren, wurden an der fibrösen Scheide und am Zellkern nahezu keine Markierungen beobachtet (Abbildung 40f und b).

Beim Einsatz der immungereinigten Antikörper gegen die Eberspermien-PK-S (Anti-PK-S) wies der Akrosombereich eine deutliche Markierung auf (Abbildung 41a), die allerdings auch beim Einsatz der mit Peptid präinkubierten Antikörper zu beobachten war (Abbildung 41b). Während die Mitochondrien unmarkiert waren, wies die fibröse Scheide Goldmarkierungen auf (Abbildung 41d und e). Auch hier zeigte sich durch die Antikörper-Präinkubation keine Veränderung der Markierung (Abbildung 41f). An den anderen Strukturen traten nur sporadisch Markierungen auf. Bei der Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper zeigten sich weder Markierungen im Akrosombereich noch an der fibrösen Scheide (Abbildung 41c und g).

Mit dem Antiserum gegen die gereinigte strukturegebundene PK aus Eberspermien wurden überwiegend Goldmarkierungen im Spermienkopf beobachtet. Der Akrosombereich wurde deutlich markiert (Abbildung 42a und c), wogegen hier beim Einsatz des Präimmunserums keine Markierung zu verzeichnen war (Abbildung 42b). Zudem wurden im Zellkern auch Bereiche markiert, die sich deutlich vom restlichen Chromatin abgrenzten (Abbildung 42c). Die postakrosomale Substanz wies keine Markierungen auf. Auch die übrigen Spermienstrukturen zeigten keine überzeugende Markierung. Lediglich an der fibrösen Scheide waren wenige Goldpartikel gebunden (Abbildung 42d).

Das Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S) führte, wie schon an Eber- und Bullenspermien, zu einer deutlichen Markierung des Akrosombereichs sowie der fibrösen Scheide. An allen anderen Bereichen der Humanspermien sowie an den Cytoplasmotropfen finden sich nahezu keine Markierungen (Abbildung 43). Bei der Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper war weder der Akrosombereich noch die fibröse Scheide markiert (Abbildung 43b und c).

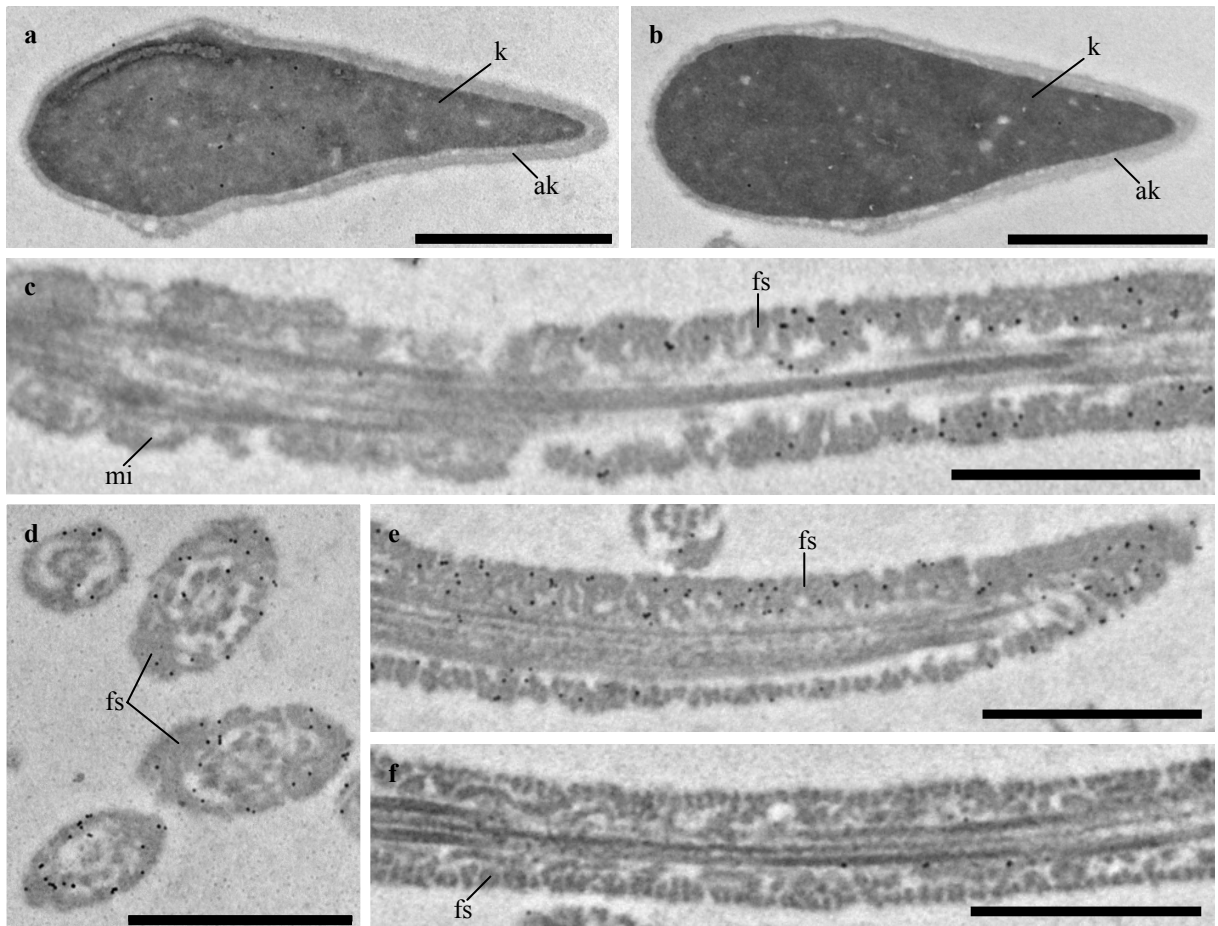


Abbildung 40: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Humanspermien mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1)

Durchführung gemäß Abbildung 32 an Humanspermien. Die Bilder b und f zeigen die Kontrolle mit den präinkubierten Antikörpern. Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 μm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a und b: jeweils Längsschnitt durch den Kopf eines Humanspermiums; **c:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums; **d:** Querschnitte durch das Hauptstück von Flagellen; **e:** Längsschnitt durch ein Hauptstück, welcher auf der rechten Seite zur Oberfläche ausläuft; **f:** Längsschnitt durch ein Hauptstück

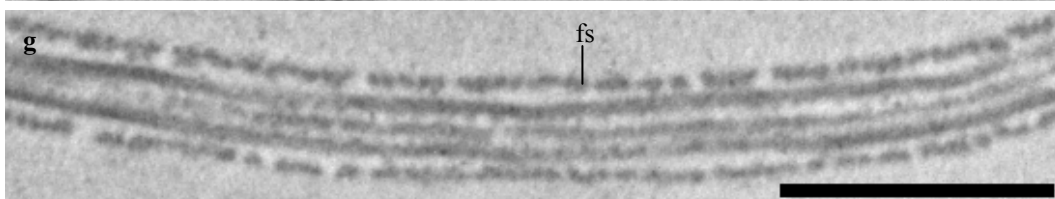
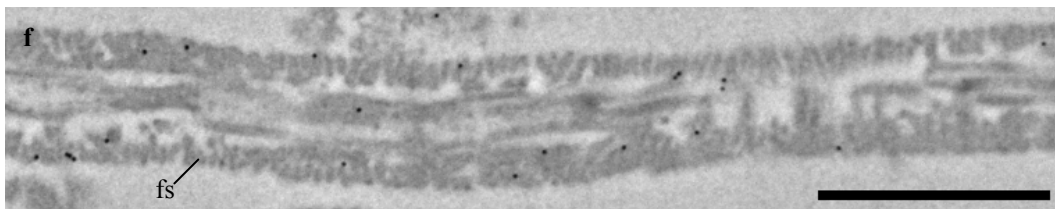
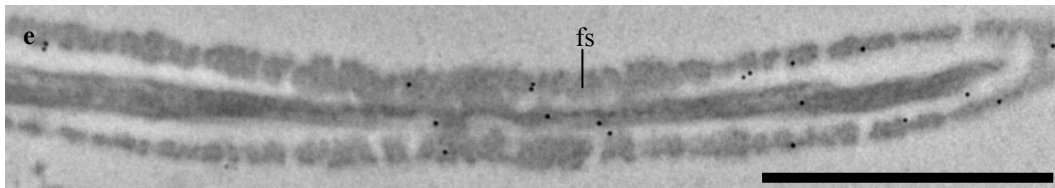
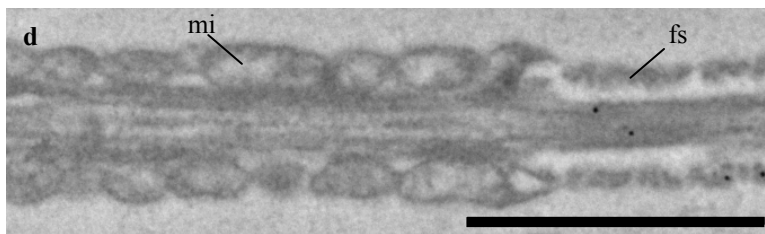
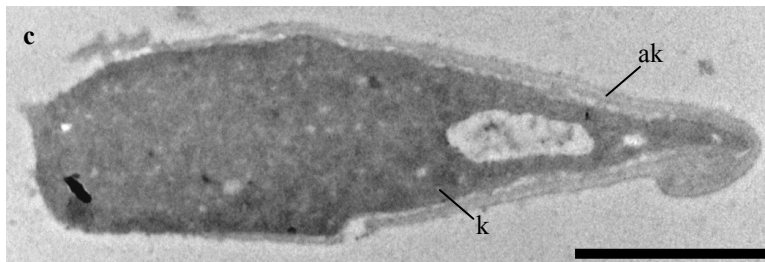
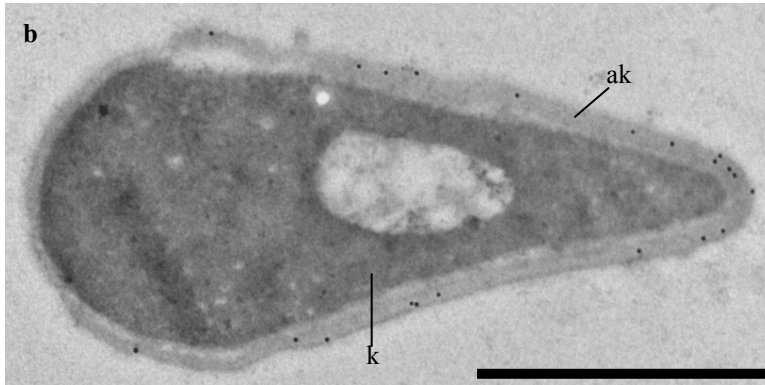
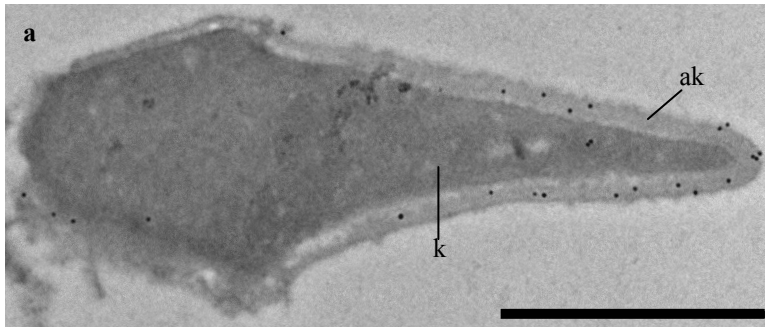


Abbildung 41:
Immunogoldmarkierung an
ejakulierten Humanspermien mit
immungereinigten Antikörpern gegen
die PK-S aus Eberspermien (Anti-
PK-S)

Durchführung gemäß Abbildung 33 an
 Humanspermien. Bilder b und f zeigen die
 Kontrolle mit den präinkubierten
 Antikörpern, Bilder c und g die Kontrolle
 ohne Primärantikörper. Die Maßstäbe zeigen
 jeweils 1 μm an. Abkürzungen s. Abbildung
 3

a bis c: jeweils Längsschnitt durch den Kopf
 eines Humanspermiums; d: Längsschnitt
 durch Mittel- und Hauptstück eines
 Flagellums; e bis g: jeweils Längsschnitt
 durch ein Hauptstück

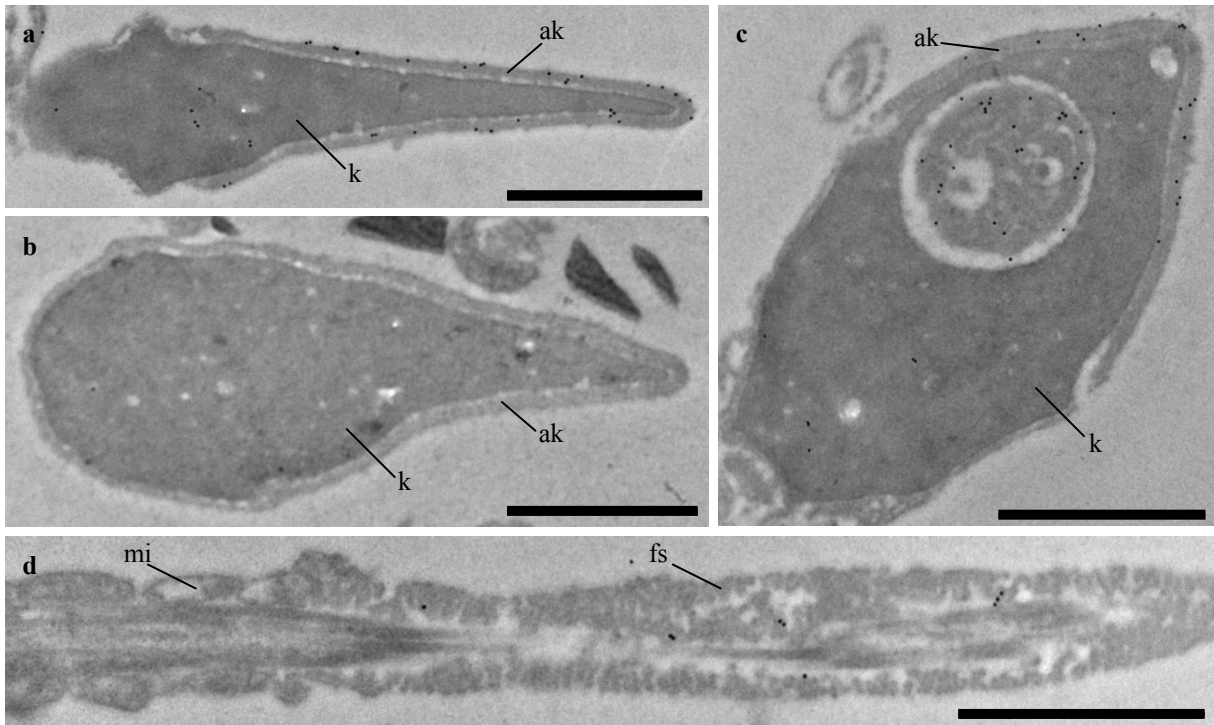


Abbildung 42: Immunogoldmarkierung an ejakulierten Humanspermien mit Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien

Durchführung gemäß Abbildung 34 an Humanspermien. Bild b zeigt die Kontrollmarkierung mit dem Präimmunserum. Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 μm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a bis c: jeweils Längsschnitt durch den Kopf eines Humanspermiums; **d:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums (mittig und rechts oberflächennah geschnitten)

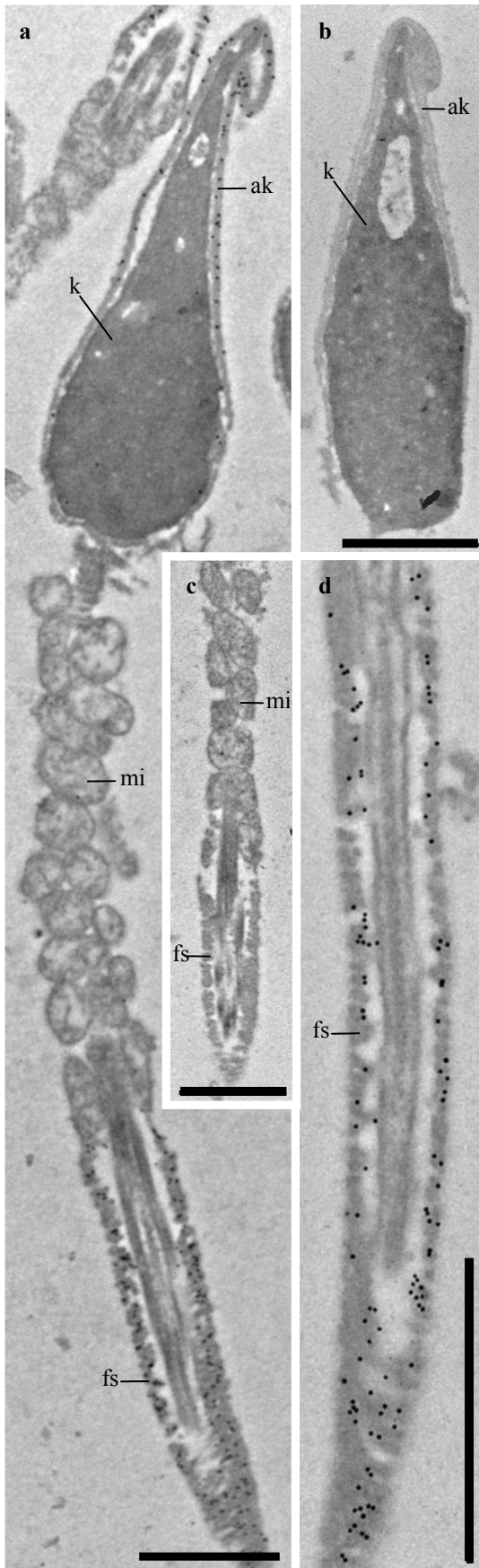


Abbildung 43:

Immunogoldmarkierung an ejakulierten Humanspermien mit Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S)

Durchführung gemäß Abbildung 35 an Humanspermien. Die Bilder b und c zeigen die Kontrolle ohne Primärantikörper. Die Maßstäbe zeigen jeweils 1 μm an. Abkürzungen s. Abbildung 3

a: Längsschnitt durch den Kopf sowie Mittel- und Hauptstück eines Humanspermiums; **b:** Längsschnitt durch einen Kopf; **c:** Längsschnitt durch Mittel- und Hauptstück eines Flagellums; **d:** Längsschnitt durch ein Hauptstück, der nach unten hin zur Oberfläche ausläuft; **e:** Querschnitte durch Mittel- und Hauptstück von Flagellen; **f:** Querschnitte durch das Hauptstück von Flagellen

Bei einer Gesamtbeurteilung der Immunogoldmarkierungen von PK und GAPDH in den verschiedenen Säugerspermien sollte generell beachtet werden, dass nur Positivergebnisse, d.h. deutliche Markierungen, eindeutige Folgerungen zulassen. Eine Nichtmarkierung kann nicht als Beweis für ein Nichtvorkommen des Enzyms dienen.

PK wurde bei Eber-, Bullen- und Humanspermien an der fibrösen Scheide im Hauptstück des Flagellums nachgewiesen. Im Akrosombereich konnte für Eberspermien gezeigt werden, dass hier PK-S vorliegt; für die Bullen- und Humanspermien ist dies nicht klar, da auch die mit dem PK-S-Peptid präinkubierte Anti-PK-S hier zu Markierungen führte. Das Antiserum gegen die Eberspermien-GAPDH-S führte bei allen drei Arten zu einer deutlichen Markierung der fibrösen Scheide und des Akrosombereichs. Die Mitochondrien sowie die dicken Filamente und das Axonem wurden durchweg nicht bzw. nicht eindeutig markiert. Beim Eber führten sowohl Antikörper gegen PK als auch das Antiserum gegen die GAPDH-S zu einer Goldmarkierung der Cytoplasmotropfen.

Der Einsatz von Antikörpern gegen PK unterschiedlicher Herkunft führte zu einer unterschiedlichen Verteilung der Markierung auf die Spermienstrukturen. So wurde die PK mit Anti-PK-M1 bei den drei unterschiedlichen Säugerspermien jeweils an der fibrösen Scheide lokalisiert. Bei Eber- und Bullenspermien wurde zusätzlich PK im Spermienkopf, und hier zum Teil im Akrosombereich, markiert. Beim Eber zeigte sich zudem eine Markierung des Cytoplasmotropfens. Hingegen wurde mit den Antikörpern gegen die PK-S durchweg der Akrosombereich deutlich markiert. Die fibröse Scheide sowie die Cytoplasmotropfen wurden meist nur verhältnismäßig sehr schwach bis gar nicht markiert (Ausnahme: Markierung der fibrösen Scheide beim Einsatz der immungereinigten Antikörper an Humanspermien). Beim Einsatz der immungereinigten Antikörper (Anti-PK-S) zeigten sich im Vergleich zum Antiserum gegen die PK-S aus Eberspermien nur geringfügige Unterschiede. So wurde der Akrosombereich der Eberspermien mit dem Antiserum noch stärker markiert als mit den immungereinigten Antikörpern. Zusätzlich zum Akrosom wurde mit den immungereinigten Antikörpern die fibröse Scheide und mit dem Antiserum die Cytoplasmotropfen schwach markiert. Bei Bullen- und Humanspermien konnten lediglich leichte Unterschiede im Ausmaß der Markierung der fibrösen Scheide festgestellt werden.

Wie das Antiserum gegen die PK-S führte das Antiserum gegen die GAPDH-S zu einer deutlichen Markierung im Akrosombereich von Eber-, Bullen- und Humanspermien. Zusätzlich wurde bei den Spermien aber auch die fibröse Scheide durchweg sehr deutlich markiert. Beim Eber wurden zudem die Cytoplasmotropfen goldmarkiert.

3.9 Lokalisierung von PK und GAPDH sowie Acrosin in Eberhodenschnitten über Fluoreszenzmarkierung

Für die Lokalisierung von Proteinen in Gewebeschnitten ist eine bestmögliche Gewebeerhaltung und Antigenimmobilisierung bei gleichzeitiger Erhaltung und Antikörperzugänglichkeit der Antigene/Epitope anzustreben. Die Lokalisierung von PK, GAPDH und Acrosin über Fluoreszenzmarkierung wurde an unterschiedlich vor- bzw. nachbehandelten Eberhodenschnitten versucht. Kryostatschnitte wurden aus unfixiertem und mit 3% PFA fixiertem (2 h) Hodengewebe angefertigt. Außerdem wurden Schnitte aus unfixiertem Gewebe nachträglich auf dem Deckgläschen fixiert und/oder permeabilisiert. Hierzu wurden die organischen Lösungsmittel Methanol und Aceton, der Kreuzvernetzer PFA sowie das Detergenz Triton X-100 eingesetzt. Zur besseren Haftung der Schnitte wurden zusätzlich Deckgläschen verwendet, die mit Poly-L-Lysin beschichtet waren.

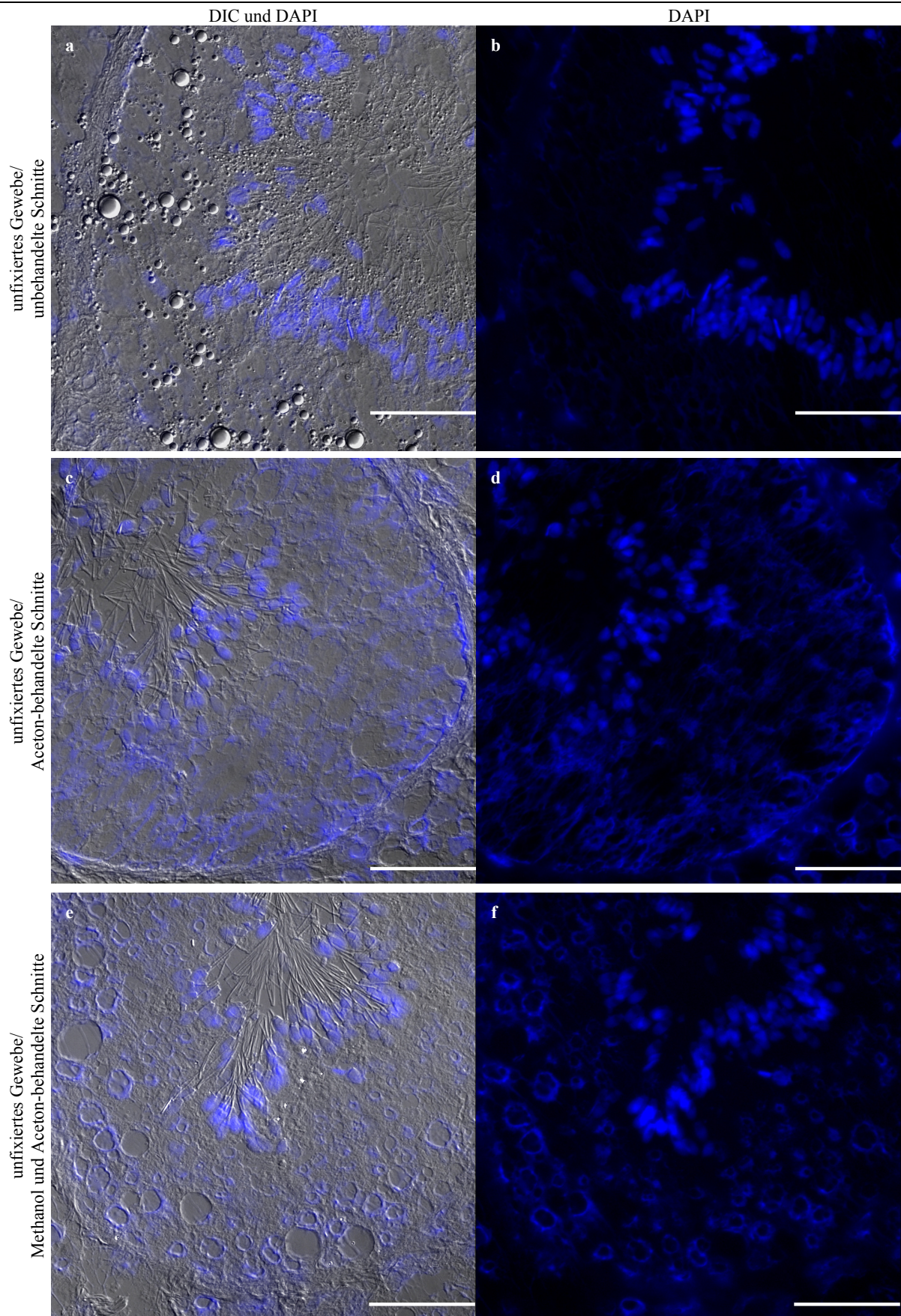


Abbildung 44: Gewebeerhaltung von fluoreszenzmarkierten Eberhodenschnitten nach unterschiedlicher Vorbehandlung

Unfixierte (a-j) und in 3% PFA fixierte (k,l) Hodenparenchymwürfel wurden gefroren und bei -20°C geschnitten. Die $10\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen aufgenommen, getrocknet und unfixierte Schnitte teilweise nachfixiert und/oder permeabilisiert (c-j). Sie wurden dann zur Fluoreszenzmarkierung verschiedener Proteine eingesetzt. Hierbei wurde der Lösung mit den Sekundäntikörpern DAPI zur Anfärbung der Zellkerne beigemischt. Es werden jeweils ein Differentialphasenkontrastbild (DIC) mit überlagertem DAPI-Fluoreszenz (a, c, e, g, i, k) sowie das DAPI-Fluoreszenzbild (b, d, f, h, j, l) gezeigt. Die DAPI-Fluoreszenzbilder wurden nachträglich in ihrem Kontrast verstärkt sowie der Tonwert linear angepasst.

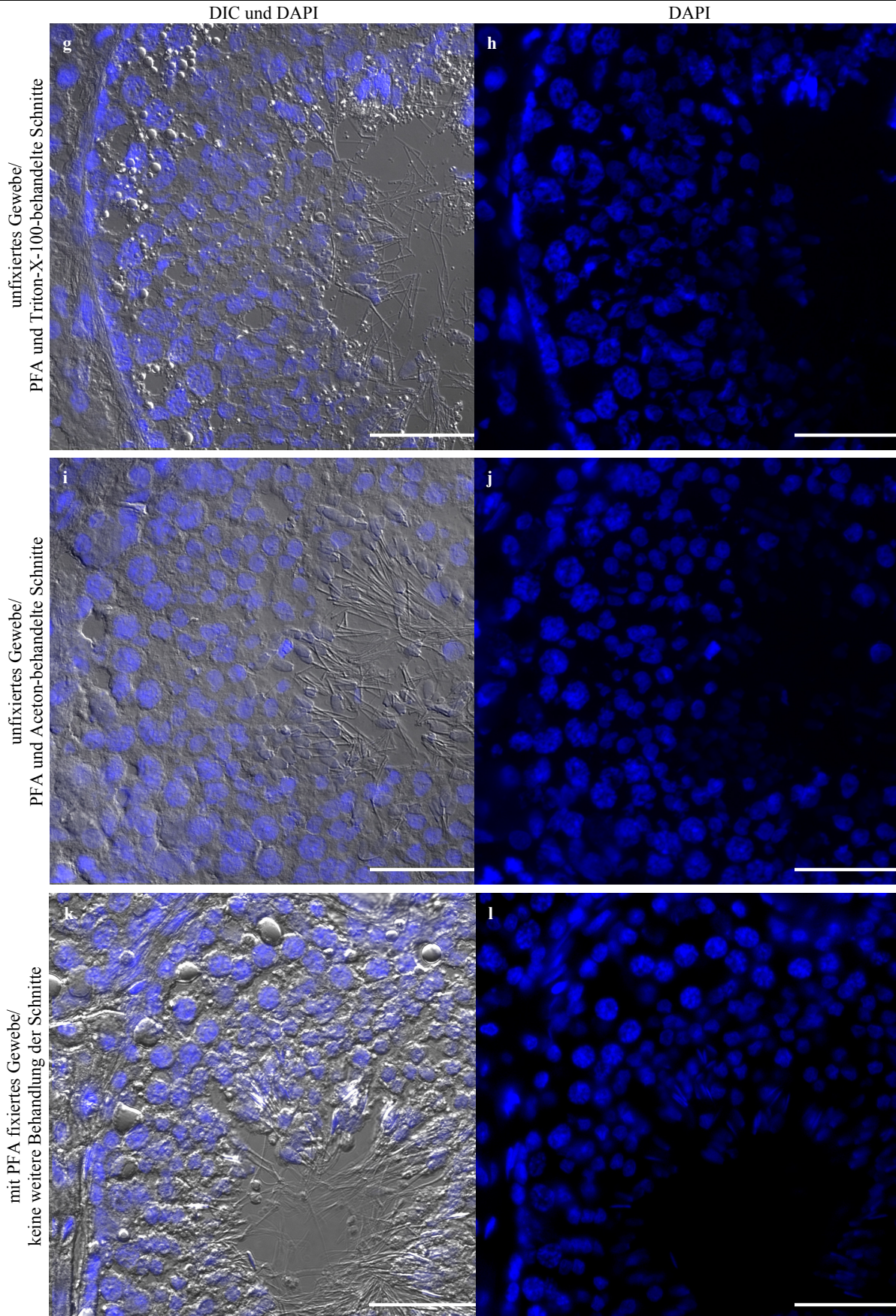


Abbildung 44 (Fszg.)

Schnitte aus unfixiertem Gewebe wurden auf dem Deckgläschen mit Hilfe von Aceton (4 min bei -20°C ; c, d), Methanol und Aceton (6 min und 1 min bei -20°C ; e, f) oder 2% PFA und Aceton (1,5 min bei RT sowie 1 min bei -20°C ; i, j) nachfixiert. Weitere unfixierte Schnitte wurden mit 2% PFA (1 min bei RT) nachfixiert und anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT; g, h). Bei den unfixierten Hodenschnitten lösten sich die meisten Zellen, mit Ausnahme der elongierten Spermatiden und der Spermien, während der Fluoreszenzmarkierung vom Deckgläschen. Organische Lösungsmittel führten schnell zum Auflösen von Zellkernen oder ganzen Zellen. Die Gewebeerhaltung nahm durch Fixierung mit PFA deutlich zu. Schnitte aus vorfixiertem Gewebe waren nach Fluoreszenzmarkierung am Besten erhalten. Maßstab: jeweils $26,2\ \mu\text{m}$

Vergleicht man die Differentialphasenkontrast(DIC)-Bilder sowie die DAPI-Fluoreszenzen der unterschiedlich vorbehandelten Eberhodenschnitte nach Fluoreszenzmarkierung (Abbildung 44), so fallen große Unterschiede in der Gewebeerhaltung auf. Bei den Schnitten aus unfixiertem Gewebe haften lediglich die elongierten Spermatiden und Spermien gut am Untergrund. Die DAPI-Anfärbung führt zu keiner deutlichen Fluoreszenz im äußeren Bereich der Hodenkanälchen sowie im Bereich zwischen den Hodenkanälchen (Abbildung 44b). Die Kerne bzw. Kernsubstanz der meisten Spermatogonien, Spermatozyten, Sertolizellen, Muskelzellen und Leydigsche Zellen sowie ein Großteil der restlichen Zellsubstanz sind vermutlich bei der Durchführung der Fluoreszenzmarkierung weggewaschen worden. Gewebereste sind im DIC-Bild noch zu sehen (Abbildung 44a). Die 4-minütige Inkubation von Schnitten aus unfixiertem Gewebe in Aceton bei -20°C führt zu keiner deutlichen Verbesserung der Gewebeerhaltung auf dem Deckgläschen. Auch hier sind nach Durchführung der Fluoreszenzmarkierung nur die elongierten Spermatiden und Spermien anscheinend komplett erhalten (Abbildung 44c). Die Kernsubstanz der umgebenden Zellen scheint durch die Behandlung mit Aceton stark verändert. So sind, besonders im Bereich der runden Spermatiden, der Spermatozyten, Spermatogonien und Sertolizellen, keine klar definierten Kernbereiche zu erkennen. Anstatt dessen werden aufgelockerte, teils netzartige bzw. fädige Strukturen durch das DAPI fluoreszenzmarkiert. Die Kerne der Leydigschen Zellen waren nach der Acetonbehandlung nicht vollständig herausgelöst. Die äußere Kernsubstanz ist zum Teil vorort erhalten, so dass eine ringartige Fluoreszenzmarkierung ihre Lage anzeigt (Abbildung 44d). Abgesehen von den Kernen ist auch bei Betrachtung des Cytoplasmas keine deutliche Verbesserung der Erhaltung durch die Fixierung mit Aceton zu erkennen (Abbildung 44c).

Die etwas weniger aggressive Fixierung der Schnitte mit Hilfe von Methanol (6 min bei -20°C) sowie kurzzeitig Aceton (1 min bei -20°C) führt augenscheinlich zu einer verbesserten Gewebeerhaltung. Zwar sind auch hier die Zellkerne nicht vollständig erhalten, jedoch zeigt sich das Cytoplasma nicht wie zuvor diffus und verschwommen, sondern mit weitgehend klaren Konturen und relativ gleichmäßiger Oberfläche (Abbildung 44e). Mit Ausnahme der kondensierten Kerne der elongierten Spermatiden und Spermien, sind die Zellkerne zum Teil herausgelöst. Die äußere Kernsubstanz ist jedoch meist erhalten und wird mit DAPI markiert, so dass fluoreszierende ringartige Strukturen die Lage der Kerne indizieren (Abbildung 44f). Bei dem Vergleich der Bilder fällt weiterhin auf, dass unter Verwendung von Aceton zur Gewebefixierung sämtliche Tropfen (vgl. Abbildung 44a), bei welchen es sich vermutlich um Lipide handelt, herausgelöst wurden. Schnitte unfixierter und fixierter Eberhodengewebe

zeigten diese Tropfen direkt nach dem Trocknen (d.h. vor der Fluoreszenzmarkierung) hauptsächlich in der Peripherie der Hodenkanälchen (nicht dargestellt).

Der Einsatz des quervernetzenden Reagenzes PFA führt zu einer klaren Verbesserung der Gewebeerhaltung. Die Kernsubstanz der verschiedenen Zellen bleibt schon bei einminütiger Fixierung eines Eberhodenschnittes mit 2% PFA (und anschließender Permeabilisierung mit Triton X-100, 5 min bei RT) im Schnitt integriert. Die Kerne erscheinen jedoch bei dieser Vorbehandlung teilweise deformiert (Abbildung 44h). Beim Cytoplasma ist keine Verbesserung der Erhaltung im Vergleich zur Methanol-Aceton-Fixierung zu erkennen. Das Cytoplasma weist einige Löcher und Unregelmäßigkeiten auf (Abbildung 44g). Die doppelte Fixierung mit 2% PFA (1,5 min bei RT) und anschließend Aceton (1 min bei -20°C) lieferte eine bessere Gewebeerhaltung nach der Fluoreszenzmarkierung. Die Oberfläche ist augenscheinlich eben. Neben den elongierten Spermatiden und Spermien sind auch die Zellkerne und das Zytoplasma der anderen Zellen im Gewebeschnitt gut erhalten (Abbildung 44i und j). Die zweistündige Fixierung eines frischen Gewebewürfels in 3% PFA mit anschließender Überführung des Würfels von 10%iger nach 30%iger Saccharoselösung vor dem Einfrieren führte zu der besten Gewebekonservierung. Das geschnittene Gewebe zeigt klare Strukturen, Zellen und Zellkerne besitzen eine klar definierte Form. Auch die Residualkörper sowie (Lipid)Tropfen in der Peripherie der Hodenkanälchen bleiben sehr gut erhalten (Abbildung 44k und l). Grundsätzlich zeigt sich bei der PFA-Fixierung, dass die kondensierten Kerne der elongierten Spermatiden und der Spermien im Vergleich deutlich schwächer markiert sind als die übrigen Zellkerne (Abbildung 44h, j und l).

Betrachtet man also nur die Gewebeerhaltung der Schnitte nach Fluoreszenzmarkierung, so sind die PFA-fixierten Schnitte, besonders die länger fixierten, den nicht oder nur mit organischen Lösungsmitteln fixierten, vorzuziehen. Aber auch die Fixierung mit Methanol und Aceton führt, mit Ausnahme der Zellkerne, zu einer akzeptablen Gewebeerhaltung.

Für die Fluoreszenzmarkierung der PK, GAPDH und des Acrosins in Eberhodenschnitten war jedoch eine Vorbehandlung zu wählen, bei welcher nicht nur das Gewebe bestmöglich erhalten war, sondern bei welcher die verwendeten Antikörper gleichzeitig ungehinderten Zugang zu ihren unveränderten Epitopen erhalten. Diese entgegengesetzten Anforderungen machten es notwendig, die Immunreaktionen der Antikörper an unterschiedlich vorbehandelten Schnitten zu prüfen. In diese Prüfung sind natürlich nur die Schnitte einzubeziehen, welche die interessierenden Strukturen zeigen. Im Allgemeinen waren die Schnitte des unfixierten Gewebes, die mit PFA-Aceton, PFA-Triton oder Methanol-Aceton behandelt wurden, für die Immunnachweise besonders geeignet. Es

war aber nicht für jeden Antikörper möglich, eine Vorbehandlung auszuwählen, bei der die Antigene an allen Zellstrukturen gleichmäßig gut detektierbar waren. Deshalb war es teilweise notwendig, die Markierung an unterschiedlich vorbehandelten Schnitten zu kontrollieren, um sich ein Gesamtbild zur Lokalisierung eines bestimmten Proteins im Eberhoden zu machen. Wichtig war weiterhin das Mitführen von Kontrollen. So wurde zu jeder Markierung eines Proteins mit dem entsprechenden Primärantikörper und zugehörigem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper parallel eine Kontrollmarkierung durchgeführt, bei welcher anstelle der Primärantikörper in Blocklösung nur (PBS in) Blocklösung eingesetzt wurde. Mit Ausnahme dieser Änderung war die Behandlung der Schnitte vollständig gleich. Sämtliche Einstellungen bei der Bildaufnahme (z. B. Vergrößerung und Belichtungsdauer) sowie bei der Bearbeitung der Fluoreszenzbilder (Parameter bei der Kontrastverstärkung und der linearen Tonwertkorrektur) wurden gleich gewählt. So sollte jeweils gezeigt werden, welche Fluoreszenz durch den Primärantikörper hervorgerufen wurde und welche schon bei alleinigem Einsatz der Sekundärantikörper zu sehen war. Im Folgenden werden die Fluoreszenzmarkierungen jeweils im Vergleich mit ihren Kontrollen gezeigt.

Wie schon bei den ejakulierten Eberspermien wurden zur Lokalisierung der PK in Eberhodenschnitten verschiedene Antikörper verwendet. Zum einen wurde Anti-PK-M1 eingesetzt, zum anderen die immungereinigten Antikörper (Anti-PK-S), welche spezifisch gegen einen Sequenzabschnitt der PK-S aus Eberspermien gerichtet waren.

In Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Eberhodenschnitte kann eine Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-M1 erreicht werden. So zeigte sich bei einer Fixierung des Schnittes mit PFA und Aceton eine gleichmäßige Markierung des gesamten Gewebes (Abbildung 45a, c und e). Im Vergleich hierzu fluoreszierten in der Kontrolle lediglich die Leydigischen Zellen sowie einige Punkte im Cytoplasma der Spermiovorläuferzellen und/oder Sertolizellen deutlich (Abbildung 45b, d und f). Die leichte Markierung des Cytoplasmas innerhalb des Hodenkanälchens sowie der es umgebenden Lamina propria kann also auf die Primärantikörper zurückgeführt werden. Bei der etwas kürzeren Fixierung mit 2% PFA (1 min) und anschließenden Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 (5 min) kann kein Unterschied in der Fluoreszenz zwischen Markierung und Kontrolle gesehen werden (Abbildung 46). Auch hier fluoreszieren die Leydigischen Zellen und Areale im Cytoplasma der Spermiovorläuferzellen und/oder Sertolizellen. Der deutlichste Unterschied zwischen der Markierung mit Anti-Kaninchenmuskel-PK und der Kontrolle ohne Primärantikörper ist bei Schnitten zu beobachten, welche mit Methanol und Aceton fixiert wurden (Abbildung 47). Neben den wie zuvor auch in der Kontrolle markierten Bereichen, werden hier deutlich die

gesamten Spermatiden-/Spermienflagellen sowie die Bereiche um die kondensierten Kerne der elongierten Spermatiden herum markiert. Ebenso wird die Lamina propria, welche das Hodenkanälchen nach außen hin abschließt, markiert. Auch das Cytoplasma im Bereich der Spermatogonien, Spermatozyten, runden Spermatiden und evtl. Sertolizellen zeigt leichte Fluoreszenz (Abbildung 47a, c und e).

Mit Anti-PK-S konzentriert sich die hervorgerufene Fluoreszenz sowohl bei PFA-Aceton- (Abbildung 48) als auch bei PFA-Triton- (Abbildung 49) und bei Methanol-Aceton- (Abbildung 50) vorbehandelten Schnitten auf den luminalen Bereich des Hodenkanälchens. An den mit PFA und Aceton fixierten Schnitten wird der Bereich um die elongierten Spermatiden, wobei es sich wahrscheinlich um Cytoplasma und Residualkörper handelt, flächig sowie deren Flagellen undeutlich markiert (Abbildung 48a, c und e). Die Leydigschen Zellen fluoreszieren sowohl bei der Markierung mit, als auch ohne Primärantikörper deutlich. Während die Fluoreszenzmarkierung bei PFA-Aceton-fixierten Schnitten nicht ganz eindeutig auf bestimmte Strukturen zurückgeführt werden kann und insgesamt körnig erscheint, ist die Fluoreszenz bei PFA-Triton- sowie Methanol-Aceton-vorbehandelten Schnitte klar den Flagellen sowie dem Bereich um die kondensierten Kerne der elongierten Spermatiden zuzuordnen. Im Bereich der Spermatogonien, Spermatozyten und Sertolizellen zeigt sich eine verhältnismäßig nur sehr schwache Fluoreszenz. Die Lamina propria fluoresziert nicht oder vernachlässigbar schwach (Abbildung 49 und Abbildung 50).

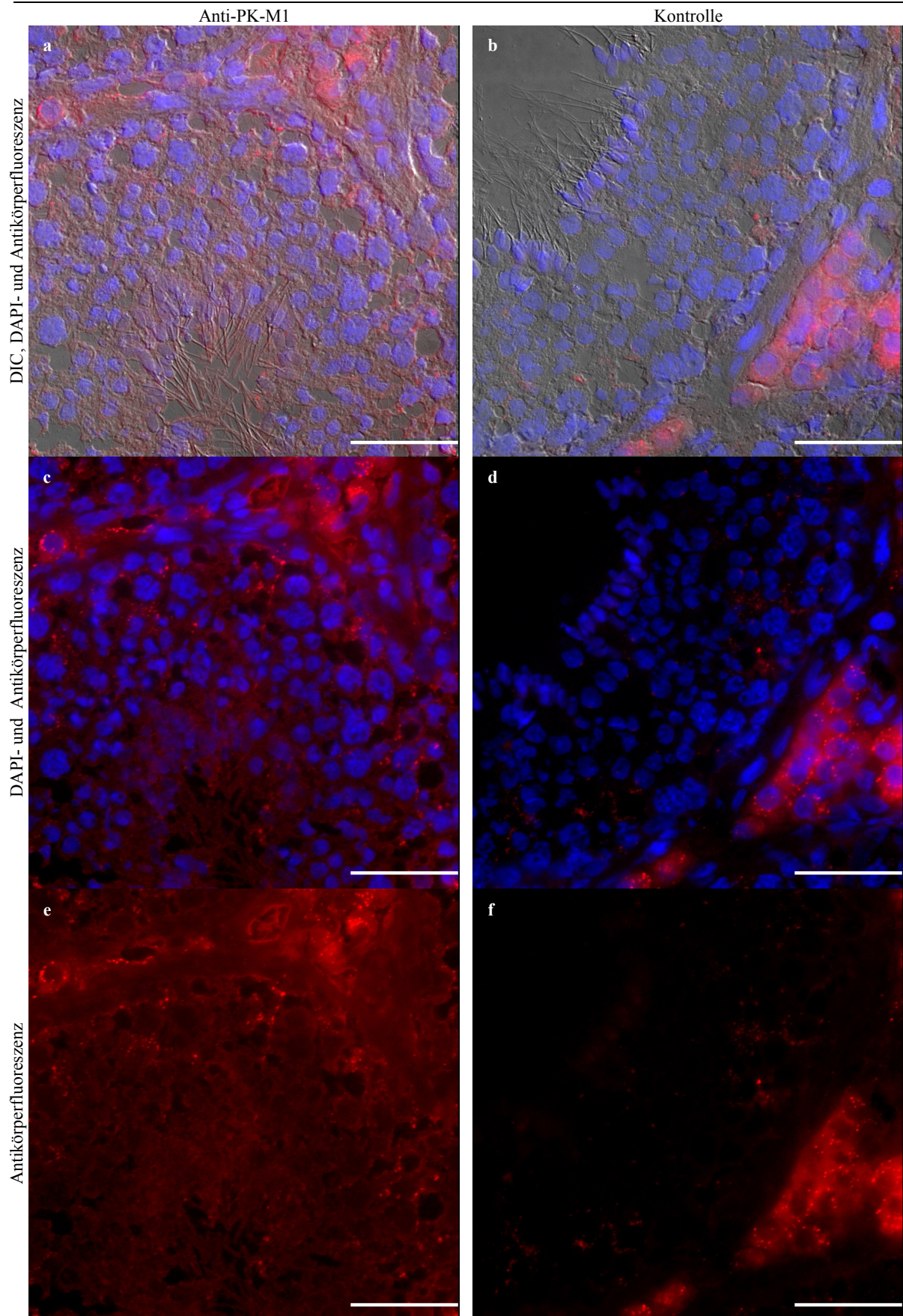


Abbildung 45: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Aceton

Ein 10 µm dicker Kryostatschnitt aus unfixiertem Eberhodengewebe wurde auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen getrocknet sowie mit 2% PFA und Aceton (1,5 min bei RT und 1 min bei -20°C) fixiert. Anschließend wurde die Markierung gemäß Protokoll (Unterabschnitt 2.16.2.7) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils ein übereinandergelagertes Bild aus dem DIC-Bild und den Bildern mit DAPI- und Antikörperfluoreszenz (a, b) sowie ein Bild mit den übereinandergelagerten Fluoreszenzen (DAPI- und Antikörper-; c, d) und das Antikörperfluoreszenzbild (e, f) für die Proteinmarkierung (a, c, e) sowie die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper (b, d, f). Für die Markierung wurden 1:10000 verdünnte Anti-PK-M1 sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Ziegen-IgG) eingesetzt. Maßstab: jeweils 26 µm

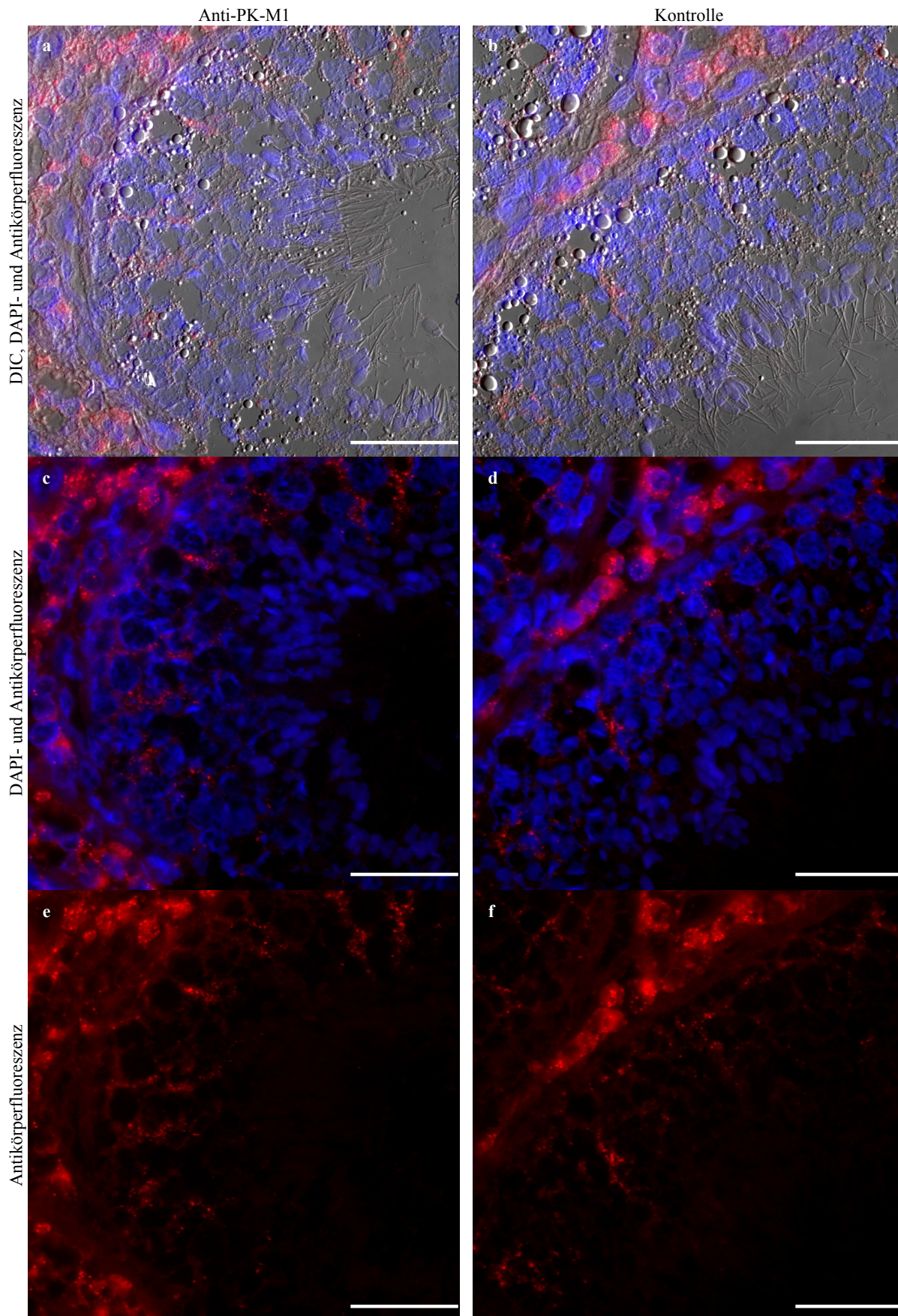


Abbildung 46: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA fixiert (1 min bei RT) sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). Die Bilder a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-M1 ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 45), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μ m

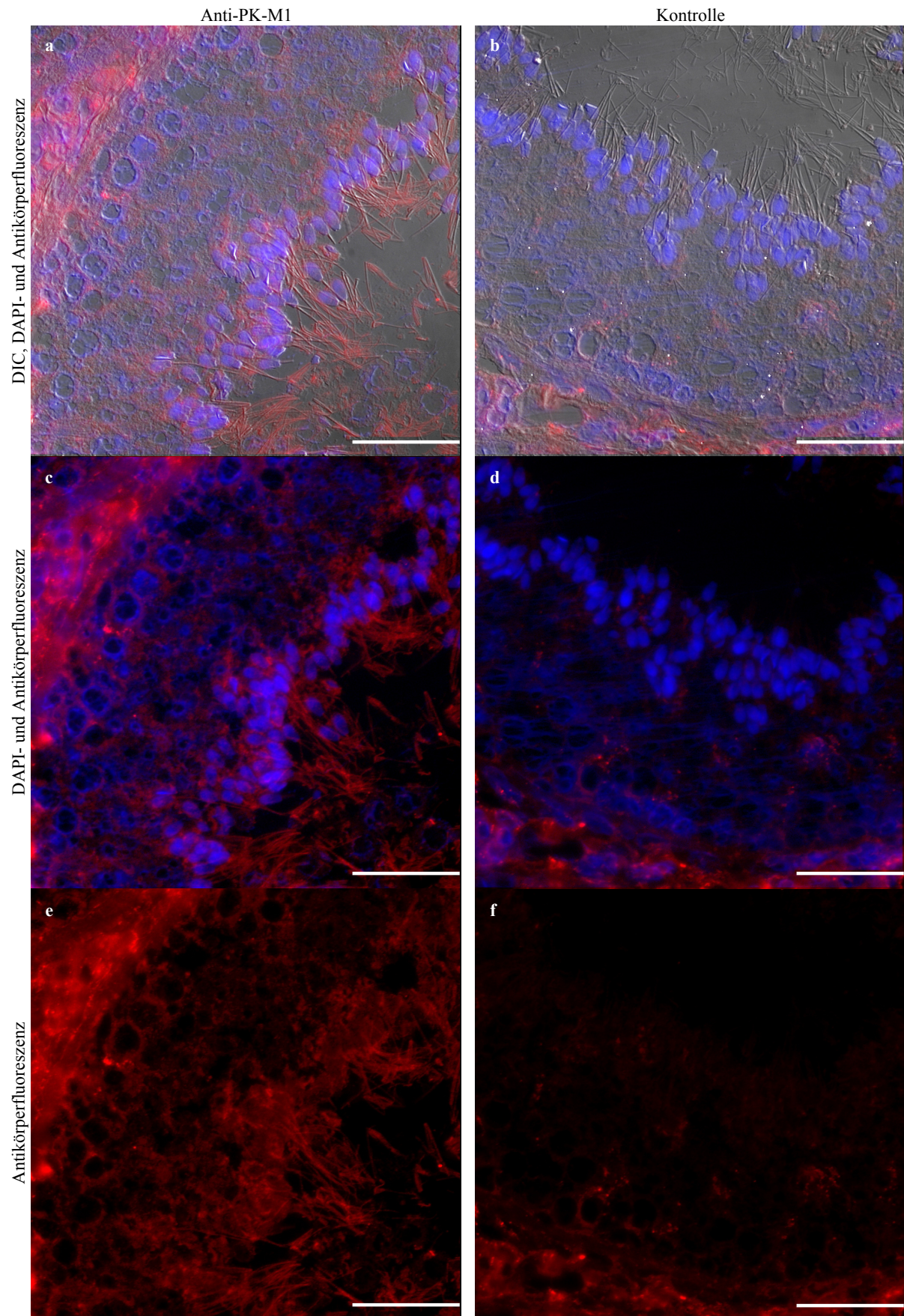


Abbildung 47: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit Methanol und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit Methanol und Aceton fixiert (6 min und 1 min bei -20°C). Die Bilder a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-M1 ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 45), die zugehörige Kontrolle ohne Primäantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μm

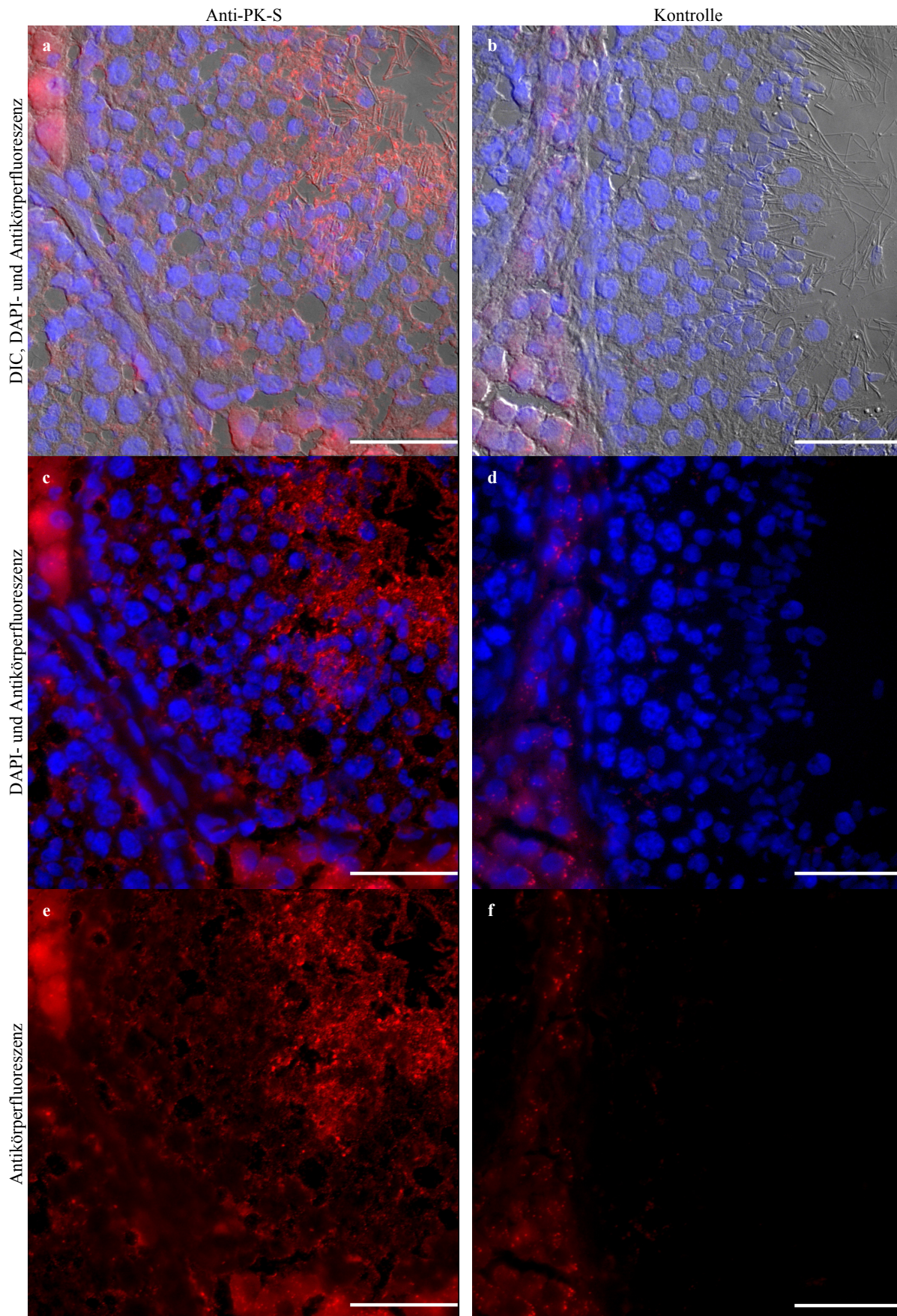


Abbildung 48: Fluoreszenzmarkierung mit immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA und Aceton fixiert (1,5 min bei RT und 1 min bei -20°C). Die Bilder a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Für die Markierung (a, c, e) wurden 1:5 verdünnte Anti-PK-S sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Die Kontrolle ohne Primäntikörper ist in b, d und f gezeigt. Maßstab: jeweils 26 μm

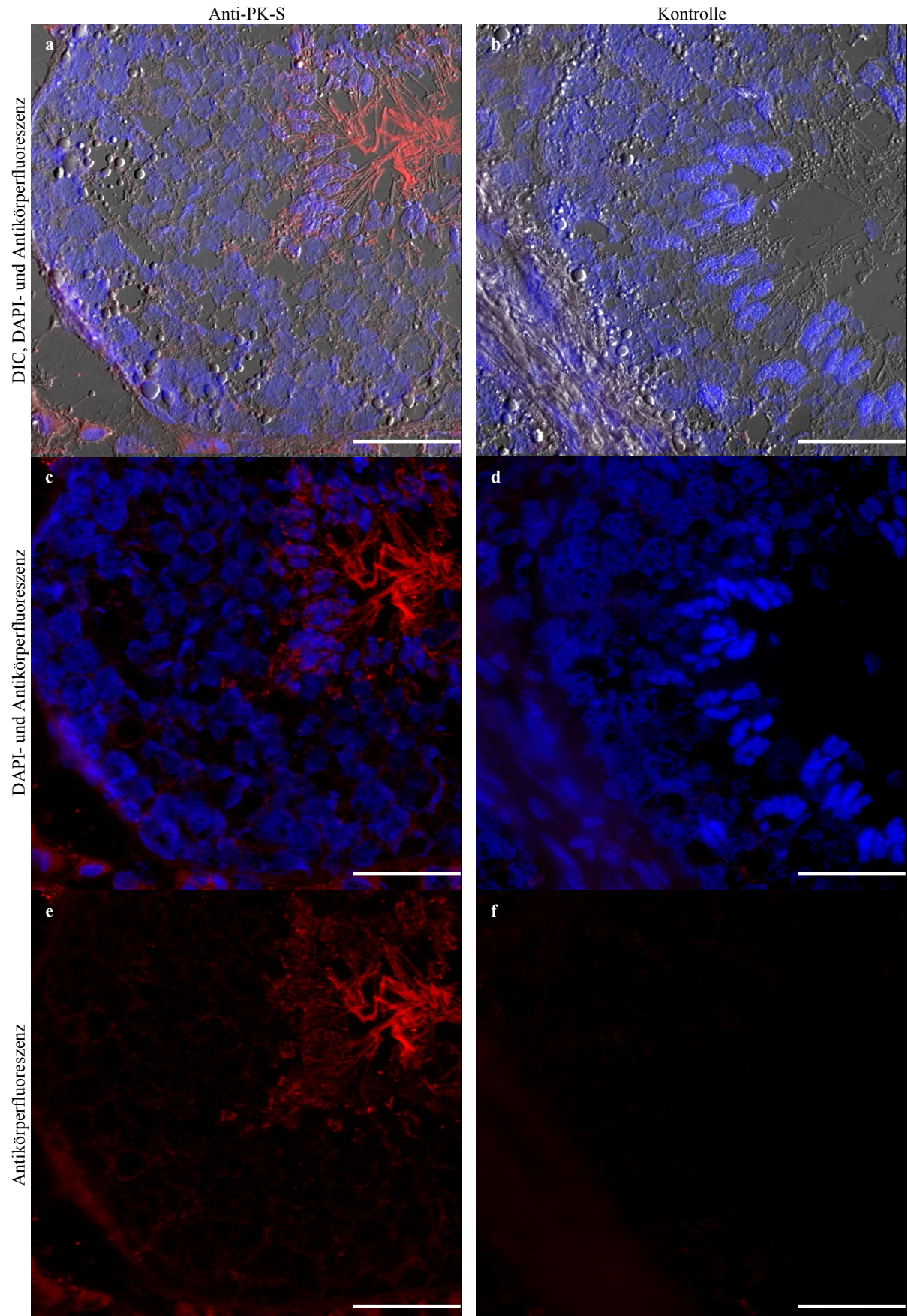


Abbildung 49: Fluoreszenzmarkierung mit immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA fixiert (1 min bei RT) sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-S ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 48), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μ m

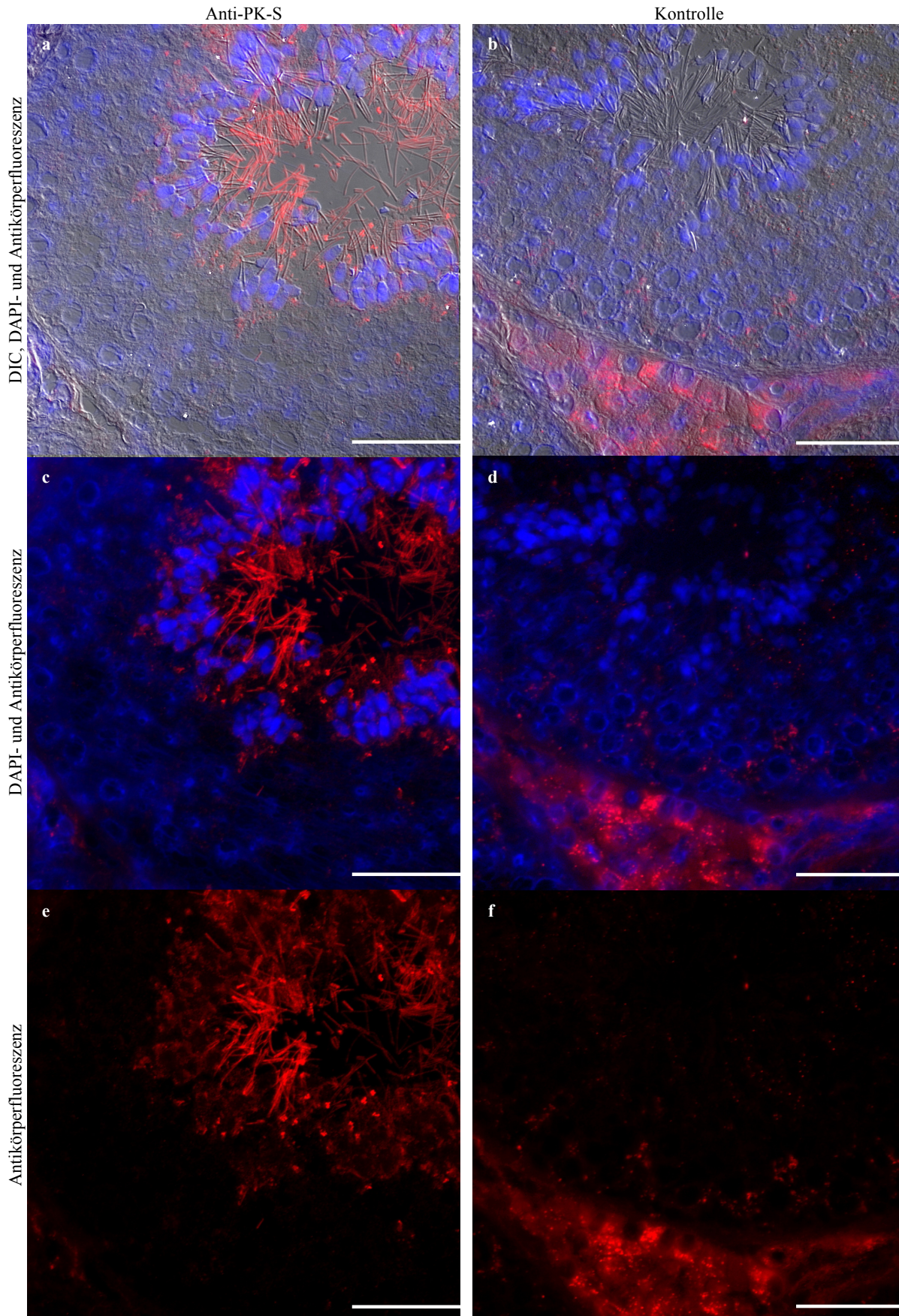


Abbildung 50: Fluoreszenzmarkierung mit immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit Methanol und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit Methanol und Aceton fixiert (6 min und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-S ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 48), die zugehörige Kontrolle ohne Primäantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils $26,2\ \mu\text{m}$ (a, c, e) bzw. $26\ \mu\text{m}$ (b, d, f)

Auch die GAPDH sollte mit Hilfe verschiedener Antikörper in Eberhodenschnitten lokalisiert werden. Es wurden monoklonale Antikörper gegen Kaninchenmuskel-GAPDH sowie Anti-GAPDH-S eingesetzt.

Mit den Antikörpern gegen die somatische GAPDH wurde bei PFA-Aceton-fixierten Schnitten eine gleichmäßige Fluoreszenzmarkierung des gesamten Cytoplasmas im Hodenkanälchen bewirkt. Auch hier fluoreszierten die Leydigischen Zellen, jedoch etwas stärker als in der Kontrolle. Die Lamina propria wurde aber, entgegen der Erwartung, nicht eindeutig markiert (Abbildung 51). An den Hodenschnitten, die vor der Fluoreszenzmarkierung mit PFA und Triton behandelt worden waren, zeigte sich das verbliebene Cytoplasma im Hodenkanälchen, wie zuvor, fluoreszierend. Die elongierten Spermatozoen und hier besonders die Flagellen waren deutlich markiert. Anscheinend wurde das Mittelstück am stärksten markiert. Auch die Lamina propria zeigte, im Gegensatz zu der in der Kontrolle, Fluoreszenz. Die Leydigischen Zellen sowie das angeschnittene Bindegewebe fluoreszierten bei der Markierung mit den Primärantikörpern stärker als bei der ohne (Abbildung 52). Wie schon die Antikörper gegen die somatische PK (Anti-PK-M1), lieferten auch die gegen die somatische GAPDH (Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH) eine deutliche Fluoreszenzmarkierung an Methanol-Aceton-fixierten Schnitten (Abbildung 53). Die Lamina propria wurde hier sehr stark markiert, während sie in der Kontrolle nahezu keine Fluoreszenz zeigte. Auch das Cytoplasma im äußeren Bereich des Hodenkanälchens, d.h. im Bereich der Spermatozoen und Spermatozoen, war stark markiert. Zum Lumen hin wird die Markierung etwas schwächer. Aber auch im Bereich der elongierten Spermatozoen und speziell der Flagellen ist noch eine deutliche Fluoreszenzmarkierung zu erkennen. Da sich in der Kontrolle innerhalb des Hodenkanälchens keine Fluoreszenz zeigte, kann die Markierung auf die Primärantikörper zurückgeführt werden.

Beim Einsatz von Anti-GAPDH-S zur Fluoreszenzmarkierung zeigte sich, wie bei der PK-S, eine deutliche Fluoreszenz im luminalen Bereich der Hodenkanälchen. Hierbei war es gleichgültig, ob PFA-Aceton- (Abbildung 54), PFA-Triton- (Abbildung 55) oder Methanol-Aceton- (Abbildung 56) vorbehandelte Schnitte verwendet wurden. Während in den Kontrollen, wenn überhaupt, nur eine leichte Fluoreszenz der Leydigischen Zellen zu beobachten war, fluoreszierten die Flagellen der elongierten Spermatozoen und der Spermien bei Verwendung der Primärantikörper eindeutig und stark. Auch im Bereich um die kondensierten Kerne der elongierten Spermatozoen und der Spermien war eine deutliche Markierung zu erkennen. Diese konnte teilweise klar dem Akrosombereich der Spermien zugeordnet werden. Die Bilder der PFA-Aceton-fixierten Schnitte deuten zusätzlich darauf hin, dass auch Cytoplasma von Spermatozoen durch das Antiserum fluoreszenzmarkiert wurde (Abbildung 54a, c und e).

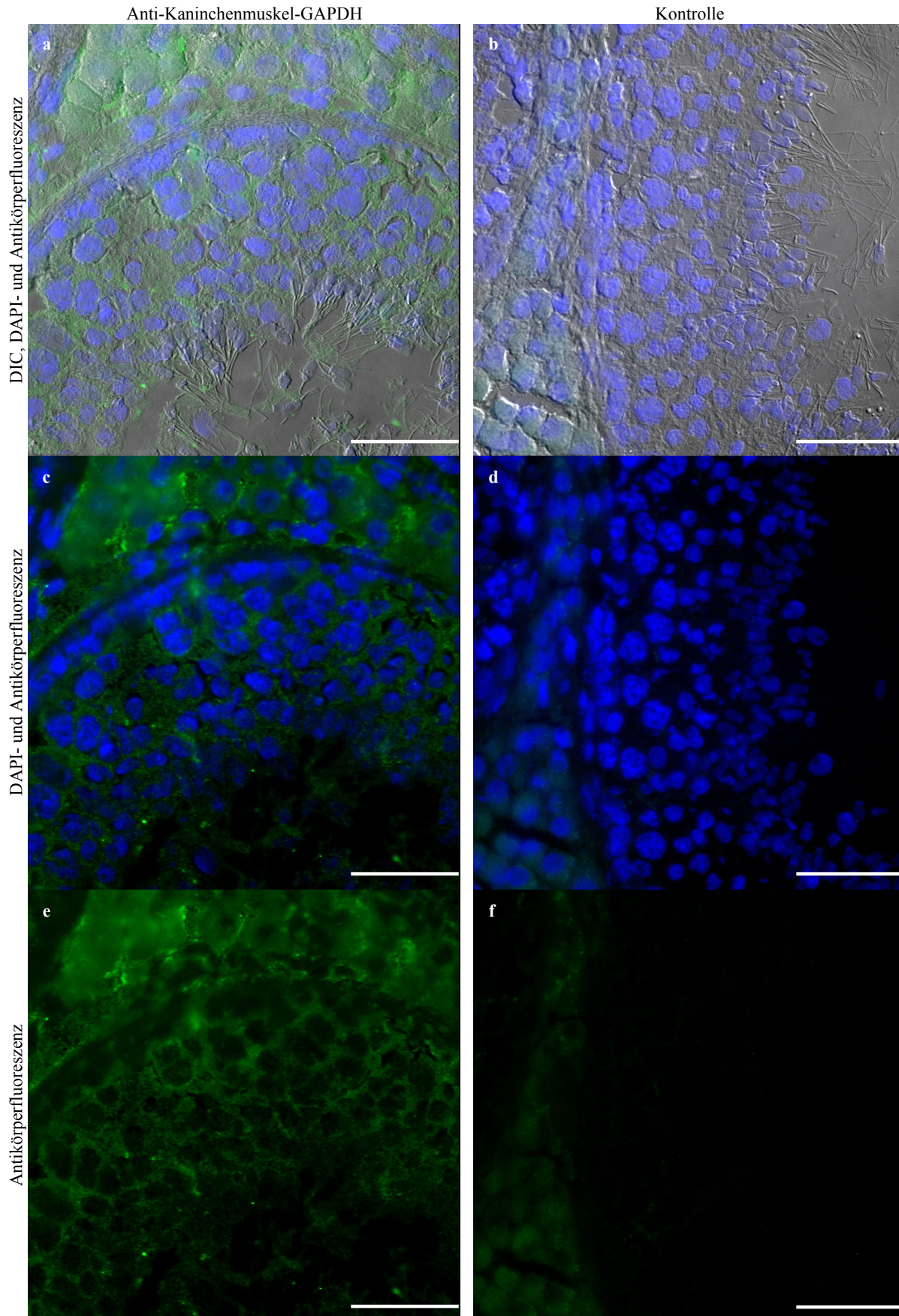


Abbildung 51: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen somatische GAPDH (Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA und Aceton fixiert (1,5 min bei RT und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Für die Markierung (a, c, e) wurden 1:100 verdünnte Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper (Anti-Maus-IgG) eingesetzt. Die Kontrolle ohne Primäntikörper ist in b, d und f gezeigt. Maßstab: jeweils $26\ \mu\text{m}$

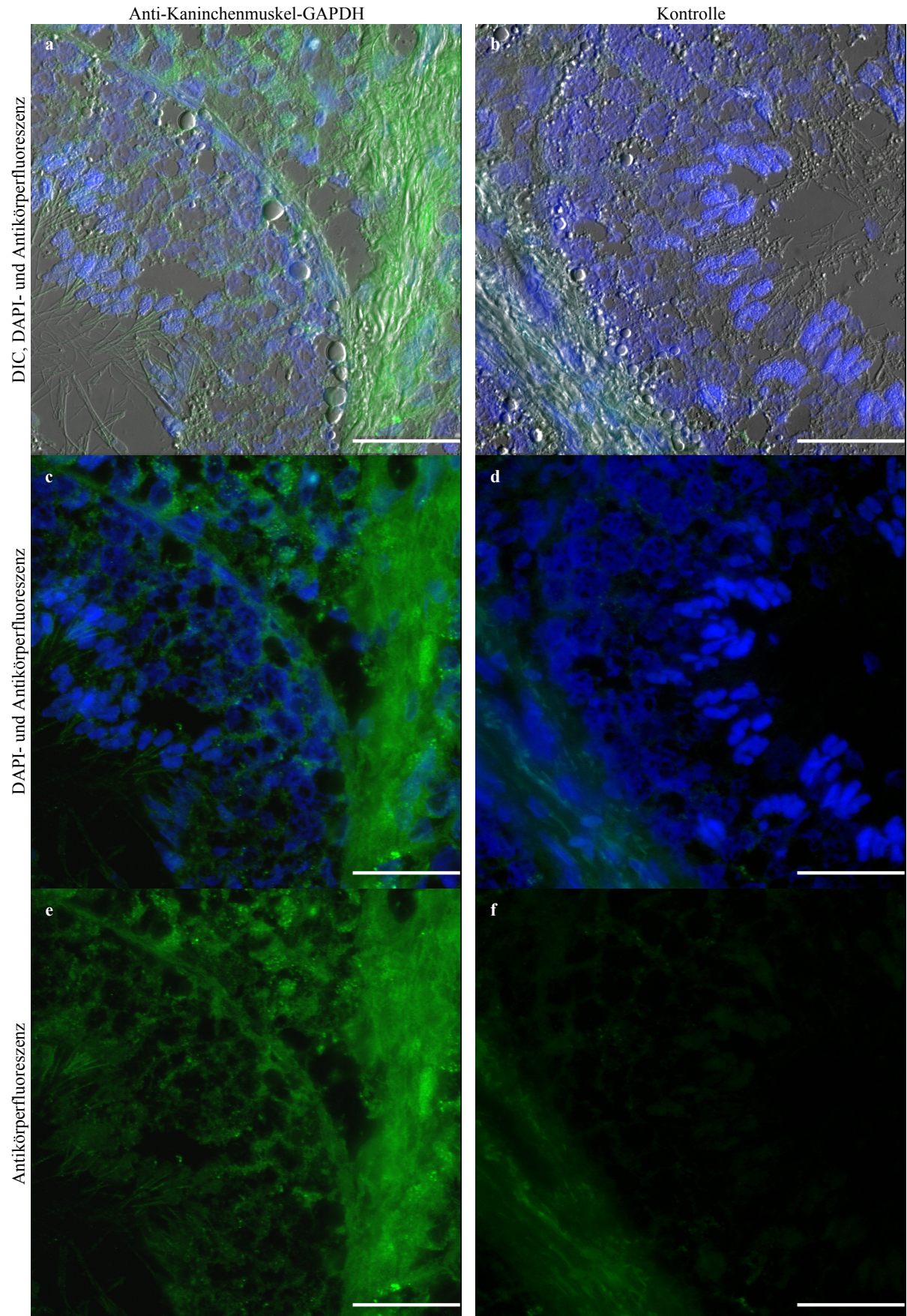


Abbildung 52: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen somatische GAPDH (Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA fixiert (1 min bei RT) sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörper-fluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 51), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μm

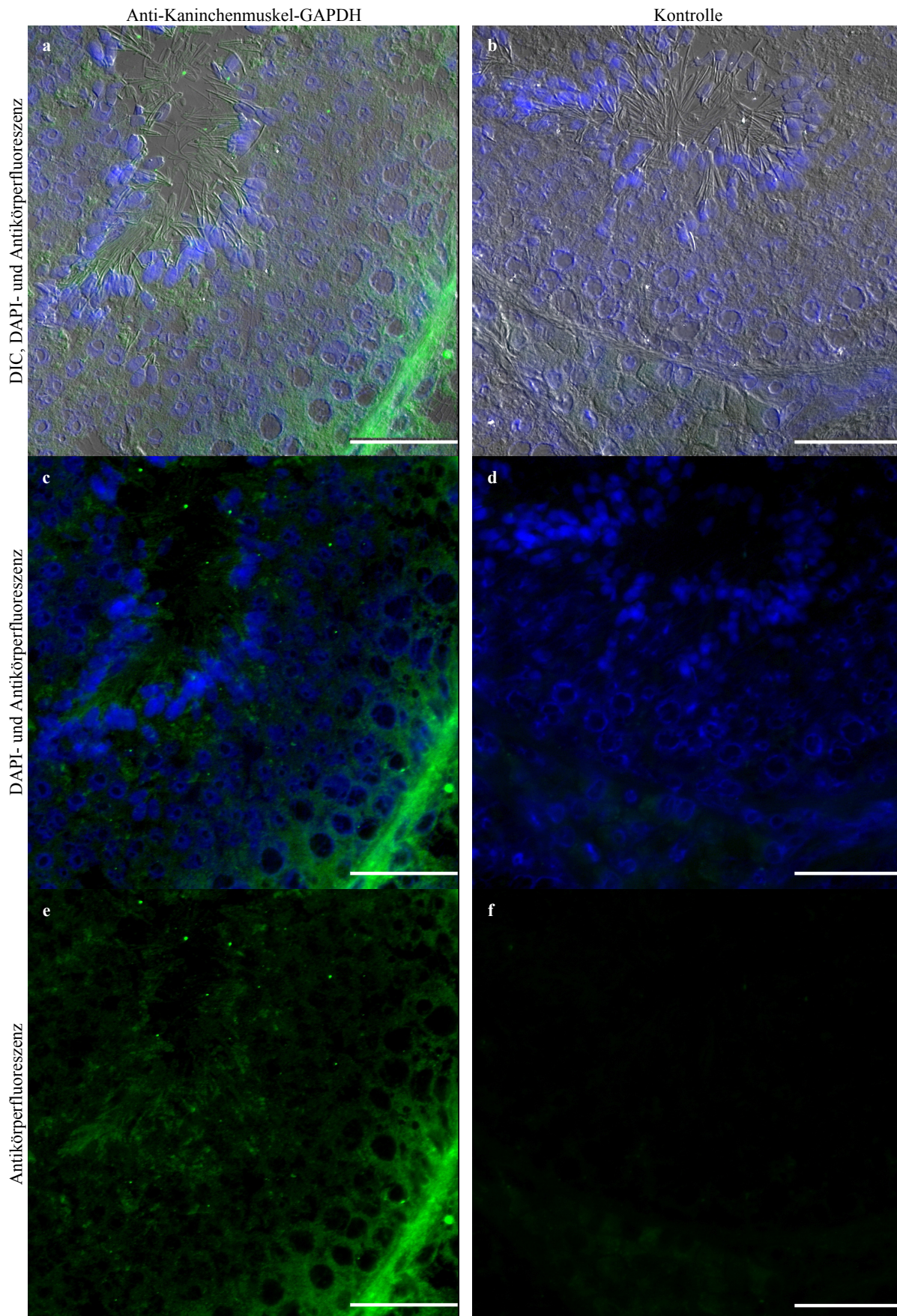


Abbildung 53: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen somatische GAPDH (Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit Methanol und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit Methanol und Aceton fixiert (6 min und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 51), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μm

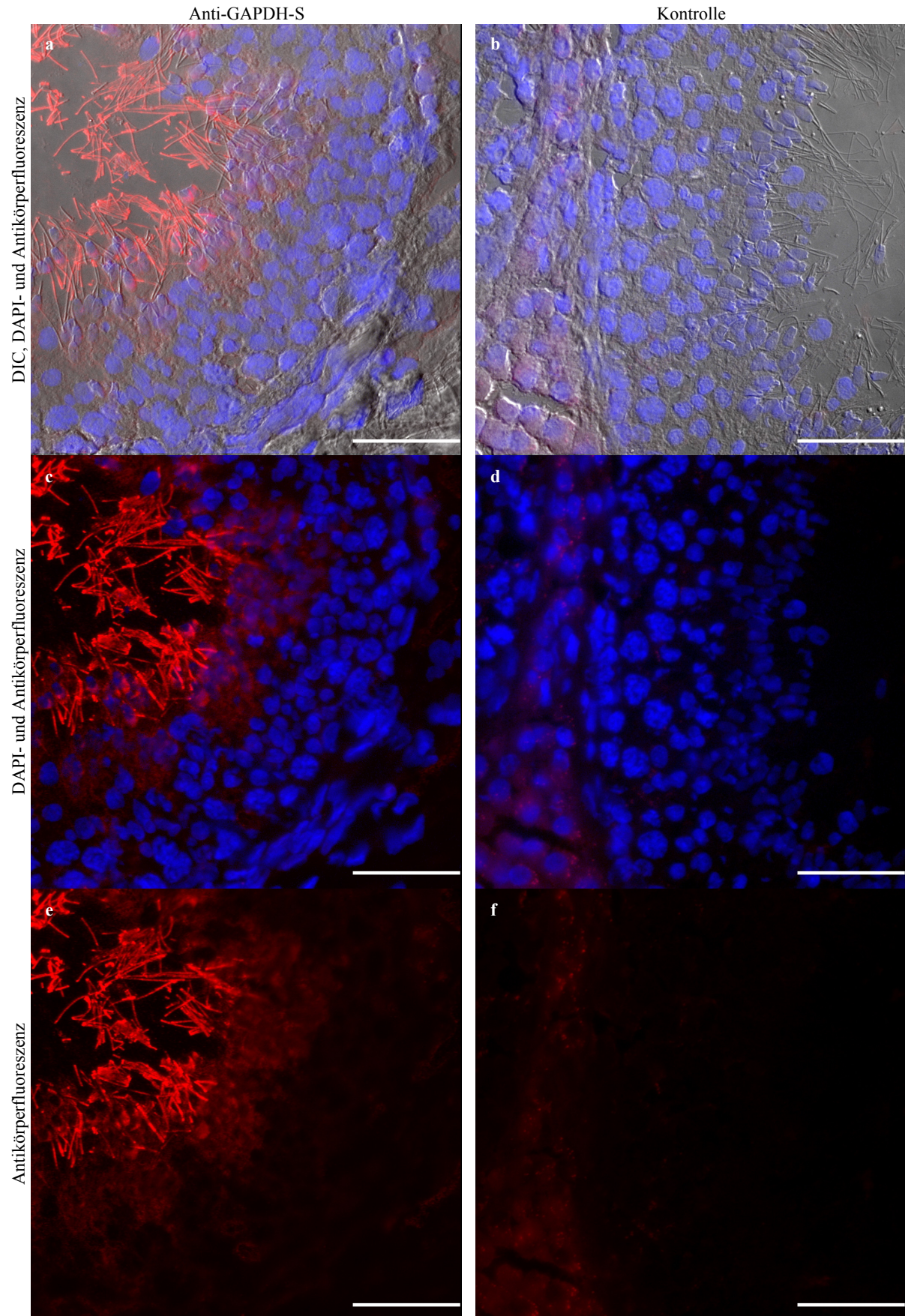


Abbildung 54: Fluoreszenzmarkierung mit Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA und Aceton fixiert (1,5 min bei RT und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Fluoreszenzbilder. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Für die Markierung (a, c, e) wurden 1:3000 verdünntes Antiserum Anti-GAPDH-S sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper (Anti-Kaninchen-IgG) eingesetzt. Die Kontrolle ohne Primäntikörper ist in b, d und f gezeigt. Maßstab: jeweils 26 µm

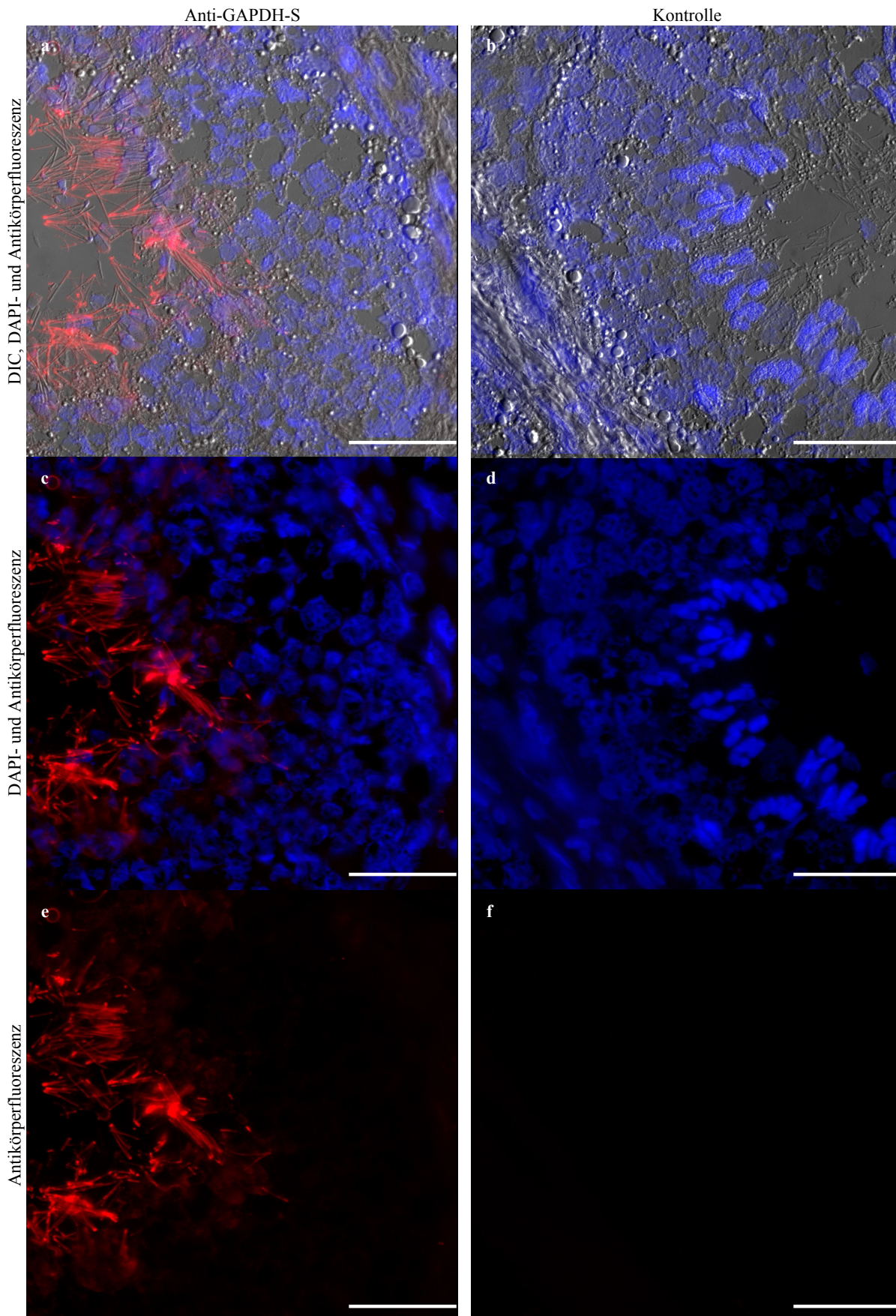


Abbildung 55: Fluoreszenzmarkierung mit Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100
 Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA fixiert (1 min bei RT) sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-GAPDH-S ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 54), die zugehörige Kontrolle ohne Primäntikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μm

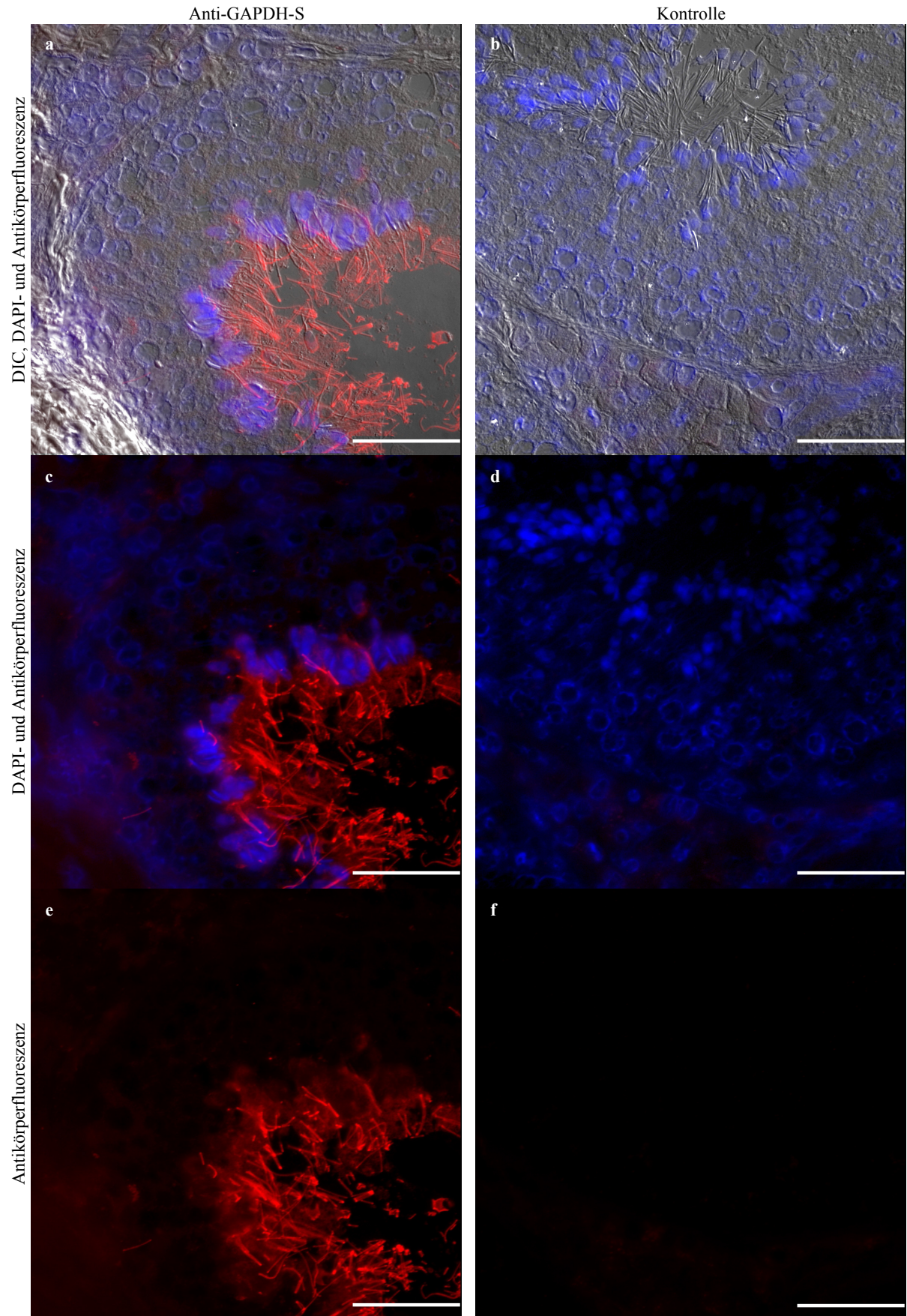


Abbildung 56: Fluoreszenzmarkierung mit Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit Methanol und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit Methanol und Aceton fixiert (6 min und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-GAPDH-S ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 54), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26 μm

Betrachtet man die Fluoreszenzmarkierungen mit den oben genannten Antikörpern an den Schnitten aus mit PFA vorfixiertem Gewebe, so sind diese durchweg sehr schwach (nicht abgebildet). Meist ist kein klarer Unterschied zwischen der Fluoreszenz der Markierung mit Primärantikörper und der Kontrolle zu erkennen. Dies ist vermutlich auf die starke Veränderung/Vernetzung des Gewebes/der Proteine zurückzuführen, welche den Antikörpern den Zugang zu ihren Antigenen/Epitopen erschwert oder auch die Epitope verändert. Eine Ausnahme bilden jedoch die Residualkörper, die sehr gut erhalten sind und vermutlich eine aufgelockere Struktur aufweisen. So sind diese die einzigen Strukturen, die teilweise sehr stark markiert wurden. Während beim Einsatz der Antikörper gegen die somatische PK und GAPDH keine Markierung der Residualkörper festgestellt werden konnte, war deren Fluoreszenz unter Verwendung der Antikörper gegen die PK-S und GAPDH-S sehr deutlich (Abbildung 57 und Abbildung 58).

Insgesamt betrachtet, zeigt die Fluoreszenzverteilung bei der Markierung von PK und GAPDH in Eberhodenschnitten ein weitgehend einheitliches Bild. Der Einsatz der Antikörper gegen die somatische PK und GAPDH führte zu einer meist gleichmäßigen Anfärbung des gesamten Cytoplasmas im Hodenkanälchen. Auch die Flagellen und der Bereich um die kondensierten Kerne der elongierten Spermatozoen und der Spermien waren deutlich markiert. Beide Antikörper lieferten die deutlichste Markierung an den mit Methanol und Aceton fixierten Schnitten. Hier wurde auch die Lamina propria mit ihren kontraktilen Zellen erwartungsgemäß klar markiert. Im Fall der Antikörper gegen die somatische GAPDH wurde außerdem eine deutlich stärkere Markierung der Leydig'schen Zellen und des Bindegewebes beobachtet.

Die Antikörper gegen die PK-S und GAPDH-S führten zu einer klaren Verschiebung der Fluoreszenz zum Tubuluslumen hin. Besonders die Flagellen der elongierten Spermatozoen und der Spermien dominierten in der Fluoreszenz. Aber auch Akrosomen und Cytoplasma um die Köpfe der elongierten Spermatozoen waren auffallend markiert. Im Gegensatz zu den eingesetzten Antikörpern gegen die somatischen Enzyme, wurden aber auch Residualkörper und/bzw. lumennahes Cytoplasma bei geeigneter Fixierung der Schnitte (PFA-vorfixiert, PFA-Triton- und/oder PFA-Aceton-behandelt) stark markiert.

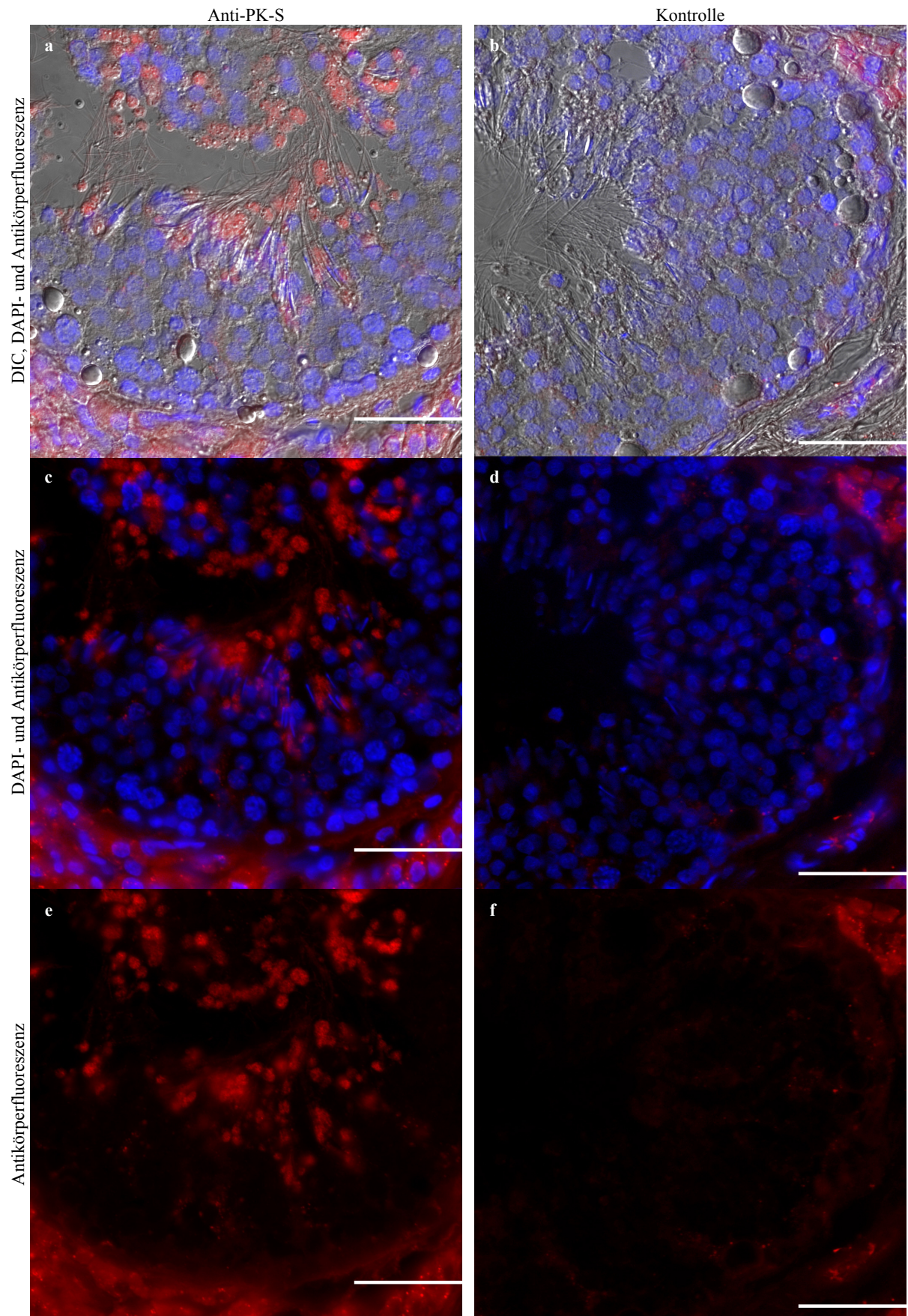


Abbildung 57: Fluoreszenzmarkierung mit immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S) an einem Schnitt aus mit PFA fixiertem Hodengewebe

10 μm dicke Kryostatschnitte aus fixiertem Eberhodengewebe (2 h in 3% PFA) wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen getrocknet. Anschließend wurde die Markierung gemäß Protokoll (Unterabschnitt 2.16.2.7) durchgeführt. a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Fluoreszenzbilder. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Markierung mit Anti-PK-S ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünungen s. Abbildung 48), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26,2 μm

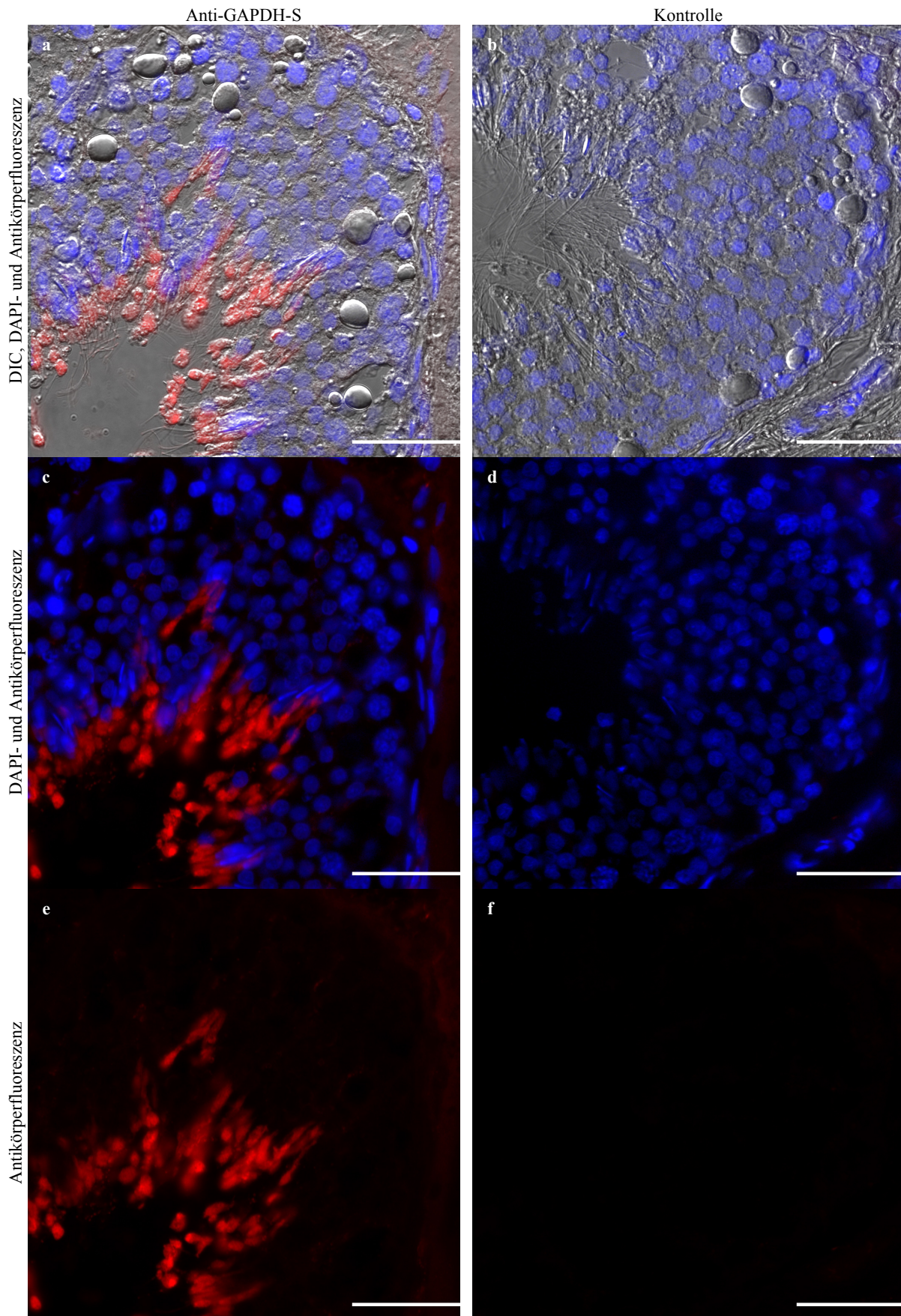


Abbildung 58: Fluoreszenzmarkierung mit Antiserum gegen die gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien (Anti-GAPDH-S) an einem Schnitt aus mit PFA fixiertem Hodengewebe

Versuchsdurchführung s. Abbildung 57. a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Fluoreszenzbilder. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-GAPDH-S ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverd. s. Abbildung 54), die zugehörige Kontrolle ohne Primäntikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 26,2 μm

Weiterhin wurde auch versucht, das Acrosin in Eberhodenschnitten zu lokalisieren. Auch hier zeigte sich, dass die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Acrosin stark von der Fixierung der Schnitte beeinflusst wird. So wurde das Akrosom an unfixierten Eberhodenschnitten nicht sowie an den mit organischen Lösungsmitteln (Aceton oder Methanol und Aceton) fixierten Schnitten nicht oder nur sehr schwach markiert. Nach kurzzeitiger Schnittfixierung mit 2% PFA [1,5 min (und 1 min Aceton) oder 1 min (und 5 min 0,1% Triton X-100)] wurden die Akrosomen hingegen deutlich markiert. Bei den Schnitten aus dem für 2 h in 3% PFA fixierten Gewebe fluoreszierten die Akrosomen nicht.

Die besten Markierungen wurden an PFA-Aceton- (Abbildung 59) und PFA-Triton- (Abbildung 60) behandelten Schnitten erzielt. Hier fällt sofort die deutliche Fluoreszenz im Bereich der Akrosomen auf. Aber auch im Bereich der Spermatiden sind klar definierte punktförmige Markierungen zu verzeichnen. Anscheinend fluoresziert hier ein Areal pro Zelle. Alle übrigen Zellen sowie die Kontrollen zeigen keine Fluoreszenz. Bei den Fluoreszenzbildern der PFA-Triton-behandelte Schnitte fällt zusätzlich auf, dass an der Akrosomoberfläche regelmäßig kleine Punkte fluoreszieren. Zudem ist hier im Übergangsbereich zwischen Spermienkopf und -flagellum jeweils ein Punkt schwach markiert (Abbildung 60a, c und e). Diese Markierung im Übergangsbereich wurde auch an anders vorbehandelten Schnitten beobachtet. Bei Methanol-Aceton-fixierten (Abbildung 61), aber auch bei unfixierten und Aceton fixierten (nicht abgebildet) Hodenschnitten trat diese Fluoreszenzmarkierung auf.

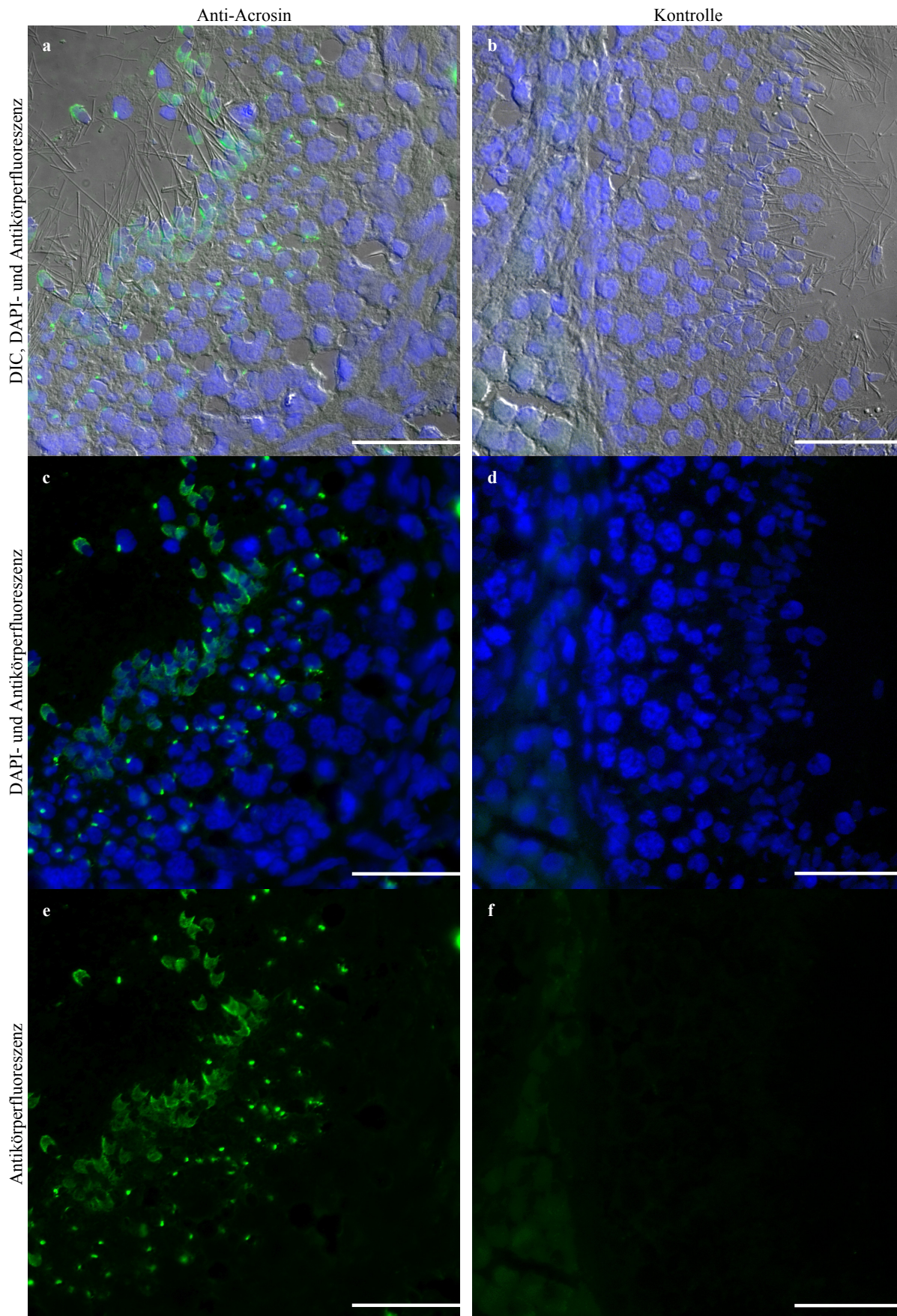


Abbildung 59: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Acrosin (Anti-Acrosin) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA und Aceton fixiert (1,5 min bei RT und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Fluoreszenzbilder. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Für die Markierung (a, c, e) wurden 1:67 verdünntes Anti-Acrosin sowie 1:400 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper (Anti-Maus-IgG) eingesetzt. Die Kontrolle ohne Primäntikörper ist in b, d und f gezeigt. Maßstab: jeweils $26,2\ \mu\text{m}$ (a, c, e) bzw. $26\ \mu\text{m}$ (b, d, f)

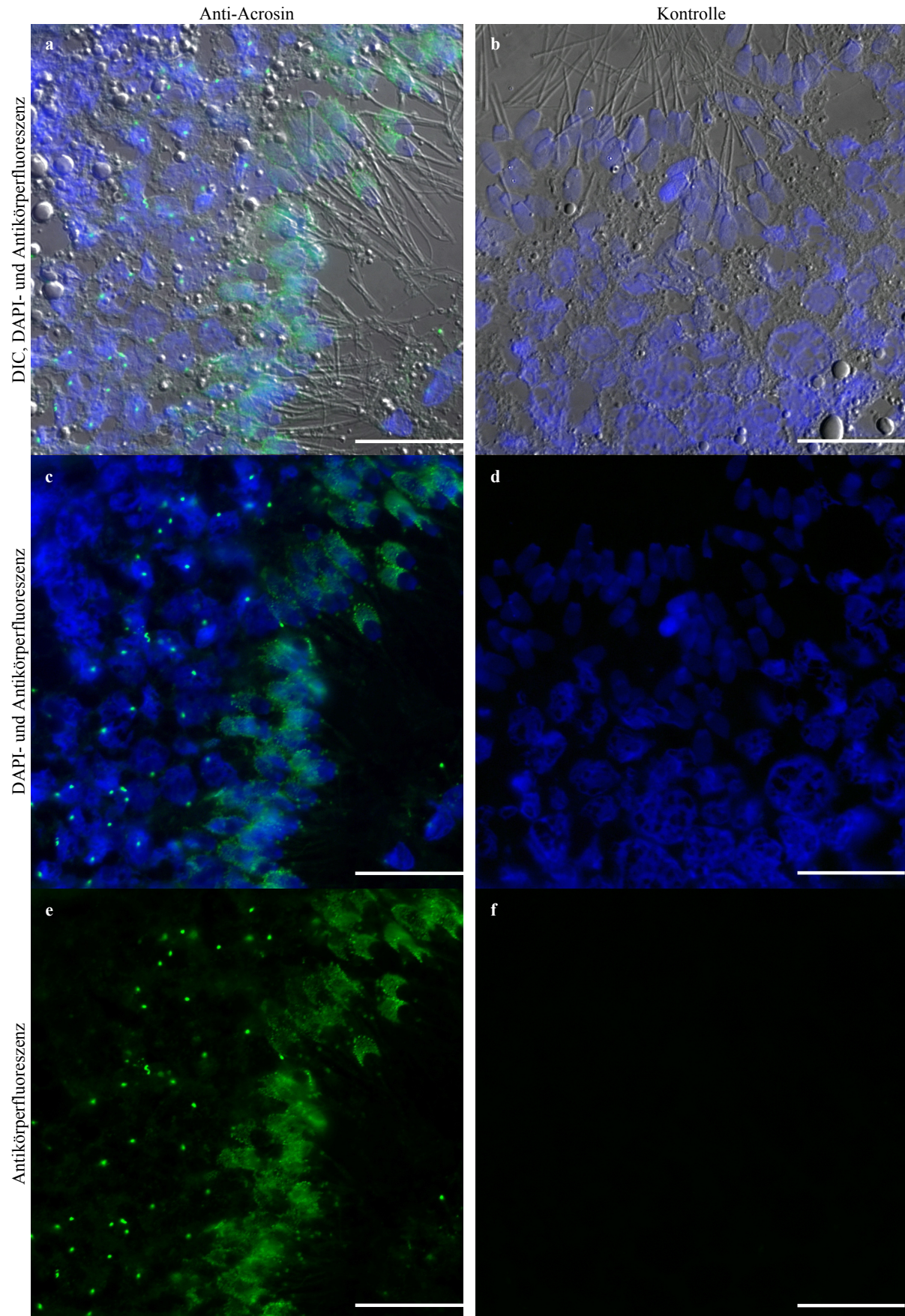


Abbildung 60: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Acrosin (Anti-Acrosin) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit 2% PFA fixiert (1 min bei RT) sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min bei RT). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Acrosin ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 59), die zugehörige Kontrolle ohne Primäntikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils 16,5 μm (a, c, e) bzw. 16,4 μm (b, d, f)

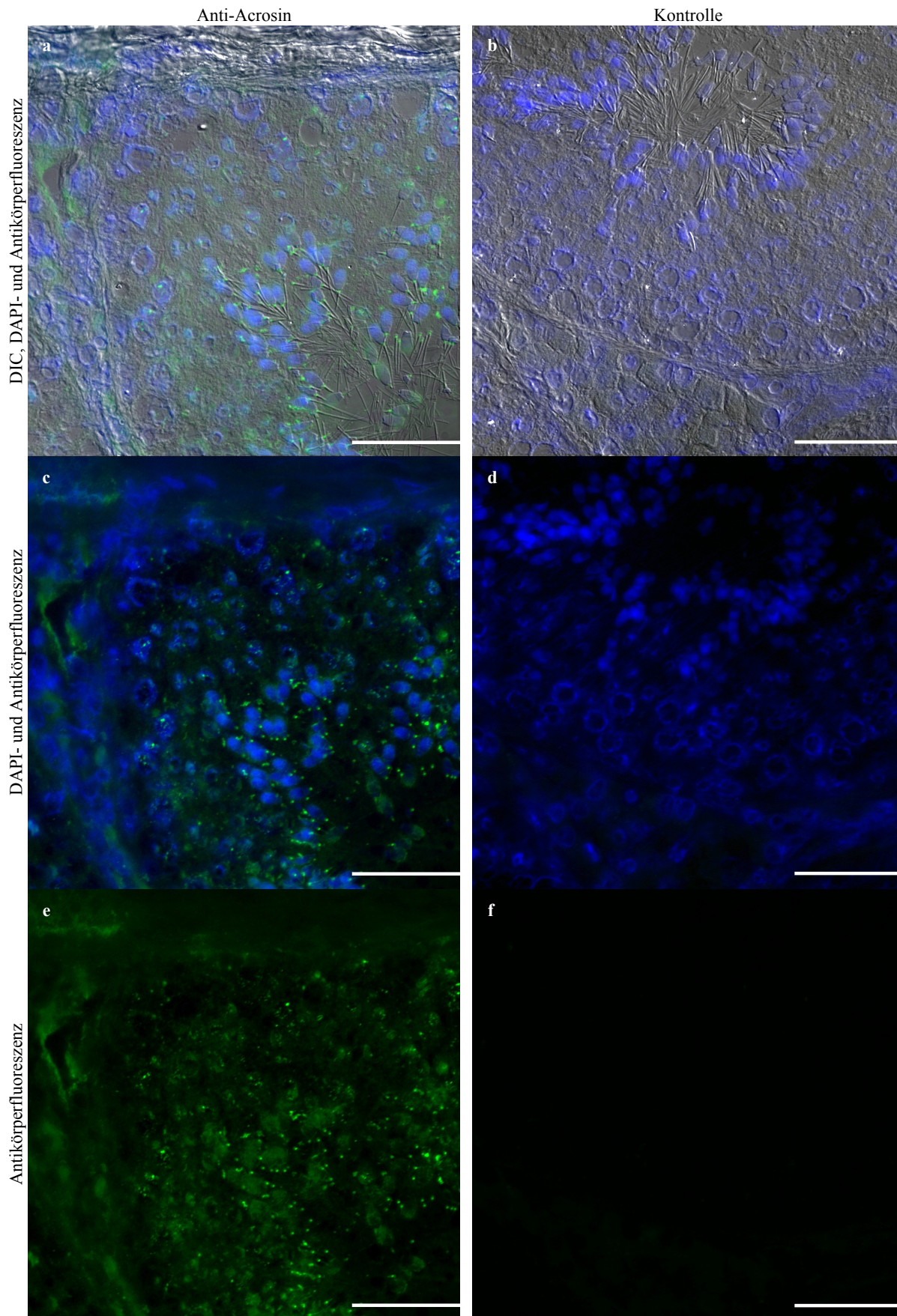


Abbildung 61: Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Acrosin (Anti-Acrosin) an einem Hodenschnitt nach dessen Fixierung mit Methanol und Aceton

Versuchsdurchführung s. Abbildung 45. Der getrocknete Schnitt wurde mit Methanol und Aceton fixiert (6 min und 1 min bei -20°C). a und b zeigen DIC-Bilder kombiniert mit den zugehörigen Fluoreszenzbildern (DAPI- und Antikörper-), c und d die übereinandergelagerten Bilder der Fluoreszenzen. In e und f sind die Antikörperfluoreszenzbilder separat gezeigt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Acrosin ist in a, c und e gezeigt (Antikörperverdünnungen s. Abbildung 59), die zugehörige Kontrolle ohne Primärantikörper in b, d und f. Maßstab: jeweils $26,2\ \mu\text{m}$ (a, c, e) bzw. $26\ \mu\text{m}$ (b, d, f)

In den Kontrollen ohne Primärantikörper war die Fluoreszenz der Leydigschen Zellen sowie einiger Punkte im Cytoplasma der Spermiovorläuferzellen und/oder Sertolizellen auffallend. Sie trat unabhängig vom Sekundärantikörper (Anti-Ziegen-IgG, Anti-Kaninchen-IgG oder Anti-Maus-IgG) auf und wurde abhängig von der Intensität der Fluoreszenzmarkierung mit Primärantikörper mehr oder weniger deutlich in der Kontrolle

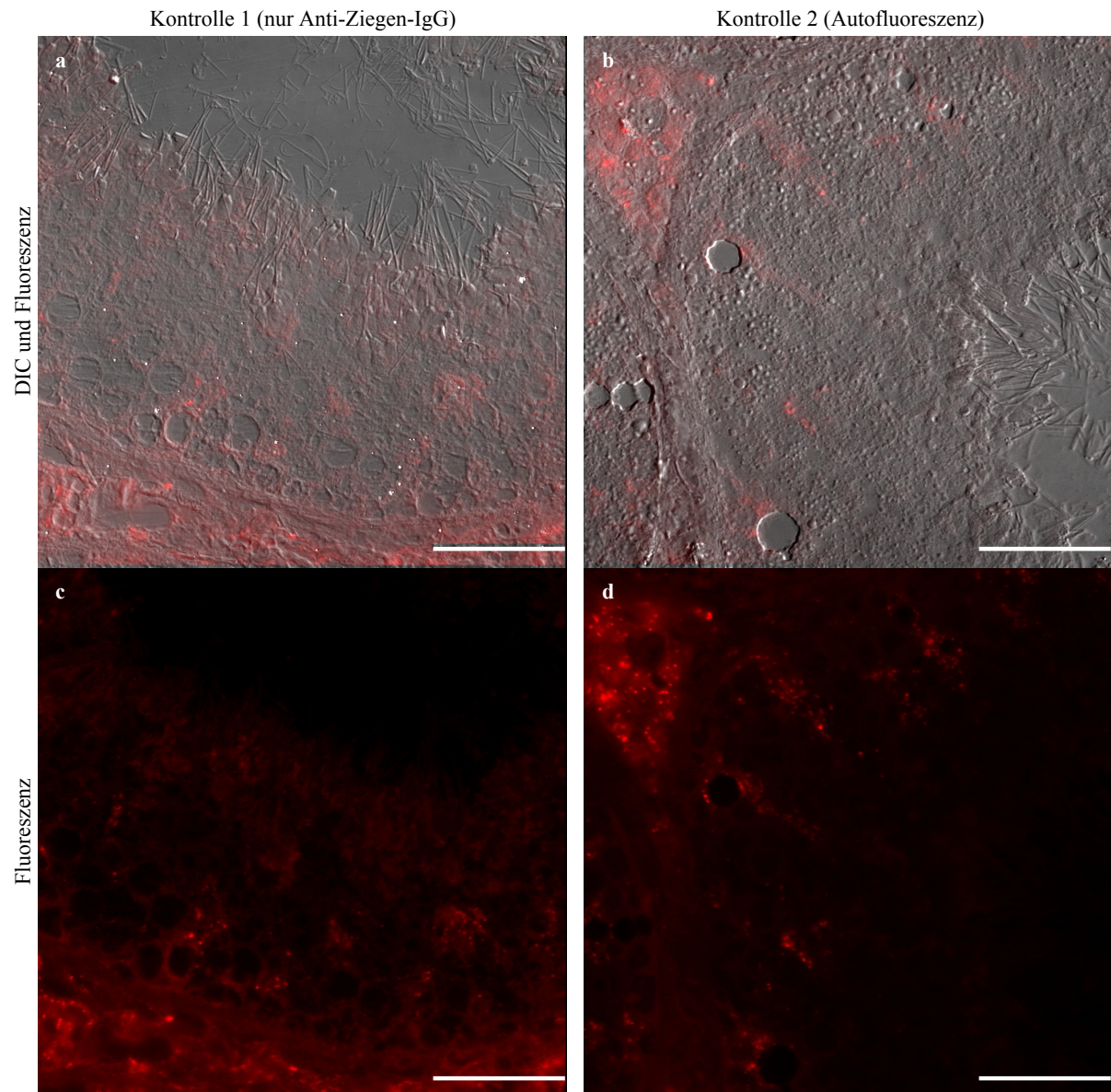


Abbildung 62: Fluoreszenz bei Grünanregung von einer Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper (nur Anti-Ziegen-IgG) an einem mit Methanol und Aceton fixierten Hodenschnitt im Vergleich zu der eines komplett unbehandelten Hodenschnitts

Für die Kontrolle 1 wurde ein 10 µm dicker Kryostatschnitt aus unfixiertem Eberhodengewebe auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen aufgenommen, getrocknet sowie mit Methanol und Aceton fixiert (6 min und 1 min bei -20°C). Anstatt mit Primärantikörpern in Blocklösung wurde der Schnitt nur mit (PBS in) Blocklösung inkubiert. Ansonsten wurde die Fluoreszenzmarkierung dem Protokoll (Unterabschnitt 2.16.2.7) entsprechend unter Einsatz der Sekundärantikörper Anti-Ziegen-IgG durchgeführt. Die Kontrolle 2 zeigt einen Kryostatschnitt aus unfixiertem Eberhodengewebe, welcher nach Aufnahme auf dem Deckgläschen und Trocknen, ohne weitere Behandlung in Mowiol eingebettet wurde.

Die erhaltenen Fluoreszenzbilder wurden durch lineare Tonwertkorrektur gleichermaßen so angepasst, dass die Fluoreszenz deutlich sichtbar ist. Die Bilder sind nur im Vergleich miteinander zu betrachten. Eine Beurteilung der Fluoreszenzstärke ist anhand dieser Bilder nicht möglich. Maßstab: jeweils 26 µm

sichtbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Fluoreszenz auch schon an getrockneten unfixierten und nachfolgend ohne Fluoreszenzmarkierung in Mowiol eingebetteten Schnitten zu beobachten war. Die Fluoreszenz bei grüner bzw. blauer Anregung der unbehandelten Schnitte wurde der der Kontrollen nach Fluoreszenzmarkierung ohne Primärantikörper gegenübergestellt. Durch gleiche Kontrastverstärkung und lineare Tonwertkorrektur konnten die Fluoreszenzen miteinander

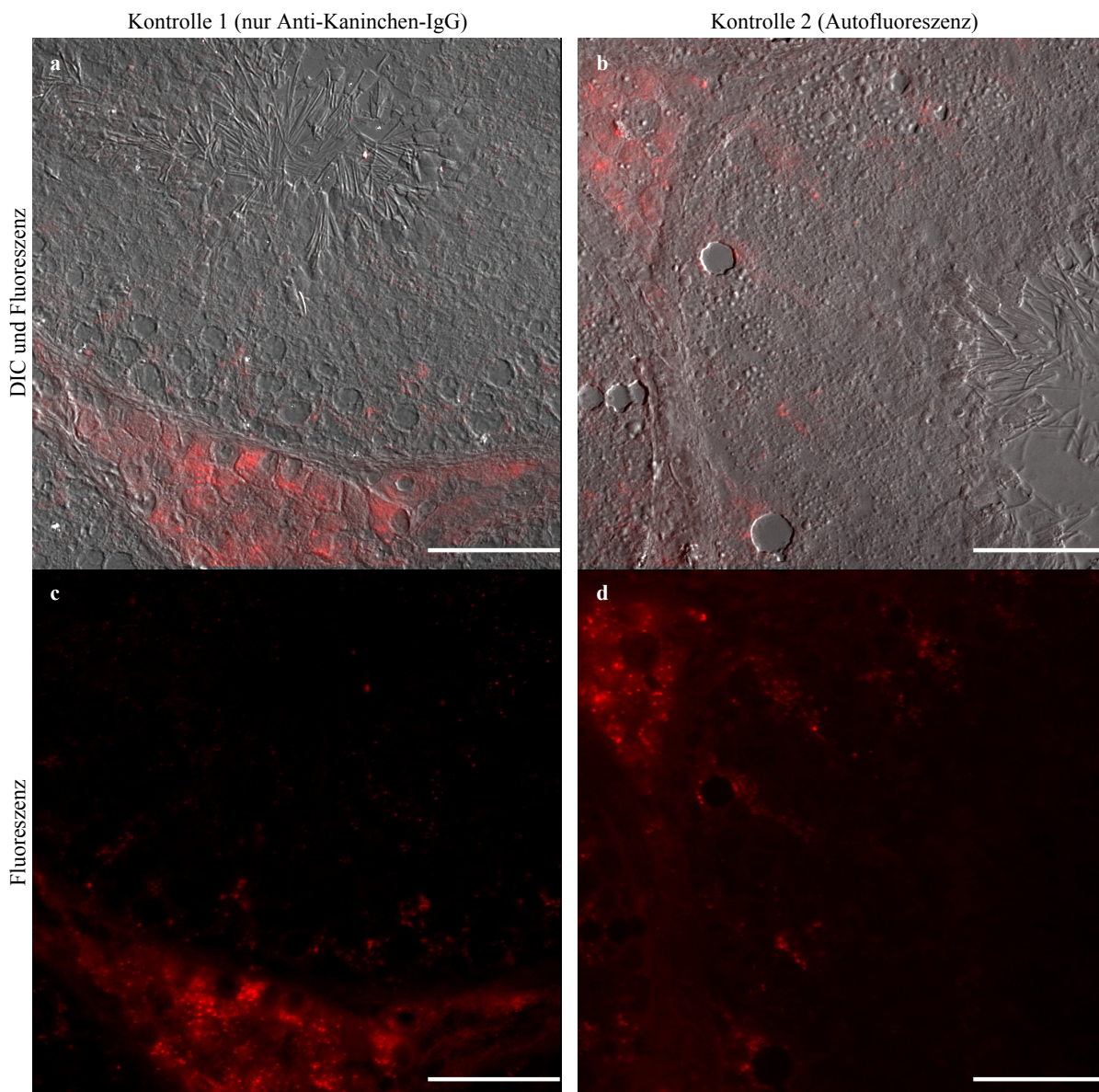


Abbildung 63: Fluoreszenz bei Grünanregung von einer Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper (nur Anti-Kaninchen-IgG) an einem mit Methanol und Aceton fixierten Hodenschnitt im Vergleich zu der eines unbehandelten Hodenschnitts

Erklärung s. Abbildung 62. Als Sekundärantikörper wurde hier Anti-Kaninchen-IgG eingesetzt. Maßstab: jeweils 26 µm

verglichen werden. Für alle drei verwendeten Sekundärantikörper wurde gezeigt, dass die o.g. Areale in der Kontrolle nach Fluoreszenzmarkierung ohne Primärantikörper ebenso stark wie im unbehandelten Kontrollschnitt fluoreszieren (s. Bsp. der Methanol-Aceton-Fixierung in Abbildung 62 bis Abbildung 64). Nur bei Verwendung von PFA-Aceton-fixierten Schnitten fluoreszierten die Leydigischen Zellen in der Kontrolle nach Markierung ohne Primärantikörper teilweise etwas stärker als in der unbehandelten Kontrolle (nicht abgebildet).

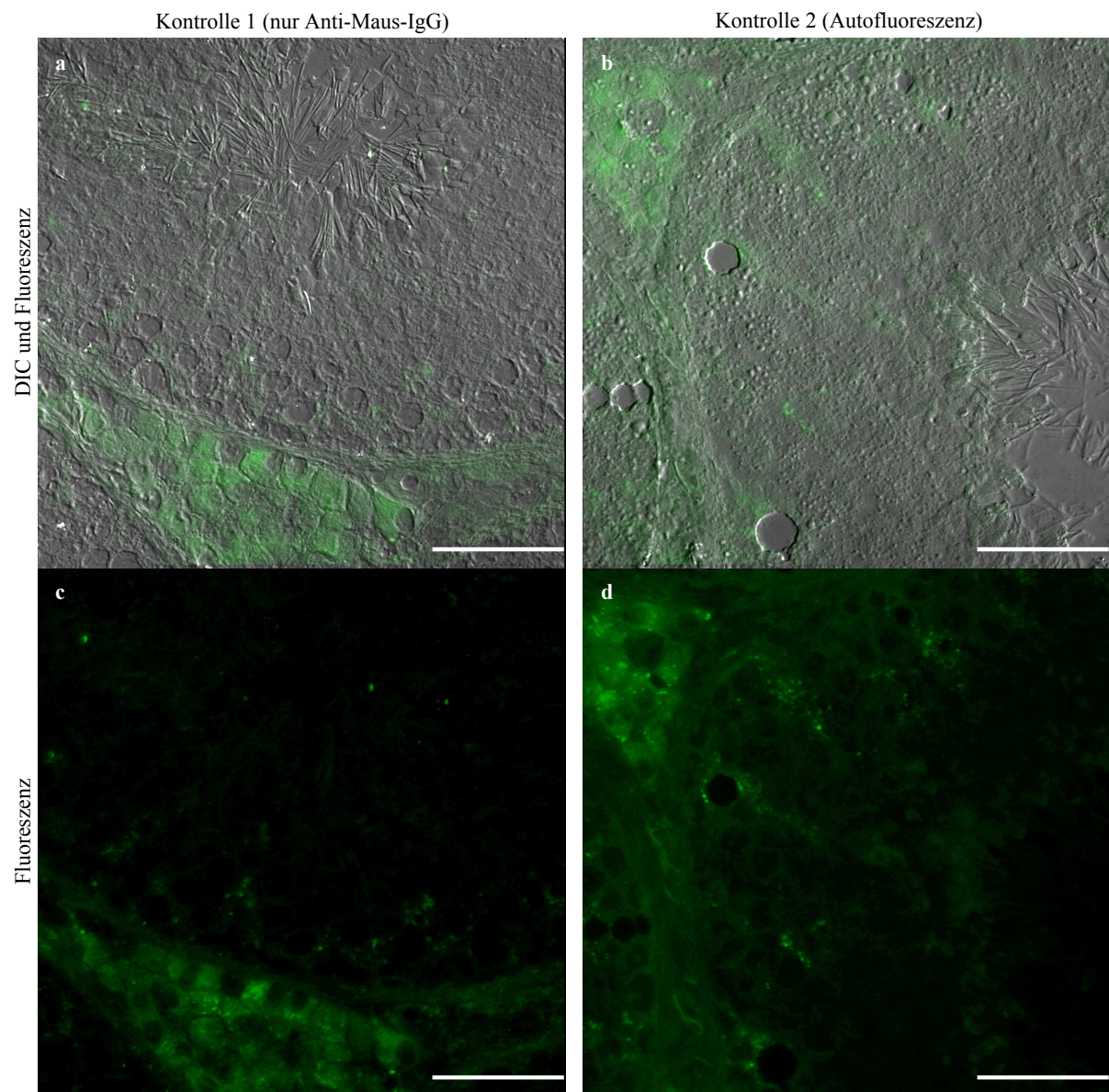


Abbildung 64: Fluoreszenz bei Blauanregung von einer Kontrollmarkierung ohne Primärantikörper (nur Anti-Maus-IgG) an einem mit Methanol und Aceton fixierten Hodenschnitt im Vergleich zu der eines unbehandelten Hodenschnitts

Erklärung s. Abbildung 62. Als Sekundärantikörper wurde hier Anti-Maus-IgG eingesetzt. Maßstab: jeweils 26 μm

4 Diskussion

4.1 Lösliche und gebundene Pyruvatkinase in Eberspermien

Bei der Extraktion von Pyruvatkinase aus Eberspermien in 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) zeigte sich, dass nach Zentrifugation des Homogenates (100000 x g, 1 Stunde) mehr als 60% ihrer Gesamtaktivität im Sediment verblieb und nicht ausgewaschen werden konnte. Nach der Definition eines löslichen Proteins (Protein im Überstand nach einstündiger Zentrifugation bei 100000 x g) ist also nur ein Teil der PK in Eberspermien löslich und besitzt wahrscheinlich nur schwache Interaktionen mit Zellstrukturen. Der strukturegebundene Teil der PK (PK-S) wurde durch das elektrisch neutrale Detergenz Triton X-100, welches die Ablösung der HK1-S von Spermienstrukturen ermöglicht (TRAVIS et al., 1998; KRISFALUSI et al., 2006), nicht solubilisiert, was darauf hindeutet, dass sie nicht über hydrophobe Wechselwirkungen gebunden ist. Allerdings führte die Behandlung mit Triton zu einer beträchtlichen Aktivitätssteigerung der PK-S. Gründe hierfür könnten in einer günstigen Veränderung der Proteinkonformation oder Enzymumgebung, evtl. mit dem Effekt einer besseren Zugänglichkeit der Substrate zur PK-S, liegen. Eine kurzfristige Inkubation mit Trypsin, wie sie zur Solubilisierung strukturegebundener GAPDH (GAPDH-S) aus Eberspermien eingesetzt wurde (WESTHOFF und KAMP, 1997), führte zur Ablösung der PK-S. Dass die katalytische Aktivität der PK durch die Proteolyse nicht vermindert wurde, basiert auf der relativ hohen Substratspezifität des Trypsins (Spaltung an Arginin und Lysin). Ist das Trypsinpräparat mit Chymotrypsin verunreinigt, kommt es zu einer völligen Enzyminaktivierung (KAMP, persönliche Mitteilung). Die Versuche zur Extraktion von PK aus Eberspermien lieferten einen ersten Hinweis auf unterschiedliche PK-Formen in diesen Zellen, eine lösliche und eine strukturegebundene PK (PK-S).

Eine feste Strukturbindung von PK wurde auch von Epididymalspermien aus Kaninchen berichtet (STOREY und KAYNE, 1975, 1980), ist aber für somatische Zellen unbekannt. Interaktionen mit Komponenten des Cytoskeletts werden zwar auch von somatischer PK beschrieben (REID und MASTERS, 1986; MASTERS et al., 1987), diese Bindungen sind aber weitaus weniger stabil als die der PK-S.

Aufgrund der festen Strukturbindung der PK-S konnte ein effizienter Reinigungsschritt durch intensives Waschen der Zellfragmente und anschließende Proteolyse erreicht werden. Bei der anschließenden Chromatographie zeigte sich, dass die abgelöste PK-S ein ähnliches Elutionsverhalten besitzt wie die GAPDH-S der Eberspermien. Eine Kombination von

Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie mit genau platzierten Elutionsstufen war erforderlich, um diese beiden Enzyme weitgehend voneinander zu trennen (Abbildung 9 und Abbildung 10). Nur so konnten die geringfügigen Unterschiede der geladenen und hydrophoben Oberflächen der beiden Enzyme zur Trennung genutzt werden. Das gereinigte PK-S-Präparat zeigte im SDS-PAGE nur zwei sehr schwache Nebenbanden. Eine stammt vermutlich von der GAPDH-S, welche in geringer Menge auch über die Aktivität nachweisbar war. Die Reinigung ist mit einem Reinigungsfaktor von knapp 1000 und einer spezifischen Aktivität der gereinigten PK-S von 116,7 U/mg Protein für die weiteren Experimente ausreichend. Da zur Teilsequenzierung der PK-S ihre Bande nach SDS-PAGE und Western-Blot aus der Membran ausgeschnitten wurde, störten die Nebenbanden hier nicht. Kinetische Untersuchungen konnten mit weitaus weniger reinen PK-S-Präparaten durchgeführt werden, da sie keine den Enzymtest störenden Metabolite und Enzymaktivitäten aufwiesen. Das erhaltene Antiserum gegen die gereinigte PK-S zeigte zwar eine gewisse Unspezifität, nach Immunreinigung von Antikörpern aus diesem Antiserum konnten aber spezifische Antikörper gegen die PK-S erhalten werden.

Die lösliche PK konnte aus Eberspermienextrakt über ein ähnliches Chromatographieverfahren angereichert werden, wie die gebundene PK (PK-S). Sie zeigte auch ein ähnliches Elutionsverhalten wie die PK-S, konnte aber nicht durch die gegen die PK-S hergestellten Antikörper markiert werden, sondern nur durch die Anti-PK-M1 (Abbildung 23). Dieses Ergebnis zeigt, dass zwei immunologisch verschiedene PK-Formen in Eberspermien vorliegen.

4.2 PK-S besitzt eine N-terminale Verlängerung

Die Sequenzierung des N-Terminus der tryptisch von Eberspermienstrukturen gelösten PK-S lieferte eine 19 Aminosäuren lange Sequenz, die C-terminal Ähnlichkeit mit der PK-M hatte. In den Positionen 79-83 (Abbildung 13) waren die Aminosäuren (AFIQT) eindeutig homolog angeordnet wie bei der PK-M1 und PK-M2, wohingegen sich die PK-L/-R-Sequenzen (AFFQQ) deutlich unterschieden. Im Vergleich mit den meisten PK-M1/-M2-Sequenzen aus den Proteindatenbanken (Swiss-Prot und TrEMBL) enthielt die Spermien-PK jedoch mindestens 4 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus (NH_2 -TSEA-COOH). Auch die L-/R-Isoformen der PK zeigten N-terminale Verlängerungen im Vergleich zu PK-M1 und -M2, die für Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften verantwortlich gemacht werden (MUIRHEAD et al., 1986). Sie besitzen aber keine Ähnlichkeit mit der PK-S. Man könnte also von einer N-terminalen Verlängerung der PK-S im Vergleich zur PK-M1/-M2 sprechen. Es

werden allerdings zwei M-Pyruvatkinasen in den Proteindatenbanken beschrieben, die eine N-terminale Verlängerung ähnlich der PK-S besitzen sollen (Q4V9L8 und Q3ZC87; Abbildung 13). Hierbei ist aber zu bedenken, dass diese, wie die meisten Pyruvatkinasen, aus Nukleotidsequenzen (cDNA, mRNA) abgeleitet sind. Es ist also nicht gezeigt, ob diese Verlängerungen auch bei den nativen Enzymen vorhanden sind. Bei der Recherche konnten nur zwei Aminosäuresequenzen von PK-M1 gefunden werden, die durch (Teil-)Sequenzierung des Proteins erhalten worden waren (P11979 und P14618, Abbildung 13). Diese sequenzierten, somatischen Pyruvatkinasen trugen beide weder eine N-terminale Verlängerung, noch ein N-terminales Methionin. Der N-Terminus der nativen PK-M1 beginnt demnach an Position 70 (Abbildung 13). Vermutlich beginnt die Translation am Methionin (Position 69, Abbildung 13).

Nach der Recherche in den Proteindatenbanken wurden die Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ und PDB nach übersetzten Nukleotidsequenzen mit Ähnlichkeit zur Teilsequenz der Spermien-PK durchsucht. Es wurden sehr viele PK-M-Sequenzen gefunden, die auf der Nukleotidebene eine Aminosäuresequenz ähnlich der PK-S-Verlängerung auf der 5'-Seite des vorhergesagten Startcodons codieren. Das heißt, die N-terminale Verlängerung der PK-S ist anscheinend in der Nukleotidsequenz der PK-M codiert, fehlt jedoch dem Protein, wie zumindest an zwei Beispielen gezeigt wurde (P11979 und P14618, Abbildung 13). Wurden die Nukleotidsequenzen, aus welchen die M1- und M2-Pyruvatkinasen in Abbildung 13 hergeleitet waren, komplett in Aminosäuren übersetzt und ungekürzt verglichen, so zeigte sich oft eine Sequenz auf der 5'-Seite des vorhergesagten Startcodons, die der Verlängerung der PK-S (NH₂-TSEA(M)-COOH) sehr ähnlich oder gleich war (Abbildung 14). Diese N-terminalen Verlängerungen, die sich aus den ungekürzten Nukleotidsequenzen der PK-M1/-M2 ergeben, beinhalteten jedoch bis auf eine Ausnahme kein weiteres Methionin (AUG-Startcodon), so dass sie in den abgeleiteten Proteinsequenzen nicht mehr vorhanden sind. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Translation bei Eukaryoten immer bei dem am nächsten zum 5'-Ende der mRNA liegenden AUG, welches für Methionin codiert, beginnt. Beschriebene Abweichungen von der AUG-Regel (z.B. „leaky scanning“, non-AUG-Startcodons und „internal initiation“) sowie eine eventuelle Fragmentierung der mRNA/cDNA bleiben hier unbeachtet. In einigen übersetzten Sequenzen (CR861086, CR925988, CR760921, AK168943 und AK135397, Abbildung 14) befanden sich in der N-terminalen Verlängerung auch Stopcodons, wodurch deren Expression wenig wahrscheinlich ist. Das Rinderprotein, bei welchem es sich der Sequenz zufolge um eine PK-M mit N-terminaler Verlängerung handelt, besitzt auf der Nukleotidebene kein weiteres Startcodon vor der Verlängerung (BC102826, Abbildung 14 bzw. Q3ZC87, Abbildung 13).

Es ist nicht klar, wieso dieses Protein in der Proteindatenbank mit N-terminaler Verlängerung beschrieben ist. Da es sich hier um ein Fragment handeln soll, könnte davon ausgegangen worden sein, dass sich ein N-terminales Startcodon noch vor dem 5'-Ende des Fragmentes befindet.

Wenn man davon ausgeht, dass die Translation immer bei dem Startcodon AUG beginnt, ist also bisher nur für eine PK (PK-M2 aus humanen Chondrosarcoma Lungenmetastasen, BC096823, Abbildung 14 bzw. Q4V9L8, Abbildung 13) gezeigt, dass sie mit einer N-terminalen Verlängerung translatiert werden könnte. Alle anderen aus Nukleotidsequenzen abgeleiteten M-Pyruvatkinasen müssten ohne N-terminale Verlängerung exprimiert werden und würden sich so von der Spermien-PK unterscheiden. Werden zur Initiation der Translation bei der PK-M auch non-AUG-Codons genutzt, so könnten evtl. weitere Pyruvatkinasen der Isoformen M1 und M2, die in den Proteindatenbanken keine N-terminale Verlängerung besitzen, diese *in vivo* nach der Translation besitzen.

Die für die gereinigte PK-S aus Eberspermien nachgewiesene 5 Aminosäuren-lange N-terminale Verlängerung ist sicherlich nur ein Teil der Verlängerung des nativen Enzyms. Der überwiegende Teil dürfte durch das Trypsin abgespalten worden sein. Die abgespaltene Sequenz könnte der N-terminalen Verlängerung der hypothetischen PK, die von cDNA aus Rinder-Ileum abgeleitet ist, ähnlich sein. Hierfür spricht, dass diese potentielle Rinder-Ileum-PK ein Lysin (K) vor dem TSEAM besitzt (Position 64, Abbildung 13), was die tryptische Spaltung an dieser Stelle bei der PK-S erklären würde. Die N-terminale Verlängerung der PK-S könnte aber auch N-terminalen Verlängerungen, die in den Nukleotidsequenzen für PK-M1 und PK-M2 codiert sind und, bis auf eine Ausnahme (BC096823, Abbildung 14 bzw. Q4V9L8, Abbildung 13), vermutlich nicht translatiert werden, ähneln. Auch in den übersetzten Nukleotidsequenzen vieler PK-M lag vor der TSEAM-ähnlichen Region oft ein Arginin (R), welches ebenfalls eine tryptische Spaltung ermöglicht. Prinzipiell wäre es sehr hilfreich, wenn die PK-S mit noch längerem Abschnitt oder sogar der kompletten N-terminalen Verlängerung extrahiert werden könnte. Dies ist allerdings schwierig, da nicht genau bekannt ist, über welche Art die PK-S so fest an Spermienstrukturen gebunden ist. Wie bereits erwähnt, konnte die PK-S nicht mit Hilfe von Triton X-100 von den Eberspermienstrukturen gelöst werden. Aus fibröser Scheide von Mausspermien konnte PK ebenfalls nicht durch Triton oder andere Proteinextraktionsverfahren (z.B. Harnstoff, KSCN) gelöst werden (KRISFALUSI et al., 2006). Man sollte versuchen, die komplette Verlängerung der PK-S auf der Nukleotidebene zu bestimmen. So könnte zuerst die mRNA aus Hoden, die biosynthetisch aktive Spermatozoen enthalten, isoliert werden. Mit der mRNA könnte dann

eine cDNA-Bank erstellt werden. Anschließend könnte die cDNA für PK-S mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide als Sonden aus der cDNA-Bank identifiziert werden. Als Grundlage für die Herstellung von Nukleinsäuresonden könnten bekannte Sequenzen für somatische PK und/oder die ermittelte Aminosäureteilsequenz der PK-S aus Eberspermien dienen. Die so identifizierte cDNA für PK-S könnte dann ansequenziert werden, um zu sehen, ob eine N-terminale Verlängerung vorhanden ist. Über die cDNA-Sequenz kann die Aminosäuresequenz bestimmt werden.

Der Sequenzabschnitt der PK-S zeigt deutliche Homologien mit der PK-M1 und der PK-M2 in den Positionen 70-83 in Abbildung 13 (7 bis 11 von 14 Aminosäuren gleich lokalisiert, entspricht 50-78%) und nur geringe mit der PK-L und der PK-R (4 von 14 Aminosäuren gleich lokalisiert, entspricht 28%). Besonders die hochkonservierte Sequenz NH₂-AFIQT-COOH ist in PK-M1/M2 und in PK-S vorhanden, nicht aber in PK-L/R (Positionen 79-83, Abbildung 13). Zudem enthalten *PKM*-mRNAs oft Sequenzen auf der 5'-Seite des vorhergesagten Startcodons, die eine Aminosäuresequenz ähnlich der PK-S-Verlängerung codieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die strukturgebundene Spermien-PK auf dem gleichen Gen wie die PK-M codiert ist. Dies würde auch die kinetische Ähnlichkeit der PK-S zur PK-M1 erklären. Von diesem Gen aus könnten also nicht nur die PK-M1 und -M2 über alternatives Splicing des gleichen Primärtranskripts (TAKENAKA et al. 1989, 1991), sondern auch die PK-S produziert werden. Wie es zur Expression der PK-S kommt, ist unklar. Es wäre möglich, dass durch einen unterschiedlichen Transkriptionsbeginn zwei unterschiedlich lange Primärtranskripte entstehen, wie für die Transkription von PK-L und -R vom gleichen Gen beschrieben (NOGUCHI et al. 1987). Würde das längere Transkript ein Startcodon für die Translation (AUG oder non-AUG) in günstigem Kontext vor der Verlängerung besitzen, so könnte ohne weitere Modifikation die N-terminal verlängerte PK-S entstehen. Dem kürzeren Transkript würde dieses Startcodon fehlen, so dass PK-M1 oder PK-M2 entsteht. Für diese Möglichkeit sprechen die unterschiedlich langen cDNA-Sequenzen für die PK-M. Eine dieser Sequenzen zeigt ein zusätzliches AUG-Startcodon vor der codierten Verlängerung (BC096823, Abbildung 14 bzw. Q4V9L8, Abbildung 13).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es ein einheitliches Primärtranskript gibt, welches die N-terminale Verlängerung inklusive zwei Startcodons für die Translation enthält. Beginnt die Translation am ersten Startcodon, welches am nächsten zum 5'-Ende der mRNA liegt, so wird die N-terminal längere Proteinsequenz der PK-S produziert. PK-M1 und PK-M2 entstehen erst nach alternativem Herausspleißen von Exon 9 (PK-M2) oder Exon 10 (PK-M1) (TAKENAKA et al., 1989, 1991) und dem zusätzlichen Verlust des ersten Startcodons. Somit

würde nach dem Abtastmechanismus der Translationsinitiation das nächste Startcodon in günstigem Kontext als neue Initiationsstelle gewählt. Es wäre auch möglich, dass durch posttranskriptionale Modifikationen des Primärtranskripts das erste Startcodon nur in einen schlechten Kontext gebracht wird, so dass ein Ablesen der Verlängerung unterbleibt.

Eine dritte Möglichkeit zur Produktion unterschiedlich langer Pyruvatkinasen vom PK-M-Gen bestünde darin, dass eine N-terminal verlängerte PK translatiert wird, von welcher posttranslational der N-Terminus abgespaltet werden kann. Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei der Mehrzahl der cDNAs bzw. mRNAs um komplette (d.h. nicht fragmentierte), derartig *in vivo* auftretende Sequenzen handelt, so müsste die Translation für fast alle PK-M an non-AUG-Codons initiiert werden. Eine solche Initiation der Translation ist möglich, jedoch eher selten. Es wurde aber beschrieben, dass die meisten Gene, für welche eine solche Initiation an non-AUG-Codons gezeigt wurde, regulatorische Proteine codieren (TOURIOL et al., 2003). Als Beispiel werden hier auch Kinasen genannt.

Da in der Literatur keine N-terminalen Sequenzen nativer PK-M2 gefunden werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass PK-M2 eine ähnliche N-terminale Verlängerung wie die PK-S besitzt. Die kinetischen Eigenschaften deuten aber darauf hin, dass die PK-S der PK-M1 ähnelt, und nicht der PK-M2. Deshalb ist anzunehmen, dass es sich bei der PK-S um eine N-terminal verlängerte PK-M1 handelt. Die Möglichkeit unterschiedlich lange Proteine von einem Gen zu produzieren ist nicht ungewöhnlich. So wurde z.B. gezeigt, dass aus einer großen Auswahl humaner mRNAs 3% das Potential besaßen, N-terminal verlängerte Varianten der ursprünglich abgeleiteten Proteine zu produzieren, während 12% auch für verkürzte Varianten codierten (KOCHEV et al., 2005).

Über den Grund für die Ausprägung zweier unterschiedlich langer Pyruvatkinasen vom gleichen Genort kann nur spekuliert werden. Eine Verlängerung des N-Terminus kann Proteinfunktionen verändern bzw. erweitern (EDDY, 2002). Dies wird, wie erwähnt, auch der N-terminalen Verlängerung der PK-L/-R zugesprochen. Ein weiteres Beispiel ist das bifunktionelle Enzym 6PF-2-K/Fru-2,6-P₂ase. Es katalysiert die Synthese und den Abbau von F₂,6P₂, welches die Glykolyse in der Leber fördert und die Gluconeogenese hemmt. Die Isoformen in Leber und Herz besitzen N-terminale Verlängerungen, welche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen (Ser32 bzw. Ser29) aufweisen und in den Isoformen von Muskel und Testis nicht auftreten (PILKIS et al., 1995). Hier kann über die verlängerten N-Termini also die Aktivität des Enzyms an die Bedürfnisse in Leber und Herz angepasst werden. Die N-terminale Verlängerung der PK-S führt jedoch nicht zu veränderten kinetischen Eigenschaften. Selbst die noch an Ebersperminstrukturen gebundene PK-S,

welche die vollständige N-terminale Verlängerung besitzt, zeigt die gleichen kinetischen Eigenschaften wie die lösliche PK aus Eberspermien und die PK-M1. Es ist also zu vermuten, dass die N-terminale Verlängerung eher einer speziellen Lokalisation bzw. räumlichen Anordnung der PK-S dient. Der spezifische N-Terminus könnte hierbei als Signalsequenz dienen, bzw. eine beinhalten, welche das Protein an bestimmte Zellorte/-strukturen dirigiert und/oder dort verankert. So könnte die PK-S in Spermien hierdurch an die fibröse Scheide und in den Akrosombereich geleitet und dort angebunden werden. Die N-terminal nicht verlängerte PK-M könnte im Cytosol verbleiben, da sie eine solche Signalsequenz nicht besitzt. Auch in der Literatur wird die Produktion unterschiedlich langer Proteine von einem Gen mit unterschiedlicher Lokalisation dieser in Zusammenhang gebracht (s. DANPURE, 1995). Bei der HK1-S, welche vom gleichen Gen wie die somatische HK1 über alternative Transkripte produziert wird, könnte der Austausch der Porinbindungsdomäne gegen eine spermien-spezifische Sequenz eine andere Lokalisierung ermöglichen (MORI et al., 1993; TRAVIS et al., 1998). Die Lokalisation könnte sozusagen über den N-Terminus kontrolliert werden. Dies gilt auch für die gegenüber der somatischen GAPDH N-terminal verlängerte GAPDH-S (WELCH et al., 1992, 2000, 2006).

Wenn man voraussetzt, dass auch in Rinderdünndarm (Ileum) und humanen Chondrosarcoma Lungenmetastasen eine N-terminal verlängerte PK produziert wird, stellt sich die Frage, ob in diesen Geweben die PK an bestimmte physiologische Anforderungen angepasst sein muss. In den Epithelzellen des Darms könnte eine N-terminale Verlängerung genutzt werden, um das ATP-produzierende Enzym gezielt am Mikrovillisaum zu lokalisieren, um die Nahrungsaufnahme zu verbessern. In Metastasen könnte eine N-terminale PK-Verlängerung mit der gesteigerten Glykolyserate, wie sie für viele Tumorzellen typisch ist (vgl. NEWSHOLME und LEECH, 1983), in Verbindung stehen. Es muss hier allerdings betont werden, dass diese Interpretation sehr spekulativ ist. Es ist nicht klar, ob die genannten Pyruvatkinasen der M-Isoform in den Zellen auch tatsächlich mit einer N-terminalen Verlängerung auftreten. Die Proteinsequenzen sind aus Nukleotidsequenzen hergeleitet; eine posttranskriptionale oder -lationale Modifizierung der PK kann nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung sind also weitere Untersuchungen notwendig. So wäre es beispielsweise sinnvoll zu überprüfen, ob im Dünndarm oder in Lungenmetastasen PK strukturgebunden vorliegt. Klarheit könnte die N-terminale Sequenzierung gereinigter PK aus diesen Geweben liefern.

4.3 Lokalisierung von PK in Säugerspermien

Über Fluoreszenz- und Immunogoldmarkierung wurde versucht, die strukturgebundene PK in Spermien von Eber und anderen Säugern (Bulle und Mensch) zu lokalisieren. Hierzu wurden die spezifischen Antikörper gegen die PK-S aus Eberspermien (Anti-PK-S) eingesetzt. Außerdem standen Antikörper gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) zur Verfügung.

Um die PK-S in Säugerspermien lokalisieren zu können, mussten zuerst spezifische Antikörper gegen diese produziert werden. Dies wurde über zwei Wege versucht. Zum einen wurde PK-S gereinigt, um sie dann zur Antikörperproduktion einzusetzen. Zum anderen wurde eine PK-S-spezifische Sequenz synthetisiert, um, nach Kopplung an ein Trägerprotein, Antikörper gegen sie herzustellen.

Das Antiserum gegen die gereinigte PK-S aus Eberspermien war nicht ausreichend spezifisch, um das Enzym eindeutig zu lokalisieren. Während das Präimmunserum bei gleicher Verdünnung keine aus Eberspermien extrahierten Proteine markierte, banden Antikörper des Antiserums an die PK-S; andere Antikörper des Serums hatten jedoch eine ähnliche oder sogar stärkere Affinität zu anderen Spermienproteinen mit höherem Molekulargewicht (ein lösliches und zwei mit Trypsin abgelöste Proteine; Abbildung 19b). Um welche Proteine es sich hierbei handelt, ist unklar. Dass die Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-PK, welche auch an die lösliche Pyruvatkinase aus Eberspermien und an die PK-S binden, nicht an diese Proteine banden, deutet darauf hin, dass es sich hier nicht um PK handelt. Eine schwache Immunantwort des Antiserums musste auch gegen GAPDH festgestellt werden. Eine klare Aussage zur Lokalisation der PK-S in Säugerspermien war mit dem Antiserum also nicht möglich. Deshalb wurden Antikörper gegen die PK-S aus dem Antiserum isoliert.

Bei der Immunisierung mit dem 13 Aminosäuren-langen synthetisierten N-Terminus der tryptisch abgelösten PK-S, zeigten beide Kaninchen eine schlechte Immunantwort, die auch durch den Austausch des Proteincarriers (Ovalbumin statt Hämocyanin) nicht ausreichend gesteigert werden konnte. Vermutlich besaß das synthetisierte Peptid keine ausreichende Immogenität. Beim Einsatz der Antiseren mit dem jeweilig höchsten erreichten Antikörpertiter zeigte sich kein überzeugender Unterschied der Antikörperfärbung im Vergleich zu den Präimmunseren, welche bereits leichte Reaktionen mit der PK und GAPDH aus Kaninchenmuskel und Spermien zeigten (Abbildung 21b,c). Weshalb bei diesen Tieren bereits in den Präimmunseren Antikörper gegen PK und GAPDH vorhanden waren, ist unklar. Auch eine Immunreinigung der Antikörper führte zu keiner Steigerung der Spezifität

(Abbildung 21d), weshalb dieser Ansatz verworfen und nur die Immunreinigung der Antikörper aus dem Antiserum gegen die gereinigte PK-S weiterverfolgt wurde.

Über Immunoaffinität zum 13 Aminosäuren-langen synthetisierten N-Terminus der tryptisch abgelösten PK-S, welcher an Sepharose gekoppelt war, konnten Antikörper gereinigt werden, die mit hoher Spezifität die Eberspermien-PK-S erkannten. Im Immunoblot banden sie nicht oder nur sehr schwach an die Muskel-PK und -GAPDH sowie an die strukturgebundene Eberspermien-GAPDH, auch wenn deren Auftragemenge hoch war. Andere aus Eberspermien extrahierte Proteine wurden nicht markiert (Abbildung 22). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Antikörper, bei gleicher Auftragemenge der Proteine, weder an die lösliche PK aus Eberspermien, noch an die Kaninchenmuskel-PK, sondern nur an die PK-S binden (Abbildung 23b). Mit den gereinigten Antikörpern (Anti-PK-S) war es nun möglich, die PK-S spezifisch anzusprechen.

Die Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) zeigten eine Kreuzreaktivität sowohl mit der löslichen PK als auch mit der PK-S aus Eberspermien (Abbildung 23c), was nicht verwunderlich war, da angenommen wird, dass es sich bei der löslichen PK um eine PK-M1 und bei der PK-S um eine N-terminal verlängerte PK-M1 handelt (s. Teil 4.2). Sie konnte also zur Markierung beider, der löslichen PK und der PK-S, in Eberspermien eingesetzt werden. Kompartimente in Spermien, die nur durch die Anti-PK-M1 markiert wurden, enthielten folglich die lösliche PK.

Zunächst wurde versucht, die PK über Fluoreszenzmarkierung in Eberspermien zu lokalisieren. In Vorversuchen wurde geprüft, wie sich die Fixierung und/oder Permeabilisierung der Eberspermien mit unterschiedlichen Reagenzien auf die Markierung auswirkt. Es zeigte sich, dass die durch den Antikörper angesprochenen Antigene, je nach Vorbehandlung und Spermienkompartiment, mehr oder weniger gut detektiert werden konnten. So war die PK-S im Akrosombereich durchweg besser zugänglich als im Hauptstück des Flagellums. Nur bei einer Fixierung mit PFA waren die Markierungen im Akrosombereich sehr schwach, was vermutlich auf eine schlechtere Zugänglichkeit der Antigene bzw. Epitope durch die Proteinquervernetzung zurückzuführen ist. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass nach Permeabilisierung PFA-fixierter Spermien mit Hilfe von Triton X-100 oder Aceton die Akrosome wieder gut markiert wurden. Auch die Flagellen zeigten nach PFA-Behandlung kaum noch Fluoreszenz, wobei die Antigenzugänglichkeit über Permeabilisierung mit Triton X-100 wieder verbessert werden konnte. Bei unfixierten Spermien war ebenfalls eine Permeabilisierung mit Triton notwendig, um die PK-S zu markieren. Diese Effekte der Vorbehandlungen konnten auch für die

Markierung strukturgebundener GAPDH (GAPDH-S) gezeigt werden. Im Cytoplasmatropfen war jedoch die Markierung der GAPDH-S unabhängig von der Vorbehandlung. Vermutlich verursachen die unterschiedliche Membran- bzw. Proteinzusammensetzung sowie die Beschaffenheit (z.B. kompakt oder locker, voluminös oder weniger voluminös) der Kompartimente/Strukturen diese unterschiedlichen Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Eine Permeabilisierung unfixierter oder PFA-fixierter Eberspermien mit Triton X-100 scheint die Akrosomen und Flagellen optimal zugänglich für die Detektion von PK-S zu machen. Aus diesem Grund wurde die PK an derartig vorbehandelten Eberspermien lokalisiert. Fluoreszenzmarkierungen von Creatinkinase in Spermien von Hahn wurden ebenfalls nach Kombination einer PFA-Fixierung mit einer Triton X-100-Permeabilisierung erfolgreich durchgeführt (KALDIS et al., 1996).

Über Fluoreszenzmarkierungen konnte die PK-S mit Anti-PK-S und Anti-PK-M1 im Hauptstück des Flagellums, im Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück sowie im Akrosombereich lokalisiert werden (Abbildung 26 und Abbildung 27). Im Mittel- und Endstück sowie im Cytoplasmatropfen war mit der Anti-PK-S nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal zu erhalten (Abbildung 26 und Abbildung 27, jeweils e,g). Dagegen wurde mit Anti-PK-M1, welches im Immunoblot sowohl an die PK-S, als auch an die lösliche Spermien-PK gebunden hatte, auch das Mittelstück sowie etwas schwächer der postakrosomale Bereich des Spermienkopfes markiert (Abbildung 26 und Abbildung 27, jeweils a,c), was darauf schließen lässt, dass in diesen Bereichen lösliche PK vorliegt. Cytoplasmatropfen enthielten anscheinend weder lösliche PK noch PK-S.

Bei der Fixierung mit PFA zeigte sich teilweise, im Gegensatz zu den unfixierten Spermien, schon in der Kontrolle ohne Primärantikörper eine geringe Fluoreszenz im Bereich der Akrosomen und des Mittelstücks (Abbildung 27d,h). Diese ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass PFA über Reaktionen mit Gewebekomponenten zu einer Erhöhung von Autofluoreszenz führen kann (vgl. BUNEA und ZARNESCU, 2001). Aldehyde können mit Aminen der Proteine reagieren und hierdurch fluoreszierendes Material produzieren. Ausser dieser Autofluoreszenz war kein wesentlicher Unterschied zwischen unfixierter und PFA-fixierter Probe zu erkennen. Sollten lösliche Proteine (z.B. lösliche PK) aufgrund der Permeabilisierung verloren gehen, so kann dieser Verlust anscheinend nicht durch Proteinvernetzung mit PFA verhindert werden.

Die Anti-PK-S führte zu einer deutlichen Markierung im vorderen Kopfbereich und es war anzunehmen, dass es sich hier um den Akrosombereich handelt. Um den Bereich des

Akrosoms klar zu definieren, wurde ein bekanntes akrosomales Protein, das (Pro)Acrosin, mit käuflich erworbenen Antikörpern fluoreszenzmarkiert.

Bei der Überprüfung der Spezifität des Anti-Acrosins im Immunoblot zeigten sich deutliche Markierungen unter den löslichen und tryptisch abgelösten Eberspermienproteinen (Abbildung 25). Anhand der zugehörigen relativen Molekülmassen konnten diese Proteine unterschiedlichen Formen des Acrosins/Proacrosins zugeordnet werden. Säureextrahiertes Proacrosin von Eberspermien besitzt eine Molekülmasse von 55 und 53 kDa (POLAKOSKI und PARRISH, 1977) und das Acrosin von 49, 43 und 35 kDa (BABA et al., 1989a,b). Im Datenblatt der Antikörper wird darauf hingewiesen, dass diese mit verschiedenen Formen des Eberacrosins bei 55, 53, 45 und 35 kDa reagieren. Dass Acrosin im Extrakt ohne und mit Trypsinbehandlung gefunden wurde, deutet darauf hin, dass das Enzym in den eingesetzten Eberspermien löslich und strukturegebunden vorlag. Ein Teil wurde erst durch die tryptische Behandlung freigesetzt. Es wird beschrieben, dass Proacrosin und α -Acrosin in Säugerspermien gebunden vorliegen, während β -Acrosin löslich ist und ins extrazelluläre Medium abgegeben werden kann (vgl. CORTES et al., 2006). Neben den Markierungen des Acrosins waren auch Markierungen der PK und GAPDH aus Muskel und Spermien zu beobachten, die aber im Verhältnis zur Auftragemenge so schwach waren, dass sie einer spezifischen Lokalisierung des Acrosins nicht im Wege standen.

Mit Hilfe des Anti-Acrosins konnte das Akrosom über Fluoreszenzmarkierung besonders an PFA-fixierten Spermien klar definiert werden (Abbildung 31). Ohne die Proteinquervernetzung mittels PFA war aber auch das Flagellum aus bisher unbekanntem Gründen leicht markiert und das Akrosom nicht klar begrenzt (Abbildung 30). Vermutlich diffundiert ohne PFA-Fixierung lösliches Acrosin aus dem Akrosom und lagert sich an anderen Strukturen (Flagellum) an. In PFA-fixierten Proben konnte durch parallele Markierung mit Antikörpern gegen Acrosin und PK-S gezeigt werden, dass die PK-S im Akrosombereich detektiert wird.

Für eine genauere, ultrastrukturelle Lokalisierung der PK wurden Immunogoldmarkierungen mit nachfolgender elektronenmikroskopischer Betrachtung durchgeführt. Hierzu wurden Ultradünnschnitte (ca. 60 nm) von Eberspermien, aber auch von Bullen- und Humanspermien eingesetzt.

Über Immunogoldmarkierung wurde die PK, wie bei der Fluoreszenzmarkierung, im Hauptstück des Flagellums sowie im Akrosombereich von Eberspermien detektiert. Im Hauptstück war insbesondere die fibröse Scheide markiert. Mit den immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S (Anti-PK-S) war die fibröse Scheide allerdings deutlich

schwächer markiert als mit Anti-PK-M1 (Abbildung 33h,i bzw. Abbildung 32d,f). Diese verhältnismäßig schwache Markierung der fibrösen Scheide ließe sich über eine schlechte Zugänglichkeit oder Veränderung des Epitops erklären. Bei der Immunogoldmarkierung erfolgte die PFA-Fixierung mit 4% PFA und mindestens 30 min gegenüber 2% PFA und 1 min bei der Fluoreszenzmarkierung. Ein anderer Grund für diese schwache Bindung der Anti-PK-S könnte noch hinzukommen. Das antigene Epitop der Anti-PK-S beschränkt sich auf nur 13 Aminosäuren, welche vermutlich nahe der Region gelegen oder sogar Teil der Region sind, über die das Enzym fest an die fibröse Scheide gebunden ist. Diese räumliche Anordnung könnte zusätzlich zur PFA-Wirkung die Zugänglichkeit des Antigens für Anti-PK-S reduzieren. Im Gegensatz hierzu bindet die Anti-PK-M1 vermutlich an unterschiedliche Epitope der PK, so dass auch bei starker Vernetzung eine Markierung wahrscheinlicher ist als durch Anti-PK-S. Dass die Antikörper gegen PK-S die fibröse Scheide nur schwach, den Akrosombereich aber deutlich markierten (Abbildung 33), könnte an der deutlich anderen chemischen Umgebung der PK in diesen Kompartimenten liegen, wodurch eine Proteinvernetzung durch PFA unterschiedlich auf Zugänglichkeit und/oder Erhaltung der Antigene/Epitope wirkt. Auch die größere Oberfläche des angeschnittenen Akrosoms gegenüber der fibrösen Scheide kann die Detektion im Akrosom begünstigen.

Mit Anti-PK-M1 war der Akrosombereich ebenfalls, der postakrosomale Bereich des Kopfes nur schwach und das Mittelstück fast gar nicht markiert (Abbildung 32). Der Befund, dass das Mittelstück durch Immunogoldmarkierung mit Anti-PK-M1 nicht markiert wurde, sondern nur durch Fluoreszenzmarkierung, könnte darauf zurückzuführen sein, dass lösliche PK während der Immunogoldmarkierung an den Ultradünnschnitten ausgewaschen wird. Dass es sich bei der PK im Mittelstück um lösliche PK handelt, wird daraus gefolgert, dass dort durch Anti-PK-M1 eine Fluoreszenzmarkierung möglich ist, aber nicht durch Anti-PK-S. Auch bei der Lokalisierung von PK im Cytoplasmatropfen zeigen sich Unterschiede zwischen Fluoreszenz- und Immunogoldmarkierung. Beide Techniken weisen darauf hin, dass im Cytoplasmatropfen keine oder nur sehr wenig PK-S vorliegt. Mit den Antikörpern gegen die Kaninchenmuskel-PK wurde der Cytoplasmatropfen jedoch goldmarkiert, während die Fluoreszenzmarkierung, wenn überhaupt, nur sehr schwach war. Möglicherweise sorgt die stärkere Vernetzung durch PFA im Cytoplasmatropfen für eine Fixierung der löslichen PK, so dass sie bei der Immunogoldmarkierung besser nachgewiesen werden konnte. Es ist nicht ungewöhnlich, dass der Antikörperzugang und die Erhaltung von Antigenen bei unterschiedlichen Techniken verschieden sind (vgl. WALLIMANN et al., 1986; KALDIS et al., 1996). Deshalb scheint es grundsätzlich wichtig zu sein, den Einfluß der Technik genau zu prüfen.

Die Immunogoldmarkierung wurde auch an Bullen- und Humanspermien durchgeführt. Auch hier wurde PK mit Anti-PK-M1 sicher an der fibrösen Scheide detektiert (Abbildung 36 und Abbildung 40). Ein Vorliegen von PK im Akrosombereich ist nicht sicher, da auch die mit dem PK-S-Peptid präinkubierten Anti-PK-S hier eine Markierung lieferten (vgl. Abbildung 37a,b,c und Abbildung 41a,b) und die Anti-PK-M1 diesen Bereich, wenn überhaupt, nur schwach markierte (Abbildung 36a und Abbildung 40a). Die Markierungen mit den beiden Antikörpern waren bei den Spermien der verschiedenen Arten unterschiedlich. Antikörper gegen Kaninchenmuskel-PK banden bei allen drei Arten an die fibröse Scheide, aber nur bei Eber und Bulle auch im Kopf und hier zum Teil im Akrosombereich (Abbildung 32, Abbildung 36 und Abbildung 40). Nur bei Eber war auch der Cytoplasmotropfen markiert. Antikörper gegen PK-S banden bei allen drei Arten im Akrosombereich (Abbildung 33, Abbildung 37 und Abbildung 41), aber nur bei Humanspermien wurde die fibröse Scheide überzeugend markiert. Ob diese Unterschiede artspezifische Besonderheiten der betreffenden glykolytischen Enzyme anzeigen, ist eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher sind strukturbedingte Unterschiede in der PFA-Fixierung, was die Zugänglichkeit des Antigens beeinflusst. Die für Eber-PK-S spezifische Sequenz, gegen welche die immungereinigten Antikörper gerichtet sind, scheint so oder sehr ähnlich zumindest auch in Bullen- und Humanspermien aufzutreten. Ob diese Sequenz auch Teil der PK oder eines anderen Proteins ist, bleibt zu klären. Ebenso ist nicht sicher, ob bei diesen Arten, wie beim Eber, eine lösliche und eine strukturegebundene PK auftreten. Für die GAPDH bestimmten WESTHOFF und KAMP (1997) in Bullen- und Humanspermien ähnlich geringe Aktivitäten der löslichen Form wie bei Eberspermien. Trotz der offenen Fragen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die PK, wie bei Eberspermien, auch in Bullen- und Humanspermien an der fibrösen Scheide und im Akrosombereich lokalisiert ist.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass in Eberspermien die strukturegebundene Form der PK, die PK-S, an der fibrösen Scheide, im Akrosombereich sowie im Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück lokalisiert ist. Im Mittelstück und im postakrosomalen Bereich des Kopfes scheint hingegen lösliche PK vorzuliegen. Auch in Bullen- und Humanspermien ist PK vermutlich an der fibrösen Scheide und im Akrosombereich vorzufinden. Die Lokalisierung der PK an der fibrösen Scheide steht in Einklang mit Untersuchungen von KRISFALUSI et al. (2006), die kürzlich eine ungewöhnlich feste Bindung von PK an gereinigte fibröse Scheide aus Mausspermien beschrieben. Eine Lokalisierung im Akrosombereich ist bislang noch nicht beschrieben worden.

4.4 Lokalisierung von GAPDH und Kompartimentierung der Glykolyse in Säugerspermien

In Spermien von Mensch und Ratte ist jeweils eine im Vergleich mit der somatischen GAPDH N-terminal verlängerte Isoform (GAPDH-S) identifiziert und im Hauptstück des Flagellums lokalisiert worden (WELCH et al., 2000, 2006). Während für die GAPDH-S in Mausspermien zudem eine ungewöhnlich feste Bindung an die fibröse Scheide gezeigt werden konnte (KRISFALUSI et al., 2006), wurde für Eberspermien noch nicht geklärt, ob hier eine derartige Isoform auftritt. Die feste Strukturbindung des Hauptanteils der Eberspermien-GAPDH (WESTHOFF und KAMP, 1997) lässt aber vermuten, dass es sich hier ebenfalls um eine von somatischer GAPDH abweichende Form handelt, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit zum besseren Verständnis als GAPDH-S bezeichnet wurde.

WESTHOFF (1996) reinigte die GAPDH-S aus Eberspermien und setzte sie zur Produktion von Antikörpern ein. Hieraus erhaltenes Antiserum wurde von der Autorin im Immunoblot für spezifisch befunden und zur Immunogoldmarkierung der GAPDH-S in Säugerspermien verwendet. Für die vorliegende Untersuchung stand dieses Antiserum zur Verfügung. Es sollte getestet werden, ob die Ergebnisse zur Lokalisierung der GAPDH-S von WESTHOFF (1996) über Fluoreszenz- und Immunogoldmarkierung reproduziert werden können. Besonderes Augenmerk lag darauf, die von WESTHOFF (1996) beschriebene Lokalisierung im Akrosombereich zu überprüfen. Dies war interessant, da die PK-S ebenfalls im Akrosombereich lokalisiert ist und die GAPDH-S in der Literatur bisher nur an der fibrösen Scheide detektiert werden konnte (BUNCH et al., 1998; WELCH et al., 2000, 2006; MIKI et al., 2004).

Vor dem Einsatz zur Lokalisierung wurde das Antiserum nochmals auf seine Spezifität hin überprüft. Das Antiserum zeigte im Immunoblot eine hohe Affinität für die GAPDH-S aus Eberspermien, markierte, im Gegensatz zu den Ergebnissen von WESTHOFF (1996), jedoch auch andere Eberspermienproteine (Abbildung 24b). Der Grund für dieses unterschiedliche Ergebnis liegt sehr wahrscheinlich darin, dass die Spezifität des Antiserums an unterschiedlichen Mengen der aufgetragenen Proteine getestet wurde. In der vorliegenden Untersuchung wurde deutlich mehr Protein eingesetzt als in den Untersuchungen von WESTHOFF (1996). Wenngleich die Fremdmarkierungen, in Anbetracht der Proteinauftragsmengen, meist sehr schwach sind, kann beim Einsatz dieses Serums zur Lokalisierung nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Enzyme markiert werden, insbesondere wenn das Antiserum nicht ausreichend verdünnt eingesetzt wird. So kann auch eine Markierung somatischer GAPDH nicht ganz ausgeschlossen werden, auch wenn diese im

Blot verhältnismäßig nur sehr schwach markiert wurde. Es soll hier also darauf hingewiesen werden, dass die Spezifität dieses Serums gegen GAPDH-S deutlich geringer ist, als die der im Rahmen dieser Arbeit immungereinigten Antikörper gegen die PK-S. Da es aber dennoch höchste Affinität zur GAPDH-S aufweist, wurde es eingesetzt, um einen Hinweis zur Lokalisierung dieser in Eberspermien zu erhalten.

Zusätzlich wurden aber auch hier, wie schon bei der Lokalisierung der PK, Antikörper gegen die somatische GAPDH eingesetzt. Die käuflich erworbenen monoklonalen Antikörper gegen Kaninchenmuskel-GAPDH reagierten im Immunoblot spezifisch auf GAPDH, wobei sie neben der Bindung an Kaninchenmuskel-GAPDH eine Kreuzreaktivität mit der GAPDH-S aus Eberspermien aufwiesen. Lösliche GAPDH liegt nach WESTHOFF und KAMP (1997) nur in geringer Menge (< 10%) in Eberspermien vor und konnte so vermutlich aufgrund unzureichender Proteinauftragmenge im Immunoblot nicht detektiert werden. Über die Verwendung der Antikörper gegen die somatische GAPDH sollte also die Lokalisierung der GAPDH mit dem Antiserum gegen die GAPDH-S abgesichert werden. Reagieren bei der Lokalisierung von GAPDH in Spermien beide Antikörper positiv, kann man sicher sein, dass GAPDH markiert wurde und es sich entsprechend dem prozentualen Anteil hierbei überwiegend um die GAPDH-S handeln dürfte.

Fluoreszenzmarkierungen mit dem Antiserum gegen GAPDH-S (Anti-GAPDH-S) und den Antikörpern gegen die somatische GAPDH (Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH) wurden an unfixierten und an PFA-fixierten, jeweils mit Triton X-100 permeabilisierten Eberspermien durchgeführt. Nach Abzug der Kontrollfluoreszenzen wurden bei diesen unterschiedlichen Vorbehandlungen pro Antikörper nahezu gleiche Ergebnisse erhalten. Wie die Anti-PK-S markierte Anti-GAPDH-S deutlich das Hauptstück des Flagellums und den Akrosombereich, sowie etwas schwächer den Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück, während das Mittelstück und der postakrosomale Kopfbereich praktisch keine Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 28 und Abbildung 29, jeweils e,g). Im Gegensatz zur Anti-PK-S wurde zudem der Cytoplasmatropfen deutlich markiert. Mit Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH wurde ebenfalls deutlich der Akrosombereich und der Cytoplasmatropfen markiert (Abbildung 28 und Abbildung 29, jeweils a,c), so dass es sicher erscheint, dass hier GAPDH vorliegt. Das Hauptstück wurde an unfixierten Spermien etwas schwächer markiert, wodurch auch hier ein Vorliegen von GAPDH zu vermuten ist. Die schwächere Markierung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die fibröse Scheide, an welcher die Markierung im Hauptstück vermutet wird, eine komplexere Struktur als das Akrosom aufweist und das Epitop der monoklonalen Antikörper aus diesem Grund schlechter zugänglich ist. Hierfür spricht

außerdem, dass die Markierung des Hauptstücks nach Proteinquervernetzung mit PFA im Vergleich zum Akrosom deutlich reduziert war. Insgesamt deuten die Markierungen mit dem Antiserum gegen die GAPDH-S und den Antikörpern gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH darauf hin, dass die GAPDH überwiegend im Akrosombereich, im Hauptstück und im Cytoplasmatropfen zu finden ist. Dass es sich hier um die strukturgebundene Form, die GAPDH-S handelt, ist nicht sicher, da hierfür die Spezifität des Antiserums nicht ausreicht. Dies ist jedoch zu vermuten, da die GAPDH-S den Hauptanteil (> 90%) der GAPDH in Eberspermien ausmacht (WESTHOFF und KAMP, 1997). Wünschenswert wären jedoch noch Kontrollexperimente mit GAPDH-S abgesättigtem Antiserum, wodurch die Aussagekraft der Experimente mit diesem Serum deutlich gesteigert werden könnte. Gereinigte GAPDH-S aus Eberspermien lag jedoch nicht vor und dessen Gewinnung in ausreichender Menge ist sehr aufwendig. Andererseits könnte man auch versuchen, wie im Fall der PK-S-Lokalisierung, spezifische Antikörper gegen GAPDH-S aus dem Serum zu reinigen.

Bei der Immunogoldmarkierung mit Anti-GAPDH-S zeigten sich die Markierungen in den gleichen Regionen der Eberspermien, wie bei der Fluoreszenzmarkierung (Abbildung 35). Deutlich markiert waren im Hauptstück des Flagellums die fibröse Scheide, im Kopf der Akrosombereich sowie der Cytoplasmatropfen. Im Mittelstück sowie im postakrosomalen Bereich war keine deutliche Markierung vorhanden. Der Einsatz von Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. Es kam lediglich zu clusterartigen Markierungen im gesamten Spermium. Der Grund könnte darin liegen, dass diese monoklonalen Antikörper an die GAPDH-S aufgrund von PFA-bedingten Veränderungen der Antigenoberfläche oder deren Zugänglichkeit nicht binden. Möglicherweise sind die monoklonalen Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH, wie auch das monoklonale Anti-Acrosin, bei der gewählten Versuchsdurchführung nicht für die Immunogoldmarkierung geeignet. Auch mit dem Anti-Acrosin war keine spezifische Immunogoldmarkierung möglich. Dieses experimentelle Problem könnte möglicherweise durch Markierung der Spermien mit dem primären Antikörper vor Fixierung und Einbettung (Preembedding-Verfahren) gelöst werden.

Das Antiserum gegen die GAPDH-S aus Eberspermien wurde auch zur Immunogoldmarkierung an Spermien von Bulle und Mensch eingesetzt. Auch hier zeigten sich deutliche Markierungen an der fibrösen Scheide und im Akrosombereich, während die anderen Spermienregionen nahezu frei von Goldpartikeln waren (Abbildung 39 und Abbildung 43). Ein Unterschied zum Eber zeigte sich bei den Cytoplasmatropfen, die bei

Bulle und Mensch nicht markiert wurden. Ob diese artspezifischen Unterschiede bezüglich der Markierung des Cytoplasmotropfens experimentell bedingt sind, ist noch unklar.

Zusammenfassend gibt es auch für die GAPDH deutliche Hinweise darauf, dass sie in Eber-, Bullen- und Humanspermien, wie die PK-S, an der fibrösen Scheide und im Akrosombereich lokalisiert ist. Die Lokalisation von GAPDH(-S) an der fibrösen Scheide stimmt mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen (BUNCH et al., 1998; WELCH et al., 2000, 2006; MIKI et al., 2004; KRISFALUSI et al., 2006) gut überein. Im Gegensatz zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten BUNCH et al. (1998) und WELCH et al. (2006) die GAPDH-S an Mäuse- und Rattenspermien nicht im Akrosom detektieren. Bei der Lokalisierung mit dem Antiserum gegen die GAPDH-S von WESTHOFF (1996) kann eine unspezifische Proteinbindung nicht ausgeschlossen werden. Da mit den monoklonalen Antikörpern gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH jedoch ebenfalls eine deutliche Fluoreszenzmarkierung des Akrosombereichs beobachtet wurde, ist ein Vorliegen von GAPDH im Akrosombereich von Eberspermien sehr wahrscheinlich. Dass die GAPDH-S von BUNCH et al. sowie WELCH et al. nicht im Akrosombereich detektiert wurde, könnte z.B. an den verwendeten Antikörpern, an unterschiedlicher Vorbehandlung der Spermien oder an artspezifischen Unterschieden zwischen Maus, Ratte, Eber, Bulle und Mensch liegen.

Mittlerweile wird die fibröse Scheide von vielen Arbeitsgruppen als Ankerstruktur für glykolytische Enzyme angesehen (vgl. EDDY et al., 2003). KRISFALUSI et al. (2006) zeigten, dass hier neben GAPDH-S und PK, außerdem die A-Isoformen der Aldolase 1 und der LDH ungewöhnlich fest sowie die HK1-S, die PGK2, die Enolase und die LDH-C etwas weniger fest gebunden sind. Triosephosphatisomerase und PGK sind mit der strukturgebundenen GAPDH in Eberspermien, zumindest teilweise, assoziiert (WESTHOFF und KAMP, 1997). Die 6-Phosphofruktokinase hingegen scheint höchstens über sehr schwache ionische Wechselwirkungen direkt oder indirekt mit der fibrösen Scheide assoziiert zu sein (KAMP et al., 2007).

Im Mittelstück von Eberspermien scheinen weder PK-S noch GAPDH-S vorzuliegen. Dies lässt vermuten, dass diese glykolytischen Enzymformen in den reifen Spermien nicht im Mittelstück gebunden sind. Auch die schwache Markierung durch Antikörper gegen die somatische GAPDH deutet auf eine nur geringe Bedeutung der Glykolyse in diesem Abschnitt. Allerdings konnte die lösliche PK (Abbildung 26 und Abbildung 27, jeweils a,c) und auch die HK1-S im Mitochondrienbereich deutlich nachgewiesen werden (TRAVIS et al., 1998).

Die Markierung von GAPDH und PK-S im Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück könnte darauf hindeuten, dass auch in diesem Bereich die Glykolyse funktionstüchtig ist. Ein möglicher Grund wäre die Bereitstellung von ATP für SPCAs (secretory pathway Ca^{2+} -ATPasen), die ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert wurden und an der Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sein könnten (vgl. JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2006). Entsprechende Markierungen wurden auch für die Creatinkinase in Spermien von Hahn beschrieben (KALDIS et al., 1996). In diesen Spermien scheint dem Phosphocreatin eine wichtige Rolle in der Energieversorgung zuzukommen.

Im Akrosombereich wurden sowohl die HK1-S (TRAVIS et al., 1998) als auch die PFK (KAMP et al., 2007) bereits detektiert. Mit der PK-S und der GAPDH konnten zwei weitere glykolytische Enzyme, über die Fluoreszenz- und die Immunogoldmethode, deutlich im Akrosombereich lokalisiert werden. Diese Daten unterstützen die Vorstellung, dass die Glykolysekette auch im Akrosombereich von Säugerspermien vorhanden ist. Ob die im Akrosombereich gefundenen glykolytischen Enzyme auch katalytisch aktiv sind, muss noch gezeigt werden. Sie könnten auch inaktive Reste der Spermatogenese darstellen oder andere als ihre glykolytischen Funktionen besitzen, wie es für die Hexokinase vorgeschlagen wurde (TRAVIS et al., 1998). Mögliche Gründe für eine glykolytische Funktion in Akrosom und fibröser Scheide werden in Teil 4.6 erörtert.

4.5 Produktion von PK und GAPDH im Laufe der Spermatogenese

Bislang wurde gezeigt, dass in Eberspermien eine Pyruvatkinase (PK-S) vorliegt, die sich von somatischer PK unterscheidet, dass die Antikörper gegen PK-S diese spezifisch binden und nicht die lösliche PK aus Eberspermien erkennen und dass die PK-S an der fibrösen Scheide sowie im Akrosombereich lokalisiert ist, während die lösliche PK im Mittelstück vorzuliegen scheint. Es stellt sich nun die Frage, wann die PK-S während der Spermatogenese produziert wird. Mit den immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S sollte es möglich sein, dies über Fluoreszenzmarkierung an Eberhodenschnitten zu überprüfen. Mit den Antikörpern gegen die Kaninchen-PK-M1 wurde zudem geprüft, ob neben der PK-S auch andere Pyruvatkinasen im Keimepithel auftreten. In gleicher Weise wurden das Antiserum gegen die GAPDH-S (von WESTHOFF, 1996) sowie die Antikörper gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH eingesetzt, auch wenn eine sichere Differenzierung zwischen löslicher GAPDH und GAPDH-S über diese Antikörper nicht möglich erschien. Für die GAPDH-S in Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass sie erst in kondensierenden Spermatischen produziert wird (WELCH et al., 2006). Für Eber ist dies noch nicht gezeigt. Auch das Vorkommen somatischer GAPDH im Keimepithel ist noch nicht untersucht. Über eine

Lokalisierung von (Pro)Acrosin sollte v.a. die Lage der runden Spermatozoen besser eingegrenzt werden. Es ist bekannt, dass Proacrosin, die Vorstufe des Acrosins, in den frühen Spermatozoen erstmals hergestellt wird (GUPTA, 2005).

Die Lokalisierung der genannten Proteine erforderte eine ausreichende Haftung und Erhaltung des Hodengewebes auf dem Deckgläschen während der Fluoreszenzmarkierung. Aus diesem Grund wurde in Vorversuchen getestet, wie sich verschiedene Vorbehandlungen des Hodengewebes auf dessen Erhaltung bei der Markierung auswirken.

Bei Verwendung von Schnitten aus unfixiertem Gewebe wurden, bis auf elongierte Spermatozoen und Spermien, nahezu alle Zellen während der Fluoreszenzmarkierung vom Deckgläschen gewaschen (Abbildung 44a,b). Der Grund könnte darin liegen, dass die elongierten Spermatozoen und die Spermien aufgrund ihrer geringen Größe überwiegend nicht angeschnitten wurden und über ihre Zelloberfläche, wie bei den Spermienausstrichen gezeigt, auch ohne Fixierung gut am Untergrund haften. Dagegen sind ihre Vorläuferzellen deutlich größer und werden so bei der gewählten Schnittdicke von 10 µm angeschnitten. Der Zellinhalt lässt sich ohne Fixierung anscheinend sehr einfach auswaschen. Auch eine 4minütige Fixierung der Schnitte mit Aceton führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Gewbeerhaltung nach Fluoreszenzmarkierung (Abbildung 44c,d). Eine Vorbehandlung der Schnitte mit Methanol und Aceton führte zu einer zumindest teilweisen Erhaltung des Keimepithelcytoplasmas, wohingegen die Kerne zum Großteil nicht erhalten blieben (Abbildung 44e,f). PFA führte über die Quervernetzung von Proteinen zu einer deutlich besseren Gewbeerhaltung, wobei diese mit der Dauer der Behandlung zunahm (Abbildung 44g-l). Schnitte aus PFA-fixiertem Hodengewebe (2 h, 3% PFA) waren nach der Fluoreszenzmarkierung am besten erhalten. Beim Vergleich der unterschiedlich vorbehandelten und fluoreszenzmarkierten Schnitte waren außerdem Tropfen in der Peripherie der Hodenkanälchen auffällig, die bei der Behandlung mit den organischen Lösungsmitteln herausgelöst/ausgewaschen wurden. Es handelt sich vermutlich um Lipidtropfen, die in den Sertolizellen auftreten. Beim Mensch wurde beobachtet, dass die Zunahme dieser Lipidtropfen in Korrelation mit dem Alter steht (PANIAGUA et al., 1991).

Neben der Erhaltung des Gewebes ist auch die Erhaltung und Zugänglichkeit der Epitope für die verwendeten Antikörper notwendig. Dies führt zu entgegengesetzten Anforderungen an die Gewebepreparation. Es muss eine Gewebefixierung gefunden werden, bei welcher beide Anforderungen bestmöglich erfüllt werden. Bei der Fluoreszenzmarkierung an Eberspermien war bereits gezeigt worden, dass die Markierung abhängig von der Vorbehandlung unterschiedlich sein kann (vgl. z.B. Markierung mit Anti-Acrosin an

unfixierten und PFA-fixierten, jeweils mit Triton X-100 permeabilisierten Spermien). Es ist zudem nicht auszuschließen, dass sich eine Vorbehandlung in den unterschiedlichen Zelltypen des Hodenschnittes unterschiedlich auf die Erhaltung und/oder Zugänglichkeit der Antigene/Epitope für einen Antikörper auswirkt. Aus diesem Grund erscheint es notwendig, eine Lokalisation der Enzyme an unterschiedlich vorbehandeltem Gewebe durchzuführen und sich hierüber ein Gesamtbild zu verschaffen.

Die beste Gewebeerhaltung wurde bei der Fluoreszenzmarkierung an Hodenschnitten aus PFA-fixiertem Gewebe erreicht. Jedoch konnten hier weder PK, noch GAPDH oder Acrosin mit den unterschiedlichen Antikörpern eindeutig in den Keimzellen detektiert werden. Da das Hodengewebe für 2 h in 3% PFA fixiert worden war, liegt der Grund hierfür vermutlich in einer zu starken Proteinvernetzung, die dazu geführt hat, dass die Epitope für die Antikörper nicht mehr zugänglich und/oder verändert waren. Interessant war jedoch, dass die Residualkörper, die in den Schnitten aus dem PFA-fixierten Gewebe sehr gut erhalten waren, eine starke Fluoreszenz nach Markierung mit Anti-PK-S und dem Antiserum gegen die GAPDH-S zeigten (Abbildung 57 und Abbildung 58), während eine Markierung mit den Antikörpern gegen somatische PK und GAPDH ausblieb (nicht abgebildet). Da gezeigt worden war, dass die Antikörper gegen die somatischen Enzyme im Immunoblot auch an die PK-S und GAPDH-S binden (Abbildung 11b, Abbildung 23c und Abbildung 24c), wird vermutet, dass ihre Epitope, im Gegensatz zu denen von Anti-PK-S und dem Antiserum gegen die GAPDH-S, bei dieser Vorbehandlung nicht erhalten und/oder zugänglich waren. Die starken Markierungen der Residualkörper mit Anti-PK-S und dem Antiserum gegen die GAPDH-S deuten darauf hin, dass große Mengen an PK-S und vermutlich GAPDH-S zum Ende der Spermiogenese hin von den elongierten Spermatiden abgeschnürt werden und auch später im Nebenhoden durch die Cytoplasmotropfen (Detektion von GAPDH in diesen, Abbildung 28a,c und Abbildung 35e). Diese Befunde stehen im Einklang mit der Beobachtung von WELCH et al. (2006), dass die Immunanfärbung von GAPDH-S in Rattenhoden mit der Abnahme des Cytoplasmavolumens durch die Abschnürung der Residualkörper bei kondensierenden Spermatiden ebenfalls abnimmt. Es wäre auch möglich, dass nur die N-terminalen Verlängerungen von PK-S und GAPDH-S mit dem Cytoplasmotropfen entfernt werden. Da Anti-PK-S primär gegen diese N-terminale Verlängerung gerichtet ist, könnte dies erklären, warum Anti-PK-M1 den Residualkörper nicht markieren. Ob die Eber-GAPDH-S wie die in Maus, Mensch und Ratte (WELCH et al., 1992, 2000, 2006) N-terminal verlängert ist, wurde bisher noch nicht geprüft. Bei der GAPDH kommt für die Interpretation erschwerend hinzu, dass eine Markierung von GAPDH

aufgrund unspezifischer Proteinbindung des Antiserums gegen die GAPDH-S nur sicher ist, wenn die Antikörper gegen die somatische GAPDH das Antigen ebenfalls markieren, was hier nicht der Fall war.

Nachdem gezeigt worden war, dass das PFA-vorfixierte Gewebe nicht für die Markierung von PK, GAPDH und Acrosin in den Keimzellen geeignet war, wurden Schnitte aus unfixiertem Hodengewebe verwendet. Eine ausreichende Gewebeerhaltung konnte nur durch Fixierung dieser Schnitte auf dem Deckgläschen erreicht werden. Die Fluoreszenzmarkierungen mit den verschiedenen Antikörpern wurden im Folgenden jeweils an Hodenschnitten durchgeführt, die mit Methanol und Aceton, PFA und Aceton bzw. PFA und Triton X-100 fixiert und permeabilisiert waren.

Zuerst wurde das Anti-Acrosin zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt, um über die Detektion des (Pro)Acrosins v.a. die Lage der runden, aber auch der elongierten Spermatiden zu bestimmen. Wie auch bei Eberspermien gezeigt, war eine kurzfristige PFA-Fixierung der Eberhodenschnitte zur klaren Fluoreszenzmarkierung mit Anti-Acrosin notwendig. Nach einer Fixierung von Schnitten mit Methanol und Aceton konnte, wenn überhaupt, nur eine schwache Markierung der Akrosomen beobachtet werden (Abbildung 61). Bei PFA-fixierten Schnitten, die zusätzlich mit Aceton (Abbildung 59) oder mit Triton X-100 (Abbildung 60) behandelt waren, wurden die Akrosomen der elongierten Spermatiden oder der Spermien deutlich markiert. Zudem wurde an runden Spermatiden eine punktförmige Markierung nahe dem Zellkern beobachtet. Es handelt sich hierbei vermutlich um das akrosomale Bläschen bzw. um das sich entwickelnde Akrosom. Dies deutet darauf hin, dass das Proacrosin schon sehr früh in das sich entwickelnde Akrosom integriert ist. Interessant ist weiterhin, dass sowohl bei PFA-Triton- als auch bei Aceton- und Methonol-Aceton-fixierten Schnitten sowie in unfixierten Schnitten jeweils eine punktförmige Markierung im Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück beobachtet wurde. Welche Funktion das Acrosin in diesem Bereich besitzt, ist nicht bekannt. An den PFA-fixierten Schnitten konnte also das (Pro)Acrosin erfolgreich lokalisiert und die Lage runder und elongierter Spermatiden klar dargestellt werden.

Mit den Antikörpern gegen somatische PK bzw. GAPDH konnten Markierungen im gesamten Cytoplasmabereich des Keimepithels, an den Flagellen sowie an der Lamina propria gefunden werden, während die Strukturen in den Kontrollen ohne Primärantikörper, wenn überhaupt, nur sehr schwach fluoreszierten (Abbildung 45 und Abbildung 47 bzw. Abbildung 51 bis Abbildung 53). Dies deutet darauf hin, dass sich in diesen Regionen PK und GAPDH befindet. Nur bei der Fluoreszenzmarkierung eines mit PFA und Triton X-100 vorbehandelten

Hodenschnittes, wurde kein Unterschied in der über Anti-PK-M1 erhaltenen Fluoreszenz im Vergleich mit der zugehörigen Kontrolle ohne Primärantikörper beobachtet (Abbildung 46). Diese Vorbehandlung war anscheinend nicht zur Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-M1 geeignet.

Sowohl für die Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-M1 als auch für die mit Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH scheint die Vorbehandlung der Hodenschnitte mit Methanol und Aceton am besten geeignet zu sein. Bei dieser Vorbehandlung ist der Bereich der Lamina propria mit Anti-PK-M1 und mit Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH deutlich fluoreszenzmarkiert (Abbildung 47 bzw. Abbildung 53). Hier befinden sich u.a. kontraktile Zellen, bei welchen PK-M1 zu erwarten war. Auch in den Leydigischen Zellen könnte PK-M1 vorliegen, jedoch wird eine Bewertung der Fluoreszenz hier durch Autofluoreszenz, welche für diese Zellen bekannt ist (MILLETTE et al., 1984; HEDGER und EDDY, 1986), erschwert. Interessant ist bei den mit Methanol und Aceton vorbehandelten Schnitten außerdem, dass eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der Spermatogonien und der elongierten Spermatiden auftritt, während der Bereich zwischen diesen Zellen nur verhältnismäßig schwach fluoresziert. Die Fluoreszenz im Bereich der elongierten Spermatiden war im Vergleich mit der Spermatogonienfluoreszenz beim Einsatz der Anti-PK-M1 stärker als bei Verwendung der Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass es sich bei der Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH um monoklonale Antikörper handelt, welche schon bei den ejakulierten Eberspermien nur zu einer schwächeren Markierung des Flagellums geführt hatten (Abbildung 28 und Abbildung 29, jeweils a,c). Die polyklonalen Antikörper gegen PK-M1 markierten im Immunoblot auch die lösliche PK und die PK-S aus Eberspermien mit hoher Affinität (Abbildung 23c), während die Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH geringere Affinität zur GAPDH-S im Vergleich zu somatischer GAPDH besitzt (Abbildung 24c).

Verglichen mit der Markierung über die Antikörper gegen somatische PK waren die Fluoreszenzmarkierungen mit den immungereinigten Antikörpern gegen die PK-S deutlich in luminale Richtung verschoben und klar den Strukturen zuzuordnen. Die Flagellen der elongierten Spermatiden bzw. der Spermien waren stark, sowie der Bereich um die Kerne der elongierten Spermatiden herum etwas schwächer markiert (Abbildung 49 und Abbildung 50). Bei der Fluoreszenzmarkierung eines mit PFA und Aceton vorbehandelten Schnittes mit Anti-PK-S könnte es sich bei den körniger wirkenden Markierungen, neben Flagellen und Kopfbereich elongierter Spermatiden, evtl. auch um Residualkörpermaterial handeln (Abbildung 48), welches zuvor bereits bei den Schnitten aus PFA-fixiertem Gewebe mit Anti-PK-S markiert wurde (Abbildung 57). Bei dieser Vorbehandlung fluoreszierte auch das Cytoplasma im Bereich der übrigen Keimzellen, jedoch verhältnismäßig sehr viel schwächer.

Überraschend war, dass sich mit dem Antiserum gegen die GAPDH-S, welches eine deutlich geringere Spezifität wie die Anti-PK-S aufweist, ein sehr ähnliches Bild wie bei der Fluoreszenzmarkierung mit Anti-PK-S zeigte. Auch hier beschränkte sich die Markierung auf den luminalen Bereich der Hodenkanälchen – und zwar auf die Flagellen sowie den Bereich um die Spermatidenkerne (Abbildung 54 bis Abbildung 56). Aufgrund der großen Affinität für GAPDH-S und einer ausreichenden Verdünnung des Antiserums fällt die unspezifische Bindung somatischer GAPDH, welche mit den Antikörpern gegen die Kaninchenmuskel-GAPDH v.a. in den Spermatogonien gezeigt worden war, anscheinend nicht ins Gewicht. Es war nahezu keine Markierung in der Peripherie der Hodenkanälchen zu beobachten. Um zu überprüfen, ob die Markierung durch das Antiserum nur auf die GAPDH-S zurückzuführen ist, wäre auch hier eine Kontrolle mit GAPDH-S präinkubiertem Antiserum notwendig.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung von PK und GAPDH in Eberhodenschnitten gezeigt werden, dass die N-terminal verlängerte PK-S sowie sehr wahrscheinlich die GAPDH-S in der Spermatogenese von Eber erstmals, oder zumindest vermehrt, in elongierenden Spermatiden auftreten. Neben diesen existieren vermutlich somatische Enzymformen, die überwiegend im Cytoplasma der Spermatogonien, aber auch in Spermatozyten und runden Spermatiden zu finden sind.

Es ist bekannt, dass während der Spermatogenese, und hier besonders in der Spermiogenese, vermehrt keimzell- bzw. spermien-spezifische Enzyme hergestellt werden (vgl. GUPTA, 2005). Auch für Glykolyseenzyme wurden bereits spezifische Enzyme beschrieben, die erst ab einem bestimmten Zeitpunkt in der Spermatogenese produziert werden. Neben der bereits genannten Lokalisierung von GAPDH-S in Rattentestes ab dem Stadium der kondensierenden Spermatiden (WELCH et al., 2006), welche mit der hier gezeigten Lokalisierung mit dem Antiserum gegen GAPDH-S in Ebertestes in Einklang steht, wurde auch beschrieben, dass die *GAPDHS*-Expression translational reguliert wird. Während die *GAPDHS*-mRNA schon in runden Spermatiden detektiert wurde, war das Protein erst in den späteren, kondensierenden Spermatiden vorzufinden (WELCH et al., 2006). Auch die HK1-S wurde in Maushoden erstmals in Spermatiden detektiert (MORI et al., 1998; TRAVIS et al., 1998). Während TRAVIS et al. die HK1-S bereits in geringer Menge in Proteinextrakten gereinigter runder Spermatiden nachweisen konnten, detektierten MORI et al. die HK1-S immunhistochemisch erst in den kondensierenden Spermatiden. Dieser Unterschied könnte evtl. von einer Verunreinigung der runden Spermatiden-Fraktion (ca. 85%ige Reinheit wurde angegeben; TRAVIS et al., 1998) mit kondensierenden Spermatiden herrühren. Auch das testis-spezifische Gen der PGK2 wird erst ab dem Beginn der Meioseteilungen der Keimzellen

exprimiert. So wurde *Pgk-2*-mRNA erstmals in präleptotänen (MCCARREY et al., 1992) oder leptotänen (GOTO et al., 1990) Spermatozyten detektiert. mRNA für die PGK1, welche X-chromosomal codiert ist, wurde hingegen in Spermatozyten und frühen Spermatozyten, nicht aber in Spermatozyten gefunden (GOTO et al., 1990; MCCARREY et al., 1992).

Zu Isoformen oder Lokalisation der PK während der Spermatogenese in Säugern wurden bisher auf der Proteinebene keine Untersuchungen durchgeführt. Untersucht wurde jedoch die Produktion von *PK-M1*- und *PK-M2*-mRNA während der Spermatogenese in Mäusehoden (DE LUIS und DEL MAZO, 1998). Es wurde beschrieben, dass die Produktion von *PK-M1*-mRNA ab dem Stadium der elongierenden Spermatozyten deutlich ansteigt, während die Menge an *PK-M2*-mRNA im Verlauf der Spermatogenese abnimmt. Die Autoren schließen aus dem Anstieg der *PK-M1*-mRNA in den elongierenden Spermatozyten, dass dieser die Produktion von PK-M1 anzeigt. Sie konnten hierbei jedoch noch nicht das spezifische Protein PK-S in Betracht ziehen. In Northern-Blots verwendeten sie zwei Primer. Der eine war komplementär zu einer spezifischen Nukleotidsequenz der *PK-M2*-mRNA, der andere zu einer Sequenz, die sowohl in der mRNA von *PK-M1* als auch der von *PK-M2* zu finden ist. Da die PK-S vermutlich, wie die PK-M1 und die PK-M2 vom *PKM*-Gen codiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Sequenz, die in mRNA von *PK-M1* und *PK-M2* auftritt, auch in der von *PK-S* vorhanden ist. Da gezeigt werden konnte, dass die PK-S in den elongierenden Spermatozyten erstmals hergestellt wird, ist zu vermuten, dass der von DE LUIS und DEL MAZO beschriebene Anstieg der *PK-M1*-mRNA zumindest teilweise auf die Synthese von mRNA für die PK-S zurückzuführen ist. Sollten die in den hier durchgeführten Untersuchungen eingesetzten polyklonalen Antikörper gegen PK-M1 eine Kreuzreaktivität mit PK-M2 besitzen, so könnte mit diesen Antikörpern die PK-M2 neben der PK-M1 in den Keimzellen markiert worden sein. Dies wäre den Ergebnissen von DE LUIS und DEL MAZO zufolge, zu vermuten. In den ausdifferenzierten Spermien scheint aber keine PK-M2 mehr zu existieren. Dies wird zumindest durch die kinetische Charakterisierung belegt.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmarkierung von PK und GAPDH stehen außerdem in Einklang mit Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel der verschiedenen Keimzellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Energiestoffwechsel der Keimzellen während der Spermatogenese deutlich verändert. Spermatozyten nutzen Glukose vermutlich als Hauptenergiequelle (BAJPAI et al., 1998). Die peripher in den Hodenkanälchen liegenden Spermatozyten sind gut mit Blutglukose versorgt (BOUSSOUAR und BENAHMED, 2004). Die zentraler liegenden Spermatozyten und runden Spermatozyten benötigen Laktat und/oder

Pyruvat, um ihren ATP-Spiegel aufrechtzuerhalten (JUTTE et al., 1981; MITA und HALL, 1982; BAJPAI et al., 1998). Es wurde ein rascher Abfall des ATP-Spiegels beobachtet, wenn den isolierten Zellen nur Glukose bereitgestellt wurde (GROOTEGOED et al., 1984, 1986; NAKAMURA et al., 1986). Laktat hingegen reicht Spermatozyten zur Aufrechterhaltung des ATP-Spiegels aus. Während Atmungsinhibitoren den Laktat- bzw. Pyruvat-Verbrauch bei Spermatozyten reduzierten, führten sie bei runden Spermatozyten sogar zur Degeneration (GROOTEGOED et al., 1984). Da sich die Spermatozyten und die Spermatozyten innerhalb der Blut-Hoden-Schranke befinden und die Flüssigkeit der Hodenkanälchen reich an Laktat, aber arm an Glukose und Pyruvat ist (SETCHELL, 1970; EVANS und SETCHELL, 1978), verwenden beide Zelltypen vermutlich Laktat zur ATP-Produktion. Zudem ist anzunehmen, dass sie von den Sertolizellen mit Laktat versorgt werden (vgl. BOUSSOUAR und BENAHMED, 2004). BAJPAI et al. (1998) beschreiben, dass in Spermien wiederum vermehrt Glukose metabolisiert wird. Dies könnte mit der besonderen Kompartimentierung der Glykolyse in Säugerspermien zusammenhängen (Teil 4.6).

In der Spermatogenese kommt es also zu einem Wechsel der zur ATP-Gewinnung genutzten Substrate und Stoffwechselwege. Während die Glykolyse für die Spermatogonien vermutlich wichtig ist, verliert sie bei den Spermatozyten an Bedeutung und tritt bei den runden Spermatozyten ganz in den Hintergrund. In Spermien scheint sie wiederum zu dominieren. In Übereinstimmung hiermit war die Fluoreszenzmarkierung der glykolytischen Enzyme PK und GAPDH mit Anti-PK-M1 und Anti-Kaninchenmuskel-GAPDH im Cytoplasma der Spermatogonien sehr stark (vgl. Abbildung 47 und Abbildung 53, Methanol und Aceton vorbehandelte Schnitte) und nahm dann zum Tubuluslumen hin ab. In den elongierten Spermatozyten und in den Spermien konnten dann die spezifischen Enzymformen PK-S und GAPDH-S detektiert werden. Da die Markierung mit den Antikörpern gegen die somatischen Glykolyseenzyme von den Spermatogonien über die Spermatozyten bis hin zu den runden Spermatozyten immer geringer wird, wäre es möglich, dass die Enzymformen, zumindest teilweise, abgebaut werden. In den elongierenden Spermatozyten werden dann die spezifischen Glykolyseenzyme PK-S und GAPDH-S hergestellt, die sich vermutlich von den somatischen Enzymen unterscheiden, um an bestimmten Orten innerhalb der Spermien lokalisiert zu werden.

4.6 Bedeutung der Glykolyse in Säugerspermien

Es ist inzwischen weitgehend anerkannt, dass der Glykolyse in Säugerspermien eine besondere Bedeutung zukommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Ansicht. Sie liefert u.a. einen weiteren Hinweis für die vermutete Lokalisierung glykolytischer Enzyme an der fibrösen Scheide (vgl. EDDY et al., 2003). Neben der HK1-S und der GAPDH-S wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die PK-S als drittes glykolytisches Enzym einen ungewöhnlichen N-Terminus besitzt und an der fibrösen Scheide lokalisiert ist. Bei der von KRISFALUSI et al. (2006) beschriebenen, fest an der fibrösen Scheide von Mausspermien gebundenen PK handelt es sich also vermutlich nicht, wie angenommen, um PK-M1, sondern um die spezifische N-terminal verlängerte PK-S. Dass auch weitere glykolytische Enzyme (A-Isoform der Aldolase 1, PGK2 und Enolase) und die LDH (LDH-A und LDH-C) in mehr oder weniger fester Bindung/Assoziation an der fibrösen Scheide lokalisiert sind (KRISFALUSI et al., 2006), deutet auf eine räumliche Organisation der Glykolyse und der LDH an der fibrösen Scheide hin. Diese Daten weisen auf Multienzymkomplexe der Glykolyseenzyme hin, wobei die ungewöhnlich fest gebundenen Enzyme (z.B. GAPDH-S und PK-S) diese Enzymkomplexe an der Struktur verankern und weiteren glykolytischen Enzymen als Anheftungsstellen dienen. Triosephosphatisomerase und 3-Phosphoglyzeratkinase scheinen beispielsweise über hydrophobe Wechselwirkungen an die GAPDH-S in Eberspermien gebunden zu sein (WESTHOFF und KAMP, 1997). Andere Enzyme, wie die 6-Phosphofruktokinase, die schon in hypotonischem Salzmedium löslich sind (KAMP et al., 2007), könnten z.B. über schwache ionische Bindung mit anderen Glykolyseenzymen oder mit der fibrösen Scheide interagieren. Die glykolytischen Enzyme könnten so über verschiedenartige und unterschiedlich starke Kräfte assoziiert einen direkten Transfer der Zwischenprodukte und glykolytischen Metabolite zum jeweils nächsten Enzym ermöglichen („Metabolic channeling“). Multienzymkomplexe glykolytischer Enzyme wurden auch von anderen Zelltypen beschrieben bzw. postuliert (vgl. LYNCH und PAUL, 1983; MASTERS et al., 1987; SRERE, 1987; KNULL und WALSH, 1992). Diese Interaktionen zwischen den Enzymen und mit zellulären Strukturen scheinen jedoch deutlich weniger stark ausgebildet zu sein als in Säugerspermien. Dieser experimentelle Vorteil könnte genutzt werden, um auch allgemein bedeutsame Informationen über die Auswirkungen von Strukturbindungen auf die Funktion von Stoffwechselwegen zu erhalten. Die Tatsache, dass Spermien diese auffallenden Struktur-Enzymbindungen zeigen, könnte man als eine Anpassung an das extrem reduzierte Cytoplasma in diesen Zellen verstehen. Auf kleinstem Raum müssen für einen effizienten Stoffwechselweg die einzelnen Enzyme optimal angeordnet sein.

Neben dem „Metabolic channeling“ wäre auch eine Regulation der Glykolyse über reversible Assoziation der Enzyme möglich. Bislang gibt es hierfür aber keine Belege in Säugerspermien. Vielmehr scheint die Aktivität des wichtigsten regulatorischen Enzyms der Glykolyse, der 6-PFK, auch in Eberspermien durch mehrere zelluläre Effektoren reguliert zu werden (KAMP et al., 2007). Wie bei der Spermien-PFK, wurde auch bei der PK-S eine inhibitorische Wirkung von Citrat und ATP beobachtet, die Effekte sind jedoch deutlich schwächer als bei der PFK. Die Hemmung von PFK und PK durch Citrat könnte für das Spermium eine besondere Bedeutung besitzen. Es ist bekannt, dass die Citratkonzentration im Seminalplasma von Eberejakulaten mit etwa 10 mM (KAMP und LAUTERWEIN, 1995) hoch ist, wenige Stunden nach Besamung von Sauen im Eileiter jedoch drastisch abgenommen hat (vgl. KAMP et al., 2007). So könnte eine Hemmung der Glykolyse durch Citrat beim Eintritt der Spermien in den Eileiter aufgehoben werden und die ATP-Produktion in den Spermien an veränderte Situationen (z.B. Kapazitation, Hyperaktivität) anpasst werden. Inwiefern extrazelluläres Citrat jedoch tatsächlich einen Effekt auf die Glykolyseenzyme im Spermium ausübt bzw. ausüben kann, ist bisher nicht klar (vgl. KAMP et al., 2007).

Auffällig bei den kinetischen Untersuchungen der PK war, dass die PK-S wie die PK-M1 und entgegengesetzt zu anderen PK-Isoformen (z.B. PK-L) weder durch F_{1,6}P₂ aktiviert, noch durch L-Alanin inhibiert wurde. Beim Leberenzym, welches zudem auch stärker als die PK-M1 und die PK-S durch ATP gehemmt wird, könnten diese kinetischen Eigenschaften eine Hemmung des Abbaus von PEP sicherstellen, wenn dieses für die Gluconeogenese z.B. aus Alanin produziert wird. In Muskeln oder Spermien, die keine Gluconeogenese durchführen (vgl. MARIN et al., 2003), ist eine derartige Regulation der PK vermutlich nicht notwendig.

Shuttle-Systeme zum Transport von mitochondrialem energiereichen Phosphat besitzen in Säugerspermien vermutlich nur eine untergeordnete Bedeutung (Abschnitt 1.2.4). Die Kompartimentierung der Glykolyse mit anschließender Laktatproduktion an der fibrösen Scheide könnte diese Transportsysteme im Flagellum ersetzen. Im Mittelstück, welches die Mitochondrien enthält, würde die Produktion von ATP durch Respiration erfolgen und im Hauptstück durch Glykolyse, die dort an der fibrösen Scheide lokalisiert ist (vgl. WESTHOFF und KAMP, 1997; TRAVIS et al., 1998; EDDY et al., 2003; WELCH et al., 2006). Unterstützt wird diese Hypothese von den Beobachtungen, dass Eberspermien auch dann Laktat produzieren, wenn genügend Sauerstoff zur Verfügung steht (KAMP et al., 2003). Die Bedeutung der Glykolyse wird auch durch Untersuchungen von MUKAI und OKUNO (2004) bestätigt. Sie zeigten, dass Mausspermien bei Hemmung der mitochondrialen ATP-

Produktion in der Lage sind, ihre Motilität über glykolytische ATP-Produktion unverändert aufrechtzuerhalten. Eine Hemmung der Glykolyse führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion der Motilität (FRASER und QUINN, 1981; MUKAI und OKUNO, 2004). Dass die Spermien von Mäusen, in denen das Gen für die testis-/spermienspezifische GAPDH-S ausgeschaltet war, nicht progressiv motil waren und nur wenig ATP enthielten, obwohl die mitochondriale Atmung unverändert möglich erschien (MIKI et al., 2004), deutet ebenfalls darauf hin, dass die Glykolyse für die Spermienmotilität essentiell ist. Man sollte jedoch nicht außer Acht lassen, dass einige Autoren auch gegensätzliche Ergebnisse zur Bedeutung der Glykolyse erhalten haben (Unterabschnitt 1.2.3.2). FORD (2006) bezweifelt, dass die lokale Glykolyse im Hauptstück in den meisten Säugerarten der einzige Weg ist, um hier ATP bereitzustellen. Nicht zuletzt die Kompartimentierung keimzell- bzw. spermienspezifischer Glykolyseenzyme an der fibrösen Scheide deutet aber sehr stark auf eine besondere Bedeutung der Glykolyse in dieser Spermienregion hin. Zudem sind die Glukosetransporter unterschiedlich im Spermium verteilt (ANGULO et al., 1998). Beispielsweise ist GLUT1, welcher für die Grundaufnahme von Glukose in allen Zellen zuständig ist, in Ratten-, Bullen- und Humanspermien deutlich im Hauptstück und nur schwach im Mittelstück zu finden. In Humanspermien wurde auch GLUT3 (hochaffin für Glukose) und GLUT5 (hochaffin für Fruktose) im Hauptstück des Flagellums lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass die Glykolyse im Hauptstück gezielt mit ihrem Substrat beliefert werden kann.

Neben der Glykolyse scheint die fibröse Scheide auch als Gerüst für Komponenten von Signaltransduktionswegen zu dienen. Die Hauptkomponente der fibrösen Scheide bilden Ankerproteine für Proteinkinase-A (AKAP). Proteinkinasen werden in Verbindung mit der Steuerung von Kapazitation und Motilität gebracht (TASH, 1989; TRAVIS et al., 2001). Ob die Glykolyse auch über diese Proteinkinase-A reguliert wird, ist unklar. Andererseits dürfte aber die Glykolyse ATP für die Proteinkinase bereitstellen. Auch zur Herstellung des sekundären Messengers cAMP wird ATP benötigt. Durch die Kompartimentierung von Glykolyse und Signalwegen im Flagellum könnten also ATP-Produktion und Steuerung der Motilität lokal gekoppelt sein (TRAVIS et al., 2001). Auch für Ionentransporte über die Plasmamembran könnte glykolytisches ATP im Hauptstück des Flagellums bereitgestellt werden. Für die Kontrolle der Spermienmotilität ist die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase PMCA4 interessant, da sie vorherrschend im Hauptstück von Mäusespermien lokalisiert ist (OKUNADE et al., 2004; SCHUH et al., 2004). Über die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} wird wahrscheinlich die Motilität und Hyperaktivierung reguliert (CARLSON et al., 2003; SUAREZ und HO, 2003; SCHMIDT und KAMP, 2004).

In dieser Arbeit wurden PK und GAPDH nicht nur an der fibrösen Scheide, sondern auch im Akrosombereich detektiert. Diese Befunde erweitern das Spektrum glykolytischer Enzyme im Akrosombereich. HK1-S (Maus; TRAVIS et al. 1998) und PFK (Eber; KAMP et al., 2007) und sogar ein Glukosetransporter (GLUT8; Maus, Mensch; SCHÜRMAN et al., 2002) wurden im Akrosombereich von Spermien bereits detektiert. GLUT3 wurde an Membranen von Eberspermienköpfen lokalisiert (MEDRANO et al., 2006b). Außerdem liegen verschiedene Hexosetransporter (GLUT1, GLUT2, GLUT3 und/oder GLUT5) im anterioren Kopfbereich von Ratten-, Bullen- und Humanspermien vor (ANGULO et al., 1998). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Glykolyse auch im Akrosombereich aktiv ist. Die Glykolyse könnte hier ATP für Ionentransporte oder Phosphorylierungsreaktionen, die auch für die Akrosomreaktion notwendig sind, zur Verfügung stellen. Sehr wichtig könnte auch die Versorgung der Ca^{2+} -ATPasen, welche die intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} gering halten, sein. Würden diese Ca^{2+} -ATPasen aufgrund von ATP-Mangel ausfallen, würde durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Akrosomreaktion vorzeitig ausgelöst (vgl. FENG et al., 2006). Eine Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase soll im Akrosombereich von Bullen- und Schafbockspermien lokalisiert sein und das Einströmen von Ca^{2+} sowie die akrosomale Exozytose kontrollieren (DRAGILEVA et al., 1999). Zudem wird ein Vorkommen von Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und sarkoplasmatisch-endoplasmatischer Ca^{2+} -ATPase diskutiert (vgl. JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2006). Auch andere ATPasen, die für die Spermienfunktion wichtig zu sein scheinen, wurden im Akrosombereich gefunden. So wurde beispielsweise eine testis-spezifische Isoform der Na^+ , K^+ -ATPase (ATP1A4) in Bullenspermien u.a. im Akrosombereich lokalisiert (THUNDATHIL et al., 2006). Diese soll, vermutlich unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, in Kapazitationsereignisse verwickelt sein. Eine testis-spezifische Isoform der Vacuolar-type H^+ -ATPase (V-ATPase, E1-Untereinheit Isoform) konnte in der Region entstehender Akrosomen von Spermatiden sowie im Akrosombereich reifer Mausspermien lokalisiert werden (SUN-WADA et al., 2002). Diese Isoform könnte für die Ansäuerung des Akrosoms verantwortlich sein. Es wurde beschrieben, dass eine derartige Ansäuerung für die Befruchtung notwendig ist und vermutlich dazu dient, nach der Akrosomreaktion eine Umgebung mit angemessenem pH für die entlassenen hydrolytischen Enzyme zu schaffen (vgl. NELSON und HARVEY, 1999).

Ein Zusammenhang zwischen Glykolyse und Ionentransport wird auch für somatische Säugerzellen diskutiert. XU und BECKER (1998) beobachteten, dass PK, Aldolase und GAPDH auf den Membranen sarkoplasmatischer Vesikel nahe der Ca^{2+} -ATPase lokalisiert sind und vermuten daher, dass die glykolytische ATP-Produktion so an den Transport von Calcium gekoppelt ist. DHAR-CHOWDHURY et al. (2005) untersuchten den ATP-empfindlichen

K_{ATP} -Kanal-Komplex und fanden Hinweise darauf, dass GAPDH, TIM und PK Teile dieses Komplexes sind. Ihre Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass die Aktivität dieser glykolytischen Enzyme, vermutlich über die lokale ATP-Produktion, zum Schließen des Kanals führt.

Weitere ATP-abhängige Reaktionen in Säugerspermien sind beschrieben worden, die zwar hinsichtlich des quantitativen Umsatzes von ATP von geringerer Bedeutung, aber dennoch für die Funktion der Spermien wichtig sind.

26S-Proteasomen wurden in Spermien von Ratte, Mensch und Maus identifiziert (RIVKIN et al., 1997; TIPLER et al., 1997; MOCHIDA et al., 2000). Bei dem 26S-Proteasom handelt es sich um eine große ATP-abhängige Protease, die aus einem 20S-Kernkomplex und einem 19S-Regulatorkomplex (aus verschiedenen ATPasen und regulatorischen Proteinen) besteht. Sie baut in Abhängigkeit von ATP Ubiquitin-konjugierte Proteine ab. Besonders im Akrosombereich wurden Anzeichen für einen derartigen ATP-abhängigen Proteinabbau gefunden. In reifen Humanspermien waren Proteasomen neben der Übergangsregion und der postakrosomalen Region auf den Akrosombereich beschränkt (WOJCIK et al., 2000; BIALY et al., 2001). An Eberspermien wurden Untereinheiten des 20S-Kernkomplexes sowie Ubiquitin ebenfalls im Akrosombereich detektiert (SUTOVSKY et al., 2004). So wird vermutet, dass die Proteasomen in Zusammenhang mit der Akrosomreaktion von Säugerspermien, der Durchdringung der Zona pellucida und somit mit der Befruchtung stehen. SUTOVSKY et al. (2004) schlagen vor, dass bei der Akrosomreaktion von Eber- und evtl. Bullenspermien Proteasomen ausgeschüttet werden, welche dann ubiquitinierte ZP-Proteine abbauen und somit die Passage der ZP erleichtern. MORALES et al. (2003) vermuten die Beteiligung akrosomaler Proteasomen in der akrosomalen Exozytose und/oder der Auflockerung der akrosomalen Matrix. Diese Funktionen könnten über die ATP-Produktion der Glykolyse im Akrosom ermöglicht werden.

Chaperone unterstützen die korrekte Faltung von Proteinen durch sequentielles Anbinden und Ablösen. So können falsche Faltungen oder Aggregationen verhindert oder aufgehoben werden. Viele Chaperone sind ATPasen. Die freie Energie aus der ATP-Hydrolyse wird zur aktiven Ablösung des Chaperones vom Protein benötigt (VOET und VOET, 1995; GUPTA, 2005). Bekannte Chaperone sind die Hitzeschockproteine (HSPs). Auch in männlichen Keimzellen wurden HSPs identifiziert (s. GUPTA, 2005). Da während der Spermio-genese zahlreiche spezifische Proteine produziert werden, ist die Anwesenheit von faltungsunterstützenden Chaperonen in Spermatischen nicht verwunderlich.

Hitzeschockproteine sind aber auch in bestimmten Bereichen der ausdifferenzierten Spermien vorhanden, und es werden ihnen weitere Funktionen zugeordnet. In Bullen- und Eberspermien wurde eine dynamische Umverteilung von HSP70 während Kapazitation und Akrosomreaktion beschrieben (KAMARUDDIN et al., 2004; SPINACI et al., 2005). Die Autoren vermuten, dass HSP70 eine wichtige Rolle bei der Spermium-Ei-Interaktion spielt. Für Bullenspermien wurde überdies gezeigt, dass Spermien im Nebenhoden HSP70 im Akrosom, postakrosomalen Bereich und Mittelstück sowie im Cytoplasmotropfen aufweisen, während sich HSP70 bei frisch ejakulierten Spermien nur im Akrosom befand (KAMARUDDIN et al., 2004). Auch im equatorialen Segment von Humanspermien wurde HSP70 lokalisiert (MILLER et al., 1992). HSP90 wurde bei akrosomintakten Humanspermien im Übergangsbereich und im Flagellum lokalisiert, in akrosomreagierten hingegen im (sub)equatorialen Kopfbereich (MILLER et al., 1992). Zudem beschreiben ECROYD et al. (2003), dass HSP90 während der Kapazitation in Mausspermien, und vermutlich auch in Human- und Rattenspermien, tyrosinphosphoryliert wird. Chaperone scheinen also in Säugerspermien eine noch nicht genau definierte Rolle bei der Kapazitation, Akrosomreaktion und/oder Spermium-Ei-Interaktion zu spielen und benötigen hierzu vermutlich ATP. Dieses könnte im Akrosombereich und im Hauptstück des Flagellums, unabhängig von den Mitochondrien, über die kompartimentierte Glykolyse bereitgestellt werden.

Da besonders im Akrosombereich noch nicht geklärt ist, ob hier ATP über die Glykolyse produziert wird, sollen hier auch andere Möglichkeiten für das Vorliegen von PK-S und GAPDH angesprochen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Enzyme andere Funktionen als die ATP-Produktion erfüllen, wie dies auch für die HK vorgeschlagen wurde (TRAVIS et al., 1998). Es wäre aber auch möglich, dass es sich hier um inaktive Überreste aus der Spermatogenese handelt. Wie gezeigt wurde, werden spezifische Glykolyseenzyme, hierunter die PK-S und die GAPDH-S, ab dem Stadium der reifenden Spermatiden in großer Menge produziert (MORI et al., 1998; WELCH et al., 2006 und diese Arbeit). So könnte die Glykolyse auch in der späteren Spermio-genese-phase bereits bedeutende Funktionen besitzen. Nur eine der vielen möglichen Funktionen soll hier vorgestellt werden. Intrazelluläre Bewegungen sind nicht nur für den Flagellenschlag eines Spermiums notwendig, sie scheinen schon während der Spermio-genese für die Entwicklung spermien-spezifischer Strukturen wichtig zu sein. Motorproteine nutzen ATP, um Vesikel oder Makromoleküle über Mikrotubuli oder Mikrofilamente an ihren Bestimmungsort zu transportieren. So werden beispielsweise an der Manschette über Motorproteine (Kinesin, Dynein und/oder Myosin) Vesikel oder Makromoleküle (z.B. Odf1, Odf2, Sak57, Spag4 und 26S Proteasom;

KIERSZENBAUM, 2001) zum entstehenden Flagellum, zum Centrosom-Bereich oder ins Cytoplasma transportiert (KIERSZENBAUM und TRES, 2004). Auch proakrosomale Vesikel werden vermutlich über Motorproteine zum Ort ihrer Verschmelzung und resultierender Akrosomentwicklung geleitet. Das Akroplaxom, welches das Akrosom an der Kernhülle verankert, besteht u.a. aus F-Aktin und Myosin Va (KIERSZENBAUM und TRES, 2004), wodurch Transportvorgänge theoretisch auch hier möglich erscheinen. Auch wenn z.B. für die Manschette bekannt ist, dass sie nach der Zellkernverlängerung und -kondensation wieder zerfällt (CLERMONT et al., 1993), ist es auch nicht auszuschließen, dass Cytoskelettelemente der Spermatiden ganz oder teilweise erhalten bleiben (z.B. das Akroplaxom), oder auch neue Cytoskelettstrukturen entstehen, die in Verbindung mit Motorproteinen auch noch im Spermium zum Transport von Molekülen, sei es im Zusammenhang mit Kapazitation oder Akrosomreaktion, genutzt werden. Dies würde ATP erfordern.

Zusammenfassend kann man sicherlich sagen, dass die vorliegende Arbeit weitere Hinweise für die Organisation der Glykolyse in Säugerspermien lieferte. Mit dem Vorliegen der N-terminal verlängerten PK-S in Eberspermien wurde ein weiteres Glykolyseenzym identifiziert, welches erst während der Spermiogenese produziert wird. Die maßgebliche Bedeutung der kompartimentierten Glykolyse in Säugerspermien scheint darin zu liegen, lokal und unabhängig von den im Mittelstück des Flagellums fixierten Mitochondrien ATP für die Spermienmotilität und die Kontrolle der Akrosomreaktion zu liefern. Sollte die Glykolyse tatsächlich ATP im Hauptstück des Flagellums für die Motilität, und hier besonders für die Hyperaktivität, und im Akrosombereich für eine Sicherung der Akrosomreaktion liefern, so wäre sie als essentiell für die Befruchtungsfähigkeit von Säugerspermien anzusehen.

5 Zusammenfassung

Nach Homogenisation ejakulierter Eberspermien und Zentrifugation des Homogenates blieben mehr als 60% der Aktivität des glykolytischen Enzyms Pyruvatkinase (PK) an Zellfragmenten im Sediment gebunden. Diese strukturegebundene PK wurde als PK-S bezeichnet. Das Detergenz Triton X-100 führte nicht zur Ablösung der PK-S; mit Trypsin konnten jedoch rund 80% der PK-S ohne Verlust an Aktivität von den Strukturen gelöst und durch kombinierte Kationenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie gereinigt werden (spezifische Aktivität: 116,7 U/mg Protein). Die lösliche PK aus Eberspermien konnte ebenfalls durch ein ähnliches Verfahren angereichert werden.

Im Gel (SDS-PAGE) zeigten die Untereinheiten der PK-S mit $64,4 \times 10^3$ eine geringfügig größere relative Molekülmasse als die der PK-M1 aus Kaninchenmuskel (62×10^3). Die kinetischen Eigenschaften der abgelösten PK-S als auch der noch an Spermienstrukturen gebundenen PK-S und der löslichen PK aus Eberspermien waren sehr ähnlich und entsprachen der M1-Isoform der PK. Antikörper gegen Kaninchenmuskel-PK (Anti-PK-M1) reagierten auch mit der löslichen PK und der PK-S aus Eberspermien.

Edman-Abbau der ersten 19 Aminosäuren zeigte, dass die tryptisch abgelöste PK-S am N-Terminus um 5 Aminosäuren gegenüber nativer PK-M1 verlängert ist, während der C-Terminus der erhaltenen PK-S-Sequenz mit einem meist nahe dem N-Terminus gelegenen Sequenzabschnitt der PK-M1 und -M2 übereinstimmt. Auf der Ebene der Nukleinsäuren sind oft Sequenzen vor dem vermuteten Startcodon für PK-M1 und PK-M2 codiert, welche der N-terminalen Verlängerung der PK-S ähnlich oder gleich sind. Aber nur die Nukleotidsequenz für die PK-M2 in humanen Chondrosarcoma Lungenmetastasen besitzt ein weiteres AUG-Startcodon, so dass eine N-terminale Verlängerung des nativen Proteins, wie ich sie bei der PK-S nachgewiesen habe, vermutet wird. Die N-terminale Verlängerung der nativen PK-S enthält sicherlich mehr als die nach tryptischer Lyse nachgewiesenen 5 Aminosäuren. Vergleiche der Aminosäure- und übersetzten Nukleotidsequenzen sowie die kinetischen Eigenschaften lassen vermuten, dass die PK-S, wie die PK-M1 und PK-M2, vom *PKM*-Gen codiert wird.

Gegen die gereinigte PK-S wurden Antikörper in Kaninchen produziert. Da das Antiserum nicht ausreichend spezifisch für PK-S war, wurden aus ihm affinitätschromatographisch Antikörper (Anti-PK-S) isoliert, die hohe Affinität zu einem synthetisierten PK-S-Peptid (13 N-terminale Aminosäuren der tryptisch abgelösten PK-S) hatten. Dieses Anti-PK-S-Präparat war spezifisch für PK-S; es reagierte weder mit Kaninchenmuskel-PK noch mit löslicher PK oder anderen Proteinen aus Eberspermien. Anti-

PK-S und Anti-PK-M1 wurden zur Lokalisierung von PK-S und löslicher PK in Spermien von Eber, Bulle und Mensch sowie in Schnitten von Eberhoden eingesetzt.

Mit Anti-PK-S wurden der Bereich des Akrosoms und das lange flagellare Hauptstück sowie der Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück von Eberspermien fluoreszenzmarkiert, wogegen das kurze, die Mitochondrien enthaltende Mittelstück des Flagellums und der postakrosomale Kopfbereich nur mit Anti-PK-M1 markiert wurden. Immunogoldmarkierung in elektronenmikroskopischen Bildern bestätigte die Lokalisierung von PK-S im Akrosombereich. Im Hauptstück banden Anti-PK-M1 und Anti-PK-S an die fibröse Scheide. GAPDH konnte von mir ebenfalls im Akrosombereich, im Übergangsbereich zwischen Kopf und Mittelstück und an der fibrösen Scheide detektiert werden. Auch an Bullen- und Humanspermien konnte über Immunogoldmarkierung PK und vermutlich GAPDH an der fibrösen Scheide gezeigt werden. Im Akrosombereich dieser Spermien waren die Nachweise von PK und GAPDH jedoch nicht sicher.

In Eberhodenschnitten war die PK-S erstmals, oder zumindest vermehrt, in den elongierenden Spermatiden über Fluoreszenzmarkierung nachweisbar, während andere, vermutlich somatische PK vermehrt in den früheren Stadien (Spermatogonien, aber auch in den Spermatozyten und runden Spermatiden) auftrat. Für die GAPDH zeigte sich ein ähnlicher Entwicklungsverlauf.

Die Ergebnisse zeigen, dass in Eberspermien zwei Isoformen der PK auftreten: eine N-terminal verlängerte, strukturgebundene Form, die PK-S, und eine lösliche Form, die beide der PK-M1 ähneln. Der ungewöhnliche N-Terminus der PK-S dient vermutlich der spezifischen räumlichen Anordnung der PK-S im Akrosombereich und an der fibrösen Scheide, nicht aber der Modulation kinetischer Eigenschaften.

Meine Untersuchungen stützen die Hypothese, dass in bestimmten Kompartimenten von Säugerspermien die Glykolyse durch Verankerung einiger ihrer Enzyme strukturell hochgeordnet ist. Dadurch wird vermutlich die Versorgung der Mitochondrien-freien Regionen mit ATP sichergestellt. Man kann diese Organisation als Anpassung des Stoffwechsels von Spermien deuten, bei denen die Mitochondrien in einem kleinen Bereich (Mittelstück) hinter dem Spermienkopf kompartimentiert sind. Im Hauptstück des Flagellums könnte die Glykolyse ATP für die Spermienmotilität liefern, im Akrosombereich für die Verhinderung einer vorzeitigen Akrosomreaktion. Somit käme der strukturierten Glykolyse eine essentielle Bedeutung für die Befruchtungsfähigkeit von Säugerspermien zu.

6 Literaturverzeichnis

ABOU-HAILA A., TULSIANI D.R. (2000) Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379:173-82

ADEOYA-OSIGUWA S.A., FRASER L.R. (1993) A biphasic pattern of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by mouse spermatozoa *in vitro* correlates with changing functional potential. *J Reprod Fertil* 99:187-94

ANDERSON W.A., PERSONNE P. (1970) The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *J Cell Biol* 44:29-51

ANGULO C., RAUCH M.C., DROPPELMANN A., REYES A.M., SLEBE J.C., DELGADO-LOPEZ F., GUAQUIL V.H., VERA J.C., CONCHA, II (1998) Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem* 71:189-203

AOKI V.W., CARRELL D.T. (2003) Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 5:315-24

ARNOULT C., ZENG Y., FLORMAN H.M. (1996) ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol* 134:637-45

BABA T., MICHIKAWA Y., KASHIWABARA S., ARAI Y. (1989a) Proacrosin activation in the presence of a 32-kDa protein from boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 160:1026-32

BABA T., MICHIKAWA Y., KAWAKURA K., ARAI Y. (1989b) Activation of boar proacrosin is effected by processing at both N- and C-terminal portions of the zymogen molecule. *FEBS Lett* 244:132-6

BACCETTI B., PALLINI V., BURRINI A.G. (1975) Localization and catalytic properties of lactate dehydrogenase in different sperm models. *Exp Cell Res* 90:183-90

BAILEY J.L., STOREY B.T. (1994) Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev* 39:297-308

BAJPAI M., GUPTA G., SETTY B.S. (1998) Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol* 138:322-7

BALDI E., KRAUSZ, C., FORTI, G. (1995) Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. *Trends Endocrinol Metab* 6:198-205

BALDI E., LUCONI M., BONACCORSI L., FORTI G. (2002) Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 53:121-31

- BALDI E., LUCONI M., BONACCORSI L., KRAUSZ C., FORTI G. (1996) Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1:d189-205
- BALHORN R., CORZETT M., MAZRIMAS J.A. (1992) Formation of intraprotamine disulfides *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 296:384-93
- BALLESTER J., FERNANDEZ-NOVELL J.M., RUTLLANT J., GARCIA-ROCHA M., JESUS PALOMO M., MOGAS T., PENA A., RIGAU T., GUINOVART J.J., RODRIGUEZ-GIL J.E. (2000) Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 56:207-19
- BALTZ J.M., WILLIAMS P.O., CONE R.A. (1990) Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod* 43:485-91
- BEDFORD J.M. (1979) Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. *The Spermatozoon. Maturity, motility, surface properties and comparative aspects*:7-21
- BEDFORD J.M. (1991) The coevolution of mammalian gametes. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*:3-28
- BEDFORD J.M. (1998) Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 59:1275-87
- BEDFORD J.M., CALVIN H.I. (1974) Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J Exp Zool* 187:181-204
- BERGMANN M. (2005) Spermatogenese, Physiologie und Pathophysiologie. *Urologe* 2005 44:1131-1138
- BERGMEYER H.U. (1983) Methods of Enzymatic Analysis. Vol 2. Verlag Chemie, Weinheim
- BIALY L.P., ZIEMBA H.T., MARIANOWSKI P., FRACKI S., BURY M., WOJCIK C. (2001) Localization of a proteasomal antigen in human spermatozoa: immunohistochemical electron microscopic study. *Folia Histochem Cytobiol* 39:129-30
- BISHOP A.L., HALL A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-55
- BLACKMORE P.F. (1993) Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* 5:531-8
- BLACKMORE P.F., BEEBE S.J., DANFORTH D.R., ALEXANDER N. (1990) Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265:1376-80
- BLACKMORE P.F., IM W.B., BLEASDALE J.E. (1994) The cell surface progesterone receptor which stimulates calcium influx in human sperm is unlike the A ring reduced steroid site on the GABAA receptor/chloride channel. *Mol Cell Endocrinol* 104:237-43

BLACKMORE P.F., NEULEN J., LATTANZIO F., BEEBE S.J. (1991) Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* 266:18655-9

BLUM H., BEIER, H., GROSS, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99

BOHNENSACK R., HALANGK W. (1986) Control of respiration and of motility in ejaculated bull spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 850:72-9

BOUSSOUAR F., BENAHMED M. (2004) Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab* 15:345-50

BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54

BREWIS I.A., CLAYTON R., BARRATT C.L., HORNBY D.P., MOORE H.D. (1996) Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2:583-9

BROOKS D.E. (1971) Examination of bull semen and of the bull and rabbit testis for the presence of creatine phosphate and arginine phosphate. *J Reprod Fertil* 26:275-8

BROOKS D.E., MANN T. (1972) Relation between the oxidation state of nicotinamide-adenine dinucleotide and the metabolism of spermatozoa. *Biochem J* 129:1023-34

BUEHR M., MCLAREN A. (1981) An electrophoretically detectable modification of glucosephosphate isomerase in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 63:169-73

BUNCH D.O., WELCH J.E., MAGYAR P.L., EDDY E.M., O'BRIEN D.A. (1998) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 58:834-41

BUNEA M.Z., O. (2001) New current aspects on the immunohistochemical techniques. *Roum. Biotechnol. Lett.* 6:177-206

BURKS D.J., CARBALLADA R., MOORE H.D., SALING P.M. (1995) Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269:83-6

BUSCH W., LÖHLE K., PETER W. (1991) Künstliche Besamung bei Nutztieren. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

CAMPELL N.A. (1997) Biologie. Berlin, Oxford: Spektrum, Akadem. Verlag

CAO W., HAIG-LADEWIG L., GERTON G.L., MOSS S.B. (2006) Adenylate kinases 1 and 2 are part of the accessory structures in the mouse sperm flagellum. *Biol Reprod* 75:492-500

CARBONELL J., FELIU J.E., MARCO R., SOLS A. (1973) Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues. *Eur J Biochem* 37:148-56

CARLSON A.E., WESTENBROEK R.E., QUILL T., REN D., CLAPHAM D.E., HILLE B., GARBERS D.L., BABCOCK D.F. (2003) CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14864-8

- CARR D.W., FUJITA A., STENTZ C.L., LIBERTY G.A., OLSON G.E., NARUMIYA S. (2001) Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. *J Biol Chem* 276:17332-8
- CHEN K., KNORR C., MOSER G., GATPHAYAK K., BRENIG B. (2004) Molecular characterization of the porcine testis-specific phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) gene and its association with male fertility. *Mamm Genome* 15:996-1006
- CLERMONT Y., OKO R., HERMO L. (1993) Cell biology of mammalian spermatogenesis. In: DESJARDINS C., EWING L. (eds) *Cell and molecular biology of the testis*. Oxford University Press, New York, pp 332-376
- COOPER T.G., YEUNG C.H., SKUPIN R., HAUFE G. (1997) Antifertility potential of ornidazole analogues in rats. *J Androl* 18:431-8
- CORTES C.J., CODELIA, V.A., MANOSALVA, I., DE LANGE, J., DE LOS REYES, M., MORENO, R.D. (2006) Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 93:165-175
- CROSS N.L. (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:7-11
- CUMMINS J.M., WOODALL P.F. (1985) On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* 75:153-75
- DABROWSKA A., PIETKIEWICZ J., DABROWSKA K., CZAPINSKA E., DANIELEWICZ R. (1998) Interaction of M1 and M2 isozymes pyruvate kinase from human tissues with phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1383:123-9
- DACHEUX J.L., PAQUIGNON M., COMBARNOUS Y. (1983) Head-to-head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence for an epididymal antagglutinin. *J Reprod Fertil* 67:181-9
- DANPURE C.J. (1995) How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends Cell Biol* 5:230-8
- DAVIS B.K. (1976) Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability of rabbit spermatozoa. *Proc Soc Exp Biol Med* 152:257-61
- DAVIS B.K. (1980) Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch Androl* 5:249-54
- DAVIS B.K., BYRNE R., HUNGUND B. (1979) Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 558:257-66
- DE DUVE C. (1963) The lysosome. *Sci Am* 208:64-72
- DE JONGE C. (2005) Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11:205-14

DE LAMIRANDE E. (1984) Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Annals New York Academy of Sciences*:125-129

DE LAMIRANDE E., LECLERC P., GAGNON C. (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3:175-94

DE LUIS O., DEL MAZO J. (1998) Gene expression of mouse M1 and M2 pyruvate kinase isoenzymes correlates with differential poly[A] tract extension of their mRNAs during the development of spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1396:294-305

DHAR-CHOWDHURY P., HARRELL M.D., HAN S.Y., JANKOWSKA D., PARACHURU L., MORRISSEY A., SRIVASTAVA S., LIU W., MALESTER B., YOSHIDA H., COETZEE W.A. (2005) The glycolytic enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, and pyruvate kinase are components of the K(ATP) channel macromolecular complex and regulate its function. *J Biol Chem* 280:38464-70

DOTT H.M., HARRISON R.A., FOSTER G.C. (1979) The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil* 55:113-24

DOW M.P., BAVISTER B.D. (1989) Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Res* 23:171-80

DRAGILEVA E., RUBINSTEIN S., BREITBART H. (1999) Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 61:1226-34

DURRIEU C., BERNIER-VALENTIN F., ROUSSET B. (1987) Binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to microtubules. *Mol Cell Biochem* 74:55-65

DZEJA P.P., ZELEZNIKAR R.J., GOLDBERG N.D. (1996) Suppression of creatine kinase-catalyzed phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle. *J Biol Chem* 271:12847-51

ECKERT W.A., KARTENBECK, J. (1997) Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. Springer Labormanual, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

ECROYD H., JONES R.C., AITKEN R.J. (2003) Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. *Biol Reprod* 69:1801-7

EDDY E.M. (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 57:103-28

EDDY E.M., TOSHIMORI K., O'BRIEN D.A. (2003) Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 61:103-15

EDWARDS Y.H., GROOTEGOED J.A. (1983) A sperm-specific enolase. *J Reprod Fertil* 68:305-10

EVANS R.W., SETCHELL B.P. (1978) The effect of rete testis fluid on the metabolism of testicular spermatozoa. *J Reprod Fertil* 52:15-20

- FAWCETT D.W. (1975) The anatomy of the spermatozoon after 300 years. *Kaibogaku Zasshi* 50:326-7
- FAWCETT D.W., PHILLIPS D.M. (1969) The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat Rec* 165:153-64
- FELGNER P.L., WILSON J.E. (1977) Effect of neutral salts on the interaction of rat brain hexokinase with the outer mitochondrial membrane. *Arch Biochem Biophys* 182:282-94
- FENG H.L., HERSHLAG A., HAN Y.B., ZHENG L.J. (2006) Localizations of intracellular calcium and Ca²⁺-ATPase in hamster spermatogenic cells and spermatozoa. *Microsc Res Tech* 69:618-23
- FERNANDEZ-NOVELL J.M., BALLESTER J., MEDRANO A., OTAEGUI P.J., RIGAU T., GUINOVART J.J., RODRIGUEZ-GIL J.E. (2004) The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Lett* 570:211-6
- FLAHERTY S.P., SWANN N.J., PRIMAKOFF P., MYLES D.G. (1993) A role for the WH-30 protein in sperm-sperm adhesion during rouleaux formation in the guinea pig. *Dev Biol* 156:243-52
- FLESCH F.M., GADELLA B.M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197-235
- FLORMAN H.M. (1994) Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 165:152-64
- FLORMAN H.M., ARNOULT C., KAZAM I.G., LI C., O'TOOLE C.M. (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 59:12-6
- FLORMAN H.M., BECHTOL K.B., WASSARMAN P.M. (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol* 106:243-55
- FLORMAN H.M., CORRON M.E., KIM T.D., BABCOCK D.F. (1992) Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 152:304-14
- FLORMAN H.M., LEMOS, J.R., ARNOULT, C., OBERDOF, J.A. ZENG, Y. (1995) Exocytotic ion channels in mammalian sperm. *Human sperm acrosome reaction*. Eds: Fenichel P., Parinaud J., Colloque/INSERIM John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge, France 236:179-189
- FLORMAN H.M., TOMBES R.M., FIRST N.L., BABCOCK D.F. (1989) An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 135:133-46
- FLORMAN H.M., WASSARMAN P.M. (1985) O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41:313-24
- FOLGERO T., BERTHEUSSEN K., LINDAL S., TORBERGSEN T., OIAN P. (1993) Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod* 8:1863-8

FORD W.C. (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update* 12:269-74

FORD W.C., HARRISON A. (1987) Futile substrate cycles in the glycolytic pathway of boar and rat spermatozoa and the effect of alpha-chlorohydrin. *J Reprod Fertil* 79:21-32

FORD W.C., WHITTINGTON K., WILLIAMS A.C. (1997) Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int J Androl* 20 Suppl 3:44-9

FORD W.C.L., REES, M. (1990) The Bioenergetics of Mammalian Sperm Motility. In: GAGNON C. (ed) *Controls of Sperm Motility*. CRC Press, Boca Raton, pp 175-201

FORESTA C., ROSSATO M., CHIOZZI P., DI VIRGILIO F. (1996) Mechanism of human sperm activation by extracellular ATP. *Am J Physiol* 270:C1709-14

FORESTA C., ROSSATO M., DI VIRGILIO F. (1993b) Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J* 294 (Pt 1):279-83

FOUQUET J.P., KANN M.L. (1994) The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol Cell* 81:89-93

FRASER L.R., GALLOSTRA-BARRI, I. (1994) pH and K⁺ modifications can modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis. *J Reprod Fertil Abstr Ser* 14:9

FRASER L.R., QUINN P.J. (1981) A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* 61:25-35

FUENTES-MASCORRO G., SERRANO H., ROSADO A. (2000) Sperm chromatin. *Arch Androl* 45:215-25

FUJITA A., NAKAMURA K., KATO T., WATANABE N., ISHIZAKI T., KIMURA K., MIZOGUCHI A., NARUMIYA S. (2000) Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci* 113 (Pt 1):103-12

FUNDELE R., WINKING H., ILLMENSEE K., JAGERBAUER E.M. (1987) Developmental activation of phosphoglycerate mutase-2 in the testis of the mouse. *Dev Biol* 124:562-6

GILLIS B.A., TAMBLYN T.M. (1984) Association of bovine sperm aldolase with sperm subcellular components. *Biol Reprod* 31:25-35

GO K.J., WOLF D.P. (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 32:145-53

GOTO M., KOJI T., MIZUNO K., TAMARU M., KOIKEDA S., NAKANE P.K., MORI N., MASAMUNE Y., NAKANISHI Y. (1990) Transcription switch of two phosphoglycerate kinase genes during spermatogenesis as determined with mouse testis sections in situ. *Exp Cell Res* 186:273-8

- GROOTEGOED J.A., JANSEN R., VAN DER MOLEN H.J. (1984) The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. *Biochim Biophys Acta* 767:248-56
- GROOTEGOED J.A., JANSEN R., VAN DER MOLEN H.J. (1986) Effect of glucose on ATP dephosphorylation in rat spermatids. *J Reprod Fertil* 77:99-107
- GUMINSKA M., STACHURSKA M.B., IGNACAK J. (1988) Pyruvate kinase isoenzymes in chromatin extracts of Ehrlich ascites tumour, Morris hepatoma 7777 and normal mouse and rat livers. *Biochim Biophys Acta* 966:207-13
- GUPTA G.S. (2005) Proteomics of Spermatogenesis. Springer Science + Business Media Inc.
- HALANGK W., BOHNENSACK R., KUNZ W. (1985) Interdependence of mitochondrial ATP production and extramitochondrial ATP utilization in intact spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 808:316-22
- HALL E.R., COTTAM G.L. (1978) Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem* 9:785-93
- HAMMERSTEDT R.H. (1993) Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 5:675-90
- HANAICHI T., SATO T., IWAMOTO T., MALAVASI-YAMASHIRO J., HOSHINO M., MIZUNO N. (1986) A stable lead by modification of Sato's method. *J Electron Microsc (Tokyo)* 35:304-6
- HARAYAMA H., LIAO P.C., GAGE D.A., MIYAKE M., KATO S., HAMMERSTEDT R.H. (2000) Biochemical characterization of sialoprotein "Anti-agglutinin" purified from boar epididymal and seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 55:96-103
- HARKEMA W., HARRISON R.A., MILLER N.G., TOPPER E.K., WOELDERS H. (1998) Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod* 58:421-30
- HEDGER M.P., EDDY E.M. (1986) Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. *Biol Reprod* 35:1309-19
- HICKS J.J., ROJAS L., ROSADO A. (1973) Insulin regulation of spermatozoa metabolism. *Endocrinology* 92:833-9
- HOFMANN R., LEHMER A., GURSTER E., HARTUNG R. (1992) Adenosine triphosphate and adenosine diphosphate in human semen: correlation with sperm count and motility. *Urol Int* 48:391-4
- HOLSTEIN A.F., SCHULZE W., DAVIDOFF M. (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1:107
- HONDA A., SIRUNTAWINETI J., BABA T. (2002) Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update* 8: 405-412

- HUITOREL P., PANTALONI D. (1985) Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem* 150:265-9
- IMAMURA K., TANAKA T. (1972) Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. I. Electrophoretic studies. *J Biochem (Tokyo)* 71:1043-51
- IMAMURA K., TANAKA T. (1982) Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods Enzymol* 90 Pt E:150-65
- IRONS M.J., CLERMONT Y. (1982) Kinetics of fibrous sheath formation in the rat spermatid. *Am J Anat* 165:121-30
- JACOBI H. (1999) Rückgang der Spermienqualität in Deutschland und Europa. Umweltstiftung WWF-Deutschland. *Meiners Druck, Bremen*:1-27
- JAMIESON B. (1996) The Ultrastructure of the Spermatozoa of Squamata-I. Scincidae, Gekkonidae and Pygopodidae (Reptilia). *Acta Zoologica* 77:85-100
- JANSSEN E., DZEJA P.P., OERLEMANS F., SIMONETTI A.W., HEERSCHAP A., DE HAAN A., RUSH P.S., TERJUNG R.R., WIERINGA B., TERZIC A. (2000) Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *Embo J* 19:6371-81
- JIMENEZ-GONZALEZ C., MICHELANGELI F., HARPER C.V., BARRATT C.L., PUBLICOVER S.J. (2006) Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 12:253-67
- JOHNSON L. (1995) Efficiency of spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 32:385-422
- JONES A.R. (1997) Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:227-32
- JONES A.R., BUBB W.A. (2000) Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 119:129-35
- JONES A.R., CHANTRILL L.A. (1989) Oxidative metabolic activity of boar spermatozoa: a system for assessing Anti-glycolytic activity of potential inhibitors *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1:357-67
- JONES A.R., CHANTRILL L.A., COKINAKIS A. (1992) Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 94:129-34
- JONES A.R., CONNOR D.E. (2000) Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 12:355-9
- JONES A.R., PICCOLO F. (1999) Glycolytic enzyme activity in hypotonically treated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 11:409-13
- JONES R. (1989) Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxf Rev Reprod Biol* 11:285-337

- JUTTE N.H., GROOTEGOED J.A., ROMMERTS F.F., VAN DER MOLEN H.J. (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62:399-405
- KALDIS P., KAMP G., PIENDL T., WALLIMANN T. (1997) Functions of creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *Adv Dev Biol* 5:275-312
- KALDIS P., STOLZ M., WYSS M., ZANOLLA E., ROTHEN-RUTISHAUSER B., VORHERR T., WALLIMANN T. (1996) Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Cell Sci* 109 (Pt 8):2079-88
- KAMARUDDIN M., KROETSCH T., BASRUR P.K., HANSEN P.J., KING W.A. (2004) Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia* 36:327-34
- KAMMERMEIER H. (1987) High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. *Basic Res Cardiol* 82 Suppl 2:31-6
- KAMMERMEIER H. (1993) Efficiency of energy conversion from metabolic substrates to ATP and mechanical and chemiosmotic energy. *Basic Res Cardiol* 88 Suppl 2:15-20
- KAMP G., BUSSELMANN G., JONES N., WIESNER B., LAUTERWEIN J. (2003) Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. *Reproduction* 126:517-25
- KAMP G., BUSSELMANN G., LAUTERWEIN J. (1996) Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. *Experientia* 52:487-94
- KAMP G., LAUTERWEIN J. (1995) Multinuclear magnetic resonance studies of boar seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1243:101-9
- KAMP G., SCHMIDT H., STYPA H., FEIDEN S., MAHLING C., WEGENER G. (2007) Regulatory properties of 6-phosphofructokinase (PFK) and control of glycolysis in boar spermatozoa. *Reproduction* in press
- KAMP G., SCHMIDT, H. (2002) Mit Kraft und Köpfchen ins Ziel, Spermien und Befruchtung bei Säugern. *Forschungsmagazin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz SONDERAUSGABE MESSEN*:39-43
- KIERSZENBAUM A.L. (2001) Spermatid manchette: plugging proteins to zero into the sperm tail. *Mol Reprod Dev* 59:347-9
- KIERSZENBAUM A.L., TRES L.L. (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67:271-84
- KIM K.S., FOSTER J.A., GERTON G.L. (2001) Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod* 64:148-56
- KNOLL H.R., WALSH J.L. (1992) Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Curr Top Cell Regul* 33:15-30
- KOCHETOV A.V., SARAI A., ROGOZIN I.B., SHUMNY V.K., KOLCHANOV N.A. (2005) The role of alternative translation start sites in the generation of human protein diversity. *Mol Genet Genomics* 273:491-6

KRISFALUSI M., MIKI K., MAGYAR P.L., O'BRIEN D.A. (2006) Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 75:270-8

KUMAGAI H., SAKAI H. (1983) A porcine brain protein (35 K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J Biochem (Tokyo)* 93:1259-69

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5

LANGLAIS J., ROBERTS, K.D. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 12:183-224

LECLERC P., DE LAMIRANDE E., GAGNON C. (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55:684-92

LEE M.A., STOREY B.T. (1989) Endpoint of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H⁺ and Ca²⁺ permeability: population and single cell kinetics. *Gamete Res* 24:303-26

LENZI A., LOMBARDO F., GANDINI L., DONDERO F. (1992) Metabolism and action of L-carnitine: its possible role in sperm tail function. *Arch Ital Urol Nefrol Androl* 64:187-96

LEYTON L., SALING P. (1989a) Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* 108:2163-8

LEYTON L., SALING P. (1989b) 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57:1123-30

LINDEMANN C.B. (1996) Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton* 34:258-70

LONGO F.J., KROHNE G., FRANKE W.W. (1987) Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol* 105:1105-20

LYNCH R.M., PAUL R.J. (1983) Compartmentation of glycolytic and glycogenolytic metabolism in vascular smooth muscle. *Science* 222:1344-6

MANN T., LUTWAK-MANN C. (1981) Male reproductive function and semen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

MARDEN W., WERTHESEN N.T. (1956) Influence of seminal fluid on sperm motility. *Fertil Steril* 7:508-15

MARIN S., CHIANG K., BASSILIAN S., LEE W.N., BOROS L.G., FERNANDEZ-NOVELL J.M., CENTELLES J.J., MEDRANO A., RODRIGUEZ-GIL J.E., CASCANTE M. (2003) Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* 554:342-6

- MASTERS C.J., REID S., DON M. (1987) Glycolysis--new concepts in an old pathway. *Mol Cell Biochem* 76:3-14
- MCCARREY J.R., BERG W.M., PARAGIOUDAKIS S.J., ZHANG P.L., DILWORTH D.D., ARNOLD B.L., ROSSI J.J. (1992) Differential transcription of Pkg genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol* 154:160-8
- MCLAY D.W., CLARKE H.J. (2003) Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125:625-33
- MEDRANO A., FERNANDEZ-NOVELL J.M., RAMIO L., ALVAREZ J., GOLDBERG E., MONTSERRAT RIVERA M., GUINOVART J.J., RIGAU T., RODRIGUEZ-GIL J.E. (2006a) Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73:369-78
- MEDRANO A., GARCIA-GIL N., RAMIO L., MONTSERRAT RIVERA M., FERNANDEZ-NOVELL J.M., RAMIREZ A., PENA A., DOLORS BRIZ M., PINART E., CONCHA, II, BONET S., RIGAU T., RODRIGUEZ-GIL J.E. (2006b) Hexose-specificity of hexokinase and ADP-dependence of pyruvate kinase play important roles in the control of monosaccharide utilization in freshly diluted boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73:1179-94
- MEISNER A.D., KLAUS A.V., O'LEARY M.A. (2005) Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *Journal of Morphology* 263:179-202
- MELANDREZ C.S., MEIZEL, S. (1995) Different Chloride channels are involved in the progesterone- and zona-initiated porcine sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 53
- MIKI K., QU W., GOULDING E.H., WILLIS W.D., BUNCH D.O., STRADER L.F., PERREAULT S.D., EDDY E.M., O'BRIEN D.A. (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16501-6
- MILLER D., BROUGH S., AL-HARBI O. (1992) Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Reprod* 7:637-45
- MILLETTE C.F., LAUFER M.R., OWENS N., SCOTT B.K. (1984) Serological and biochemical identification of a plasma membrane antigen specific to Leydig cells. *Biol Reprod* 31:1037-48
- MINASCHEK G., GROSCHEL-STEWART U., BLUM S., BEREITER-HAHN J. (1992) Microcompartmentation of glycolytic enzymes in cultured cells. *Eur J Cell Biol* 58:418-28
- MITA M., HALL P.F. (1982) Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol Reprod* 26:445-55
- MITA M., HARUMI T., SUZUKI N., UETA N. (1991) Localization and characterization of phosphatidylcholine in sea urchin spermatozoa. *J Biochem (Tokyo)* 109:238-42
- MOCHIDA K., TRES L.L., KIERSZENBAUM A.L. (2000) Structural features of the 26S proteasome complex isolated from rat testis and sperm tail. *Mol Reprod Dev* 57:176-84

- MORALES P., KONG M., PIZARRO E., PASTEN C. (2003) Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum Reprod* 18:1010-7
- MORI C., NAKAMURA N., WELCH J.E., GOTOH H., GOULDING E.H., FUJIOKA M., EDDY E.M. (1998) Mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1-S protein is localized mainly in the sperm tail. *Mol Reprod Dev* 49:374-85
- MORI C., WELCH J.E., FULCHER K.D., O'BRIEN D.A., EDDY E.M. (1993) Unique hexokinase messenger ribonucleic acids lacking the porin-binding domain are developmentally expressed in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 49:191-203
- MOUNIB M.S., CHANG M.C. (1964) Effect of in Utero Incubation on the Metabolism of Rabbit Spermatozoa. *Nature* 201:943-4
- MUIRHEAD H., CLAYDEN D.A., BARFORD D., LORIMER C.G., FOTHERGILL-GILMORE L.A., SCHILTZ E., SCHMITT W. (1986) The structure of cat muscle pyruvate kinase. *Embo J* 5:475-81
- MUJICA A., NAVARRO-GARCIA F., HERNANDEZ-GONZALEZ E.O., DE LOURDES JUAREZ-MOSQUEDA M. (2003) Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc Res Tech* 61:76-87
- MUKAI C., OKUNO M. (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71:540-7
- NAABY-HANSEN S., MANDAL A., WOLKOWICZ M.J., SEN B., WESTBROOK V.A., SHETTY J., COONROD S.A., KLOTZ K.L., KIM Y.H., BUSH L.A., FLICKINGER C.J., HERR J.C. (2002) CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. *Dev Biol* 242:236-54
- NAKAMURA K., FUJITA A., MURATA T., WATANABE G., MORI C., FUJITA J., WATANABE N., ISHIZAKI T., YOSHIDA O., NARUMIYA S. (1999) Rhophilin, a small GTPase Rho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of the sperm tail. *FEBS Lett* 445:9-13
- NAKAMURA M., MORIYA M., BABA T., MICHIKAWA Y., YAMANOBÉ T., ARAI K., OKINAGA S., KOBAYASHI T. (1993) An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res* 205:101-10
- NAKAMURA M., OKINAGA S., ARAI K. (1986) Studies of metabolism of round spermatids: glucose as unfavorable substrate. *Biol Reprod* 35:927-35
- NAKANO M., YONEZAWA N., HATANAKA Y., NOGUCHI S. (1996) Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl* 50:25-34
- NELSON N., HARVEY W.R. (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79:361-85
- NEWSHOLME E.A., LEECH A.R. (1983) Biochemistry for the medical sciences. John Wiley & Sons, Chichester

- NISHIKAWA Y. (1975) Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. *J Reprod Fertil Suppl*:99-104
- NOGUCHI T., YAMADA K., INOUE H., MATSUDA T., TANAKA T. (1987) The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J Biol Chem* 262:14366-71
- NOWAK T., SUELTER C. (1981) Pyruvate kinase: activation by and catalytic role of the monovalent and divalent cations. *Mol Cell Biochem* 35:65-75
- OKO R. (1988) Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 39:169-82
- OKO R. (1998) Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia* 30:193-206
- OKO R., CLERMONT Y. (1989) Light microscopic immunocytochemical study of fibrous sheath and outer dense fiber formation in the rat spermatid. *Anat Rec* 225:46-55
- OKUNADE G.W., MILLER M.L., PYNE G.J., SUTLIFF R.L., O'CONNOR K.T., NEUMANN J.C., ANDRINGA A., MILLER D.A., PRASAD V., DOETSCHMAN T., PAUL R.J., SHULL G.E. (2004) Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 279:33742-50
- OLIVA R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12:417-35
- OLIVA R., DIXON G.H. (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40:25-94
- OSHEROFF J.E., VISCONTI P.E., VALENZUELA J.P., TRAVIS A.J., ALVAREZ J., KOPF G.S. (1999) Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 5:1017-26
- PALOMO M.J., FERNANDEZ-NOVELL J.M., PENA A., GUINOVART J.J., RIGAU T., RODRIGUEZ-GIL J.E. (2003) Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. *Mol Reprod Dev* 64:349-59
- PANIAGUA R., NISTAL M., SAEZ F.J., FRAILE B. (1991) Ultrastructure of the aging human testis. *J Electron Microscop Tech* 19:241-60
- PILKIS S.J., CLAUS T.H., KURLAND I.J., LANGE A.J. (1995) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem* 64:799-835
- POLAKIS P.G., WILSON J.E. (1985) An intact hydrophobic N-terminal sequence is critical for binding of rat brain hexokinase to mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 236:328-37

POLAKOSKI K.L., PARRISH R.F. (1977) Boar proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. *J Biol Chem* 252:1888-94

RAMALHO-SANTOS J., SCHATTEN G., MORENO R.D. (2002) Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 67:1043-51

REID S., MASTERS C. (1986) On the developmental multiplicity and subcellular interactions of pyruvate kinase. *Mech Ageing Dev* 33:257-73

RIGAU T., RIVERA M., PALOMO M.J., FERNANDEZ-NOVELL J.M., MOGAS T., BALLESTER J., PENA A., OTAEGUI P.J., GUINOVART J.J., RODRIGUEZ-GIL J.E. (2002) Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* 123:579-91

RIVKIN E., CULLINAN E.B., TRES L.L., KIERSZENBAUM A.L. (1997) A protein associated with the manchette during rat spermiogenesis is encoded by a gene of the TBP-1-like subfamily with highly conserved ATPase and protease domains. *Mol Reprod Dev* 48:77-89

ROBITAILLE P.M., ROBITAILLE P.A., MARTIN P.A., BROWN G.G. (1987) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of spermatozoa from the boar, ram, goat and bull. *Comp Biochem Physiol B* 87:285-96

RODRIGUEZ-GIL J. (2006) Mammalian Sperm Energy Resources Management and Survival during Conservation in Refrigeration. *Reprod Domest Anim* 41 Suppl 2:11-20

ROSALES J.L., LEE B.C., MODARRESSI M., SARKER K.P., LEE K.Y., JEONG Y.G., OKO R. (2004) Outer dense fibers serve as a functional target for Cdk5.p35 in the developing sperm tail. *J Biol Chem* 279:1224-32

RUIZ-PESINI E., DIEZ C., LAPENA A.C., PEREZ-MARTOS A., MONTOYA J., ALVAREZ E., ARENAS J., LOPEZ-PEREZ M.J. (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 44:1616-20

RUSSELL D.L., KIM K.H. (1996) Expression of triosephosphate isomerase transcripts in rat testis: evidence for retinol regulation and a novel germ cell transcript. *Biol Reprod* 55:11-8

SAKAI Y., KOYAMA Y., FUJIMOTO H., NAKAMOTO T., YAMASHINA S. (1986) Immunocytochemical study on fibrous sheath formation in mouse spermiogenesis using a monoclonal antibody. *Anat Rec* 215:119-26

SAKKAS D., LEPPENS-LUISIER G., LUCAS H., CHARDONNENS D., CAMPANA A., FRANKEN D.R., URNER F. (2003) Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 68:1463-9

SAUBER K., MEIZEL, S. (1995) Importance of bicarbonate to the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *J Androl* 16:266-271

SAXENA D.K., TANII I., OH-OKA T., YOSHINAGA K., TOSHIMORI K. (2000) Behaviour and role of an intra-acrosomal antigenic molecule, acrin 3, during mouse fertilisation *in vitro*. *Zygote* 8:329-38

- SAXENA D.K., TANII I., YOSHINAGA K., TOSHIMORI K. (1999) Role of intra-acrosomal antigenic molecules acrin 1 (MN7) and acrin 2 (MC41) in penetration of the zona pellucida in fertilization in mice. *J Reprod Fertil* 117:17-25
- SCHMIDT H., KAMP G. (2004) Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128:171-9
- SCHOFF P.K., CHEETHAM J., LARDY H.A. (1989) Adenylate kinase activity in ejaculated bovine sperm flagella. *J Biol Chem* 264:6086-91
- SCHUH K., CARTWRIGHT E.J., JANKEVICS E., BUNDSCHU K., LIEBERMANN J., WILLIAMS J.C., ARMESILLA A.L., EMERSON M., OCEANDY D., KNOBELOCH K.P., NEYSES L. (2004) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 279:28220-6
- SCHURMANN A., AXER H., SCHEEPERS A., DOEGE H., JOOST H.G. (2002) The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res* 307:237-42
- SETCHELL B.P. (1970) The secretion of fluid by the testes of rats, rams and goats with some observations on the effect of age, cryptorchidism and hypophysectomy. *J Reprod Fertil* 23:79-85
- SHALGI R., SELIGMAN J., KOSOWER N.S. (1989) Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 40:1037-45
- SI Y., OKUNO M. (1995) Extrusion of microtubule doublet outer dense fibers 5-6 associating with fibrous sheath sliding in mouse sperm flagella. *J Exp Zool* 273:355-62
- SMITH A.D., WILSON J.E. (1991) Disposition of mitochondrially bound hexokinase at the membrane surface, deduced from reactivity with monoclonal antibodies recognizing epitopes of defined location. *Arch Biochem Biophys* 287:359-66
- SPINACI M., VOLPE S., BERNARDINI C., DE AMBROGI M., TAMANINI C., SEREN E., GALEATI G. (2005) Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol Reprod Dev* 72:534-41
- SPORNITZ U.M. (1996) Anatomie und Physiologie. *Lehrbuch und Atlas für die Fachberufe im Gesundheitswesen* 2. Auflage Springer Verlag
- SRERE P.A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* 56:89-124
- SRERE P.A., KNOLL H.R. (1998) Location-location-location. *Trends Biochem Sci* 23:319-20
- STARCK D. (1975) Embryologie. *Stuttgart, Georg Thieme Verlag*
- STOREY B.T., KAYNE F.J. (1975) Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden-Myerhof pathway of glycolysis: activities of pathway enzymes in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Fertil Steril* 26:1257-65

STOREY B.T., KAYNE F.J. (1980) Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: relation to metabolic strategy of the sperm cell. *J Exp Zool* 211:361-7

STRANDHOLM J.J., DYSON R.D., CARDENAS J.M. (1976) Bovine pyruvate kinase isozymes and hybrid isozymes. Electrophoretic studies and tissue distribution. *Arch Biochem Biophys* 173:125-31

STRYER L. (1999) Biochemie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford

SUAREZ S.S., HO H.C. (2003) Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim* 38:119-24

SUELTER C.H. (1990) Experimentelle Enzymologie. Grundlagen für die Laborpraxis. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

SUN-WADA G.H., IMAI-SENGA Y., YAMAMOTO A., MURATA Y., HIRATA T., WADA Y., FUTAI M. (2002) A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem* 277:18098-105

SUTOVSKY P., HAUSER R., SUTOVSKY M. (2004) Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum Reprod* 19:628-38

SUZUKI F., YANAGIMACHI R. (1989) Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 23:335-47

TAKAI Y., SASAKI T., MATOZAKI T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208

TAKENAKA M., NOGUCHI T., INOUE H., YAMADA K., MATSUDA T., TANAKA T. (1989) Rat pyruvate kinase M gene. Its complete structure and characterization of the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 264:2363-7

TAKENAKA M., NOGUCHI T., SADAHIRO S., HIRAI H., YAMADA K., MATSUDA T., IMAI E., TANAKA T. (1991) Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene. *Eur J Biochem* 198:101-6

TANABE T., YAMADA M., NOMA T., KAJII T., NAKAZAWA A. (1993) Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J Biochem (Tokyo)* 113:200-7

TANAKA H., TAKAHASHI T., IGUCHI N., KITAMURA K., MIYAGAWA Y., TSUJIMURA A., MATSUMIYA K., OKUYAMA A., NISHIMUNE Y. (2004) Ketone bodies could support the motility but not the acrosome reaction of mouse sperm. *Int J Androl* 27:172-7

TASH J.S. (1989) Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 14:332-9

- THOMAS P., MEIZEL S. (1989) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca²⁺ influx. *Biochem J* 264:539-46
- THUNDATHIL J.C., ANZAR M., BUHR M.M. (2006) Na⁺/K⁺ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 75:308-17
- TIPLER C.P., HUTCHON S.P., HENDIL K., TANAKA K., FISHEL S., MAYER R.J. (1997) Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:1053-60
- TOSHIMORI K. (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 61:1-6
- TOURIOL C., BORNES S., BONNAL S., AUDIGIER S., PRATS H., PRATS A.C., VAGNER S. (2003) Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell* 95:169-78
- TOVICH P.R., OKO R.J. (2003) Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J Biol Chem* 278:32431-8
- TOVICH P.R., SUTOVSKY P., OKO R.J. (2004) Novel aspect of perinuclear theca assembly revealed by immunolocalization of non-nuclear somatic histones during bovine spermiogenesis. *Biol Reprod* 71:1182-94
- TRAVIS A.J., FOSTER J.A., ROSENBAUM N.A., VISCONTI P.E., GERTON G.L., KOPF G.S., MOSS S.B. (1998) Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Biol Cell* 9:263-76
- TRAVIS A.J., JORGEZ C.J., MERDIUSHEV T., JONES B.H., DESS D.M., DIAZ-CUETO L., STOREY B.T., KOPF G.S., MOSS S.B. (2001) Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol Chem* 276:7630-6
- TSO W.W., LEE W.M. (1980) Seminal plasma and progressive motility of boar spermatozoa. *Int J Androl* 3:243-50
- TSUBAMOTO H., HASEGAWA A., NAKATA Y., NAITO S., YAMASAKI N., KOYAMA K. (1999) Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* 61:1649-54
- TULSIANI D.R., ABOU-HAILA A., LOESER C.R., PEREIRA B.M. (1998) The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240:151-64
- TURNER K.O., GARCIA M.A., MEIZEL S. (1994) Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement. *Mol Cell Endocrinol* 101:221-5
- URNER F., SAKKAS D. (1999) A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa in gamete fusion in the mouse. *Biol Reprod* 60:733-9

- VERA J.C., BRITO M., ZUVIC T., BURZIO L.O. (1984) Polypeptide composition of rat sperm outer dense fibers. A simple procedure to isolate the fibrillar complex. *J Biol Chem* 259:5970-7
- VERTESSY B.G., OROSZ F., KOVACS J., OVADI J. (1997) Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *J Biol Chem* 272:25542-6
- VISCONTI P.E., BAILEY J.L., MOORE G.D., PAN D., OLDS-CLARKE P., KOPF G.S. (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-37
- VISCONTI P.E., KOPF G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6
- VISCONTI P.E., MOORE G.D., BAILEY J.L., LECLERC P., CONNORS S.A., PAN D., OLDS-CLARKE P., KOPF G.S. (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121:1139-50
- VOET D., VOET J.G. (1992) Biochemie. VCH
- WALENSKY L.D., SNYDER S.H. (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130:857-69
- WALLIMANN T., MOSER H., ZURBRIGGEN B., WEGMANN G., EPPENBERGER H.M. (1986) Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Muscle Res Cell Motil* 7:25-34
- WALSH J.L., KEITH T.J., KNULL H.R. (1989) Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta* 999:64-70
- WARD W.S., COFFEY D.S. (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569-74
- WASSARMAN P.M. (1988a) Fertilization in mammals. *Sci Am* 259:78-84
- WASSARMAN P.M. (1988b) Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57:415-42
- WELCH J.E., BARBEE R.R., MAGYAR P.L., BUNCH D.O., O'BRIEN D.A. (2006) Expression of the spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDS) in rat testis. *Mol Reprod Dev* 73:1052-60
- WELCH J.E., BROWN P.L., O'BRIEN D.A., MAGYAR P.L., BUNCH D.O., MORI C., EDDY E.M. (2000) Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. *J Androl* 21:328-38
- WELCH J.E., SCHATTE E.C., O'BRIEN D.A., EDDY E.M. (1992) Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 46:869-78
- WESTHOFF D. (1996) Mikrokompartmentierung eines glycolytischen Enzyms in Säugerspermien. *Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*

- WESTHOFF D., KAMP G. (1997) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J Cell Sci* 110:1821-9
- WEYAND I., GODDE M., FRINGS S., WEINER J., MULLER F., ALTENHOFEN W., HATT H., KAUPP U.B. (1994) Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368:859-63
- WISTROM C.A., MEIZEL S. (1993) Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* 159:679-90
- WOJCIK C., BENCHAIIB M., LORNAGE J., CZYBA J.C., GUERIN J.F. (2000) Proteasomes in human spermatozoa. *Int J Androl* 23:169-77
- WOLFRUM U., SCHMITT A. (2000) Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 46:95-107
- XU K.Y., BECKER L.C. (1998) Ultrastructural localization of glycolytic enzymes on sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Histochem Cytochem* 46:419-27
- YANAGIMACHI R. (1994) Mammalian Fertilization. In: KNOBIL E., NEILL J. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 189-317
- YANAGIMACHI R., USUI N. (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 89:161-74
- YEUNG C.H., OBERLANDER G., COOPER T.G. (1995) Effects of the male antifertility agent ornidazole on sperm function *in vitro* and in the female genital tract. *J Reprod Fertil* 103:257-64
- ZANEVELD L.J., DE JONGE C.J., ANDERSON R.A., MACK S.R. (1991) Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 6:1265-74
- ZELEZNIKAR R.J., DZEJA P.P., GOLDBERG N.D. (1995) Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem* 270:7311-9

7 Publikationen

1. Forschungsergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden beim Fachjournal *Reproduction* eingereicht.

FEIDEN S., STYPA H., WOLFRUM U., WEGENER G., KAMP G. A novel pyruvate kinase (PK-S) from boar spermatozoa is localized at the fibrous sheath and the acrosome. *Reproduction* submitted

2. KAMP G., SCHMIDT H., STYPA H., FEIDEN S., MAHLING C., WEGENER G. (2007) Regulatory properties of 6-phosphofructokinase (PFK) and control of glycolysis in boar spermatozoa. *Reproduction* in press