

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Institut/Klinik für Besamungs- und Embryotransfer
(Leiterin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Christine Aurich, Dipl.ECAR)

Etablierung der Tyrosinphosphorylierung zur Überprüfung des Kapazitationsstatus von Hundespermien

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von
Marlene Kirchwegger

Wien, im Februar 2024

Betreuerin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Sabine Schäfer-Somi, Dipl.ECAR

Klinik für Besamung und Embryotransfer

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Dr.med.vet. Auke Boersma

Institut für In-vivo und In-vitro-Modelle

Department für Biomedizinische Wissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese schriftliche Arbeit wurde noch an keiner Stelle vorgelegt.

Neuhaus, 09.02.2024

Harlene Kirchweger

Zusammenfassung

Die Kapazitation von Spermien ist ein wichtiger Reifungsprozess, welche für die Befruchtungsfähigkeit unerlässlich ist. Im Zuge der Kapazitation kommt es zu physiologischen und biochemischen Veränderungen am Spermium. Calcium und Bicarbonat strömen in die Zelle ein, Cholesterol strömt aus der Membran aus, die molekulare Zusammensetzung der Spermienmembran ändert sich und Proteine im Spermium werden phosphoryliert. Außerdem entwickeln die Spermien eine hyperaktivierte Bewegung. Zum Nachweis der Kapazitation beim Hund wird derzeit vor allem der Chlortetrazyklinassay verwendet, hierbei wird Calcium im Spermium angefärbt und charakteristische Färbemuster entstehen. Eine neuere Nachweismethode stellt die Tyrosinphosphorylierung dar, hierbei wird mittels fluoreszierender Antikörper dargestellt, wie Proteine während der Kapazitation verändert werden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden ein Vergleich dieser beiden Nachweisverfahren vorgenommen. Die spermienreiche Phase aus dem Ejakulat gesunder Rüden wurde auf 100×10^6 Spermien/mL verdünnt und Anteile davon entnommen zur Prüfung der Membranintegrität und Bestimmung der kinematischen Daten, sowie jeweils für den CTC-Assay und die Tyrosinphosphorylierung. Die jeweiligen Verfahren wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde durchgeführt und anschließend die Ergebnisse miteinander verglichen.

Zum Zeitpunkt der Beurteilung zeigten sich beim CTC-Assay $54,2 \% \pm 17,1 \%$ der untersuchten Spermien als kapazitiert. Bei der Tyrosinphosphorylierung war ein Prozentsatz von $18,7 \% \pm 25,4 \%$ der Spermien phosphoryliert ($p = 0,075$). Zwischen den unkapazitierten Spermien war ein signifikanter Unterschied erkennbar ($p = 0,028$).

Im Rahmen der Beurteilung bestätigte sich die Hypothese, dass die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind, da mit den verschiedenen Verfahren unterschiedliche Vorgänge in den Spermien dargestellt werden, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kapazitation stattfinden.

Summary

Capacitation is an important spermatozoa maturation process and essential for fertilization. During capacitation, physiological and biochemical changes occur in the cell. Calcium and bicarbonate flow into the cell, cholesterol is transported through and out of the sperm membrane, the molecular composition of the sperm membrane changes and sperm proteins are phosphorylated.

The chlortetracycline (CTC) assay is a frequently used method to detect capacitation in canine spermatozoa. Within this method, intracellular calcium binds chlortetracycline, resulting in characteristic staining patterns. Another method for determining the capacitation state of sperm is the tyrosine phosphorylation assay. This method uses fluorescent antibodies to indicate modification of location of a special membrane protein during capacitation.

The aim of this study was to compare these two methods. The sperm-rich phase from the ejaculate of healthy male dogs was diluted to 100×10^6 sperm/mL and aliquots were taken for determining membrane integrity and kinematic data, as well as for the chlortetracycline assay and tyrosine phosphorylation. The different methods were performed after an incubation period of one hour, then the results were compared.

At the time of assessment, the CTC assay showed $54.2 \% \pm 17.1 \%$ of capacitated sperm, whereas with tyrosine phosphorylation assay, a percentage of $18.7 \% \pm 25.4 \%$ of cells was phosphorylated ($p = 0.075$). A significant difference was seen between the uncapacitated spermatozoa ($p = 0.028$).

During the assessment, it became apparent that the hypothesis was true and results are not directly comparable, since the different methods evaluate different processes during capacitation occurring at different time points of capacitation.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	3
2.1.	KAPAZITATION	3
2.1.1.	<i>Membranveränderungen</i>	3
2.1.2.	<i>Cholesterol-Efflux</i>	4
2.1.3.	<i>Tyrosinphosphorylierung</i>	5
2.1.4.	<i>Calcium</i>	6
2.1.5.	<i>Hyperaktivierung</i>	7
2.2.	ASSAYS ZUM NACHWEIS DER KAPAZITATION	8
2.2.1.	<i>Nachweis der Hyperaktivierung</i>	8
2.2.2.	<i>Nachweis der Akrosomenreaktion</i>	8
2.2.3.	<i>Chlortetrazyklin-Assay</i>	9
2.2.4.	<i>Tyrosinphosphorylierung</i>	10
3.	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1.	SAMENGEWINNUNG	12
3.2.	VERSUCHSAUFBAU	12
3.3.	QUALITÄTSKONTROLLE	13
3.3.1.	<i>Kinematische Daten</i>	13
3.3.2.	<i>Membranintegrität</i>	13
3.3.3.	<i>Spermienkonzentration und -morphologie</i>	14
3.4.	CHLORTETRAZYKLIN-ASSAY	14
3.5.	TYROSINPHOSPHORYLIERUNG	15
4.	STATISTIK	16
5.	ERGEBNISSE	17
5.1.	KINEMATISCHE DATEN	17
5.2.	CHLORTETRAZYKLIN-ASSAY	17
5.3.	TYROSINPHOSPHORYLIERUNG	18
6.	DISKUSSION	19
7.	LITERATURVERZEICHNIS	21
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	27
9.	TABELLENVERZEICHNIS	28

1. Einleitung

Kapazitation ist die funktionelle Reifung des Spermatozoons und seiner Membran, sie ist die Voraussetzung für die Akrosomenreaktion und somit für die Befruchtungsfähigkeit des Spermiums. (1)

Ausgelöst wird die Kapazitation in vivo durch den Kontakt der ejakulierten Spermien mit dem weiblichen Genitaltrakt, es spielt vor allem der caudale Bereich des Eileiters eine Rolle. (2) In vitro initiieren spezielle Nährmedien den Ablauf der Reaktion.

Die Kapazitation beginnt mit einem Influx von Bicarbonat ins Spermium, welches durch die Aktivierung eines Protein-Kinase-A abhängigen Signalweges die Kapazitation in Gang setzt. (3) Eine Veränderung ist etwa der Efflux von Cholesterol aus der Spermienmembran. Das Cholesterol stabilisiert die Membran und würde so alle für die Kapazitation notwendigen Vorgänge verhindern. (4) Wieder aufgenommen wird das Cholesterol von extrazellulären Molekülen wie beispielsweise Albumin. (5) Innerhalb der Membran kommt es zur Umverteilung von Membranphospholipiden und die Zusammensetzung der Spermienmembran ändert sich. (6) Dadurch können Moleküle wie Calcium oder Bicarbonat leichter in die Zelle eintreten. Ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel sorgt für eine gesteigerte Motilität des Spermiums, die Spermien werden hypermotil. Diese hyperaktivierte Bewegung ermöglicht es den Spermien, sich in vivo von der Uterusschleimhaut zu lösen und sich auf die Eizelle zuzubewegen (7) beziehungsweise die Zona pellucida zu durchdringen. (8) Die Akrosomenreaktion kennzeichnet das Ende der Kapazitation. (9)

Die Beurteilung der Kapazitation bei Hundespermien wird derzeit hauptsächlich mit Hilfe des Chlortetracyclin-Assays durchgeführt. Dabei wird mittels Chlortetracyclin sichtbar gemacht, wie sich Calcium während der Kapazitation im Akrosom anreichert und typische Färbemuster entstehen. (10) Eine neuere Methode stellt die Tyrosinphosphorylierung dar. Hierbei wird mittels Immunfluoreszenz und fluoreszierenden Antikörpern dargestellt, wie bestimmte Proteine im Spermium modifiziert werden. (11) Das geht mit spezifischen Fluoreszenzmustern bei verschiedenen Tierarten einher, die sich nur teilweise decken. Für den Hund existiert erst eine Studie zum Fluoreszenzmuster (12) und keine, in der die Tyrosinphosphorylierung mit den Vorgängen der Kapazitation abgeglichen wird.

Die Hypothese dieser Arbeit lautet: Die Tyrosinphosphorylierung ergibt bei Hundespermien tierart-spezifische Färbepatterns. Die Tyrosinphosphorylierung wird parallel zur Chlortetrazyklinmethode angewendet. Da beide Methoden unterschiedliche Prozesse während der Kapazitation untersuchen, werden die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sein.

2. Literatur

2.1. Kapazitation

Die Definition von Kapazitation umfasst alle Veränderungen an einem Spermium, welche es nach dem Austritt aus dem männlichen Genitaltrakt befruchtungsfähig machen. (13) Dazu gehört die Fähigkeit, mit der Zona Pellucida der Eizelle zu verschmelzen und die Akrosomenreaktion durchzumachen, sowie zu einer hyperaktivierten Vorwärtsbewegung fähig zu sein. (9) Spermien haben nicht von Beginn an die Fähigkeit, Eizellen zu befruchten, erst durch den Kontakt mit dem weiblichen Genitaltrakt verändern sich die Spermien so, dass sie später mit der Eizelle verschmelzen können. Das Spermium unterläuft diversen physiologischen und biochemischen Veränderungen. (1) Dabei geschehen viele Vorgänge auf einmal – es kommt zu einem Cholesterolefflux aus der Membran, welche daraufhin ihre Eigenschaften und Durchlässigkeit ändert, sowie auch ihre molekulare Zusammensetzung, Proteine werden phosphoryliert und die Spermien entwickeln eine hyperaktivierte Bewegung. (9) Der Vorgang beginnt mit dem intrazellulären Anstieg von Bicarbonat (HCO_3^-), welches durch einen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Co-Transporter in das Spermium gelangt. Die Eigenschaften der Spermienmembran ändern sich, weiters kommt es zur Aktivierung vom Protein-Kinase-A-Signalweg und die Kapazitation wird in Gang gesetzt. Diese Veränderungen ermöglichen den Cholesterolefflux und somit eine Destabilisierung der Membran. (3) Durchgeführt wird der Cholesterolausstrom von sogenannten ATP-bindenden Kassetten Transportern (ABC-Transporter), welche sich dabei die übrig gebliebene Energie der ATP-Spaltung zunutze machen. (14) Während der Kapazitation steigt außerdem der pH-Wert im Spermium an, Grund hierfür ist die gesteigerte Aufnahme von Bicarbonat in die Zelle. (15) Die Akrosomenreaktion kennzeichnet das Ende der Kapazitation. (9)

Die Kapazitation läuft nicht in allen Spermien gleichzeitig ab, sondern ist auf mehrere Etappen aufgeteilt. Somit gibt es immer einen Pool an fertilen Spermien und die Chance auf eine Befruchtung, sobald der Eisprung erfolgt ist, ist höher. (9)

2.1.1. Membranveränderungen

Die Spermienmembran weist im Gegensatz zu den Membranen anderer Zellen im Körper einen höheren Cholesterolgehalt auf. (16) In Anwesenheit von Bicarbonat (HCO_3^-) kommt es im Spermium zur Aktivierung von Adenylatcyclase und der Gehalt an cyclischem

Adenosinmonophosphat (cAMP) steigt an, dadurch startet ein Protein Kinase A abhängiger Signalweg und Phospholipidtranslokatoren werden aktiviert. Diese Translokatoren sorgen für eine Neuverteilung von Phospholipiden in der Membran. Sie ändern die Lokalisation der Phospholipide in der Spermienmembran und dadurch ändert sich die Zusammensetzung der Membran. Die Enzyme, die dieses Hin- und Herschieben der Phospholipide möglich machen, werden aktiviert durch eine von Bicarbonat abhängige Tyrosinphosphorylierung der Proteine. Diese Umverteilung der Lipidanordnung in der Plasmamembran ist innerhalb von fünf Minuten nach dem Kontakt mit HCO_3^- abgeschlossen. (17)

Weiters entstehen sogenannte „Lipid rafts“, dabei kommt es zu einer Ansammlung von Proteinen und Lipiden in der Membran. Diese Mikrodomänen haben eine andere molekulare Zusammensetzung als der Rest der Spermienmembran und sie spielen im späteren Verlauf eine wichtige Rolle bei der Akrosomenreaktion, da sie die Bindung an die Zona pellucida ermöglichen. (6) Die neu modellierte Zusammensetzung der Spermienmembran führt zu einer Destabilisierung derselbigen (17), es erleichtert anschließend den Cholesterolausstrom aus dem Spermium. (15)

2.1.2. Cholesterol-Efflux

Auch für den Cholesterolefflux spielen die die bereits genannten Veränderungen, wie die Membranveränderungen, der Anstieg an Bicarbonat sowie die erhöhte Produktion von cAMP, eine Rolle. Die hohen cAMP-Level sorgen für die Aktivierung eines Proteinkinase-A abhängigen Signalwegs, es kommt zu einer Destabilisierung und erhöhten Fluidität der Spermienmembran. (18) Durch einen HCO_3^- abhängigen Signalweg kommt es zu einer Umverteilung von Cholesterol in die apikale Membran. Es wird davon ausgegangen, dass dies einen erster Schritt für den Cholesterolausstrom aus der Membran darstellt. (17) Die Gesamtheit der Veränderungen erleichtern den Cholesterolefflux. Ermöglicht wird der Ausstrom von Cholesterol durch sogenannte Transmembranproteine, in diesem speziellen Fall durch ATP-bindende Kassetten (ABC) Transporter. (19) Diese ABC-Transporter verlagern das Cholesterol aus der Zelle in den Extrazellulärraum, wo es von Albumin, Apo-Lipoproteinen oder high-density-Lipoproteinen aufgenommen wird, in vitro wird oft auch bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Ohne diese Moleküle im Extrazellulärraum wäre der Cholesterolausstrom nicht möglich. (5) Beim Ausschleusen der Cholesterol-Moleküle kommt es zu oxidativem Stress, die

Moleküle werden oxidiert und das Cholesterol wird hydrophiler. Dadurch kann es leichter durch die extrazellulären Moleküle aufgenommen werden. (20)

Der Cholesterolefflux sorgt ebenfalls für eine Modifikation der Spermienmembran, er beeinflusst die Tyrosinphosphorylierung (erwiesenermaßen bei Mensch (21) und Maus (22)) und ist somit ein wichtiger Mechanismus zum Erlangen der Befruchtungsfähigkeit.

ATP-bindende Kassetten (ABC) Transporter sind allgemein für ihre Cholesterol-Transportfähigkeit bekannt. Bei Mäusen konnten die ABC-Transporter A1, A7, A17 und G1 in den ejakulierten Spermien nachgewiesen werden. (5) Auch beim Menschen wird der ABCA1-Transporter exprimiert. (23) In Hundespermien konnte der ABCA1-Transporter am Akrosom, am Spermienkopf, am Mittelteil und in der Schwanzregion nachgewiesen werden. (19) Es wurde an Hundespermien nachgewiesen, dass der ABCA1-Transporter wesentlich für die Kapazitation ist. (24)

2.1.3. Tyrosinphosphorylierung

Unter Phosphorylierung versteht man das reversible Anfügen einer Phosphatgruppe an ein Protein. (25) Die Phosphorylierung von Proteinen stellt einen der wichtigsten intrazellulären Signalwege während der Kapazitation dar. Sie wird beeinflusst von steigendem intrazellulärem Bicarbonat (HCO_3^-) und Calcium (Ca^{2+}), vom Cholesterolausstrom aus der Spermienmembran und der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species ROS). (11) Die Phosphorylierung ist essenziell für die Kapazitation, sie beeinflusst unter anderem die Hyperaktivierung und ist unerlässlich für die Akrosomenreaktion. Ohne diesen Vorgang wäre es dem Spermium unmöglich, die Eizelle zu erreichen, sie zu penetrieren und mit ihr zu verschmelzen. (25) Bei der Phosphorylierung werden Proteine in den Spermien post-translational modifiziert (26), vorwiegend betrifft das die Aminosäure Tyrosin, aber auch Serin und Threonin werden phosphoryliert. (27) Nur Tyrosin aber ist ein Indikator, ob die Kapazitation eines Spermiums bereits stattgefunden hat, denn wird die Phosphorylierung von Tyrosin blockiert, findet auch keine Kapazitation statt. (11) Serin/Threonin wird gleich am Anfang der Kapazitation phosphoryliert, Tyrosin folgt erst später. (28)

Die Phosphorylierung wird durch einen Adenylatcyclase-abhängigen Signalweg ausgelöst. (29) Ein Anstieg von cAMP aktiviert die Proteinkinase A. PKA ist eigentlich eine Serin/Threonin-Kinase, sorgt aber indirekt für einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung, indem sie Tyrosinkinasen aktiviert. (4) Man unterscheidet zwischen Rezeptor-aktivierten-

Tyrosinkinasen (RTKs) und Nicht-Rezeptor-aktivierten-Proteintyrosinkinasen (PTK). Die RTKs sind Transmembranproteine und werden durch Bindung von beispielsweise Wachstumsfaktoren oder ROS aktiviert. Die PTKs liegen intrazellulär. (4, 25) Einer der Hauptorte, an dem die Phosphorylierung stattfindet, ist der Spermienschwanz. Durch die Veränderungen dort kommt es zur Hyperaktivierung, welche es dem Spermium erst ermöglicht, die Eizelle zu penetrieren. (30) Proteine, die phosphoryliert werden, sind beispielsweise A-Kinase Anker Proteine (AKAP3, AKAP4). Sie kommen vor allem im Spermienschwanz vor und regulieren die Spermienmotilität über Proteinkinase-A Untereinheiten. Nachgewiesen wurden sie bisher bei Menschen, Hamster und Maus. Ein weiteres wichtiges Protein ist das CABYR-Protein (Calcium-bindend und Tyrosinphosphorylierungs-reguliert). Es bindet im Laufe der Kapazitation Calcium und beeinflusst so die Hyperaktivierung. (11) Die Phosphorylierung der Proteine in der Membran des Spermienkopfes kennzeichnet das Ende der Kapazitation, sie ist schlussendlich wichtig für die Akrosomreaktion. (12)

2.1.4. Calcium

Durch den Cholesterolausstrom und das Destabilisieren der Spermienmembran erhöht sich die Durchlässigkeit der Membran für Calcium (Ca^{2+}). Der hohe intrazelluläre Calciumgehalt führt zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und die Spermienmotilität steigert sich. Der Ca^{2+} Transport erfolgt über Kanäle. Am Spermium werden Niederspannungskanäle exprimiert, welche eine Spannungsschwelle von etwa -60 mV aufweisen. (31) Während der Kapazitation steigt der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt von $50 - 100$ nM auf einen Höchstgehalt von $125 - 175$ nM. Diese erhöhten Konzentrationen kann man vor allem am Spermienkopf und am Spermienschwanz nachweisen. (32) Auch intrazelluläre Calciumspeicher spielen eine Rolle, diese werden durch Inositol 1,5,5-trisphosphat (IP3) aufgelöst und das Calcium wird zum Verbrauch frei. Extrazelluläres Calcium ermöglicht ein Auffüllen der Speicher und somit eine verlängerte Dauer der hypermotilen Phase. (33)

Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Kanälen: CatSper und Ca_v s. CatSper (Kationen Kanäle des Spermatozoons) sind Ca^{2+} -selektive Niederspannung-Transporter, die die Hyperaktivierung erst möglich machen. Durch einen intrazellulär hohen pH-Wert steigert sich ihre Wirkung. (34) Es gibt insgesamt vier Untereinheiten (CatSper 1 – 4), welche vor allem im Hauptstück des Spermienschwanzes vorkommen. Diese Kanäle findet man nicht nur bei

Säugetieren, sondern auch bei Reptilien, Stachelhäutern und Nesseltieren. Sie transportieren das Calcium entgegen dem elektrochemischen Gradienten in die Zelle und sind eine Grundvoraussetzung, um hyperaktivierte Spermien zu ermöglichen. (35, 36)

Ca_vs wandeln Änderungen im Membranpotential in Ca^{2+} -Signale um. (35) Auch hier handelt es sich um Niederspannungskanäle. Ab einem Membranpotential von -40 mV sind sie inaktiviert, sie benötigen eine Hyperpolarisation von mindestens -80 mV um sich zu öffnen. Bei der Kapazitation kommt es zu dieser Hyperpolarisation, eine Öffnung der Kanäle wird möglich. (37)

2.1.5. Hyperaktivierung

Bereits nach dem Verlassen des Nebenhodens beginnen die Spermien mit einer asymmetrischen Bewegung ihrer Flagellen, sie zeigen eine deutliche Beweglichkeit. Erst im Laufe der Kapazitation ändert sich dieses Bewegungsmuster und eine hyperaktivierte Vorwärtsbewegung entsteht. (3) Die Hyperaktivierung ist einer der wichtigsten Vorgänge im Laufe der Kapazitation. (9) Die Hyperaktivierung der Spermien kennzeichnet sich durch charakteristisch asymmetrische, peitschenhiebartige Schläge des Spermischwanzes, in einer höheren Amplitude und Frequenz als die sich in normaler Geschwindigkeit fortbewegenden Spermien. Diese gesteigerte Vorwärtsbewegung ist wichtig, damit sich die Spermien von der Eileiterschleimhaut lösen und auf die Eizelle zuschwimmen können. (7) Hier haben beispielsweise Petrunkina et al. (38) festgestellt, dass es einen Zusammenhang zwischen ungebundenen Spermien und phosphorylierten Spermienköpfen gibt. (38) Weiters spielt die Hyperaktivierung der Spermien auch eine Rolle beim Eindringen in die Eizelle. Hypermotile Spermien haben eine viel höhere Wahrscheinlichkeit, die Zona pellucida der Eizelle zu durchdringen, als normal bewegliche Spermien. (8)

Auch hier spielen wieder die Moleküle Ca^{2+} , cAMP und HCO_3^- eine Rolle. Zur Erhaltung der Hyperaktivierung ist extrazelluläres Ca^{2+} relevant. Durch die Bindung von cAMP an CatSper-Kanäle kann das extrazelluläre Ca^{2+} in die Zelle einströmen und das notwendige Ca^{2+} -Level in den intrazellulären Speichern kann aufrechterhalten werden. (33) Bei hyperaktivierten Spermien findet man im Spermischwanz einen höheren Ca^{2+} -Gehalt als in normal beweglichen Spermien. (39) Dies liegt daran, dass durch einen cAMP-abhängigen Prozess Ca^{2+} pulsatil von intrazellulären Speichern im Spermienkopf in den Spermischwanz abgegeben wird. Das Ca^{2+} ist verantwortlich für die typische, asymmetrische Bewegung des

hyperaktivierten Spermenschwanzes, cAMP sorgt für die Aufrechterhaltung der Bewegung. (33)

2.2. Assays zum Nachweis der Kapazitation

Erst in den letzten 25 Jahren wurden Methoden zum Nachweis der Kapazitation für den Hund etabliert. Im Jahre 1999 wurde beispielsweise die Chlortetrazyklinmethode, welche davor bereits erfolgreich bei anderen Tierarten wie beim Rind oder bei Mäusen angewandt wurde, für den Hund angewandt. (10) Andere Methoden sind ein Nachweis der Hyperaktivierung oder der abgelaufenen Akrosomenreaktion. Mit diesen Nachweisverfahren lässt sich die abgeschlossene Kapazitation feststellen, nicht aber die Veränderungen im Laufe der Kapazitation. Die derzeit bevorzugte Methode zur Beurteilung des Kapazitationsstatus von Hundespermien stellt die Tyrosinphosphorylierung dar. (40) Eine kurze Erwähnung verdient auch die Methode der bildler-basierten Durchflusszytometrie. Dabei handelt es sich um eine in der Humanmedizin angewendete, halbautomatische Analysemethode, mit der sich verschiedenste Signalwege in Zellen darstellen lassen, unter anderem auch die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Spermium. (41)

2.2.1. Nachweis der Hyperaktivierung

Die Hyperaktivierung der Spermien wird gekennzeichnet durch charakteristische, asymmetrische und peitschenartige Schläge der Spermiengeißel, mit hoher Amplitude und Frequenz. Da diese Hyperaktivierung im Zuge der Kapazitation im Spermium ausgelöst wird, eignet sie sich als Indikator für kapazitierte Spermien. Der Anteil an hyperaktivierten Spermien kann gemessen werden mittels normaler mikroskopischer Untersuchung der Proben oder mithilfe computerunterstützter Spermienanalyse (CASA). Hierbei werden die Spermien unter anderem untersucht auf eine Fortbewegung in höhere Geschwindigkeit sowie auf eine veränderte Frequenz und Amplitude der Kopf- und Schwanzbewegungen. (42)

2.2.2. Nachweis der Akrosomenreaktion

Die Akrosomenreaktion (AR) gehört an sich nicht mehr zur Kapazitation. Spermien, welche bereits die AR durchlaufen haben, kennzeichnen die abgeschlossene Kapazitation, da nur ausreichend destabilisierte Spermien eine AR durchlaufen sollten. (9) Bei der Beurteilung von AR-Spermien muss man unterscheiden zwischen vitalen und toten Spermien, da auch bereits abgestorbene Spermatozoen im Zuge der Apoptose eine AR durchlaufen können.

Ausschließlich die lebendigen, akrosomenreagierten Spermien können mit einer vollständig abgelaufenen Kapazitation gleichgesetzt werden. Eine Möglichkeit, die AR zu beurteilen, ist die direkte Beurteilung der Spermien unter einem Phasenkontrastmikroskop. (43) Das Anfärben der Spermien mit einer fluoreszierenden Lectinlösung (zB FITC-PNA) und der anschließenden Begutachtung mittels Durchflusszytometrie stellt hier aber die weitaus komfortablere und subjektivere Methode dar. (44)

2.2.3. Chlortetrazyklin-Assay

Um bereits kapazitierte Spermien darstellen zu können, eignet sich der Chlortetrazyklin-Assay. Dabei werden die Veränderungen in der Spermienmembran mittels Chlortetrazyklin als fluoreszierender Sonde angefärbt. Dies ist möglich, da das Chlortetrazyklin (CTC) an membrangebundene Kationen, allen voran Ca^{2+} , bindet. In der Zelle wird freies Calcium gebunden, die Farbintensität steigt dadurch. Es entstehen so unterschiedliche Färbemuster, welche man den Stadien Unkapazitiert, Kapazitation und Akrosomenreaktion zuordnen kann. Das Sperma der Hunde wird zuerst unter dem Mikroskop auf seine Motilität überprüft und anschließend in zwei Zyklen mit dem Kapazitationsmedium gewaschen und zentrifugiert, bei 300 G für je zehn Minuten. Da auch der Spermiengehalt eine Auswirkung auf die Kapazitation hat, wird dieser auf 10^6 Spermien pro ml reduziert. Nach einer Inkubation bei $38,5\text{ }^\circ\text{C}$ in diesem Medium ist bereits eine deutliche Verminderung der Spermienmotilität sichtbar. (10)

Für die CTC-Lösung zum Anfärben der Spermien werden $750\text{ }\mu\text{l}$ Chlortetrazyklin mit einem Puffer bestehend aus 20 mM Tris, 130 mM NaCl und 5 mM Cystein angemischt. (45) Nun werden $5\text{ }\mu\text{l}$ der CTC-Lösung mit $5\text{ }\mu\text{l}$ der zentrifugierten Spermien suspension auf einem Objektträger gemischt. Anschließend werden $0,2\text{ }\mu\text{l}$ einer Paraformaldehyd-Lösung hinzugefügt. Um die Intensität der Fluoreszenz zu erhalten, werden weiters $5\text{ }\mu\text{l}$ einer 1,4-diaza-bicyclo-Octan (DABCO) Lösung aufgetragen. Nach dem Auflegen eines Deckblättchens und dem Entfernen der überflüssigen Flüssigkeit, wird das Deckgläschen mit klarem Nagellack versiegelt. Nun werden die Proben unter einem Mikroskop mit fluoreszierender Optik betrachtet. (10, 45)

Ganz ähnlich ging Witte et al (2009) (46) vor. Nach waschen und verdünnen der Spermien werden $200\text{ }\mu\text{l}$ der Spermien mit $7\text{ }\mu\text{g}$ Hoechst 33258 für zwei Minuten inkubiert. Bevor diese Lösung für fünf Minuten bei 900 G zentrifugiert wird, fügt man 2 ml einer 2% igen Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Lösung hinzu. Der Überstand wird abgegossen und das Sediment

in 45 µl CTC-Lösung resuspendiert. Nun werden noch 2 µl einer 50 %igen Glutaraldehydlösung hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen. 5 µl der gefärbten Lösung werden auf einem Objektträger mit 2 µl DABCO fixiert. (46) Das Fixieren der Deckgläschen funktioniert wie bei Fraser et al. (1990) (45), die Proben werden unter 1000facher Vergrößerung und unter ultraviolettem Licht begutachtet. Auf jedem Objektträger werden mindestens 100 Spermien abgezählt und beurteilt. (46)

Da die Färbemuster der Hundespermien denen von anderen Spezies ähneln (unter anderem denen von Mäusen (45), Bullen (47), Hasen (48), Ebern (49), Schafen (50) sowie dem Menschen (51)), werden sie auch gleich benannt. Das Färbemuster F kennzeichnet sich durch eine Anfärbung des Spermienkopfes und ist typisch für noch nicht kapazitierte Spermien. Bereits kapazitierte Spermien zeigen sich im Färbemuster B, das Spermium zeigt postakrosomal keine Fluoreszenz mehr. Die Akrosomenreaktion verfügt über ein eigenes Färbemuster, genannt AR. Das Spermium weist nur noch ab dem Äquator Fluoreszenz auf, das Akrosom ist nicht mehr intakt und färbt sich daher auch nicht mehr an. (10) Sichtbar sind diese Färbemuster in Abbildung 1. (24) Nachteil dieser Methode ist die hohe Subjektivität, denn mitunter ist die Differenzierung zwischen intakt und kapazitiert für das menschliche Auge schwierig, vor allem, wenn der Hintergrund, durch Eidotterpartikel und sonstige Verdünnungsbestandteile, ebenfalls geringgradig fluoresziert.

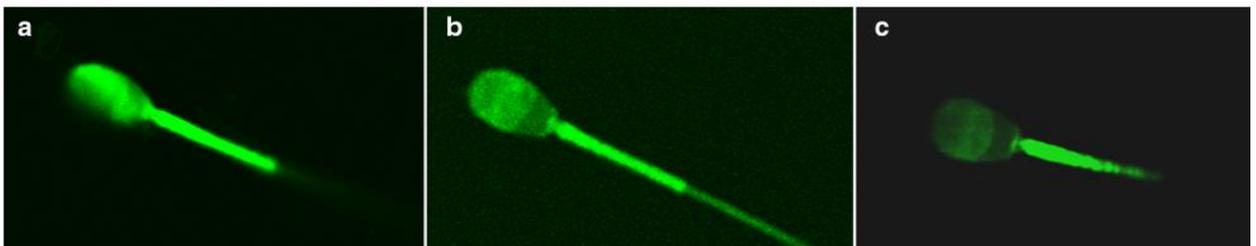


Abbildung 1: Verschiedene Färbemuster nach Durchführung eines CTC-Assays.

a) zeigt das Färbemuster F, welches unkapazitierte Spermien darstellt. Auf Abbildung b) ist die Fluoreszenz postakrosomal abgeschwächt, es zeigt Färbemuster B (kapazitierte Spermien). Bild c) zeigt das Färbemuster nach einer vollendeten Akrosomenreaktion. (24)

2.2.4. Tyrosinphosphorylierung

Eine weitere Nachweismethode für die Kapazitation ist die Tyrosinphosphorylierung. Bei anderen Tierarten ist bereits ein Zusammenhang zwischen der Kapazitation und einer fortschreitenden Phosphorylierung nachgewiesen worden. Visconti et al. (1995) wies bei Mäusen einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung mit fortschreitender Kapazitation

nach. (40) Auch bei anderen Tierarten wurde eine fortschreitende Tyrosinphosphorylierung mit voranschreitender Kapazitation nachgewiesen (etwa bei der Katze (52), beim Schwein (53) oder auch beim Rind (54)). Die maximale Tyrosinphosphorylierung erfolgte bei der Maus in einem Zeitraum von 90 Minuten, in dieser Zeitspanne wurde auch die Kapazitation abgeschlossen. (40)

Für den Hund wurden bisher nur zwei Studien über die verschiedenen Fluoreszenzmuster bei der Kapazitation durchgeführt (12, 38), aber noch kein direkter Vergleich mit dem CTC-Assay getroffen. Im Zuge dieses Versuchs wurden die Spermien von fünf Hunden zuerst in einem Kapazitationsmedium inkubiert und anschließend mit Maus Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern erneut inkubiert. Danach wurde eine Ziegen Anti-Maus IgG Lösung hinzugegeben und die Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Die ersten deutlichen Veränderungen waren nach 30 Minuten ersichtlich, nach 360 Minuten waren nur mehr 8 % nicht-phosphorylierte Spermien sichtbar. Die Tyrosinphosphorylierung wurde bei diesem Versuch im Spermienkopf und im Spermischwanz nachgewiesen. Insgesamt wurden 9 verschiedene Färbemuster erhoben. Es konnte festgestellt werden, dass der Anteil an nicht phosphorylierten Spermien im Verlauf der Kapazitation abnahm und der Anteil an phosphorylierten Spermien zunahm. Zwischen den Proben gab es individuelle Unterschiede. Die Phosphorylierung findet zuerst im Mittelstück des Spermiums statt, dann folgen das Haupt- und Endstück. Abschließend werden die Proteine im Spermienkopf phosphoryliert. (12)

3. Material und Methoden

3.1. Samengewinnung

Es wurden die Samenproben von insgesamt 16 Hunden untersucht. Das Ejakulat wurde durch händisches Absamen gewonnen. Bei den Rüden handelte es sich einerseits um Hunde der Veterinärmedizinischen Universität Wien (3 Beagle) und andererseits um gesunde Patienten der Plattform für Besamung und Embryotransfer (Flat coated Retriever, Golden Retriever, Schnauzer, Weißer Schweizer Schäfer). Die Ethikkommission wurde informiert, eine Tierversuchsgenehmigung war nicht nötig. Es wurde nur Samen guter Qualität und davon ausschließlich die spermienreiche Fraktion verwendet.

3.2. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist Abbildung 2 zu entnehmen.

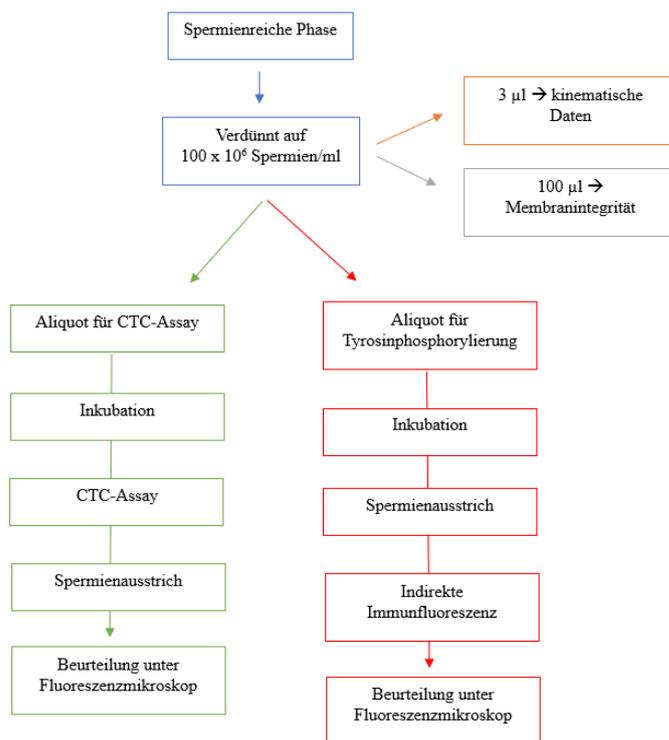


Abbildung 2: Versuchsaufbau

Die Ejakulate der spermienreichen Phase wurden auf 100×10^6 Spermien/ml verdünnt. Davon wurden Anteile genommen, um die kinematischen Daten der Spermienprobe zu erheben und um die Membranintegrität zu überprüfen. Für den CTC - Assay wurden $200 \mu\text{l}$ der Probe verwendet und nach einer zweistündigen Inkubationsperiode dem CTC - Assay unterzogen, anschließend auf einen Objektträger aufgetragen und unter einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Für die Tyrosinphosphorylierung wurde nach der Inkubation ein Spermienausstrich der Probe angefertigt und mit einem indirekten Immunfluoreszenzverfahren gefärbt sowie anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

3.3. Qualitätskontrolle

3.3.1. Kinematische Daten

Mittels CASA (computer assisted sperm analysis; CASA, Sperm Vision®, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) wurden die Parameter Beweglichkeit (M), progressive Beweglichkeit oder Vorwärtsbewegung (P) überprüft sowie einige andere Parameter. Davor wurden die Spermien mit einem TRIS-Zitronensäure-Fruktose-Puffer auf 100×10^6 Spermien/ml verdünnt. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 37°C untersucht. Es wurden $3 \mu\text{l}$ der Probe auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Pro Probe wurden sieben Felder mit 100 Zellen pro Feld untersucht, immer von derselben Person. Die folgenden Parameter wurden untersucht: Motilität (M), progressive Motilität (P), weiters die curvilinear velocity/Kurvengeschwindigkeit (VCL, $\mu\text{m/s}$), linear velocity/lineare Geschwindigkeit (VS; $\mu\text{m/s}$), mean velocity/mittlere Geschwindigkeit (VAP, $\mu\text{m/s}$), mean coefficient/mittlerer Koeffizient (STR, %), linear coefficient/linearer Koeffizient (LIN, %), wobble coefficient/schwankender Koeffizient (WOB, %), beat cross frequency/Kopfschlagfrequenz (BCF, Hz), Amplitude of lateral head displacement/Amplitude der seitlichen Kopfbewegung (ALH, μm), Distance curved line/Kurvenabstand (DCL, μm), Distance average path/Länge durchschnittlicher Weg (DAP, μm). Die gesamte Beweglichkeit wurde definiert als ein $\text{VCL} > 15 \mu\text{m/s}$, eine Vorwärtsbewegung als $\text{VCL} > 15 \mu\text{m/s}$ und $\text{LIN} > 0.9\%$, weiters wurde die lineare Beweglichkeit als $\text{STR} > 0.9\%$ und $\text{LIN} > 0.5\%$ definiert.

3.3.2. Membranintegrität

Die Überprüfung der Membranintegrität wurde mittels SYBR-14/PI Doppelfärbung vorgenommen und sichtbar gemacht mittels Epifluoreszenzmikroskop, welches an einen Computer angeschlossen wurde. Die Auswertung erfolgte mit einer Spezialsoftware (Sperm Vision®, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland). Es wurden $100 \mu\text{l}$ einer Spermienprobe in einer Phiole mit $2 \mu\text{l}$ von SYBR-14/PI gemischt und 10 Minuten im Finstern bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Tropfen davon wurde anschließend auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckgläschen abgedeckt und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer 400fachen Vergrößerung beurteilt (Olympus AX70, Olympus Optical CO., Ltd., Japan; U-MWB Filter Blocker, BP420-480 Anregungsfilter, BA515 Unterdrückungsfilter,

dichromatischer Spiegel: DM500). Die Köpfe lebensfähiger Spermien zeigen sich hellgrün, kaputte Membranen färben sich rot an. Beide Farben wurden automatisch von einer Videokamera erfasst. Jede Spermienprobe wurde einmal untersucht, pro Probe wurden aber mindestens 500 Spermien überprüft und der Mittelwert durch eine Software von SpermVision® berechnet. Die Ergebnisse werden als prozentualer Mittelwert der intakten Membranen angegeben.

3.3.3. Spermienkonzentration und -morphologie

Die Spermienkonzentration der Proben wurde mittels eines Nucleocounters SP 100 (ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark) nach Anweisung des Herstellers automatisch gezählt. Der Prozentsatz an abnormalen Spermien oder Spermien mit defekten Akrosomen wurde nach einer Fixierung in Hancock's Lösung (37 % Formalin) und einer Beurteilung von 200 Zellen pro Probe unter einem Phasenkontrastmikroskop (1000fache Vergrößerung und Öl-Immersion) ermittelt.

3.4. Chlortetrazyklin-Assay

Die nativen Proben wurden nach einer einstündigen Inkubationszeit einem CTC-Assay nach Witte et al. (12) unterzogen. Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen (Hoechst 33258; H6024; Glutaraldehyd: G6403; DABCO: D2522; Chlortetracycline CTC: 94498; Cystein: 30095; Polyvinylpyrrolidon PVP: 81400). Die CTC-Lösung besteht aus 4 mg CTC-Chloride und 8.8 mg Cystein in 10 mL CTC Puffer (24 mg TRIS und 76 mg NaCl/10 ml Aqua bidest. PVP 2 % in PBS: 40 mg PVP/2 mL PBS. Der CTC-Puffer und die PVP Lösung wurden aliquotiert und bei -18 °C eingefroren, die CTC-Lösung vor jedem Testlauf neu angemischt.

Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden 0.1386 µg Hoechst 33258 (0.7 µg/mL) zu den Aliquots von 200 µL hinzugefügt und für zwei Minuten inkubiert. Danach wurden 2 mL PVP 2% in PBS hinzugefügt und alles zusammen für fünf Minuten bei 900 G zentrifugiert. Das Spermis sediment wurde mit 45 µL der frisch zubereiteten CTC-Lösung vermengt und für 20 Sekunden inkubiert. Nach dem Zugabe von 8 µL einer 12.5 %igen Glutaraldehydlösung wurden 10 µL von jeder Samenprobe auf einem Objektträger mit einem Tropfen DABCO 0.22 M in Glycerol gemischt, die Probe mit einem Deckgläschen verschlossen und mit Klarlack versiegelt. Nun wurden die Proben bei 4 °C im Dunklen verwahrt und am nächsten Tag

begutachtet. Der Prozentsatz an unkapazitierten (F), kapazitierten (B) und Akrosomenreagierten (AR) Spermien wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung festgestellt (Öl-Immersion, Filterwürfel U-MWB).

3.5. Tyrosinphosphorylierung

Für die Tyrosinphosphorylierung wurden die Proben nach der einstündigen Inkubationszeit für ein indirektes Immunfluoreszenzverfahren gefärbt. Es wurde ein Spermienausstrich auf einem Objektträger angefertigt und mit 4%igem Formaldehyd (PFA; w/v) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nun wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton X-100 (v/v) permeabilisiert. Nach einer Waschung mit PBS wurden die Objektträger mit 1 % BSA (bovines Serum Albumin) in PBS (w/v; PBS-BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ausstriche mit Maus Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern (clone 4G10®; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung 1:100 bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die vorbereiteten Proben wurden dreimal mit PBS-BSA gewaschen und mit Alexa Fluor 488 konjugiertem Ziegen Anti-Maus IgG (1:100 Verdünnung, Sigma Aldrich, Wien, Österreich) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne der Spermien wurden mit 10 µM Hoechst33342 (Sigma Aldrich, Wien, Österreich) gefärbt. Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBS wurden die Objektträger mit Entellan® (Schnelleindeckmedium, 107960, Merck Millipore, Wien, Österreich) eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Alle Proben wurden mit einem Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axio Imager Z2) untersucht, bei 630facher Vergrößerung und Ölimmersion sowie NA 1,4. Die Farbstoffe Alexa Fluor 488 und Hoechst 33342 wurden angeregt mittels einem 450-490 nm und einem 300-400 nm Spektrum. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrum von 500-550 nm und 420-470 nm aufgenommen (Carl Zeiss Mikroskopie, LLC, Filter Set 38 und 49). Die so aufgenommenen Bilder wurden nach Petrunkina et al. (12) auf Tyrosinphosphorylierung untersucht. Pro Probe wurden 200 Zellen untersucht und der Prozentsatz von jedem Färbemuster vermerkt.

Die Färbemuster wurden, angelehnt an Petrunkina et al. (38), in insgesamt sechs Kategorien eingeteilt (siehe Abb. 3): Das Färbemuster TP (Tyrosinphosphorylierung) 1) zeigt nicht-phosphorylierte Spermien mit einer Fluoreszenz um den Äquator. Färbemuster 2) stellt tyrosinphosphorylierte Spermien mit Fluoreszenz am Mittelstück dar, Färbemuster 3) zeigt

zusätzlich das fluoreszierende Endstück. Bei Färbemuster 4) wurde nur der Spermienkopf phosphoryliert. Das Färbemuster 5) zeigt eine Fluoreszenz am Kopf und am Mittelstück, bei Muster 6) sind der Spermienkopf und Spermischwanz phosphoryliert.

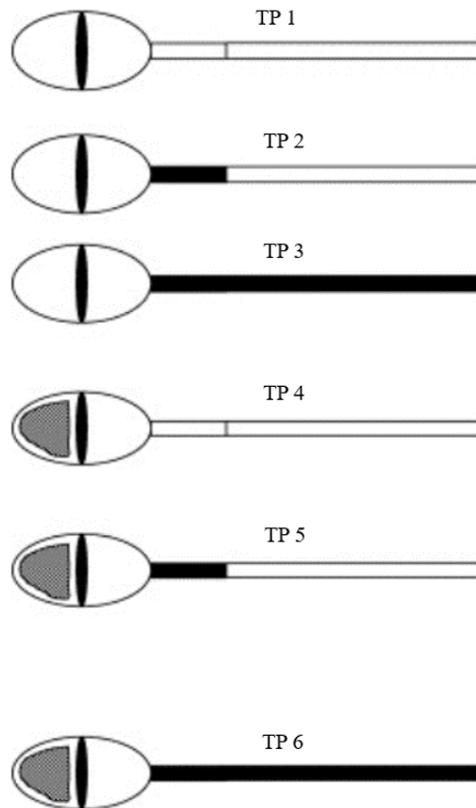


Abbildung 3: Färbemuster der Tyrosinphosphorylierung

TP 1 = nicht phosphoryliertes Spermium; TP 2 = tyrosinphosphoryliertes Spermium mit Fluoreszenz am Mittelstück; TP 3 = Fluoreszenz an Mittelstück und Spermischwanz, TP 4 = Fluoreszenz vom Spermienkopf; TP 5 = Fluoreszenz von Kopf und Mittelstück; TP 6 = Fluoreszenz zeigt sich am gesamten Spermium (38)

4. Statistik

Die Ergebnisse wurden mittels IBM SPSS statistics Version 24 (SPSS Ltd, Hong Kong) und mit Excel kalkuliert. Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Als nicht-parametrischer Test wurde der Wilcoxon-Test gewählt, da die Datensätze zusammenhängend sind. Die Ergebnisse werden, wenn im Text nicht anders deklariert, als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Ergebnisse wurden dann als signifikant gewertet, wenn der p-Wert 5 % unterschritten hat ($p < 0,05$).

5. Ergebnisse

5.1. Kinematische Daten

Die Ergebnisse der Qualitätsüberprüfung der Spermien ergaben eine durchschnittliche Spermienkonzentration von $227,1 \pm 178,5 \times 10^6/\text{ml}$. Es konnte in den Proben eine durchschnittliche Beweglichkeit von $90,0 \pm 8,2 \%$ nachgewiesen werden und eine durchschnittliche Vorwärtsbeweglichkeit von $85,3 \pm 12,8 \%$. Die Membranintegrität der Spermien lag bei $91,7 \pm 5,1 \%$ ($n = 16$). Die weiteren kinematischen Daten lagen allesamt im Bereich der Norm.

5.2. Chlortetrazyklin-Assay

Insgesamt 7 Spermienproben wurden mittels Chlortetrazyklinassay beurteilt. Das Färbemuster B, welches bereits kapazitierte Spermien darstellt, konnte zum Zeitpunkt der Beurteilung bei $54,2 \% \pm 17,1 \%$ der beurteilten Spermien nachgewiesen werden. Ein Prozentsatz von $33,6 \% \pm 9,8 \%$ der Spermien war zum Zeitpunkt der Beurteilung unkapazitiert (Färbemuster F) und $4,9 \% \pm 4,5 \%$ hatten bereits die Akrosomenreaktion (Färbemuster AR) durchlaufen.

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Färbemuster B	54,2 %	17,1 %	17,1 %
Färbemuster F	33,6 %	9,8 %	3,7 %
Färbemuster AR	4,9 %	4,5 %	1,7 %
Abgestorbene Zellen	7,19 %	-	-

Tabelle 1: Unterteilung der CTC-Färbemuster

5.3. Tyrosinphosphorylierung

In den Proben konnten insgesamt $18,7\% \pm 25,4\%$ tyrosinphosphorylierte Spermien festgestellt werden ($n = 8$). Innerhalb dieses Prozentsatzes wurden die verschiedenen Färbemuster aus Abbildung 3 (38) nachgewiesen. Das Färbemuster TP1 (nicht phosphorylierte Spermien) war zu finden bei $6,1\% \pm 7,2\%$ der untersuchten Spermien. Die genaue Aufteilung in die einzelnen Färbemuster ist zu finden in Abbildung 5.

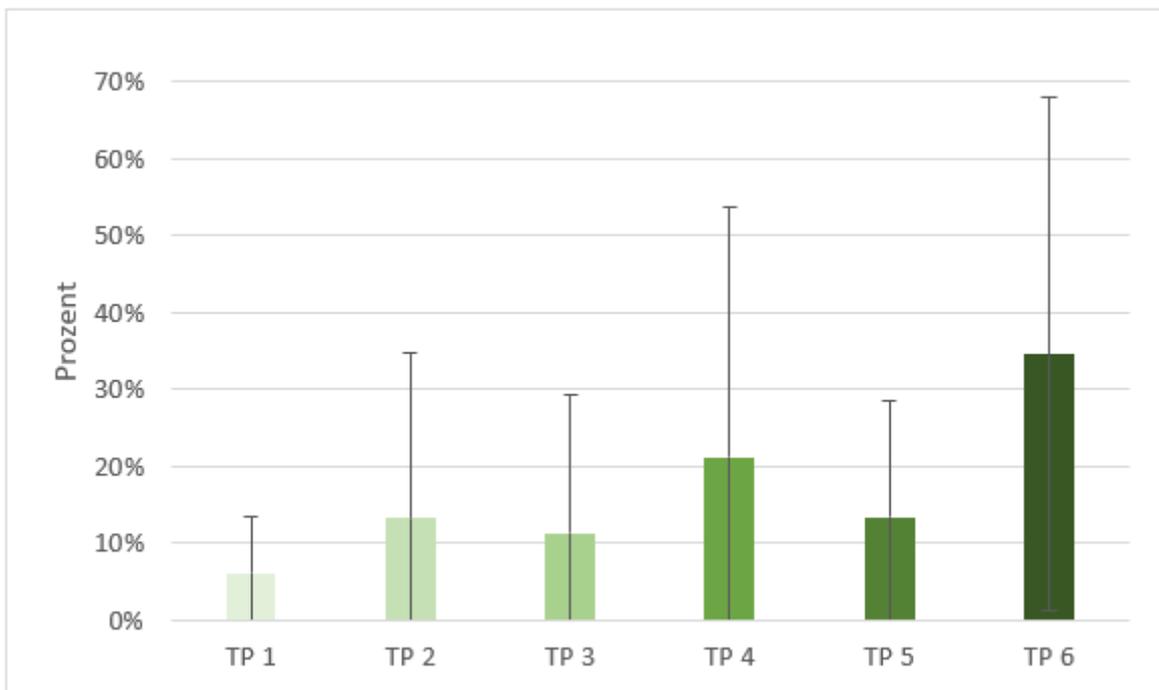


Abbildung 4: Prozentsätze der einzelnen Tyrosinphosphorylierungs-Färbemuster Datensätze gegeben in $x \pm$ Standardabweichung ($n=8$)

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden der Chlortetrazyklin-Assay und die Tyrosinphosphorylierung als Nachweismethoden für kapazitierte Spermien verglichen. Da jede der beiden Methoden unterschiedliche Vorgänge während der Kapazitation untersucht, gab es bereits im Vorhinein die Vermutung, dass die beiden Methoden nicht direkt vergleichbar sein werden.

Im direkten Vergleich zeigten zum Untersuchungszeitpunkt beim CTC-Assay $33,6 \% \pm 9,8 \%$ der untersuchten Spermien das Färbemuster F (nicht kapazitiert) und bei der Tyrosinphosphorylierung waren $6,1 \% \pm 2,5 \%$ der Proben nicht phosphoryliert. Zwischen diesen Zahlen herrscht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,028$).

Die Zahlen des Färbemusters AR beim CTC-Assay lassen sich mit vorangegangenen Forschungen vergleichen, bei ähnlichen Versuchen lag der Prozentsatz der Spermien, welche bereits eine Akrosomenreaktion durchgemacht hatten, nach einer einstündigen Inkubation ebenfalls bei etwa 5 %. (10, 12)

Der Anteil an kapazitierten Spermien wurde in dieser Forschung nach einer einstündigen Inkubationszeit erhoben. Die Ergebnisse zeigten eine Wahrscheinlichkeit von $p = 0,075$. Laut Visconti (2009) (3) unterteilen sich die Vorgänge während der Kapazitation in frühere und spätere Schritte. Der Einstrom von Calcium in das Spermium und der damit verbundene Anstieg an frei verfügbaren Ca^{2+} -Ionen in der Zelle zählen zu früheren Ereignissen während der Kapazitation. (3) Die Tyrosinphosphorylierung findet erst im späteren Verlauf der Kapazitation statt. Die ersten deutlichen Veränderungen sind nach etwa 30 Minuten wahrnehmbar, nach sechs Stunden zeigten sich bei Petrunkina et al. (2003) über 90 % der Spermien vollständig phosphoryliert. (12) Aufgrund dieser zeitlichen Unterschiede in den verschiedenen Abläufen ist es naheliegend, dass der prozentuelle Anteil an kapazitierten Spermien mit sich zu diesem Zeitpunkt der Kapazitation mit den beiden Methoden nicht vergleichen lässt. Das Ca^{2+} tritt zuerst in das Spermium ein, gemeinsam mit HCO_3^- . Diese beiden Moleküle stimulieren eine Adenylatcyclase, daraufhin steigt cAMP an und die Proteinkinase A wird aktiviert. Wie bereits erwähnt, fungiert diese nur als Enzym für Serin/Threonin, sorgt aber durch die Aktivierung von Tyrosinkinasen indirekt auch für die Phosphorylierung von Tyrosin. (4, 35) Betrachtet man diese Vorgänge, ist es nur logisch, dass zu diesem frühen Zeitpunkt der Inkubation beim CTC-Assay mehr Spermien als kapazitiert angesehen werden als bei der Tyrosinphosphorylierung.

Bis die Tyrosinphosphorylierung in Gang kommt, dauert es ungefähr 30 Minuten. Ca^{2+} strömt ab der Sekunde in das Spermium, in der die Kapazitation beginnt. Somit können mit dem CTC-Assay ab dem Beginn der Kapazitation Veränderungen erfasst werden, mit der Tyrosinphosphorylierung erst zeitverzögert.

Eine Limitation dieser Arbeit stellt sicherlich der kleine Stichprobenumfang dar (CTC-Assay $n = 7$, Tyrosinphosphorylierung $n = 8$). Ein Großteil der ermittelten Werte, vor allem bei den ermittelten Tyrosinphosphorylierungs-Färbemustern, weist eine hohe Standardabweichung auf. Eine größere Stichprobe würde vielleicht zu präziseren Ergebnissen mit einer geringeren Standardabweichung führen. Andererseits sollte man auch individuelle Unterschiede zwischen den Proben der verschiedenen Hunde im Hinterkopf behalten (12), da diese zu Ausreißern in den Ergebnissen führen und die Streuung der Standardabweichung beeinflussen können. Weitere Begrenzungen ergaben sich im Zuge der Auswertung der Daten: die Untersuchung der Spermien zu nur einem bestimmten Zeitpunkt zeigte auf, dass die so gewonnenen Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind.

Aus dieser Beschränkung ergibt sich jedoch eine mögliche Weiterentwicklung der Forschung: eine parallele Darstellung der beiden Methoden über einen längeren Zeitraum hinweg, um die Prozentsätze an kapazitierten Spermien kontinuierlich zu vergleichen. Hier wäre vor allem ein Vergleich der Werte am Ende des Kapazitationsvorganges von Interesse, um festzustellen, ob beide Methoden mit einer ähnlichen Prozentzahl an kapazitierten Spermien die Kapazitation abschließen.

7. Literaturverzeichnis

1. Florman HM, Fissore RA. Fertilization in Mammals. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier; 2015. p. 149–96.
2. Rathi R, Colenbrander B, Stout TAE, Bevers MM, Gadella BM. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 2003; 64(1):120–8.
3. Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(3):667–8.
4. Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(12):785–93.
5. Morales CR, Marat AL, Ni X, Yu Y, Oko R, Smith BT et al. ATP-binding cassette transporters ABCA1, ABCA7, and ABCG1 in mouse spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376(3):472–7.
6. Gadella BM, Tsai P-S, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6):473–80.
7. Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 1992; 46(5):779–85.
8. Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6):455–62.
9. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York, NY : Raven Press; 1994. p. 189–387.
10. Guérin P, Ferrer M, Fontbonne A, Bénigni L, Jacquet M, Ménézo Y. In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 1999; 52(4):617–28.
11. Naresh S, Atreja SK. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology* 2015; 70(3):211–6.

12. Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel A-R, Töpfer-Petersen E. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J Androl* 2003; 24(3):423–37.
13. Breves G, Diener M, Gäbel G, Bruckmaier RM, Gerstberger R, Fromm M et al. *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2022.
14. Toshimori K, Eddy EM. The Spermatozoon. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Elsevier; 2015. p. 99–148.
15. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59(1):7–11.
16. Martínez P, Morros A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci* 1996; 1:d103-17.
17. Gadella BM, Harrison RAP. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002; 67(1):340–50.
18. Harrison R, Miller N. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(2):220–8.
19. Palme N, Becher AC, Merkl M, Glösmann M, Aurich C, Schäfer-Somi S. Immunolocalization of the cholesterol transporters ABCA1 and ABCG1 in canine reproductive tract tissues and spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2014; 49(3):441–7.
20. Brouwers JF, Boerke A, Silva PFN, Garcia-Gil N, van Gestel RA, Helms JB et al. Mass spectrometric detection of cholesterol oxidation in bovine sperm. *Biol Reprod* 2011; 85(1):128–36.
21. Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. 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* 1999; 5(11):1017–26.
22. Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in

protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999; 214(2):429–43.

23. Calderón B, Huerta L, Casado ME, González-Casbas JM, Botella-Carretero JI, Martín-Hidalgo A. Morbid obesity-related changes in the expression of lipid receptors, transporters, and HSL in human sperm. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(4):777–86.

24. Schäfer-Somi S, Budik S. The ABCA1 blocking agent probucol decreases capacitation in ejaculated dog spermatozoa. *Acta Vet Scand* 2020; 62(1):2.

25. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:75.

26. Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev* 2006; 20(4):411–6.

27. Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2011; 123(1-2):40–7.

28. Fraser LR. The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(3):197–208.

29. Witte TS, Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2007; 102(3-4):181–93.

30. Liu DY, Clarke GN, Baker HWG. Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 2006; 21(4):1002–8.

31. Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 1998; 59(1):12–6.

32. Florman HM. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1994; 165(1):152–64.

33. Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 2001; 122(4):519–26.
34. Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 2006; 439(7077):737–40.
35. Visconti PE, Krapf D, La Vega-Beltrán JL de, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 2011; 13(3):395–405.
36. Navarro B, Kirichok Y, Chung J-J, Clapham DE. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6):607–13.
37. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6757–62.
38. Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel A-R, Töpfer-Petersen E. Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology* 2004; 61(9):1617–34.
39. Suarez SS, Varosi SM, Dai X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(10):4660–4.
40. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121(4):1129–37.
41. Matamoros-Volante A, Moreno-Irusta A, Torres-Rodriguez P, Giojalas L, Gervasi MG, Visconti PE et al. Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: the case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 2018; 24(2):64–73.
42. Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 1999; 57(3-4):199–215.

43. Martínez AIP. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:209–24.
44. Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *J Exp Zool* 1993; 265(5):599–603.
45. Fraser LR, Herod JE. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *J Reprod Fertil* 1990; 88(2):611–21.
46. Witte TS, Schäfer-Somi S, Kuchar A, Möstl E, Iben C, Aurich C. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; 110(3-4):293–305.
47. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 1995; 40(2):233–41.
48. Vaidya RA, Bedford JM, Glass RH, Morris JM. Evaluation of the removal of tetracycline fluorescence from spermatozoa as a test for capacitation in the rabbit. *J Reprod Fertil* 1969; 19(3):483–9.
49. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1995; 104(2):305–13.
50. Pérez LJ, Valcárcel A, las Heras MA de, Moses DF, Baldassarre H. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology* 1996; 45(5):1037–46.
51. DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993; 99(1):135–43.

52. Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol Reprod Dev* 1998; 49(1):48–57.
53. Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 2001; 65(3):784–92.
54. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56(3):707–19.

8. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: VERSCHIEDENE FÄRBEMUSTER NACH DURCHFÜHRUNG EINES CTC-ASSAYS.....	10
ABBILDUNG 2: VERSUCHSAUFBAU	12
ABBILDUNG 3: FÄRBEMUSTER DER TYROSINPHOSPHORYLIERUNG.....	16
ABBILDUNG 4: PROZENTSÄTZE DER EINZELNEN TYROSINPHOSPHORYLIERUNGS-FÄRBEMUSTER.....	18

9. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: UNTERTEILUNG DER CTC-FÄRBEMUSTER.....	17
--	----