

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität der Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung von Carboanhydrase II und IV
in murinen Spermatozoen**

Dissertation
zur Erlangung eines naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von:
Petra Melitta Wandernoth
geb. am: 23.01.1985 in Merzig

*Nur indem man das Unerreichbare anstrebt,
gelingt das Erreichbare.
Miguel de Unamuno*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 7

Tabellenverzeichnis 10

Abkürzungsverzeichnis 11

1 Zusammenfassung 13

2 Summary 14

3 Einleitung..... 15

3.1 Infertilität 15

3.2. Mikro- und makroskopischer Aufbau der männlichen Geschlechtsorgane..... 18

3.3 Morphologischer Aufbau eines Spermatozoons 26

3.4 Die Reifung der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt..... 28

3.5 Carboanhydrasen 31

3.6 Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit 35

4 Material 36

4.1 Geräte..... 36

4.2 Verbrauchsmaterialien 37

4.3 Chemikalien 37

4.4 Puffer und Standardlösungen..... 40

4.5 Antikörper..... 47

4.5.1 Primärantikörper 47

4.5.2 Sekundärantikörper..... 47

4.6	Kits/Assays	47
4.7	Primer	48
	4.7.1 CAII Primer	48
	4.7.2 CAIV Primer	48
4.8	Mauslinien	49
	4.8.1 Knockout-Tiere.....	49
	4.8.2 Wildtyp-Tiere	49
4.9	Software Versionen	49
5.	Methodik.....	51
5.1	Genotypisierung.....	51
	5.1.1 Gewebeverdau	51
	5.1.2 PCR.....	51
5.2	Murine Spermienpräparation	54
	5.2.1 Zellzählung	54
5.3	Immunoblotting	54
	5.3.1 Proteinaufreinigung und Konzentrationsbestimmung.....	54
	5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	56
	5.3.3 Western Blot.....	56
5.4	Histologie.....	57
	5.4.1 Anfertigen von silanisierten Objektträgern	57
	5.4.2 Bouin- und Formalinfixierung.....	57
	5.4.3 Methanolfixierung von Spermienausstrichen.....	58
	5.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	58
	5.4.5 Immunhistologie.....	59
	5.4.5.1 Immunzytochemische Färbung.....	59
	5.4.5.2 Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen.....	62
5.5	Quantitative Real Time-PCR.....	63
	5.5.1 RNA-Isolierung	64
	5.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	64
	5.5.3 Reverse Transkription.....	65
	5.5.4 qRT-PCR	65
5.6	Computer Assisted Sperm Analysis	68
5.7	CA Aktivitätsmessung	69
5.8	Schlagfrequenzanalyse	71

5.9	Phospholipase C Behandlung der Spermien	72
5.10	[pH] _i Messung.....	73
5.10.1	Kalibrierung.....	75
5.11	Charakterisierung der CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse	76
5.11.1	Generierung der CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse	76
5.11.2	Phänotypisierung der CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse	77
5.11.3	Bestimmung der Keimepithelhöhe im HE-gefärbten Hodenschnitt.....	77
5.11.4	Fertilitätsanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	78
5.12	Statistik	79
6	Ergebnisse.....	80
6.1	CAII Knockout-Mäuse	80
6.1.1	Molekularbiologische Analysen	80
6.1.1.1	CAII und CAIV RNA-Expressionsmuster im männlichen Genitaltrakt der Maus.....	80
6.1.1.2	CAII Proteinnachweis mittels Western Blot	82
6.1.1.3	Immunhistochemische CAII Proteinlokalisierung im Gewebe des männlichen Genitaltraktes und in isolierten Spermien	83
6.1.2	Funktionsanalytische Methoden	87
6.1.2.1	Reduzierte CA Gesamtaktivität in Spermien von CAII Knockout- Mäusen	87
6.1.2.2	Signifikante Unterschiede der CAII Knockout-Spermienpopulation in den CASA Parametern	88
6.1.2.3	Verzögerte HCO ₃ ⁻ und CO ₂ Antwort in Spermien von CAII Knockout- Mäusen	89
6.1.2.4	Der [pH] _{ex} hat keinen Einfluss auf die Grundschlagfrequenz muriner Spermien, aber auf die HCO ₃ ⁻ und CO ₂ induzierte Schlagfrequenzerhöhung.....	93
6.1.2.5	Der Einfluss des [pH] _{ex} auf den [pH] _i	95
6.1.2.6	Spermien von CAII Knockout-Mäusen weisen keinen veränderten [pH] _i auf	96
6.1.2.7	Wiederherstellung des basalen [pH] _i in CAII Knockout-Spermien nach intrazellulärer Alkalisierung.....	97
6.2	CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse.....	100
6.2.1	Phänotypisierung von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	100
6.2.2	Verringerte Keimepithelhöhe in CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen ..	104
6.2.3	Fertilitätsanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	106
6.2.4	Molekularbiologische Analysen	107
6.2.4.1	CAXIV Überexpression im Gewebe von CAII CAIV Doppelknockout- Mäusen	107
6.2.4.2	CAII und CAIV Proteinnachweis mittels Western Blot.....	109
6.2.4.3	Immunhistologische Doppelfärbung zur Proteinlokalisierung von CAII und CAIV im männlichen Genitaltrakt der Maus.....	110

6.2.4.4	CAII und CAIV Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung an murinen Spermien	113
6.2.5	Funktionsanalytische Methoden	115
6.2.5.1	CASA Analyse der Spermien von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	115
6.2.5.2	Schlagfrequenzanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien	116
6.2.5.2	CAII CAIV Doppelknockout-Spermien weisen keinen veränderten [pH] _i auf	119
5.2.5.3	Wiederherstellung des [pH] _i in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien nach intrazellulärer Alkalisierung	120
6.3	Biochemisch generierte CAII CAIV Doppelknockout-Spermien aus CAII Knockout-Spermien mittels PLC	122
6.3.1	Molekularbiologische Analysen	122
6.3.1.1	CAIV Proteinnachweis in biochemisch generierten CAIV Knockout-Spermien	122
6.3.1.2	Immunhistologischer CAIV Nachweis in phänotypischen CAIV Knockout-Spermien	123
6.3.2	Funktionsanalytische Methoden	124
6.3.2.1	Verminderte HCO ₃ ⁻ und CO ₂ Antwort in phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien	124
7	Diskussion	132
7.1	Verteilung der CAII und CAIV im männlichen Genitaltrakt der Maus und kompensatorische Mechanismen in den Knockout-Linien	132
7.2	CAII, ein im Hoden konstitutiv exprimiertes Protein, CAIV, ein im Nebenhoden transferiertes Protein in murinen Spermatozoen	137
7.3	Verminderte Spermienmotilität durch den CAII und CAIV Proteinverlust	138
7.4	CAII und CAIV sind Schlüsselenzyme im HCO ₃ ⁻ vermittelten Signalweg	140
8	Literaturverzeichnis	145
8	Anhang	159
8.1	Danksagung	159
8.2	Lebenslauf	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Ursachen ungewollter Kinderlosigkeit zwischen Mann und Frau (WHO 1987)	15
Abbildung 2: Darstellung des männlichen Genitaltraktes der Maus (modifiziert aus A color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse (Iwaki 2001)).....	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Spermatogenese (Holstein and Roosen-Runge 1981).....	20
Abbildung 4: Histologische Gliederung des murinen Nebenhodens.....	22
Abbildung 5: Grafische Darstellung und elektronenmikroskopische Abbildung eines humanen Spermatozoon (modifiziert nach Holstein and Roosen-Runge, Atlas of Human Spermatogenesis, 1981).....	27
Abbildung 6: Schematische Modelldarstellung des katalytischen Zentrums der CAII Struktur (Sly and Hu 1995).....	32
Abbildung 7: Schema der reversiblen Hydratisierung von CO_2 zu HCO_3^- durch die katalytische Reaktion der CAII (Sly and Hu 1995)	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung nach der Biotin-Avidin Methode	61
Abbildung 9: Modell der qRT-PCR Methode von Applied Biosystems® (Getting Started Guide, Applied Biosystems®).....	67
Abbildung 10: Hydrations- und Dehydrations-Schritte von CO_2 und HCO_3^-	70
Abbildung 11: Methode der Schlagfrequenzanalyse.....	72
Abbildung 12: Strukturformel von BCECF (Rink et al., 1982)	73
Abbildung 13: Exzitationsspektrum und Emissionsspektrum von BCECF bei gegebenen pH-Werten (Rink et al., 1982)	74
Abbildung 14: Verpaarungsschema mit den dazugehörigen Allelkombinationen zur Generierung von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	77
Abbildung 15: Standardisierte Analyse der Keimepithelhöhe in HE-gefärbten Hodenschnitten	78
Abbildung 16: Relative CAII Expression im männlichen Genitaltrakt der Maus.....	80
Abbildung 17: Relative CAIV Expression im männlichen Genitaltrakt der Maus	81
Abbildung 18: CAII Proteinnachweis im männlichen Genitaltrakt und in isolierten Spermien der Maus mittels Western Blot	83
Abbildung 19: Immunhistochemische Lokalisation von CAII in der Niere	84

Abbildung 20: Immunhistochemische Lokalisation von CAII im Hoden und Nebenhoden	85
Abbildung 21: Immunhistochemische Lokalisation von CAII im Ductus deferens	86
Abbildung 22: Immunhistochemische Lokalisation von CAII in Spermien	87
Abbildung 23: CAII Aktivität in murinen Spermien.....	88
Abbildung 24: Reduzierte Motilität der Spermien von CAII Knockout-Mäusen	89
Abbildung 25: Reduzierte Antwort auf HCO_3^- in CAII Knockout-Spermien	90
Abbildung 26: Verzögerter Schlagfrequenzanstieg in CAII Knockout-Spermien nach Stimulation mit HCO_3^-	91
Abbildung 27: Verzögerte CO_2 vermittelte Schlagfrequenzerhöhung in CAII Knockout-Spermien	92
Abbildung 28: Veränderung des $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ hat keinen Einfluss auf die Grunds Schlagfrequenz muriner Spermien.....	93
Abbildung 29: Ein saurer $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ wirkt inhibierend auf die HCO_3^- und CO_2 induzierte Schlagfrequenzerhöhung.....	95
Abbildung 30: Einfluss des $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ auf den $[\text{pH}]_{\text{i}}$ von Spermien.....	96
Abbildung 31: Kein veränderter $[\text{pH}]_{\text{i}}$ in Spermien von CAII Knockout-Mäusen	97
Abbildung 32: Keine Veränderung bei Wiederherstellung des basalen $[\text{pH}]_{\text{i}}$ in Spermien von CAII Knockout-Mäusen.....	98
Abbildung 33: Gewichtszunahme der CAII CAIV Doppelknockout-Nachkommen.....	101
Abbildung 34: Phänotypisierung von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	104
Abbildung 35: Morphologische Charakterisierung des Hodengewebes von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen	104
Abbildung 36: Verringerte Keimepithelhöhe in CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen ..	105
Abbildung 37: Relative CAXIV Expression im männlichen Genitaltrakt der Maus	108
Abbildung 38: CAII und CAIV Proteinnachweis im männlichen Genitaltrakt und in isolierten Spermien mittels Western Blot	110
Abbildung 39: Immunhistologische CAII CAIV Doppelfärbung der Niere	111
Abbildung 40: Immunhistologische CAII CAIV Doppelfärbung an Hoden- und Nebenhodengewebe	112
Abbildung 41: Immunhistologische CAII CAIV Doppelfärbung am Ductus deferens	113
Abbildung 42: CAII CAIV Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung an murinen Spermien..	114

Abbildung 43: CASA Analyse von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien.....	115
Abbildung 44: Reduzierte HCO_3^- Antwort in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ...	117
Abbildung 45: Schlagfrequenzanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien nach Stimulation mit HCO_3^- bzw. CO_2	118
Abbildung 46: Kein veränderter $[\text{pH}]_i$ in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien	119
Abbildung 47: Kein Unterschied bei der Wiederherstellung des basalen $[\text{pH}]_i$ in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien	121
Abbildung 48: CAIV Proteinnachweis in biochemisch generierten CAIV Knockout-Spermien	123
Abbildung 49: Immunhistologischer CAIV Nachweis in phänotypischen CAIV Knockout-Spermien	124
Abbildung 50: Verminderte Grund- und Maximalschlagfrequenz nach HCO_3^- Stimulation in phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien .	126
Abbildung 51: Schlagfrequenzanalysen von biochemischen und genetischen CAIV Knockout-Spermien während der Stimulation mit HCO_3^- und CO_2	128
Abbildung 52: Phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen den stärksten verzögerten HCO_3^- vermittelten Schlagfrequenzanstieg	130
Abbildung 53: Phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen den stärksten verzögerten Schlagfrequenzanstieg bei Stimulation mit CO_2	131
Abbildung 54: Modell der CAII und CAIV Aktivität in murinen Spermatozoen (modifiziert aus Wandernoth et al., 2010)	141
Abbildung 55: Schematische Darstellung der beteiligten Mechanismen am HCO_3^- induzierten Signalweg in Spermatozoen.....	143

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verhältnis der relativen CAIV mRNA-Mengen zwischen den Geweben von CAII Knockout- und Wildtyp-Mäusen.	82
Tabelle 2: Verpaarungsanalysen von Wildtyp-Weibchen mit CAII CAIV Doppelknockout-Männchen.....	107
Tabelle 3: Verpaarungsanalysen von Wildtyp-Männchen mit CAII CAIV Doppelknockout-Weibchen	107
Tabelle 4: Verhältnis der relativen CAXIV mRNA-Mengen zwischen den Geweben von einer CAII CAIV Doppelknockout-Maus und von Wildtyp-Mäusen.....	109

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
[pH] _i	intrazellulärer pH-Wert
AB	Applied Biosystem
AE	<i>anion exchanger</i> (Anionenaustauscher)
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein acetoxymethyl ester
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Carboanhydrase
CAII Knockout-Spermien	Spermien von CAII Knockout-Mäusen
CAII CAIV Knockout-Spermien	Spermien von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen
CAIV Knockout-Spermien	Spermien von CAIV Knockout-Mäusen
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CASA	<i>computer assisted sperm analysis</i>
CatSper	<i>cation channel of sperm</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis-transmembrane- conductance regulator</i>
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
Cy3	Indocarboxyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2- phenylindol
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
[HCO ₃ ⁻] _i	intrazelluläre Bikarbonatkonzentration
HE	Hämatoxylin Eosin <i>Horseradish Peroxidase</i>
HRP	(Meerrettichperoxidase)
HS	<i>high saline</i>
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

kDa	Kilo-Dalton
ko	Knockout
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBC	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Ko-Transporter
NEB	<i>New England Biolab</i>
NHE	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger (Austauscher)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
qRT-PCR	quantitative Real Time-PCR
rb	<i>rabbit</i> (Hase)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
sAC	<i>soluble adenylyl cyclase</i> (lösliche Adenylatcyclase)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunden
Spam	<i>sperm adhesion-molecule</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween
W	Wochen
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wildtyp-Spermien	Spermien von Wildtyp-Mäusen
wt	Wildtyp
ZChL	Zentrales Chemikalien Lager
-/-	Knockout
+/+	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Carboanhydrasen (CA) katalysieren die reversible Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- und regulieren damit die $[\text{HCO}_3^-]_i$ in einer Vielzahl von Zelltypen. HCO_3^- ist ein wichtiger Faktor für Spermatozoen und beeinflusst sowohl deren Reifung im männlichen als auch im weiblichen Genitaltrakt. Eine erhöhte $[\text{HCO}_3^-]$ im Seminalplasma und im Uterussekret induziert die Spermienaktivierung und führt zu einem signifikanten Anstieg der Schlagfrequenz. In dieser Arbeit wurde zum einen das Verteilungsmuster der CAII im männlichen Genitaltrakt der Maus, zum anderen der CAII Einfluss auf die Spermienmotilität und die Beteiligung in die frühe HCO_3^- vermittelte Spermienaktivierung analysiert.

CAII wurde mittels Immunoblot, Immunhistochemie und qRT-PCR in Epithelzellen aller Nebenhodenabschnitte nachgewiesen und deutet auf eine Beteiligung des Enzyms an der Ansäuerung des luminalen Sekrets hin. Weiterführende Expressionsanalysen zeigten einen Anstieg der CA Isoformen IV und XIV in verschiedenen Nebenhodenabschnitten der Knockout-Linien und lassen auf einen kompensatorischen Mechanismus schließen, der den Gendefekt ausgleicht.

In murinen Spermien wurde CAII im Hauptstück nachgewiesen und dessen Enzymaktivität massenspektrometrisch bestimmt. Spermien von CAII Knockout-Mäusen zeigten in der CASA Analyse eine signifikant reduzierte Motilität. Einzelzellanalysen bestätigten die Beteiligung der CAII an der HCO_3^- induzierten Schlagfrequenzerhöhung.

Da die Beteiligung der CAIV in den HCO_3^- vermittelten Signalweg bereits in Vorarbeiten bestätigt wurde, wurden im Folgenden CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse generiert. Doppelknockout-Nachkommen zeigten eine signifikante Körper- und Hodengewichtsreduktion sowie eine Subfertilität und eine verringerte Spermienmotilität.

Abschließend wurden Spermien von CAII Knockout-Mäusen mit Phospholipase C behandelt, um CAIV nachträglich abzuspalten und so phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Zellen zu generieren. Im Gegensatz zu den genetischen zeigten die biochemischen Doppelknockout-Spermien eine verringerte Grundschlagfrequenz und einen zusätzlich inhibierenden Effekt auf den HCO_3^- Stimulus. Die Ergebnisse deuten auf einen kompensatorischen Mechanismus hin, der den genetischen CAII CAIV Verlust ausgleicht, so dass der HCO_3^- vermittelte Signalweg weiterhin gewährleistet bleibt. Die Enzymaktivität der CAII und CAIV ist damit essentiell für die Motilität und Fertilität muriner Spermien.

2 Summary

Carbonic anhydrases catalyze the reversible hydration of CO_2 to HCO_3^- , thus regulating $[\text{HCO}_3^-]_i$ in numerous cell types. HCO_3^- is fundamental for spermatozoa and influences their maturation both in the male and female genital tract. An increase in $[\text{HCO}_3^-]$ in the seminal fluid and in the fluid of the oviduct induces sperm activity and leads to a significant increase in beat frequency. In this study we focused on both the distribution pattern of CAII in the male murine genital tract as well as on the influence of CAII on sperm motility and its involvement in early HCO_3^- -induced sperm activity.

The determination of the presence of CAII in the epithelial cells throughout the epididymal duct by means of immunoblotting, immunohistochemical techniques and qRT-PCR, leads to the conclusion that the enzyme is involved in the acidification of the luminal fluid.

Further expression analyses revealed up-regulation of the CA isoforms IV and XIV in different sections of epididymis of the knockout lines, indicating a compensatory mechanism for the gene defect.

CAII was located in the principal tail piece of murine sperm and its enzymal activity determined by means of mass spectrometry. CASA analysis revealed that motility is significantly decreased in sperm of CAII knockout mice. Single-cell measurements confirmed the participation of CAII in HCO_3^- -induced increase in beat frequency.

As an earlier study had already established the involvement of CAIV in the HCO_3^- -induced sperm pathway, we generated double-deficient CAII CAIV knockout mice. The double knockout offspring displayed a significant reduction in body and testes weight, subfertility as well as reduced sperm motility.

Finally, sperm of CAII knockout mice were treated with phospholipase C in order to cut off CAIV and thus generate phenotypical create CAII CAIV double knockout cells. In contrast to the genetically generated double knockout cells the biochemically generated ones displayed a reduced basic beat frequency and an additional inhibitory effect on HCO_3^- stimulus.

These results suggest a compensatory mechanism to counterbalance the CAII CAIV gene loss in order to uphold the essential HCO_3^- -induced pathway. CAII and CAIV enzyme activity are thus essential for the motility and fertility of murine sperm.

3 Einleitung

3.1 Infertilität

Als infertil bezeichnet man in der Medizin ein Paar, das trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr innerhalb eines Jahres keine Schwangerschaft vorweist. In Deutschland schätzt man die Infertilität auf über 15% bei Paaren im reproduktionsfähigen Alter (Bruckert 1991). Davon suchen 4-17% medizinische Betreuung auf, 3-4% aller Paare bleiben ungewollt kinderlos (Templeton and Drife 1992). Die Ursachenverteilung für Fertilisationsstörungen (Abbildung 1) liegt sowohl bei der Frau (39%) als auch beim Mann (20%) (WHO 1987). Gründe für männliche Infertilität können testikuläre Ursachen (Hodentumor, Varikozele), chromosomale und genetische Defekte (Klinefelter Syndrom, XX-Mann-Syndrom), Lageanomalien und Fehlbildungen der Genitalorgane (Kryptorchismus, bilaterale Aplasie des Vas deferens), Toxine und Medikamente (Röntgenbestrahlung, Immunsuppressiva), bakterielle und virale Infektionen (Mumps, Anti-Spermatozoen-Antikörper), Störungen des endokrinen Systems (Östrogenüberschuss, Testosteron-Defizit), Spermatozoenfunktionsstörungen (Immotilität, Azoospermie) oder Umweltgifte (Nikotin, Alkohol, Stress) sein. Bei 15% aller Paare bleibt die Ursache für die Kinderlosigkeit ungeklärt.

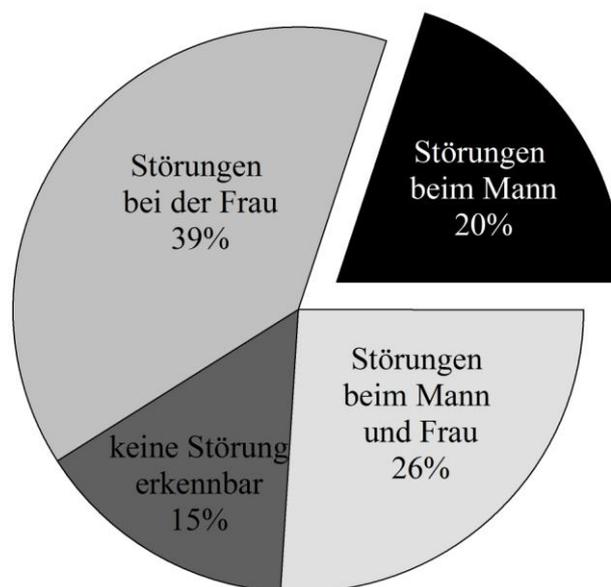


Abbildung 1: Verteilung der Ursachen ungewollter Kinderlosigkeit zwischen Mann und Frau (WHO 1987)

Etablierte Techniken zur Behandlung von Infertilität sind die Insemination, die konventionelle *In-vitro*-Fertilisation (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (Krause et al., 2011). Eine der am häufigsten angewandten Therapie bei Paaren mit idiopathischer Unfruchtbarkeit ist die Insemination (Nieschlag and Behre 2000). Bei der intrauterinen Insemination (IUI) werden aufbereitete Spermien vor der Ovulation mittels Katheter in den Uterus eingeführt. Die kostengünstige und stressfreie Therapie bringt konstante Schwangerschaftsraten hervor (Kremer 1979; Guzick et al., 1999; Goverde et al., 2000; Krause et al., 2011), führt jedoch nur bei geringer Subfertilität des Mannes zum Erfolg, da mindestens 1 Million bewegliche Spermatozoen nach Aufbereitung des Ejakulats zur Verfügung stehen müssen (Krause et al., 2011). Ebenfalls gibt es Kontraindikationen auf Seiten des weiblichen Geschlechts (z. B. tubare Sterilität), die die Kinderwunschbehandlung limitieren (Krause et al., 2011). Die IVF und die ICSI sind weiterführende Entwicklungen künstlicher Befruchtungsmethoden (Stephoe and Edwards 1978; Lanzendorf et al., 1988; Palermo et al., 1992). Während bei der klassischen IVF, durch das Zusammenbringen der isolierten Eizelle mit den aufbereiteten Spermien in einem Reagenzglas, die Befruchtung spontan abläuft, wird bei der ICSI ein einziges Spermium in eine reife Eizelle injiziert. Derzeit ist die ICSI Methode die bestmögliche Therapie bei männlicher Infertilität. Für die Durchführung ist nur eine geringe Spermatozoenzahl notwendig, deren Gewinnung sowohl testikulär, epididymal oder aus dem Ejakulat erfolgen kann. Eine Möglichkeit zur Fertilitätsprotektion, z. B. vor dem Beginn fertilitätsschädigender Therapien, besteht derzeit in der Kryokonservierung von Spermatozoen. Die klinisch etablierte Maßnahme zur Konservierung von Spermatozoen unter Erhalt ihrer Vitalität ist die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C (Bunge et al., 1954). Die kryokonservierten Spermatozoen können später für eine ICSI eingesetzt werden, dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen den eingefrorenen und frischen Spenderproben auf die Fertilisationsrate (Tournaye 1999, Wood 2002). Eine weitere Methode zur Fertilitäts-erhaltung, die sich noch in der experimentellen Entwicklung befindet, ist die stammzellbasierte Behandlungsstrategie (Schlatt et al., 2009). Die isolierten testikulären Stammzellen können ebenfalls kryokonserviert und im Folgenden für die Keimzelltransplantation (Brinster u. Zimmermann 1994), die testikuläre Gewebetransplantation (Paris u. Schlatt 2007) und für die *in vitro* Generierung der Spermatogenese (Ghobara 2010) eingesetzt werden.

Durch die intensive Hormonbehandlung und die operativen Eingriffe, die zur Eizell- und Spermengewinnung durchgeführt werden, sind diese reproduktionsmedizinischen

Strategien risikoreich und können unter anderem zu vaginalen Blutungen, pelvinen Entzündungen und zum ovariellen Hyperstimulationssyndrom führen (Nieschlag and Behre 2000; Krause et al., 2011). Die ICSI beschränkt sich ausschließlich auf die Befruchtung der Eizelle. Die Entwicklungsfähigkeit der befruchteten Eizelle und das Herbeiführen einer Schwangerschaft sind von weiteren Faktoren, im Besonderen von der Fertilität des weiblichen Partners abhängig. Auch stößt die ICSI zur Behandlung männlicher Infertilität an ihre Grenzen. Spermienfunktionsstörungen wie z. B. Azoospermie (keine Spermatozoen im Ejakulat), Globozoospermie (kugelförmige Spermatozoen, ohne ausgebildetes Akrosom) und Nekrozoospermie (unbewegliche Spermatozoen im Ejakulat) zeigen sich ungeeignet und vermindern die Erfolgchancen der ICSI (Nieschlag and Behre 2000). Unter diesen Gesichtspunkten ist das Verständnis für die molekularen und physiologischen Grundlagen der Fertilisation essentiell, um die Reproduktionstechniken zu verbessern und weiterzuentwickeln. Dazu zählen nicht nur das Verständnis der eigentlichen Gametenverschmelzung, sondern auch die Prozesse der Gametenbildung und deren Reifung im Genitalorgan. Für Spermatozoen ist insbesondere die posttestikuläre Reifung im Nebenhoden und eine weiterführende Reifung im weiblichen Genitaltrakt, die sog. Kapazitation, Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Penetration der Eizelle (Visconti et al., 1998). Die hierbei ablaufenden Signalwege und beteiligten Komponenten sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Schlüsselkomponente für die Spermienreifung und die Kapazitation ist Bikarbonat (HCO_3^-) (Carr and Acott 1984; Wennemuth 2004; Liu et al., 2012). Die Säure-Base-Homöostase von CO_2 und HCO_3^- wird in vielen Zellen durch die Enzymfamilie der Carboanhydrasen (CA) beeinflusst, da CA die reversible Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- katalysieren (Breton 2001; Liu et al., 2012). Erste Hinweise für die Beteiligung von CA am HCO_3^- Haushalt von murinen Spermatozoen liefern Genexpressionsanalysen (Johnston et al., 2005; Small et al., 2005), die zeigen, dass die CAII Isoform verstärkt im Nebenhoden und in differenzierenden Keimzellen mit dem höchsten Expressionsniveau im Pubertätsstadium exprimiert wird (http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85283, http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85293). Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die Bedeutung und Funktion der CAII im murinen Reproduktionstrakt und in Spermatozoen untersucht werden.

3.2. Mikro- und makroskopischer Aufbau der männlichen Geschlechtsorgane

Die Geschlechtsorgane dienen zur Fortpflanzung und werden in äußere Genitalorgane, die zur Ausübung des Geschlechtsverkehrs dienen, und in innere Reproduktionsorgane gegliedert. In Abbildung 2 ist der vollständige Aufbau des männlichen Genitaltrakts der Maus dargestellt (Storch and Welsch 2002; Schiebler and Korf 2007). Zu den männlichen Geschlechtsorganen gehören die paarigen Hoden, Nebenhoden, Samenwege, akzessorischen Geschlechtsdrüsen und das äußere Genital. Die paarige Bläschendrüse und die Prostata zählen zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Bei der Maus werden die beiden vorderen Prostatalappen häufig auch als Koagulationsdrüsen bezeichnet. Als Anhangsdrüsen der Urethra ist die paarige Cowper-Drüse zu nennen.

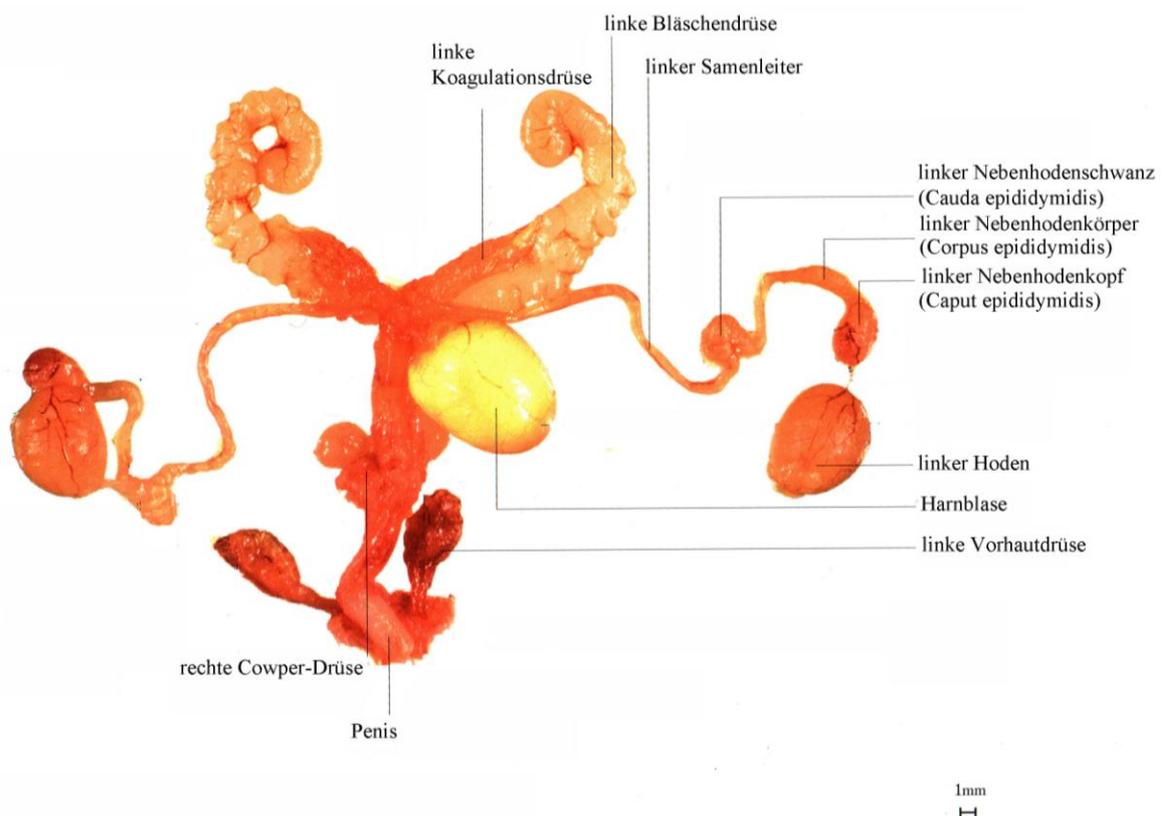


Abbildung 2: Darstellung des männlichen Genitaltraktes der Maus (modifiziert aus A color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse (Iwaki 2001))

Der Hoden hat eine pflaumenförmige Gestalt und wird von einer derben Bindegewebshülle, der sog. Tunica albuginea, umgeben. Die von der Kapsel einziehenden Bindegewebsstraßen (Septula testis) unterteilen das Parenchym in Hodenläppchen (Lobuli testis). Im Bindegewebe sind Nerven und Gefäße eingelagert, die für die Versorgung des Parenchyms verantwortlich sind. Die Lobuli testis enthalten einen oder mehrere stark gewundene Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti). Die Tubuli seminiferi contorti werden von Keimepithel ausgekleidet (Schiebler and Korf 2007). Es werden hier zwei

Zellpopulationen unterschieden. Die Keimzellen, die in den verschiedenen Keimzellstadien der Spermatogenese vorliegen, und die postmitotischen somatischen Sertoli-Zellen. Die hochprismatischen Sertoli-Zellen durchziehen radiär die gesamte Höhe des Keimepithels. Sie bilden ein stabilisierendes Stützgerüst für die wandernden Keimzellen. Neben ihrer Stützfunktion werden ihnen sezernierende und phagozytierende Fähigkeiten zur Hilfe der Keimzeldifferenzierung zugesprochen. Eine weitere wichtige Funktion der Sertoli Zellen besteht in ihrer Beteiligung an der Bildung der Blut-Hoden-Schranke (Krause et al., 2011; Wennemuth 2012). Jedes Hodenkanälchen ist von einer Basalmembran umgeben und durch eine angrenzende Lamina propria vom umliegenden interstitiellen Bindegewebe abgegrenzt. Die in der Lamina propria integrierten Myofibroblasten stellen kontraktile Elemente dar, die durch ihre rhythmische Kontraktion für den Transport der Spermatozoen verantwortlich sind (Krause et al., 2011). Im interstitiellen Bindegewebe sind Leydig-Zellen lokalisiert. Sie übernehmen mit ihrer endokrinen Funktion als Testosteronlieferanten regulatorische Aufgaben im Hoden und steuern die Spermatogenese (Lüllmann-Rauch 2009; Wennemuth 2012).

Die Spermatogenese beschreibt die Bildung von männlichen Keimzellen. Dieser Prozess kann in zwei Phasen, Spermatozytogenese und Spermiogenese, eingeteilt werden (Lüllmann-Rauch 2009). Während der Spermatozytogenese kommt es zur klonalen Vermehrung und Differenzierung der Keimzellen. Dabei durchlaufen die Zellen verschiedene Reifestadien. Im Verlauf der Spermatogenese wandern die sich entwickelten Keimzellen vom basalen zum adluminalen Kompartiment der Hodenkanälchen. Die Spermatogonien A sind die Ausgangszellen und liegen der Basalmembran der Hodentubuli an. Durch mitotische Teilung, die in der Pubertät einsetzt, wird jeweils eine Tochterzelle zur Spermatogonie B, die zu Spermatozyten I übergeht, während die zweite Spermatogonie Typ A als Stammzellreservoir zurückbleibt. Die primären Spermatozyten I werden durch eine erste Meiose zu sekundären Spermatozyten (II), die damit nur noch einen haploiden Chromosomensatz mit replizierten Chromosomen besitzen (Junqueira et al., 2005; Lüllmann-Rauch 2009). In der zweiten Meiose trennen sich die Schwesterchromatiden und es entstehen die Spermatozyten. Die Spermatozyten haben nun einen haploiden Chromosomensatz mit nicht replizierten Chromosomen. Aus einer diploiden Keimzelle entwickeln sich durch die beiden meiotischen Teilungen somit vier haploide Gameten mit rekombinanten Chromosomen (Junqueira et al., 2005; Lüllmann-Rauch 2009). Die adluminal lokalisierten Spermatozyten unterliegen im Folgenden der Spermiogenese, der zweiten Phase der Spermatogenese. Die dabei ablaufenden Prozesse sind miteinander

gekoppelt und beschreiben die Zytodifferenzierung und Umwandlung der Spermatiden zu Spermatozoen. Es kommt zur Kernkondensation, zur Ausbildung des Akrosoms aus dem spezialisierten Golgi-Apparat, zur Längsstreckung der Spermatiden und zum Auswachsen des Flagellums, zur spiralförmigen Anordnung der Mitochondrien, zur Abstoßung des Zytoplasmas als Restkörper und damit zur Zytoplasmareduktion (Abbildung 3) (Lüllmann-Rauch 2009; Krause et al., 2011). Die Spermatozoen werden anschließend in das Lumen der Hodenkanälchen abgegeben.

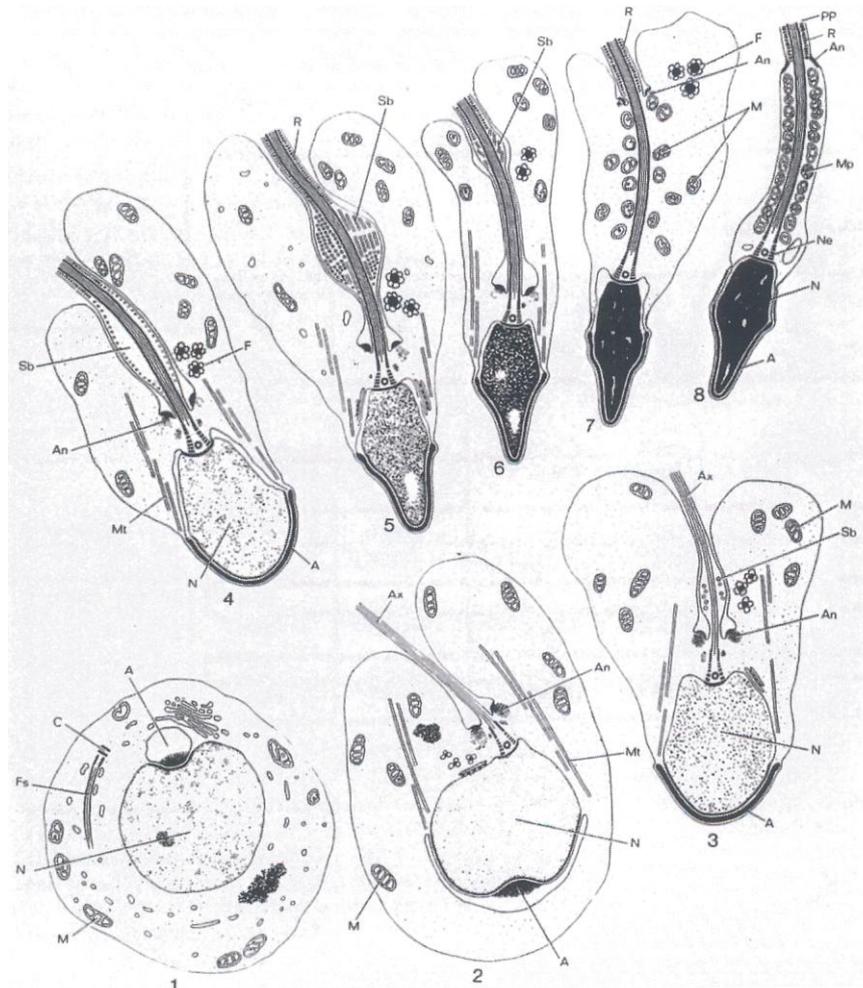


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Spermatogenese (Holstein and Roosen-Runge 1981)

1. Golgi-Phase, 2-4 Kappenphase, 5-6 Akrosomphase, 7-8 Reifungsphase. A= Akrosom, An= Anulus, Ax= Axonem, C= Zentriol, F = blumenähnliche Struktur, Fs= flagellare Struktur, M= Mitochondrien, Mp= Mittelstück, Mt= Mikrotubulusmanschette, Ne= Hals, N= Nukleus, PP= Hauptstück, R = Ringfasern, Sb= spindelförmiger Körper

Die Dauer der Spermiogenese beträgt beim Mensch 74 Tage und ist ein kontinuierlicher Prozess (Krause et al., 2011). Eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche ablaufende Spermatogenese ist der Hodenabstieg (Descensus testis). Beim Menschen erfolgt die Auslagerung des Hodens aus der Bauchhöhle im dritten Fetalmonat. Im Gegensatz dazu ist

der Hodenabstieg bei Nagetieren erst in der Pubertät. Des Weiteren findet im Mausorganismus der Ablauf in spermatogenetischen Wellen statt und dauert ca. 35 Tage (Storch and Welsch 2002; Schiebler and Korf 2007).

Die Tubuli seminiferi contorti des Hodens konfluieren im Rete testis zu mehreren Ductuli efferentes. Die Ductuli efferentes stellen die Verbindung zum sich anschließenden Nebenhodengang (Ductus epididymidis) dar (Schiebler and Korf 2007). Der gerichtete Transport der noch immotilen, aber morphologisch ausdifferenzierten Spermien wird durch die wellenartige Kontraktion der Myofibroblasten und den apikal lokalisierten Kinozilien der Epithelzellen der Ductuli efferentes gewährleistet (Wennemuth 2012). Der vielfach gewundene Ductus epididymidis bildet den Nebenhoden (Epididymis), welcher sich makroskopisch in ein Caput epididymidis (Nebenhodenkopf), ein Corpus epididymidis (Nebenhodenkörper) und eine Cauda epididymidis (Nebenhodenschwanz) gliedert. Der Nebenhodenkopf sitzt auf dem oberen Pol des Hodens, der Nebenhodenkörper und der Nebenhodenschwanz liegen dem Hoden dorsal an (Schiebler and Korf 2007). Mikroskopisch besteht der Nebenhodengang aus einem zweireihigen Epithel (Abbildung 4). Das Epithel der unterschiedlichen Nebenhodenabschnitte unterscheidet sich jedoch im Aufbau hinsichtlich der Zellzusammensetzung. Während der Durchmesser des Lumens zunimmt, flacht das Epithel nach distal ab. Des Weiteren findet eine Verdichtung der luminal lokalisierten Spermien entlang des Nebenhodengangs statt. Umgeben ist der Ductus epididymidis von einer Muskelschicht, die ebenfalls im Verlauf variiert. Im Caput und Corpus epididymidis sind Myofibroblasten durch Spontanaktivität für den Weitertransport des luminalen Inhalts verantwortlich. Die Cauda epididymidis wird durch glatte Muskelzellen begleitet, die nur nach neuronaler Stimulation kontrahieren und eine Rolle während der Ejakulation spielen (Schiebler and Korf 2007; Lüllmann-Rauch 2009). Der vorherrschende Zelltyp im Epithelverband sind die sog. Hauptzellen. Apikal sind die Hauptzellen mit langen Mikrovilli (Stereozilien) besetzt, welche die resorptive und sekretorische Aktivität des Epithels unterstützen. Ein weiterer Zelltyp sind die linsenförmigen Basalzellen, die der Basalmembran direkt aufsitzen. Sie dienen dem Zellersatz und der Ernährung der Hauptzellen. Der dritte vorkommende Zelltyp ist die sog. helle Zelle (Clear Cells). Diese Zellen zeichnen sich durch ein nahezu transparentes Zytoplasma aus und sind schwer von den Hauptzellen zu unterscheiden. Ihr Vorkommen nimmt nach distal zu (Junqueira et al., 2005; Turner 2008; Wennemuth 2012).

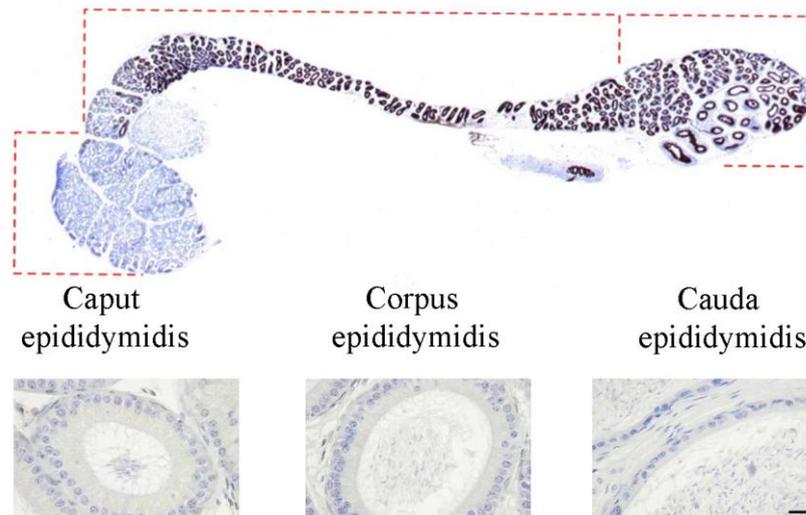


Abbildung 4: Histologische Gliederung des murinen Nebenhodens
 Lichtmikroskopische Aufnahmen eines murinen Nebenhodens nach Hämatoxylin Färbung nach Ehrlich. Die 5-fach vergrößerte Aufnahme der verschiedenen Nebenhodenabschnitte Caput, Corpus, Cauda epididymidis zeigen das variierende zweireihige Epithel. Bar = 20 µm.

Die Funktion der Epithelzellen (Hauptzellen, helle Zellen) ist vielseitig. Sie bestimmen mit ihrer resorptiven und sekretorischen Tätigkeit die Funktion des Nebenhodens, die sowohl den Transport, die Konzentrierung, die Speicherung und die Reifung der Spermien beinhaltet (Krause et al., 2011).

Der Reifungsprozess posttestikulären Spermatozoen, der während ihrer Passage durch den Nebenhodengang stattfindet, ist ein noch nicht vollständig aufgeklärter Mechanismus, bei dem extrinsisch wirkende Faktoren komplexe biochemische Modifikationen innerhalb des reifenden Spermiums hervorrufen. Bekannt ist die Relokalisation von verschiedenen Plasmaproteinen (z. B. Basigin, Fertilin). Außer der Proteinumorientierung finden auch Proteinmodifikationen von membrangebundenen Glykoproteinen statt. Diese Oberflächenmodifikationen werden von Proteasen, Transferasen und Glycosidasen, die im epididymalen Sekret lokalisiert sind, prozessiert (Phelps et al., 1990; Hunnicutt et al., 1997; Saxena et al., 2002). Als weiterer Reifungsprozess wird auch die Aufnahme von Proteinen in die Spermienmembran aus dem Nebenhodensekret während der Passage durch den Nebenhoden beschrieben. Ein solcher epididymaler Transfer, der durch sog. Epididymosomen vollzogen wird (Sullivan et al., 2007; Oh et al., 2009), wurde bereits für das mausspezifische Spam1-Protein (Deng et al., 2000; Zhang and Martin-Deleon 2003) und für die Carboanhydrase IV (Ekstedt et al., 2004; Wandernoth et al., 2010) nachgewiesen.

Humane Spermatozoen verweilen zwischen 10-14 Tage im Nebenhoden, um den posttestikulären Reifungsprozess abzuschließen (Wennemuth 2012). Das Nebenhodensekret spielt bei allen Reifungsprozessen eine entscheidende Rolle. Es wird in seiner Zusammensetzung vom Epithel reguliert und unterliegt einer ständigen Veränderung entlang des Nebenhodengangs (Hinton and Palladino 1995; Johnston et al., 2005; Shum et al., 2009).

Ebenso wird die SpermienSpeicherung und Konzentrierung vom Nebenhoden reguliert. Die Speicherung im Nebenhodenschwanz und zum Teil im Samenleiter der inaktiven, aber motilen Spermien wird durch verschiedene Faktoren unterstützt. Der intraluminale pH-Wert und die $[\text{HCO}_3^-]$ sind wichtige Faktoren für die Spermienmotilität. Ein inaktiver Zustand der Spermien wird durch ein saures Milieu (pH 5,5–6,8) und eine geringe $[\text{HCO}_3^-]$ im Sekret gewährleistet (Acott and Carr 1984; Okamura et al., 1985). Die Ansäuerung wird durch apikal lokalisierte Protonenpumpen (ATPasen, V-ATPasen) in der Membran der hellen Zellen erreicht. Außerdem sind Na^+/H^+ Austauschere an der Ansäuerung des Nebenhodensekrets beteiligt, deren Expression nach distal zunimmt (Breton et al., 1996; Bagnis et al., 2001; Kaunisto and Rajaniemi 2002; Shum et al., 2009). Die basolateral im Epithel nachgewiesenen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (z. B. AE2) und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Ko-Transporter sind in die HCO_3^- Homöostase involviert (Jensen et al., 1999; Jensen et al., 1999). Des Weiteren wird den CA eine Funktion bei der Regulation der $[\text{HCO}_3^-]$ im Sekret zugesprochen (Au and Wong 1980; Kaunisto et al., 1995).

Das vorherrschende saure intraluminale Sekret beeinflusst den intrazellulären pH-Wert ($[\text{pH}]_i$) der Spermien und damit die Motilität (Babcock et al., 1983), da nicht nur das Sekret, sondern auch der $[\text{pH}]_i$ epididymaler Spermien mit einem Wert von etwa 6,0 im sauren Bereich liegt. Verantwortlich dafür ist zum einen der Einfluss des sauren extrazellulären Milieus (Gatti et al., 1993; Hamamah and Gatti 1998), zum anderen Na^+/H^+ und Na^+ abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (Tajima and Okamura 1990; Zeng et al., 1996; Garcia and Meizel 1999) in der Spermienmembran. Der saure $[\text{pH}]_i$ und der geringe $[\text{HCO}_3^-]_i$ unterstützen den inaktiven Zustand der Spermien im Nebenhoden.

Ein weiterer inhibierender Einfluss auf die Spermienmotilität wird durch die hohe Viskosität des Sekrets im Nebenhodenschwanz erreicht (Usselman and Cone 1983; Carr et al., 1985). Dem CFTR Kanal wird eine Rolle bei dem Prozess der Spermienkonzentrierung zugesprochen. Zusammen mit dem basal lokalisierten Na^+ Transporter entsteht ein osmotischer Gradient, die treibende Kraft für die Wasserrückresorption über Aquaporin-Kanäle aus dem Lumen (Pastor-Soler et al., 2001; Turner 2008). Die im

Nebenhodenschwanz gespeicherten inaktiven Spermien werden während der Ejakulation in den sich anschließenden Samenleiter (Ductus deferens) befördert.

Der humane Ductus deferens ist ca. 40 cm lang und stellt die Verbindung zwischen Nebenhoden und Harnröhre (Urethra) dar. Er zieht nach kranial durch den Leistenkanal ins kleine Becken und gelangt im Bauchraum von lateral an die Harnblase heran. Zuerst nimmt der Ductus deferens das Sekret der Bläschendrüse und Koagulationsdrüse auf. Anschließend mündet er in die Prostata und wird ab hier als Ductus ejaculatorius bezeichnet (Schiebler and Korf 2007). Im weiteren Verlauf nimmt der Ductus ejaculatorius das Sekret der Cowper-Drüsen und den Anhangsdrüsen auf. Es folgt die Eröffnung in die Urethra. Mikroskopisch ist der Samenleiter durch seine dreischichtige spiralförmig angeordnete dicke Muskelschicht und ein enges Lumen charakterisiert. Das Lumen wird von einem zweireihigen prismatischen Epithel ausgekleidet, wobei die apikalen Mikrovilli kürzer sind als im Ductus epididymidis (Wennemuth 2012). Bei neuronaler Stimulation kommt es zur Verkürzung und Verengung des Samenleiters und der entstehende Innendruck führt zu Ejakulation (Krause et al., 2011).

Wie oben beschrieben münden die akzessorischen Geschlechtsdrüsen über einen Ausführungsgang in den Samenleiter. Sie geben ihr Sekret während der Ejakulation ab und machen den Hauptteil des Ejakulats aus.

Die Bläschendrüse, die am Harnblasengrund lokalisiert und fixiert ist, wird von einem einschichtigen, teils auch zwei- bis mehrreihigem Epithel ausgekleidet. Die Sekretion erfolgt sowohl apokrin als auch ekkrin. Das Sekret wird durch die Kontraktion des umgebenden Muskelmantels weitertransportiert. Die Drüsenfunktion ist stark androgenabhängig. Das alkalische Sekret macht etwa 60% des Ejakulatvolumens aus und beinhaltet Fruktose, Prostaglandine, Glutathion und Semenogelin (Schiebler and Korf 2007; Krause et al., 2011). Der Inhibitor Semenogelin ist ein wichtiger Faktor bei der Koagulation des Ejakulats und hemmt die progressive Motilität der Spermien (Robert and Gagnon 1996; Mitra et al., 2010).

Die Prostata ist eine tubuloalveoläre exokrine Drüse. Die humane Prostata schmiegt sich von kaudal an den Fundus der Harnblase und umgreift die Harnröhre und die beiden Ductus ejaculatorii. Die Ausführungsgänge der DrüsenSchläuche münden über einen Ausführungsgang in die Urethra (Schiebler and Korf 2007). Die hochprismatischen Zellen bilden ein ein- bis zweireihiges Epithel. Die vorherrschenden Zelltypen, sind die sekretorischen Hauptzellen, deren Aktivität androgenabhängig ist, die Basalzellen, die als Vorläuferzellen fungieren und neuroendokrine Zelle, die unter anderem Serotonin und

Calcitonin sezernieren. Eingebettet ist das Drüsenepithel in ein Stroma aus Fibrozyten und glatten Muskelzellen (Lüllmann-Rauch 2009; Wennemuth 2012). Das Sekret der Prostata macht etwa 15-30% des Seminalplasmas aus und enthält proteolytische Enzyme (z. B. saure Phosphatase), Proteasen (z. B. PSA), niedermolekulare Proteine (z. B. Spermin) und Zinkionen (Krause et al., 2011). Die von der Prostata sezernierten Zinkionen hemmen unter anderem eine vorzeitige Spermienaktivierung durch Inhibition des humanen Protonenkanals Hv1 in der Spermienmembran. Erst durch die Verdünnung des Seminalplasmas mit der weiblichen Genitalflüssigkeit gewinnt der Hv1 an Aktivität und reguliert den $[pH]_i$ der Spermienzelle (Lishko et al., 2010). Das im Seminalplasma enthaltene prostataspezifische Antigen (PSA) hydrolysiert Semenogelin. Etwa 30 Minuten nach der proteolytischen Aktivität von PSA kommt es zur Verflüssigung des Ejakulats und zur Motilitätszunahme der enthaltenen Spermien (Krause et al., 2011). Die murine Prostata liegt der Bläschendrüse kaudal an.

Die paarige Cowper-Drüse ist im Diaphragma urogenitale lokalisiert. Das tubuloazinöse Drüsengewebe mündet über einen Hauptausführungsgang in den distalen Abschnitt der Urethra. Das zähflüssige Sekret wird vor der Ejakulation abgegeben und überzieht die Urethra mit einem Schleimfilm. Die enthaltenen Glykoproteine verhindern eine vorzeitige Koagulation des Ejakulats in der Urethra (Lüllmann-Rauch 2009; Krause et al., 2011).

Die Sekrete aus Bläschendrüse, Prostata und Cowper-Drüse bilden zusammen das Ejakulat, das bei der Ejakulation den männlichen Keimzellen beige setzt und ausgestoßen wird. Das Volumen dieses schwach alkalischen Sekrets beträgt beim Mann ca. 1,5 ml, wobei der zelluläre Anteil nur 5% beträgt. Zusammenfassend wirken die Sekrete der verschiedenen Geschlechtsdrüsen auf die Bewegungsfähigkeit der Spermien, die innere Oberfläche der Urethra sowie auf den weiblichen Genitaltrakt (Lüllmann-Rauch 2009; Krause et al., 2011). Dabei können die Sekretkomponenten auf direktem Weg mit den Spermatozoen interagieren oder auf indirektem Weg, indem sie das umgebende Milieu verändern. Die vollständige Zusammensetzung und komplexe Wirkungsweise des Ejakulats mit all seinen Proteinen, Ionen und Metaboliten ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Owen and Katz 2005).

3.3 Morphologischer Aufbau eines Spermatozoons

Das morphologisch ausdifferenzierte, motile Spermatozoon gliedert sich in die zwei Hauptelemente Kopf und Flagellum (Abbildung 5) und ist ca. 60 μm lang (Krause et al., 2011). Der Spermienkopf besteht aus dem Kern mit dem kondensierten Chromatin und dem kappenartig aufliegendem Akrosom. Das Akrosom ist ein Golgi-Derivat und beinhaltet hydrolysierende Enzyme, die für die spätere Penetration der Eizelle wichtig sind. Das Flagellum dient zur Fortbewegung der polarisierten Zelle und wird nochmal in Mittel-, Haupt- und Endstück untergliedert (Krause et al., 2011; Wennemuth 2012). Das zentrale Axonema, das seinen Ursprung am Zentriol hat, durchzieht alle drei Teilbereiche des Flagellums. Es besteht aus einer Mikrotubulstruktur, welche den typischen $9 \times 2 + 2$ Aufbau aufweist. Die quervernetzten Dyneinarme stellen durch ATP Hydrolyse die notwendige Energie für die Gleitbewegung der Filamente bereit (Krause et al., 2011). Gleichzeitig sind die Dyneinarme an der Regulation der Bewegung beteiligt (Brokaw and Kamiya 1987). Der komplexe Schlagmechanismus und das daraus resultierende Schlagmuster der Spermienzelle wird unter anderem durch den $[\text{pH}]_i$ und den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beeinflusst (Brokaw 1987; Lindemann and Goltz 1988). Im Mittelstück des Spermiumschwanzes sind um das Axonema herum zirkulär angeordnete Mitochondrien lokalisiert, die die notwendige Energie für die Bewegung liefern. Im Hauptstück grenzen spiralförmig angeordnete Ringfasern an den zentralen Achsenfaden und enden etwa 5 μm vor dem Ende des Spermiumschwanzes. Ab diesem Punkt beginnt das Endstück (Holstein and Roosen-Runge 1981; Schiebler and Korf 2007; Krause et al., 2011; Wennemuth 2012). Eine weitere Struktur ist der sog. Anulus, dessen Funktion noch fraglich ist. Er trennt Mittel- und Hauptstück voneinander und könnte möglicherweise die freie Diffusion von Plasmaproteinen zwischen den beiden Flagellendomänen verhindern (Kwitny et al., 2010). Ein zytosolisches Fasergerüst verknüpft die Plasmamembranstrukturen mit den unterliegenden zellulären Strukturen und verleiht dem Flagellum zum einen seine Festigkeit, zum anderen findet durch die Verankerung eine strikte Kompartimentalisierung der Proteine innerhalb des Spermiumschwanzes statt. Dem Fasergerüst wird somit eine regulatorische Funktion in Spermienreifung und Motilität zugesprochen (Eddy et al., 2003). Das zytoplasmatische Droplet beschreibt eine Region, in der die Vernetzung zwischen Plasmaproteinen und intrazellulären Strukturen nur spärlich ausgebildet ist. Die Anhäufung des Zytoplasmas erscheint als blasenförmige Anschwellung. In humanen Spermatozoen grenzt diese Region an den Spermienkopf, in murinen Spermien ist das Droplet zwischen Mittel- und Hauptstück lokalisiert. Während der Ejakulation kommt es

zu drastischen osmotischen Veränderungen, die in der Spermienzelle einen Wasserinflux bewirken. Es wird angenommen, dass das Droplet als Reservoir dient, um sich dem hypotonischem Stress anzupassen (Cooper 2011). Vergleicht man humane mit murinen Spermatozoen kann ein weiterer morphologischer Unterschied beobachtet werden. Murine Spermatozoen besitzen eine Art Haken, der dem Akrosom aufsitzt und dessen Funktion noch diskutiert wird (Holstein and Roosen-Runge 1981; Storch and Welsch 2002).

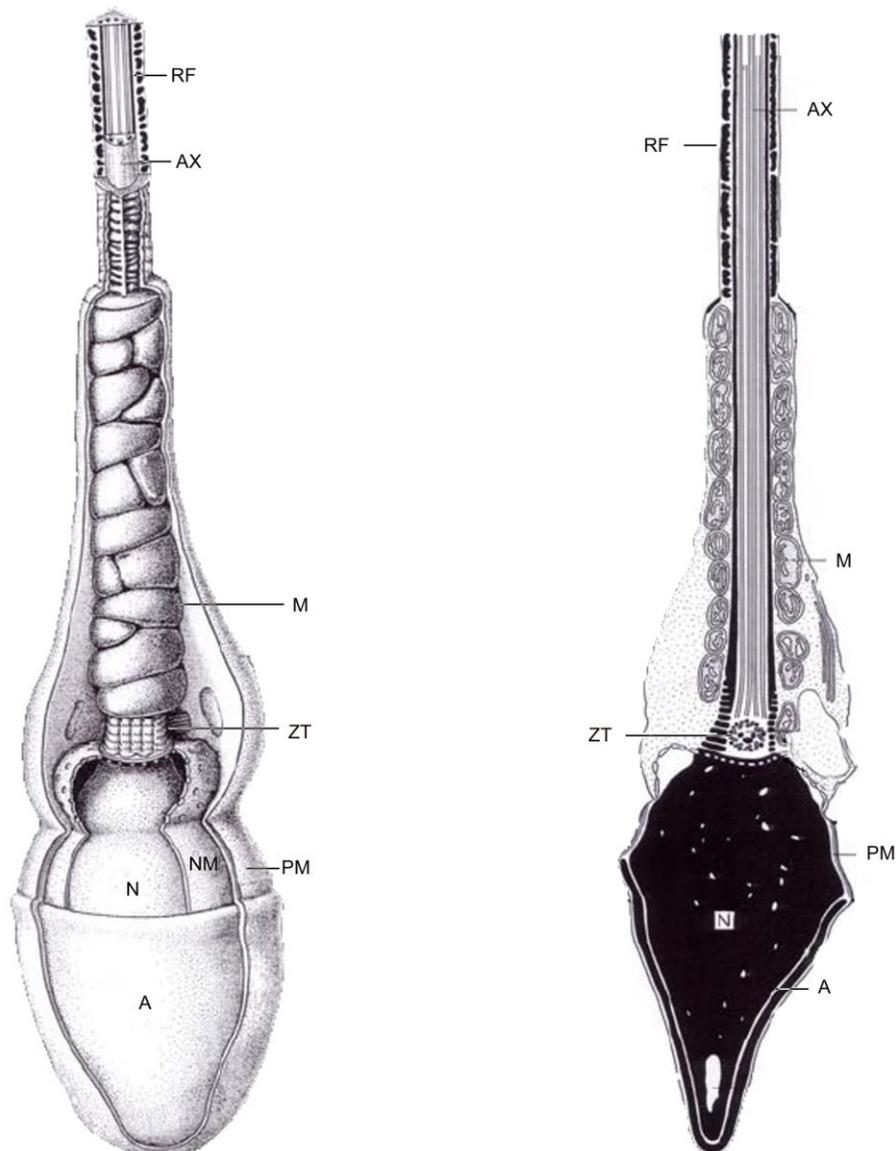


Abbildung 5: Grafische Darstellung (links) und elektronenmikroskopische Abbildung (rechts) eines humanen Spermatozoon (modifiziert nach Holstein and Roosen-Runge, Atlas of Human Spermatogenesis, 1981)

A= Akrosom, AX= Axonema, M= Mitochondrium, N= Nukleus, NM= Nukleäre Membran, PM= Plasmamembran, RF= Ringfaser, ZT= Zentriol; das Schwanzstück ist nur partiell dargestellt.

3.4 Die Reifung der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt

Frisch ejakulierte Spermien sind trotz vollständiger morphologischer Ausdifferenzierung noch nicht in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Hierfür ist eine weitere Reifung im weiblichen Genitaltrakt erforderlich. Der physiologische posttestikuläre Reifungsprozess zu fertilen Spermatozoen wird Kapazitation genannt und wurde 1951 das erste Mal von Austin und Chang definiert (Austin 1951; Chang 1951). Die Kapazitation beinhaltet viele Teilelemente, die letztendlich in der Fähigkeit, eine Eizelle zu befruchten, resultieren. Eingeleitet und ausgelöst werden die Signalwege der Kapazitation, die sowohl parallel als auch zeitversetzt aufeinander folgend ablaufen, durch Faktoren im Ejakulat und der weiblichen Genitalflüssigkeit. Entscheidende Parameter sind pH, HCO_3^- , Albumin und Ca^{2+} (Visconti et al., 1995; Visconti et al., 2002).

Einer der ersten Schritte der Kapazitation ist der Anstieg des $[\text{pH}]_i$. Die Alkalisierung wird durch das Beimischen der Seminalflüssigkeit während der Ejakulation eingeleitet. Die Seminalflüssigkeit besitzt einen höheren pH-Wert als die Nebenhodenflüssigkeit und führt durch die Aktivität des spermien-spezifischen Na^+/H^+ Austauschers (sNHE) und des HCO_3^- Austauschers zum Anstieg des $[\text{pH}]_i$ in der Spermienzelle (Zeng et al., 1996; Garcia and Meizel 1999). In humanen Spermatozoen ist der aktive, protonenselektive Ionenkanal Hv1 mitverantwortlich für die Ausschleusung von Protonen (Lishko et al., 2010). Gleichzeitig neutralisiert das Seminalplasma das saure Vaginalsekret. Das basische Umgebungsmilieu und der damit assoziierte erhöhte $[\text{pH}]_i$ steigert die Spermienmotilität (Babcock et al., 1983; Carr and Acott 1989) und ist Voraussetzung für die folgende Induzierung der Hyperaktivität und der Akrosomenreaktion (Florman et al., 1989; Parrish et al., 1989; Marquez and Suarez 2007). Die bedeutende Rolle des sNHE in der Regulation der Spermienmotilität zeigt sich in der Elimination des NHE-Gens. Die dadurch teilweise gehemmte Alkalisierung führt zu immotilen Spermien und damit zur männlichen Infertilität (Bell et al., 1999; Wang et al., 2003; Wang et al., 2007). Die beobachtete Zunahme der Schlagfrequenz in der frühen Aktivierungsphase der Kapazitation wird durch HCO_3^- ausgelöst (Wennemuth 2004). Eine erhöhte $[\text{HCO}_3^-]_i$ führt zur Aktivierung der löslichen Adenylatcyclase (sAC), einem Anstieg der cAMP Konzentration (Chen et al., 2000; Litvin et al., 2003) und einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Zielproteine, die unterschiedliche Zellantworten auslösen, werden von der PKA phosphoryliert (Visconti et al., 1995; Nolan et al., 2004). Die Phosphorylierung der axonemalen Dyneinketten führt zur erhöhten Schlagfrequenz des Flagellums (Okamura et al., 1985; Harrison 2004; Nolan et al., 2004; Hess et al., 2005; Salathe 2007). Die Schlagfrequenzerhöhung durch HCO_3^-

erfolgt bereits nach 30 s und resultiert in einer symmetrischen, progressiven Motilität, die die Spermienzelle antreibt (Wennemuth et al., 2003). Wie genau HCO_3^- die Spermienzelle passiert, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Diskutiert werden HCO_3^- Austauscher und Transporter (Parkkila et al., 1993; Demarco et al., 2003), die aktiv HCO_3^- in die Zelle schleusen und bzw. oder die Beteiligung von CA, die durch ihre reversible Enzymreaktion den HCO_3^- Haushalt der Zelle beeinflussen (Wandernoth et al., 2010). Die essentielle Bedeutung dieses Signalweges zeigt sich in sAC Knockout-Mäusen. Spermien von sAC-Null Mäusen zeigen einen Totalverlust der HCO_3^- vermittelten progressiven Motilität und sind unfähig, die Eizelle zu penetrieren (Esposito et al., 2004; Xie et al., 2006).

Ein Effekt, der erstmals nach 60 min nachweisbar ist, ist die durch die PKA induzierte Tyrosin Phosphorylierung von Proteinen (Harrison and Miller 2000; Harrison 2004; Arcelay et al., 2008). Eine weitere Beobachtung ist, dass die bereits beschriebenen Parameter wie pH, Viskosität und $[\text{HCO}_3^-]$ im Sekret des weiblichen Genitaltrakt variieren. Am weiblichen Fertilitätspeak in der Mitte des Menstruationszyklus ist der Zervixschleim weniger viskös und der pH sowie die $[\text{HCO}_3^-]$ höher (Maas et al., 1977; Eggert-Kruse et al., 1993; Mannowetz et al., 2011; Miki and Clapham 2013). Diese Bedingungen erhöhen die Chancen der Spermien auf ein erfolgreiches Eindringen und Durchdringen des weiblichen Genitaltraktes.

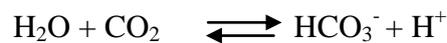
Eine weitere Komponente der Kapazitation ist die Umgestaltung der Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran. Dieser als Phospholipid-Scrambling bezeichnete Prozess wird durch HCO_3^- stimuliert und veranlasst die Ausschleusung von membranverankertem Cholesterol aus der akrosomalen Region des Spermiums (Gadella and Harrison 2000; Flesch et al., 2001). Das in der folliculären Flüssigkeit enthaltene Albumin ist der wichtigste Cholesterolaktzeptor (Ehrenwald et al., 1990). Die Cholesterolreduktion steigert die Fluidität der Spermienmembran und erleichtert die Verschmelzung mit der Eizelle.

Die Konzentration von Ca^{2+} spielt sowohl in frühen, als auch in späten Kapazitationsphasen eine bedeutende Rolle. Der HCO_3^- vermittelte sAC Signalweg zur Motilitätssteigerung ist von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig (Carlson et al., 2007). Ca^{2+} hat ebenfalls eine direkte aktivierende Wirkung auf die sAC und beeinflusst über Proteinphosphorylierung die Schlagfrequenz in der frühen Aktivierung (Jaiswal and Conti 2003; Carlson et al., 2007). In der späten Kapazitation ist ein $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg für die Einleitung der Hyperaktivität und der sich anschließenden Akrosomenreaktion notwendig. Die Ca^{2+} -abhängige Hyperaktivität beschreibt eine Zunahme der Schlagfrequenzamplitude

des Flagellums und resultiert in einer asymmetrischen Bewegungsform (Brokaw 1979; Lindemann et al., 1987; Ho et al., 2002; Suarez 2008). Diese asymmetrische Schlagform verleiht dem Spermium eine kraftvollere und forciertere Bewegungsform, die für die Penetration der Eizelle notwendig ist (Kirichok and Lishko 2011). Nach der Penetration des Cumulus oophorus, der äußeren Eizellschicht, bindet die Spermienzelle über Oberflächenproteine an der Zona pellucida. Über einen G-Protein induzierten $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg und einer weiteren $[pH]_i$ Erhöhung wird die akrosomale Exozytose induziert (Florman et al., 1989; Xia and Ren 2009; Ren and Xia 2010). Durch die Auflösung des Akrosoms kommt es zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, die die Zona pellucida der Eizelle durchsetzen und zur Verschmelzung führen (Allison and Hartree 1970; Wassarman et al., 2001; Ren and Xia 2010). Reguliert wird die $[Ca^{2+}]_i$ durch Ionenkanäle. Ein essentieller Kalziumkanal für die Spermienfertilität ist der 2001 entdeckte spermien-spezifische CatSper-Kanal (Ren et al., 2001; Navarro et al., 2008). Elektrophysiologische Studien an CatSper zeigen, dass dieser Ca^{2+} selektiv und pH sensitiv ist (Kirichok et al., 2006). Progesteron und verschiedene Prostaglandine zeigen eine aktivierende Wirkung auf den humanen CatSper Kanal. Damit triggert das von den Cumulus-Zellen sezernierte Progesteron den $[Ca^{2+}]_i$ Einstrom während der Penetration (Blackmore et al., 1990; Lishko et al., 2011). Mutationen bzw. Deletionen innerhalb der CatSper-Genfamilie führen zur männlichen Infertilität. Die CatSper defizienten Spermien sind durch den Verlust der Ca^{2+} induzierten Hyperaktivität nicht mehr in der Lage, die Eizelle zu penetrieren (Ren et al., 2001; Avenarius et al., 2009; Hildebrand et al., 2010).

3.5 Carboanhydrasen

Die Proteinklasse der Carboanhydrasen (CA) umfasst derzeit 16 Isoformen und ist in allen Säugetierorganismen vorhanden. Die zelluläre Lokalisation verteilt sich auf zytoplasmatische (CAI, II, III, VII und XIII), membrangebundene (CAIV, IX, XII, XIV und XV), mitochondriale (CAVA und CAVB) und sezernierte (CAVI) Proteinformen. Die Metalloenzyme besitzen in ihrem aktiven Zentrum ein Zinkion und katalysieren die reversible Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- . Dabei ist die Enzymaktivität konzentrations- und pH-abhängig (Krishnamurthy et al., 2008):



Die Reaktion zeigt die regulatorische Rolle der CAs in der Säure-Base-Homöostase, der Sekretion von HCO_3^- , dem Transport und Austausch von CO_2 , der Beeinflussung des pHs, sowohl intrazellulär als auch im extrazellulären Milieu (Sly and Hu 1995). Anhand dessen, und durch das breite Verteilungsmuster der CAs im Säugetierorganismus, wird diesen Enzymen eine Beteiligung an einer Vielfalt von biologischen Prozessen zugesprochen, unter anderem bei der Regulation der Respiration und des Gasaustausches (Heming et al., 1994), bei Knochenentwicklung und Knochenumbauprozessen (Waite et al., 1970; Waite 1972), bei der Produktion von Speichelflüssigkeit, Magensäure und des Pankreassekrets (Fleming et al., 1995; Kivela et al., 2005), bei der Regulation der Säure-Base-Homöostase des Blutplasmas und der Zerebrospinalflüssigkeit (Meldrum and Roughton 1933; Ghandour et al., 1992; Shah et al., 2005), bei der Muskelfunktion und im zentralen Nervensystem (Waheed et al., 1992; Svichar et al., 2009), bei der Aufrechterhaltung des intraokularen Drucks (Becker 1954) und bei der Zusammensetzung des Harns (Lucci et al., 1979). Die große physiologische Relevanz der CAs ruft deshalb auch großes Interesse im pharmazeutischen Bereich hervor. CA Inhibitoren sind bereits von medizinischer Bedeutung und finden in Diuretika ihre Anwendung (Puscas et al., 1999). Der diuretische Effekt der CA Hemmung kommt durch die verminderte Resorption von Na^+ und HCO_3^- im proximalen Nierentubulus zu Stande und führt infolgedessen zu einer erhöhten Wasserausscheidung. Heutzutage werden CA Inhibitoren nicht mehr als Diuretika eingesetzt, da bessere wirkende Arzneistoffe entwickelt worden sind. Eine Indikation von CA Inhibitoren findet man derzeit noch bei Glaukompatienten. Im Auge sind CAs verantwortlich für die Kammerwasserproduktion, indem sie die Na^+ und H_2O Aufnahme in

den Ziliarkörper begünstigen. Durch die CA Inhibierung kann bei einem Glaukom der Kammerinnendruck reduziert werden (Alward 1998).

Eine der am besten charakterisierten zytosolischen CAs ist die Isoform II. Die erste CA Aktivität wurde vor 60 Jahren in Bullenerythrozyten entdeckt (Meldrum and Roughton 1933). 1961 konnte die enzymatisch hochaktive CA Isoform aus humanen Erythrozyten isoliert und aufgereinigt werden (Nyman 1961). Es folgte die Aufklärung der Aminosäuresequenz (Henderson et al., 1973) und der Kristallstruktur (Liljas et al., 1972) der heute bekannten CAII. Das Enzym besitzt eine kugelförmige Struktur. Den Mittelpunkt des katalytischen Zentrums bildet ein Zn^{2+} , welches tetraedrisch von 3 Histidinresten (His94, His96, His119) und einem H_2O Molekül, welches auch in deprotonierter Form vorliegen kann, koordiniert ist. Am Hydroxidion binden zwei Aminosäurereste, das Thr199 und Glu106. Die beiden hydrophilen Reste und die Orientierung der Bindungen um das aktive Zentrum wirken bei der Bildung der hydrophilen Angriffstasche mit (Abbildung 6) (Sly and Hu 1995; Lindskog 1997).

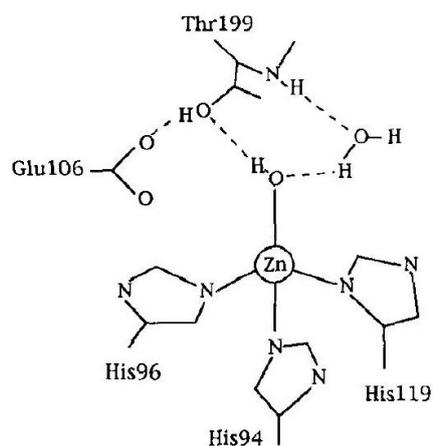


Abbildung 6: Schematische Modelldarstellung des katalytischen Zentrums der CAII Struktur (Sly and Hu 1995)

Der nukleophile Angriff des $Zn-OH^-$ auf das CO_2 Molekül ist der erste Schritt der Reaktion. Das an Zink gebundene HCO_3^- wird freigesetzt und durch ein H_2O Molekül ersetzt (Abbildung 7A). Im zweiten Schritt kommt es zur Freisetzung des Protons. Diese Abspaltung wird über das His64, welches als Protonenshuttle fungiert, katalysiert (Abbildung 7B). Die enzymatisch hochaktive CAII besitzt eine maximale CO_2 Hydrationsrate von $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Khalifah 1971; Sly and Hu 1995; Lindskog 1997).

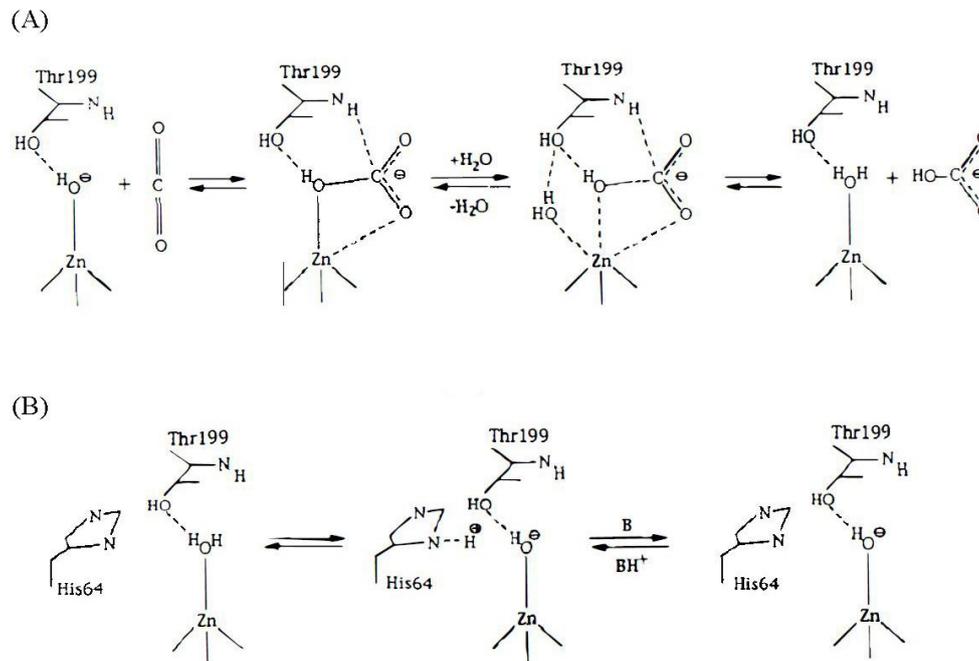


Abbildung 7: Schema der reversiblen Hydratisierung von CO_2 zu HCO_3^- durch die katalytische Reaktion der CAII (Sly and Hu 1995)

Dass CAII eine große physiologische Bedeutung zukommt, zeigt sich im Krankheitsbild des sog. CAII deficiency syndrom, welches bis zum jetzigen Zeitpunkt als einzige durch den Verlust einer CA hervorgerufenen Krankheit bekannt ist. Betroffene Patienten leiden unter Osteopetrose begleitet von einer renalen tubulären Azidose und zerebraler Verkalkung (Sly et al., 1983).

Weiterhin wird diskutiert, ob die CA Isoenzyme auch bei der Zusammensetzung des Nebenhodensekrets eine Rolle spielen. Ein saures Nebenhodensekret und eine geringe $[\text{HCO}_3^-]$ (Levine and Marsh 1971; Levine and Kelly 1978) sind entscheidende Faktoren für die posttestikuläre Reifung und eine erfolgreiche Speicherung der Spermien in einem sog. Ruhestatus (Acott and Carr 1984; Okamura et al., 1985). Der erste Hinweis für die Beteiligung der CAs liefern Genexpressionsstudien (Johnston et al., 2005; Small et al., 2005), die zeigen, dass die CAII und IV wichtige Isoformen im murinen Nebenhoden sind mit dem stärksten Expressionsniveau im Pubertätsstadium

(http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85283, http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85293). Des Weiteren weist der CA Proteinnachweis im Nebenhodenepithel (Cohen et al., 1976; Parkkila et al., 1993; Hermo et al., 2005) auf die Beteiligung der Enzyme an der H^+ Sekretion und HCO_3^- Resorption hin (Au and Wong 1980; Kaunisto et al., 1995; Breton et al., 1998). Dabei soll der Mechanismus analog zu dem in der Niere ablaufen. Durch apikal lokalisierte Protonenpumpen (Brown et al., 1992;

Breton et al., 1996; Shum et al., 2009) und Na^+/H^+ Austauscher (Chew et al., 2000; Bagnis et al., 2001) werden die von der CAII generierten Protonen ins Lumen sezerniert. Die $[\text{HCO}_3^-]_i$ wird über basolaterale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (Jensen et al., 1999) und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Ko-Transporter (Jensen et al., 1999) reguliert. Für die Resorption katalysiert die extrazelluläre CAIV das luminaire HCO_3^- mit einem H^+ zu CO_2 , welches über die Plasmamembran der Epithelzelle diffundiert und intrazellulär wieder zu HCO_3^- und einem H^+ reagiert (Klinke et al., 2005; Cordat and Casey 2009). Welche CA Isoformen in den einzelnen Nebenhodenabschnitten der verschiedenen Spezies exprimiert werden, deren Regulation sowie die Bedeutung der Enzymaktivität für die Zusammensetzung des Sekrets, wird noch diskutiert.

Eine weitere offene Fragestellung ist die Rolle der CAs in murinen Spermatozoen. Sowohl der $[\text{pH}]_i$ als auch $[\text{HCO}_3^-]_i$ sind entscheidende Faktoren für die Regulation der Spermienmotilität (Babcock et al., 1983; Wennemuth 2004). Der durch HCO_3^- induzierte sAC Signalweg ist bereits charakterisiert (Okamura et al., 1985). Fraglich ist jedoch, wie HCO_3^- in die Spermienzelle eintritt. Diskutiert werden zwei Möglichkeiten: Ein direkter HCO_3^- Eintritt durch $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Ko-Transporter und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (Parkkila et al., 1993; Zeng et al., 1996; Demarco et al., 2003) oder ein indirekter HCO_3^- Transfer durch extra- und intrazelluläre CAs (Parkkila et al., 1991). Eine vorangegangene Studie der Arbeitsgruppe Wennemuth etablierte 2010 die Beteiligung der extrazellulär lokalisierten CAIV an der Spermienreifung im männlichen Genitaltrakt und an der HCO_3^- induzierten frühen Spermienaktivierung im weiblichen Genitaltrakt. CAIV defiziente Mäuse zeigen sowohl eine Reduktion des prozentualen Anteils motiler Spermien, als auch einen verzögerten Schlagfrequenzanstieg durch HCO_3^- und CO_2 . Durch den CAIV Genverlust kommt es während der Stimulation zu einem Disequilibrium von CO_2 und HCO_3^- nahe der Spermienoberfläche. Dies führt zu einer verlangsamten HCO_3^- Bereitstellung, was wiederum eine verzögerte sAC Aktivierung zu Folge hat und Grund für die verzögerte Frequenzerhöhung ist (Wandernoth et al., 2010). In dieser Arbeit soll die Bedeutung und Funktion der CAII in murinen Spermatozoen und im speziellen deren Einfluss auf die HCO_3^- vermittelte Schlagfrequenzerhöhung in der frühen Spermienaktivierung untersucht werden.

3.6 Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit

In Rahmen dieser Dissertation sollte die Verteilung der CAII im männlichen Genitaltrakt und in Spermatozoen der Maus und deren Involvierung in den HCO_3^- vermittelten Signalweg in der frühen Spermienaktivierung untersucht werden. Dafür wurde eine CAII Knockout-Mauslinie etabliert und analysiert. Eine vorangegangene Studie zeigte bereits die Beteiligung der CAIV an dem HCO_3^- induzierten Signalweg. Aus diesem Grund wurden CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse generiert und entsprechend charakterisiert. Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Ist CAII ein konstitutiv exprimiertes Protein in Spermien und wie ist die CAII Protein- und RNA-Verteilung im männlichen Genitaltrakt?
- 2) Welche Bedeutung hat die CAII Enzymaktivität an der CA Gesamtkativität in Spermien?
- 3) Welche Rolle spielt CAII in der Spermienmotilität und in der HCO_3^- vermittelten frühen Spermienaktivierung?
- 4) Ist es möglich, CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse zu generieren?
 - Zeigen die Mäuse phänotypische Auffälligkeiten bzw. makroskopische und mikroskopische Strukturveränderungen im Aufbau des männlichen Genitaltrakts?
 - Ist eine eingeschränkte Fertilität zu beobachten?
 - Welchen Einfluss hat der Doppelknockout auf den HCO_3^- vermittelten Signalweg und infolgedessen auf die frühe Spermienaktivierung?
 - Wird der Genverlust im männlichen Genitaltrakt der Maus eventuell durch andere CA Isoformen kompensiert?
- 5) Ist es möglich, mittels Phospholipase C Behandlung aus CAII Knockout-Spermien phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zu erzeugen?
 - Wie reagieren die mit PLC generierten phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien im Vergleich zu den genetischen Doppelknockout-Spermien auf die HCO_3^- induzierte Schlagfrequenzerhöhung?

4 Material

4.1 Geräte

Attofluor® Cell Chamber	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Brutschrank, CO2 Inkubator MCO-5AC	Sanyo, München, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CCD Kamera	Monacor, Bremen, Deutschland
ChemiDoc™ XRS-Detektor	BioRad, München, Deutschland
Color View, Soft Imaging System	Olympus, Hamburg, Deutschland
Autotechnikon, Einbettautomat	Slee, Mainz, Deutschland
FITC Filter	Nikon, Tokyo, Japan
Gas Bubbler, GBM10	Warner Instruments, Hamden CT, USA
Gelkammer	BioRad, München, Deutschland
Historange Microtome, LKB	Bomma, Schweden
Invertoskop, Eclipse TE2000-U	Nikon, Tokyo, Japan
Laser Scanning Mikroskop Eclipse TE2000-E mit dem konfokal Modul C1	Nikon, Tokyo, Japan
Makler Counting Chamber	Medical Instruments, Herford, Deutschland
Mikroskop Inkubator System, Tokai Hit	Medical Technology, Hamburg, Deutschland
Mikroskop, Axiophot	Spectra Services, Ontario NY, USA
Mikroskop, Diaphot 300	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus, CX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop, Olympus BX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Monitor CDM-1203	Olympus, Hamburg, Deutschland
Monochromator, Polychrome IV	Monacor, Bremen, Deutschland
Motion-Scope M3-mono fast speed Kamera	Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Imaging Solutions, Regensdorf, Schweiz
Ohrlochzange 2,0 mm	Laboroptik, Lancing, UK

PCR Cycler, G-Storm	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Perifusion Valve Controller Mode, VC-8M	AlphaMetrix, Rödermark, Deutschland
Photomultiplier, Digidata 1320 Series	Warner Instruments, Hamden CT, USA
Quadrupol Massenspektrometer, OMNISTar™	Axon Instruments, Hamburg Deutschland
Photomultiplier	Axon Instruments, Hamburg Deutschland
Savitzky-Golay Filter	Pfeiffer Vacuum, Asslar, Deutschland
Spannungsgerät	BioRad, München, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Xcell SureLock® Blot Module	BioRad, München, Deutschland
Xcell SureLock® Elektrophoresis Cell	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
4.2 Verbrauchsmaterialien	
Deckgläser	VWR, Darmstadt, Deutschland
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoro Dishes, FD35	WPI, Sarasota FL, USA
Homogenisierungsstößel	VWR, Darmstadt, Deutschland
Nitrozellulosemembran 0,45 µm Porengröße	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 9 well/12 well	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Plastikküvetten für Photometer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger (76 x 26 mm/3 x 1 inch)	VWR, Darmstadt, Deutschland
96 well Platten	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
4.3 Chemikalien	
2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]- sulfonsäure (HEPES)	Sigma, Steinheim Deutschland

10 x NEB-Puffer	BioLabs, Hitchen, UK
10 x Roti Block	Roth, Karlsruhe, Deutschland
100 x Bovines Serum Albumin (BSA)	BioLabs, Hitchen, UK
2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM)	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Steinheim Deutschland
Aceton	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Avidin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Biotin	Sigma, Steinheim Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	ZChL, Universität Saarbrücken, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Depex	VWR, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Größenstandard	BioLabs, Hitchen, UK
dNTP-Mix	BioLabs, Hitchen, UK
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70%; 75%, 80%; 99%	ZChL, Universität Saarbrücken,
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim Deutschland
Formaldehyd 37%	ZChL, Universität Saarbrücken,
Glucoseoxidase	Sigma, Steinheim Deutschland
Glukose	Sigma, Steinheim Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glykogen	Peqlab, Erlangen, Deutschland

Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Baxter, Bielefeld, Deutschland
2-Propanol 70%; 80%; 90%; 100%;	ZChL, Universität Saarbrücken, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Steinheim Deutschland
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methylbenzoat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium D/L Laktat	Sigma, Steinheim Deutschland
Natriumazid	Sigma, Steinheim Deutschland
Natrium-Bikarbonat (NaHCO ₃)	Sigma, Steinheim Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nigericin	Sigma, Steinheim Deutschland
N-tris (Hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acidsodium-potassium (TAPS)	Sigma, Steinheim Deutschland
Paraffin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phospholipase C (PLC)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pluronic® F-127	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Ponceau-Rot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Protease Inhibitor	Sigma, Steinheim Deutschland
Proteinase K	Sigma, Steinheim Deutschland
Pyruvat	Sigma, Steinheim Deutschland
RNAPure	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	ZChL, Universität Saarbrücken,

SeeBlue® Standard	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Silan (3-aminopropyl-Triethylsilan)	Sigma, Steinheim Deutschland
Slim Fast	Apotheke, Universität Saarbrücken, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	BioLabs, Hitchen, UK
Transfer Puffer (20 x)	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Tris[hydroxymethyl]aminomethan	Sigma, Steinheim Deutschland
Tris-Chlorid (Tris-Cl)	Sigma, Steinheim Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma, Steinheim Deutschland
Triton™ X 100	Sigma, Steinheim Deutschland
Tsp 45 I	BioLabs, Hitchen, UK
Tween® 20	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vectashield® Mounting Medium	Linaris, Dossenheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	ZChL, Universität Saarbrücken,
Ziegenserum	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

4.4 Puffer und Standardlösungen

Proteinase K Enzym-Lösung (Gewebeverdau)

0,2 mg/ml Proteinase K
in Aqua dest.

10 x PCR-Puffer

500 mM KCl
100 mM Tris-Cl
22,5 mM MgCl₂
5 % DMSO
in Aqua dest. (sterilfiltriert)

50 x TAE-Puffer (Gelelektrophorese)

0,05 M	EDTA
2 M	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
1 M	Essigsäure 100%

in Aqua dest.

Den pH-Wert mit konzentrierter HCl-Lösung auf pH 8,3 einstellen
und für die Gebrauchslösung 1:50 mit Aqua dest. verdünnen.

Probenauftragspuffer (Gelelektrophorese)

0,2 %	SDS
50 %	Glycerin
0,05 %	Bromphenolblau
0,05 %	Xylencyanol

in Aqua dest.

10 x BSA-Puffer (Restriktionsverdau)

1 mg/ml	BSA
---------	-----

in Aqua dest.

HS-Puffer (pH 7,4)

135 mM	NaCl
15 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	CaCl ₂
20 mM	HEPES
5 mM	Glukose
10 mM	Natrium D/L Laktat
1 mM	Pyruvat

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

HS-Puffer (pH 6,6)

135 mM	NaCl
15 mM	KCl

1 mM	MgCl ₂
2 mM	CaCl ₂
20 mM	MES
5 mM	Glukose
10 mM	Natrium D/L Laktat
1 mM	Pyruvat

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 6,6 eingestellt.

HS-Puffer (pH 8,2)

135 mM	NaCl
15 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	CaCl ₂
20 mM	TAPS
5 mM	Glukose
10 mM	Natrium D/L Laktat
1 mM	Pyruvat

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 5% HCl-Lösung auf pH 8,2 eingestellt.

HCO₃⁻-haltige HS-Puffer

15 mM	NaHCO ₃
-------	--------------------

in HS-Puffer

NaHCO₃ durch leichtes rotieren im Puffer lösen

HS/BSA-Puffer

0,5 %	BSA
-------	-----

in HS-Puffer

Lösen des Bovines Serum Albumin durch Inkubation bei 37 °C im Wasserbad.

Lämmli-Puffer (Proteinaufreinigung)

0,3 M	SDS
0,15 M	Bromphenolblau
2,7 M	Glycerin 20%
120 mM	Tris[hydroxymethyl]aminomethan in Aqua dest.

Homogenisierungspuffer (Proteinaufreinigung)

100 mM	NaCl
10 mM	HEPES
2 mM	EDTA
1 mM	DTT
2 %	Triton TM X 100 in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 5% HCl-Lösung auf 7,3 eingestellt.

20 x MES-Puffer (Western Blot)

1 M	MES
1 M	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
69,4 mM	SDS
20,5 mM	EDTA in Aqua dest.

Für die Gebrauchslösung wird die Stocklösung
1:20 mit Aqua dest. verdünnt.

Transfer-Puffer (Western Blot)

1 : 20	Transfer Puffer 20 x
1 : 10	Methanol
1 : 800	Antioxidant in Aqua dest.

Ponceau-Rot-Lösung (Membranfärbung, Western Blot)

0,1 %	Ponceau-Rot in Essigsäure 2%
-------	---------------------------------

10 x PBS (Waschpuffer)

1,4 M	NaCl
26,8 mM	KaCl
80 mM	di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat
14,7 mM	KH ₂ PO ₄

in Aqua dest.

Für die Gebrauchslösung wird die Stocklösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Der pH-Wert wird mit 5% HCl-Lösung auf pH 7,2 eingestellt.

TBS-Puffer (Waschpuffer)

50 mM	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
154 mM	NaCl

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit konzentrierter HCl-Lösung auf pH 7,6 eingestellt.

TBS-T-Puffer (Waschpuffer)

1 %	Tween® in TBS-Puffer
-----	----------------------

Bouin-Fixierungslösung

1 : 4	Formaldehyd
-------	-------------

in Pikrinsäure (heiß gesättigt)

5% Eisessig werden ergänzt und das entsprechende Volumen der Lösung zuvor verworfen.

Glukoseoxidase-Puffer (Blockpuffer, immunzytochemische Färbung)

10 mM	Glucose
1 mM	Natriumazid
0,4 U/ml	Glukoseoxidase

in 1 x PBS

Biotin-Stammlösung (immunzytochemische Färbung)

4,1 M	Biotin
15,4 M	Natriumazid
	in 1 x PBS pH 7,2

Avidin-Stammlösung (immunzytochemische Färbung)

15,2 mM	Avidin
15,4 M	Natriumazid
	in 1 x PBS pH 7,2

DAB (immunzytochemische Färbung)

1,4 mM	DAB
	in 1 x TBS pH 7,6
	Das DAB in Eppendorfgefäße aliquotieren und bei bei -20 °C bis zum Gebrauch einfrieren.

Reaktives DAB (immunzytochemische Färbung)

1 ml	DAB (1,4 M)
	Das DAB 2 min bei 2000 g abzentrifugieren und den Überstand mit 10 µl der folgenden Lösung versetzen:
4 %	H ₂ O ₂ (30%) in Aqua dest.

Tris HCl-Puffer (immunzytochemische Färbung)

100 mM	Tris-HCl
	in Aqua dest.
	Der pH-Wert wird mit KCl Plätzchen auf pH 8,2 eingestellt.

BCECF Ansatz

0,1 µM	BCECF-AM
0,2 µM	Pluronic®-F127
	In HS-Puffer, Endvolumen 250 µl.
	BCECF Ansatz 1:1 mit der Spermisuspension versetzen

K-Puffer (pH 7,0) (Kalibrierung)

5 mM	NaCl
135 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	CaCl ₂
20 mM	HEPES
10 mM	Glukose
10 mM	Natrium D/L Laktat
1 mM	Pyruvat
10 µM	Nigericin

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 1 M KOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt.

K-Puffer (pH 5,0) (Kalibrierung)

5 mM	NaCl
135 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	CaCl ₂
20 mM	MES
10 mM	Glukose
10 mM	Natrium D/L Laktat
1 mM	Pyruvat
10 µM	Nigericin

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 5% HCl-Lösung auf pH 5,0 eingestellt.

K-Puffer (pH 9,0) (Kalibrierung)

5 mM	NaCl
135 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	CaCl ₂
20 mM	TAPS
10 mM	Glukose
10 mM	Natrium D/L Laktat

1 mM	Pyruvat	
10 µM	Nigericin	
	in Aqua dest.	
	Der pH-Wert wird mit 1 M KOH-Lösung auf pH 9,0 eingestellt.	
NH ₄ Cl-Puffer		
20 mM	NH ₄ Cl	
	in HS-Puffer (pH 7,4)	
4.5	Antikörper	
4.5.1	Primärantikörper	
Ziege anti-Maus CA IV polyklonal IgG Antikörper		R&D System, Wiesbaden, Deutschland
Hase anti-Maus CAII polyklonal IgG Antikörper		Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
4.5.2	Sekundärantikörper	
Ziege anti-Maus CA IV polyklonal IgG Antikörper		R&D System, Wiesbaden, Deutschland
Hase anti-Maus CAII polyklonal IgG Antikörper		Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Ziege anti-Hase IgG Alexa Fluor® 488 konjugiert		Acris Antibodies, San Diego CA, USA
Esel anti-Ziege IgG Cy3 konjugiert		Acris Antibodies, San Diego CA, USA
Esel anti-Hase IgG HRP konjugiert		Abcam, Cambridge, UK
Esel anti-Ziege IgG HRP konjugiert		Santa Cruz, Heidelberg Deutschland
biotinylierter Esel anti-Ziege IgG		Santa Cruz, Heidelberg Deutschland
biotinylierter Ziege anti-Hase IgG		Linaris, Dossenheim, Deutschland
4.6	Kits/Assays	
BCA Protein Assay Kit		Fisher Scientific, Schwerte,

	Deutschland
CAII TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
CAIV TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
CAXIV TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Fairfield CT, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kits	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
HistoRed, Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Linaris, Dossenheim, Deutschland
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
18S RNA Assay	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Vectastain® ABC-AP Kit	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
Vectastain® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA

4.7 Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

4.7.1 CAII Primer

CA2f: 5'-CTG CAC GCT ATT TTT TGA AGA TTG GAC CTG CGT CA-3'

CA5R: 5'-TGG AAG CAA TTA TTT ACT CCG GTA AAC TG-3'

4.7.2 CAIV Primer

CA4K/OE25': 5'-CAC CCT TCA TCC TCG TCG GCT ATG ACC AAA AGC-3'

CA4K/Oexon63': 5'-TGT GGA TCT TGA TGG GTT GTT TGT ACA CAG TCC-3'

CA4K/Ointron1A5': 5'-TGA GGT CAA TTC CCA GCT CCC ACA TTG TTG C'3

4.8	Mauslinien	
4.8.1	Knockout-Tiere	
	CAIV Knockout-Mäuse	Jackson Laboratory, Bar Harbor
	B6.129S1-Car4 ^{tm1Sly} /J	ME, USA
	CAII Knockout-Mäuse	Jackson Laboratory, Bar Harbor
	B6.D2-Car2 ⁿ /J	ME, USA
	CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse	selbst generiert
		Forschungsgebäude 65, Tierhaltung
		der Experimentellen Chirurgie
		Tierzuchtantrag Nr. 02/2011
4.8.2	Wildtyp-Tiere	
	Wildtyp-Mäuse C57 Bl/6J	Jackson Laboratory, Bar Harbor
		ME, USA
4.9	Software Versionen	
	Adobe Bridge CS4	Adobe, Dublin, Irland
	Adobe Photoshop CS4	Adobe, Dublin, Irland
	Axoscope, v9.0	Axon Instruments, Hamburg
		Deutschland
	Endnote X2	Thomson Corp., Stamford CT,
		USA
	EZ-C1, v3.90	Nikon, Tokyo, Japan
	Igor Pro, v6.04	Wavemetrics, Lake Oswego OR,
		USA
	Image J, v1.37	Online Freeware
	ImageLab Software	BioRad, München, Deutschland
	Cell ^D Imaging Software for	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Life Science Microscopy	
	MedeaLAB CASA System, v5.5	Medical Technology, Hamburg,
		Deutschland
	MetaMorph, v 7.1	Molecular Devices, Sunnyvale
		CA, USA
	Microsoft Excel 2007	Microsoft, Redmond WA, USA

Microsoft Word 2007	Microsoft, Redmond WA, USA
Motion Studio 64 Software	Imaging Solutions, Regensburg, Schweiz
OriginPro™7	OriginLab, Northhampton MA, USA
SigmaPlot®, v11.0	Systat Software, Erkrath, Deutschland
.Slide, v02/2005	Olympus, Hamburg, Deutschland
StepOnePlus™ Software	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland

5. Methodik

5.1 Genotypisierung

Zur Bestimmung des genetischen Status der Maus wird mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis et al., 1986) eine Genotypisierung durchgeführt. Dabei wird die Verteilung der Allele sowohl für das CAII als auch für das CAIV Gen ermittelt.

5.1.1 Gewebeverdau

Die benötigte DNA wird aus einem Stück Ohrgewebe isoliert. Hierzu wird die gewonnene Gewebeprobe mit 90 µl Proteinase K-Lysepuffer und 10 µl 10 x PCR-Puffer versetzt und über Nacht bei 55 °C im Heizblock lysiert. Die enthaltene Proteinase K, deren optimale Enzymaktivität bei 55 °C liegt, bewirkt den Aufschluss der Zellen. Es folgt eine Inaktivierung des Enzyms bei 95 °C für 20 min. Die lysierte Probe dient als Ausgangsmaterial für die anschließende PCR.

5.1.2 PCR

In der PCR kommt es durch die Taq-Polymerase und das Einsetzen spezifischer Primer zur exponentiellen Amplifikation gezielter Genabschnitte. Die sich wiederholenden PCR Zyklen gliedern sich in eine Denaturierungsphase (92-98 °C), eine Anlagerungsphase (primerdefinierte Temperatur) und in eine Verlängerungsphase (72 °C). Die Anlagerung der sequenzspezifischen Primer an die einzelsträngige DNA dient als Startpunkt der Taq-Polymerase, die in der Verlängerungsphase den komplementären Genabschnitt synthetisiert. Im weiteren Reaktionsverlauf kommt es zur exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Im ersten Schritt wird der Mastermix auf Eis zusammen pipettiert. Die Mastermixzusammensetzung für die CAII bzw. CAIV PCR und die dazugehörigen PCR-Protokolle lauten wie folgt:

Pipettierschema eines 50 µl CAII PCR-Ansatzes:

CA2f-Primer	[50 µM]	1,00 µl
CA5R-Primer	[50 µM]	1,00 µl
dNTP-Mix	[10 mM]	1,00 µl
10x PCR-Puffer	[1x]	5,00 µl
H ₂ O _{steril}		38,50 µl
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>[5 Units]</u>	<u>0,5 µl</u>
		47 µl
Lysierter Gewebeverdau	[0,1-0,5 µg]	3 µl

CAII PCR-Protokoll:

94°C	3 min	1x
95°C	45 s	} 35x
63°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	1x
4°C	∞	

Pipettierschema eines 50 µl CAIV PCR-Ansatzes:

CA4K/OINTRON1A5'	[20 µM] (Primer)	1,25 µl
CA4K/OE25'	[20 µM] (Primer)	1,25 µl
CA4K/OEXON63'	[40 µM] (Primer)	1,25 µl
dNTP-Mix	[10 mM]	1,25 µl
10x PCR-Puffer	[1x]	5 µl
H ₂ O _{steril}		34 µl
DMSO		2,5 µl
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>[5 Units]</u>	<u>0,5 µl</u>
		47 µl
Lysierter Gewebeverdau	[0,1-0,5 µg]	3 µl

CAIV PCR-Protokoll:

94°C	2 min	1x
94°C	15 s	} 10x
68°C	60 s	
94°C	15 s	} 20x
68°C	60 s	
(autoextension + 20 s/Zyklus)		
68°C	10 min	1x
4°C	∞	

Die CAIV Mauslinie beschreibt eine Deletionsmutation. Durch den teilweisen Verlust des CAIV Gens ist das Mutanten-Allel kürzer als das Wildtyp-Allel. Die in der CAIV PCR verwendeten sequenzspezifischen Primer in Bezug auf das Wildtyp- bzw. Mutanten-Allel führen in der Amplifikation zu zwei unterschiedlichen DNA Fragmentgrößen. Die CAIV PCR Proben benötigen deshalb keine weitere Reaktion und können direkt im Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und analysiert werden.

Die CAII Mauslinie ist durch eine Punktmutation charakterisiert, die eine Missens Mutation hervorruft. Mutanten- und Wildtyp-Allel können nicht durch unterschiedliche amplifizierte Fragmentgrößen in der PCR dargestellt werden. Das Mutanten-Allel zeichnet sich jedoch durch den Verlust einer Restriktionsschnittstelle aus. Aus diesem Grund wird das CAII PCR-Produkt in einem anschließenden Restriktionsverdau 3 h bei 65 °C im Heizblock verdaut.

Pipettierschema eines 20 µl CAII Restriktionsverdau-Ansatzes:		
10x NEB-Puffer	[1x]	2,00 µl
10x BSA	[1x]	2,00 µl
Tsp 45 I	[4 U/µl]	1,00 µl
		10 µl
CAII-PCR-Produkt		10 µl

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt für die CAII Produkte in einem 3% und für die CAIV Produkte in einem 1% Agarosegel (Aaij and Borst 1972). Die Gele werden mit 1 x TAE-Puffer angesetzt und enthalten zusätzlich 0.007% Ethidiumbromid. 20 µl der PCR- bzw. der verdauten PCR-Probe werden mit 10 µl Probenauftragspuffer versetzt und in die Geltasche pipettiert. Durch das Anlegen einer Spannung (80 V für 40 min) wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe durch das Agarosegel zur Anode. Das Agarosegel wirkt dabei wie ein Molekularsieb, durch welches kleine Fragmente schneller durch die Matrix wandern als größere. Dabei bestimmt die Agarosekonzentration die Porengröße des Gels, die wiederum von der Größe der aufzutrennenden DNA abhängig ist. Der zugesetzte Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäure und ermöglicht eine Detektion der DNA-Fragmente bei Anregung mit UV-Licht (Le Pecq and Paoletti 1966). Zur Größenbestimmung der Fragmente wird ein DNA Größenstandard im Gel mitaufgetrennt. Die definierte Fragmentgröße gibt eine eindeutige Aussage darüber, in welcher Allelform das Gen vorliegt, was wiederum auf die Art des Genotyps schließen lässt.

Zur Bestimmung des CAII Genotyps gelten folgende Fragmentgrößen:

Wildtyp-Allel (wt)	162 und 34	Basenpaare
Mutanten-Allel(ko)	195	Basenpaare
Heterozygote Allelform	162, 34 und 195	Basenpaare

Zur Bestimmung des CAIV Genotyps gelten folgende Fragmentgrößen:

Wildtyp-Allel (wt)	350	Basenpaare
Mutanten-Allel(ko)	200	Basenpaare
Heterozygote Allelform	350 und 200	Basenpaare

5.2 Murine Spermienpräparation

Die Maus wird mit Isofluran sediert und durch einen Genickbruch getötet. Der Ductus epididymidis und der Ductus deferens werden von Fett und begleitenden Blutgefäßen freipräpariert und in HS-Puffer gewaschen. Je nach Versuchshintergrund wird der Genitaltrakt separiert und in eine mit HS-Puffer (0,5-1 ml) gefüllte Petrischale überführt. Der Ductus deferens wird mit einer Pipette ausgestrichen. Die Nebenhodenabschnitte werden mehrmals mit der Schere eingeschnitten. Es folgt das 20 minütige Ausschwimmen („swim-out“) der Spermien bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Anschließend wird die Spermiesuspension zweimal mit HS-Puffer gewaschen. Hierfür wird sie auf vier Eppendorfgefäße verteilt, mit HS-Puffer aufgefüllt und bei 300 x g 3 min zentrifugiert. Nach jedem Waschschrift werden zwei Spermienpellets vereint, sodass am Ende ein Eppendorfgefäß mit dem gesamten Spermienpool vorliegt.

5.2.1 Zellzählung

Mittels Neubauer-Zählkammer wird die Zellkonzentration bestimmt und anschließend die Zellsuspension auf eine Endkonzentration von $1-2 \times 10^7$ Zellen pro ml verdünnt. Hierfür werden 10 µl der Spermiesuspension in die Zählkammer pipettiert und vier Eckquadrate gezählt. Der Mittelwert wird mit dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche (1 mm²) und definierter Kammerhöhe (0,1 mm) multipliziert. Das Ergebnis ergibt die Zellzahl pro µl. Die im HS-Puffer gepoolte Spermiesuspension ist Ausgangsmaterial für die folgenden Experimente.

5.3 Immunoblotting

Das Immunoblotting ist eine Methode für den spezifischen Nachweis von Proteinen. Die nach dem Zellaufschluss gewonnenen Proteine werden in einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es folgt ein Transfer, der sog. Blot (Southern 1975), auf eine Nitrozellulosemembran. Der Blot ermöglicht es, auf der Membran immobilisierte Proteine mittels geeigneter Antikörper zu identifizieren.

5.3.1 Proteinaufreinigung und Konzentrationsbestimmung

Für die Proteingewinnung aus Spermien und Gewebe ist ein mechanischer Zellaufschluss notwendig. Das gepoolte Spermienpellet wird nach dem letzten Waschschrift in einem kleinstmöglichen Puffervolumen resuspendiert und 1:1 mit 2 x Lämmli-Puffer versetzt.

Der anschließende Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm, 15 min, 4 °C, führt zum Aufschluss der Zellen. Das im Lämmli enthaltene Detergenz SDS denaturiert die in Lösung gegangenen Proteine. Der proteinreiche Überstand wird in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und im Immunoblot eingesetzt.

Die zu testenden Gewebe werden in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß mit 200-500 µl Homogenisierungspuffer (abhängig von der Gewebegröße) überführt. Mit Hilfe eines Stößels erfolgt der mechanische Aufschluss. Sowohl durch das Arbeiten auf Eis als auch durch das im Homogenisierungspuffer enthaltene DTT und Triton™ X 100 werden die freigesetzten Proteine konserviert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis werden Zellfragmente in einem Zentrifugationsschritt pelletiert (13.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Je nach Reinheitsgrad des Überstandes wird der Zentrifugationsschritt wiederholt. Bevor im nächsten Schritt die Proteinfraction mit 2 x Lämmli-Puffer (Verhältnis 1:1) versetzt und denaturiert wird, werden 2,5 µl der Fraction für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung dient zum einen der Erfolgskontrolle der Proteinaufreinigung, zum anderen dem Einsatz gleicher Proteinmengen unterschiedlicher Gewebeproben im Western Blot. Die BCA Methode beschreibt eine quantitative photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Smith et al., 1985). Zweiwertige Kupferionen reagieren durch die Anwesenheit von Proteinen zu einwertigen Kupferionen, die wiederum mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Die Bildung von einwertigen Kupferionen korreliert mit der Menge an Protein in der Lösung, weshalb die Absorption des violetten Komplexes bei 562 nm eine Aussage über die Proteinkonzentration zulässt.

Für die Bestimmung wird ein BCA-Protein Assay Kit verwendet. Die gewonnene Proteinlösung wird 1:10 mit autoklaviertem Wasser verdünnt. 27,5 µl der verdünnten Lösung wird mit 200 µl der Gebrauchslösung versetzt. Diese setzt sich zusammen aus dem Reagenz A (bicinchoninsäurehaltig) und Reagenz B (kupferhaltig), die im Verhältnis 50:1 angesetzt werden. Ein Kontrollansatz, der für den Nullabgleich am Photometer notwendig ist, besteht aus Homogenisierungspuffer und wird ebenfalls mit der Gebrauchslösung versetzt. Die Proben inkubieren 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Es folgt die Absorptionsmessung am BSA-geeichten Photometer. Zur Bestimmung der Endkonzentrationen werden die Werte mit den Verdünnungsfaktoren multipliziert (1:10 Verdünnung mit Wasser 1:1, Verdünnung mit Lämmli-Puffer).

5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die komplexe Proteinlösung wird in einer SDS-Elektrophorese aufgetrennt. Das im Lämmli-Puffer enthaltene SDS bewirkt die Denaturierung von Proteinen, da durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen Sekundär- und Tertiärstrukturen verloren gehen. Des Weiteren erfolgt eine negative Aufladung der Proteine proportional zur Masse (1,4 g SDS pro g Protein). Dies bewirkt eine unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Für die Aufspaltung der noch verbliebenen Disulfidbrücken werden die Proben mit 5% Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 100 °C gekocht, bevor sie in die Geltaschen eines 4-12% Bis-Tris-Gels pipettiert werden. Für die spätere Identifizierung der Proteingröße werden ebenfalls 7 µl Proteingrößenstandard separat ins Gel aufgetragen. Als Laufpuffer dient der MES-Puffer. Die Elektrophorese läuft 40 min bei 200 V und 120 mA.

5.3.3 Western Blot

Im Western Blot werden die zuvor im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Burnette 1981). Dabei bleibt das elektrophoretische Auftrennungsmuster erhalten. Der Aufbau der Blotkammer erfolgt nach einer genau definierten Reihenfolge, zwei Watte pads, ein Filterpapier, das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, ein Filterpapier und zwei Watte pads. Alle Komponenten werden vor dem Blotaufbau 30 min in Transfer-Puffer eingeweicht, um den anschließenden Blot möglichst luftblasenfrei zusammenzubauen und somit einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten. Ebenfalls wird die Blotkammer mit Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Blot läuft 90 min bei 25 V, 160 mA und 17 Watt. Die Nitrozellulosemembran wird 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, bevor zur Kontrolle eine Gesamtproteinfärbung mit Ponceau-Rot (5 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler) durchgeführt wird. Die Membran wird durch drei Waschschriffe mit Aqua dest. für jeweils 5 min wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungen der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wird die Membran eine Stunde in einer 5% Slim-Fast/TBS-Pufferlösung geblockt. Der Primärantikörper (Hase anti-Maus CAII-Antikörper bzw. Ziege anti-Maus CAIV-Antikörper, 1:1000 in 10% Roti Block/Aqua dest.) inkubiert über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Nach drei Waschschriffen mit TBS-Puffer, erfolgt die Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (Esel anti-Hase IgG-HRP-Antikörper bzw. Esel anti-Ziege IgG-HRP-Antikörper, 1:10000 in TBS-T) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Für den gemeinsamen Proteinnachweis von

CAII und CAIV erfolgt die Inkubation des Sekundärantiköpers in zwei Schritten, um Kreuzreaktionen der Antikörper auszuschließen. In diesem Fall inkubiert zuerst der Esel anti-Ziege IgG-HRP-Antikörper, gefolgt von drei Waschschritten in TBS-T-Puffer, bevor der zweite Esel anti-Hase IgG-HRP-Antikörper für 1 h inkubiert. Die Membran wird anschließend dreimal 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Für die Detektion des HRP-gekoppelten Sekundärantiköpers mittels Chemilumineszenz wird der ECL Western Blotting Kit eingesetzt. Im Verhältnis 1:1 werden die Reagenzien auf die Membran pipettiert. Die Chemilumineszenz entsteht durch die Oxidation von Luminol durch die Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 . Die freiwerdende Lichtemission der Wellenlänge 428 nm wird mit dem ChemicDocTM XRS-Detektor und der ImageLab Software dokumentiert. Dabei bestätigen dunkle Proteinbanden auf der Membran die Anwesenheit des zu testenden Proteins. Mit Hilfe der Proteingröße, die durch den Vergleich mit dem Größenstandard ermittelt wird, kann das Protein identifiziert werden. Die weitere Bearbeitung des Blots erfolgt mit der Adobe Photoshop Software.

5.4 Histologie

5.4.1 Anfertigen von silanisierten Objektträgern

Die Vorbehandlung der Objektträger mit Silan (3-aminopropyl-Triethylsilan) bewirkt eine Absättigung der negativ geladenen Silikat-Gruppen auf der Glasoberfläche. Da die später aufgetragenen Gewebeschnitte eine hohe Anzahl an negativ geladenen Gruppen als Bindungsstellen aufweisen, wird somit das Anhaften der Gewebeschnitte verbessert. Die Objektträger werden über Nacht in 5% HCl-Lösung gereinigt. Anschließend erfolgt ein Waschschriff für 5 min in Aqua dest., bevor die Objektträger für 5 min in 100% Ethanol überführt werden. Die luftgetrockneten Objektträger inkubieren im nächsten Schritt 5 min in einer 2% Silan-Lösung, die in Aceton angesetzt wird. Es folgen zwei Inkubationsschritte für jeweils 5 min in 2% Aceton in Aqua dest. Ein letzter Waschschriff in Aqua dest. für 5 min schließt sich an, bevor die Objektträger über Nacht bei 100 °C im Wärmeschrank getrocknet werden. Die silanisierten Objektträger werden bis zu ihrem Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

5.4.2 Bouin- und Formalinfixierung

Die Maus wird getötet (s. Kapitel 5.2) und ihre Organe in die jeweilige Fixierungslösung überführt. Sowohl die Bouin- als auch die 4% Formalin-Gewebefixierung erfolgt über Nacht auf dem Schüttler. Die Bouin-Lösung wird für 24 h durch 70% 2-Propanol ersetzt,

bevor die Gewebe in einen automatisierten Entwässerungsautomat gegeben werden. Nach der Formalinfixierung werden die Gewebe zunächst über Nacht bei fließendem Leitungswasser gewässert bevor eine Inkubation in 70% 2-Propanol für 24 h stattfindet. Anschließend werden auch die formalinfixierten Gewebe in den Entwässerungsautomat überführt. Die automatisierte Entwässerung und anschließende Überführung in Paraffin beinhaltet folgende Inkubationsschritte:

Entwässerungsschritte und Inkubationszeiten der fixierten Gewebe:

80%	2-Propanol	3 h	1 x
96%	2-Propanol	3 h	1 x
100%	2-Propanol	3 h	1 x
	Methylbenzoat	3 h	3 x
	Paraffin	3 h	3 x

Von den in Paraffin ausgehärteten Gewebeblöckchen werden mit dem Historange Microtome ~5 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt, auf silanisierte Objektträger aufgetrocknet und im Wärmeschrank für 24 h getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung werden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur gelagert.

5.4.3 Methanolfixierung von Spermienausstrichen

Als Ausgangsmaterial für die Anfertigung von Spermienausstrichen dient die gewaschene Spermien suspension (s. Kapitel 5.2). Die Zelldichte wird kontrolliert und ggf. eine Verdünnung mit HS-Puffer hergestellt, bis die Spermien vereinzelt vorliegen. Jeweils 10 µl der Suspension werden auf einen silanisierten Objektträger pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Es folgt eine 15 minütige Fixierung in Methanol. Nachdem das Methanol an der Luft verdampft ist, werden die Spermienausstriche für maximal zwei Wochen im Kühlschrank bis zu ihrer Weiterverwendung gelagert.

5.4.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Routinefärbemethode zur Darstellung von Gewebestrukturen für morphologische Untersuchungen. Sie beruht auf zwei Einzelfärbungen. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau (z. B. DNA), während Eosin alle azidophilen Strukturen (z. B. Zellplasmaproteine) rot anfärbt. Die bouinfixierten Gewebeschnitte werden im ersten Schritt entparaffiniert:

Entparaffinierungsschritte:

Xylol		5 min	3 x
100%	2-Propanol	3 min	1 x
90%	2-Propanol	3 min	1 x
80%	2-Propanol	3 min	1 x
70%	2-Propanol	3 min	1 x
Aqua dest.		3 min	2 x

Es folgt eine 15 minütige Inkubation der Präparate in der Hämatoxylinlösung. Anschließend werden die Präparate 2 x 5 min in Aqua dest. gespült bevor sie für 10-15 s in HCl-Alkohol überführt werden. Die Differenzierung im HCl-Alkohol wird durch Aqua dest. Waschschritte (2 x 5 min) gestoppt. Die Präparate werden 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgt die zweiminütige Gegenfärbung mit Eosin. Die Präparate werden nochmals 3 x 5 min mit Aqua dest. gewaschen, zum Entwässern in einer Alkoholreihe (1 x 3 min 90% 2-Propanol; 1 x 3 min 100% 2-Propanol; 3 x 5 min Xylol) inkubiert und anschließend mit Depex eingedeckt.

5.4.5 Immunhistologie

Immunhistologische Methoden dienen dem spezifischen Nachweis und der Lokalisationsbestimmung einzelner Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Die immunzytochemische bzw. Immunfluoreszenz-Färbung erfolgt an fixierten Gewebeschnitten.

5.4.5.1 Immunzytochemische Färbung

Die Proteindetektion mittels immunzytochemischer Färbung ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Der spezifische Primärantikörper bindet an das Epitop des zu detektierenden Proteins und bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex aus. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den spezifischen Primärantikörper. Auf Grund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin wird dann ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat an den Komplex gekoppelt. Das gekoppelte Enzym löst bei Zugabe des Substrats eine Farbreaktion aus. Das Signal wird mittels Mikroskop detektiert und gibt Ausschluss über die Lokalisation des Proteins im Gewebe. Der Vorteil dieser indirekten Methode durch die Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern ist die Sensitivität. Eine zusätzliche Verstärkung des Signals wird durch die hohe Biotin-Avidin Affinität erzielt, da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Die Enzymkonjugation wird mit dem Vectastain® ABC Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Der Sekundärantikörper kann HRP- oder

AP-konjugiert sein. Die Meerrettichperoxidase (HRP) oxidiert das farblose Chromogen DAB zu einem braunen Endprodukt. Als Katalysator für die Reaktion dient Wasserstoffperoxid. Die alkalische Phosphatase (AP) spaltet Phosphatverbindungen und das Substrat (HistoRed) reagiert zu einem roten Endprodukt. Durch das Einsetzen von zwei unterschiedlichen Detektionssystemen ist es möglich, immunzytochemische Doppelfärbungen durchzuführen.

Die bouinfixierten Gewebeschnitte werden im ersten Schritt entparaffiniert:

Entparaffinierungsschritte:

Xylol		5 min	3 x
100%	2-Propanol	3 min	1 x
90%	2-Propanol	3 min	1 x
80%	2-Propanol	3 min	1 x
70%	2-Propanol	3 min	1 x
Aqua dest.		3 min	2 x

Die Präparate werden in PBS-Puffer überführt und 3 x 5 min gewaschen. Die methanolfixierten Spermienausstriche werden nicht entparaffiniert, sondern im ersten Schritt in PBS-Puffer (3 x 5 min) gewaschen. Zum Vorblocken der endogenen Peroxidase inkubieren die Schnitte mit Glukoseoxidase-Puffer für 45 min im Wasserbad bei 37 °C. Um das Austrocknen der Präparate zu verhindern, finden alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer statt. Der Primärantikörper (Hase anti-Maus CAII-Antikörper bzw. Ziege anti-Maus CAIV-Antikörper, 1:100) wird in PBS/5% BSA angesetzt, der zusätzlich zur Absättigung endogenen Biotins Avidin (1:300) enthält. Der Antikörper bindet über Nacht bei 4 °C. Es folgen drei Waschschrte mit PBS-Puffer bevor der biotinylierte Sekundärantikörper (Ziege anti-Hase IgG-Antikörper bzw. Esel anti-Ziege IgG-Antikörper, 1:200) in PBS/5% BSA und Biotin 1:50 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS-Puffer findet die Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Bindung mit dem Vectastain® Elite ABC Kit statt. Die Vectastain®-Gebrauchslösung wird bereits 30 min vor Verwendung angesetzt und inkubiert 30 min auf den Gewebeschnitten. Das Vectastain® wird mit TBS-Puffer abgespült. 50 µl TBS-Puffer verbleiben auf den Präparaten. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 50 µl reaktivem DAB gestartet, unter dem Mikroskop verfolgt und bei ausreichender Färbung (1-2 min) mit Aqua dest. gestoppt. DAB, sowie alle mit DAB kontaminierten Gebrauchsgegenstände werden zur Inaktivierung in Natriumhypochlorid gespült. Die Präparate werden zum Waschen in PBS-Puffer überführt (3 x 5 min). Für die

einfache Immunfärbung erfolgt im nächsten Schritt bereits die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Ehrlich. Die Präparate inkubieren für 1 min im Hämatein, 40 s in Aqua dest. und abschließend 5 min in Leitungswasser. Das Hämatein (oxidiertes Hämatoxylin) bindet durch Chelatbildung an Phosphatgruppen der DNA und bildet in Gegenwart von mehrwertigen Kationen einen dunkelblauen Farbkomplex aus. Anschließend werden die Gewebeschnitte entwässert und mit Depex eingedeckt.

Entwässerungsschritte:

70%	2-Propanol	3 min	1 x
80%	2-Propanol	3 min	1 x
90%	2-Propanol	3 min	1 x
100%	2-Propanol	3 min	1 x
Xylol		5 min	3 x

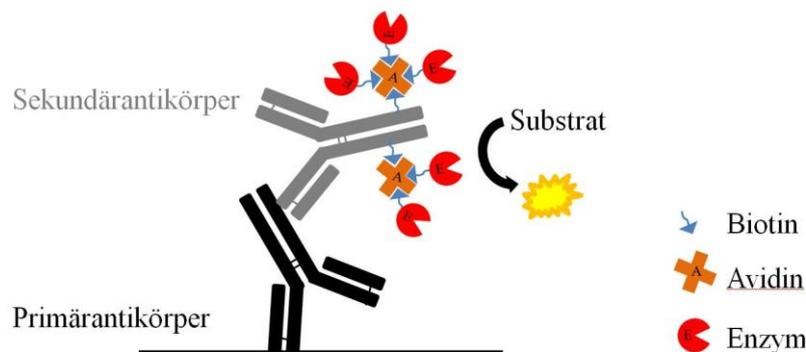


Abbildung 8: Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung nach der Biotin-Avidin Methode

Der Primärantikörper bindet spezifisch das Epitop des nachzuweisenden Proteins. Ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat bildet mit dem gegen den primär-gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper einen Komplex. Bei Zugabe des Substrats findet durch die Bindung des Enzyms an Stelle der Komplexbildung eine Farbreaktion statt.

Für die immunzytochemische Doppelfärbung werden die mit PBS-Puffer gewaschenen Präparate nach der ersten Enzymreaktion mit HRP mit dem zweiten Primärantikörper (Hase anti-Maus CAII-Antikörper bzw. Ziege anti-Maus CAIV-Antikörper, 1:100) in PBS/5% BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrritten erfolgt eine 30 minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Ziege anti-Hase IgG-Antikörper bzw. Esel anti-Ziege IgG-Antikörper, 1:200) in PBS/5% BSA bei Raumtemperatur. Es folgen drei Waschschrritte mit PBS-Puffer für jeweils 5 min. Die Enzymkonjugation und -reaktion erfolgt mit Hilfe des Vectastain® ABC-AP Kit. Die Vectastain®-Gebrauchslösung wird 30 min vor Gebrauch angesetzt und inkubiert 30 min auf den Gewebeschnitten. Die Präparate werden mit Tris HCl-Puffer überspült und 50 µl

der angesetzten HistoRed-Substratlösung jeweils auf die Präparate pipettiert. Die Farbereaktion wird wieder unter dem Mikroskop beobachtet und bei gewünschter Signalintensität (8-10 min) durch spülen mit Aqua dest. gestoppt. Nach drei Waschschritten in PBS-Puffer erfolgen wie bereits bei der einfachen Immunfärbung beschriebene Kernfärbung, Entwässerung und Eindecken (s.o.). Die Analyse und Dokumentation der Präparate erfolgt am Lichtmikroskop und mit Hilfe der Cell^D Software.

5.4.5.2 Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Immunfluoreszenz-Färbung basiert ebenfalls auf dem Prinzip der Primär- und Sekundärantikörperbindung. Der Unterschied liegt darin, dass der Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Das fluoreszenzmarkierte Protein wird mit einem Laser-Scan-Mikroskop detektiert. Der physikalische Hintergrund beruht auf der Tatsache, dass durch die Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge das Fluorophor einen elektrisch angeregten Zustand erreicht und beim spontanen Zurückfallen in den Grundzustand ein Teil dieser Energie als Lichtemission, die sog. Fluoreszenz, abgegeben wird (Lottspeich and Engels 2012). Ein Teil der freiwerdenden Energie wird auch als nicht strahlende Relaxation frei. Aus diesem Grund ist die Emission in Bezug auf die Absorption immer in einen langwelligeren Lichtbereich verschoben. Die Wellenlängendifferenz zwischen Absorption und Emission wird als Stokes Shift bezeichnet. Jedes Fluorophor besitzt ein für es charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum (Lottspeich and Engels 2012). Für die Doppelfluoreszenzfärbung von CAII und CAIV wurden die Fluorophore Alexa Fluor® 488 und Indocarbocyanin (Cy3) verwendet. Alexa Fluor® 488 hat sein Absorptionsmaximum bei 495 nm und sein Emissionsmaximum bei 519 nm. Cy3 dagegen wird mit einer Wellenlänge von 550 nm angeregt und emittiert Licht von 570 nm (Lottspeich and Engels 2012). Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der zur Kernfärbung eingesetzt wird, absorbiert UV-Licht (358 nm) und besitzt sein Emissionsmaximum bei 461 nm (Tanious et al., 1992). Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgt an einem Laser Scan Mikroskop mit der EZ-C1 3.40 Software von Nikon. Ein Laser erzeugt monochromatische Lichtstrahlen. Die Verwendung unterschiedlicher Laser (violetter Diodenlaser, blauer Argon-Ionen-Laser, grüner HeNe-Laser) ermöglicht es, Lichtstrahlen für die verschiedenen Absorptionsmaxima der Fluorophore (DAPI, Alexa Fluor 488, Cy3) künstlich zu erzeugen (Lottspeich and Engels 2012). Das Emissionslicht wird mit den entsprechenden Detektoren (Blau, Grün, Rot) detektiert.

Die formalinfixierten Gewebeschnitte werden zunächst entparaffiniert (s. Kapitel 5.4.5.1). Die Präparate werden 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen und inkubieren über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Ziege anti-Maus CAIV-Antikörper, 1:100 in PBS/5% BSA). Die Spermienausstriche werden nur in PBS-Puffer gewaschen bevor der Primärantikörper inkubiert. Es folgen drei Waschschrte mit PBS-Puffer sowie eine 60 minütige Inkubation mit dem Cy3 markierten Sekundärantikörper (Esel anti-Ziege IgG-Antikörper, 1:200 in PBS/5% BSA) bei Raumtemperatur. Ab diesem Zeitpunkt verlaufen alle Inkubationsschritte im Dunkeln. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS-Puffer erfolgt ein Vorblocken mit 5% Ziegenserum in PBS für 45 min bei Raumtemperatur. Der zweite Primärantikörper (Hase anti-Maus CAII-Antikörper, 1:100 in PBS/5% BSA) inkubiert über Nacht bei 4 °C. Nach den Waschschrten, 3 x 5 min PBS-Puffer, schließt sich die Inkubation des zweiten Alexa Fluor® 488 Sekundärantikörpers (Ziege anti-Hase IgG-Antikörper, 1:200 in PBS/5% BSA) an. Nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Gewebeschnitte gewaschen (3 x 5 min mit PBS) und es folgt eine 15 minütige DAPI (1:1000 in Aqua dest.) Kernfärbung. Die DAPI-Lösung wird in drei PBS Waschschrten entfernt und die Präparate werden mit Vectashield® luftblasenfrei eingedeckt. Die Auswertung erfolgt an einem Laser Scan Mikroskop von Nikon. Zur Kontrolle der morphologischen Gestalt der Gewebe bzw. Zellen wird außer den Einzel-Fluoreszenz-Aufnahmen ebenfalls eine Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Aufnahme gemacht. Die Fluoreszenzbilder werden mit der EZ-C1 3.40 Software von Nikon zusammengefügt und bearbeitet.

5.5 Quantitative Real Time-PCR

Die qRT-PCR beruht auf der gleichen Methode wie die herkömmliche qualitative PCR, wo es durch die Verwendung spezifischer Primer zu einer Vervielfältigung der gewünschten Nukleinsäure kommt. Durch den Einsatz von cDNA, die zuvor mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wird, spiegelt das Ergebnis nicht die Gen-, sondern die RNA-Menge des zu untersuchenden Proteins wider. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Amplifizierung in Echtzeit dargestellt wird. Die Echtzeitquantifizierung erfolgt durch den Einsatz von Fluoreszenz markierten TaqMan®-Sonden. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die erhaltenen relativen Expressionswerte geben anschließend Aufschluss über die CAII, CAIV und CAXIV Expression in den verschiedenen Geweben des männlichen Genitaltrakts.

5.5.1 RNA-Isolierung

Zur Bestimmung der RNA-Menge in den verschiedenen Geweben des männlichen Genitaltraktes ist eine RNA-Aufreinigung Grundvoraussetzung. Die RNA-Isolierung erfolgt mit RNAPure. Gewebestücke von Niere, Hoden, Caput, Corpus und Cauda epididymidis und Ductus deferens werden in 200 µl RNAPure überführt und mittels Stößel homogenisiert. Das lysierte Gewebe inkubiert 5 min bei Raumtemperatur. Um die störende genomische DNA zu fällen, wird im nächsten Schritt 40 µl Chloroform hinzugegeben, die Suspension 15 s geschüttelt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der folgende Zentrifugationsschritt (12.000 x g für 5 min bei 4 °C) führt zu einer Phasentrennung zwischen Protein- und RNA-Fraktion. Der wässrige RNA-haltige Überstand wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 0,5 µl Glykogen versetzt. Es folgt eine RNA-Fällung durch 1:1 Mischung mit 2-Propanol. Die Suspension inkubiert weitere 15 min auf Eis bevor sich ein Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min, 4 °C) anschließt. Der Überstand wird verworfen und das RNA-haltige Pellet 2 x mit 500-1000 µl 75% Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschsritten erfolgt jeweils ein Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min, 4 °C). Das gewaschene RNA-Pellet wird im Anschluss in 10 µl H₂O resuspendiert. Um den Lösungsvorgang der RNA zu begünstigen, wird die Suspension bei 55 °C im Heizblock für maximal 30 min erhitzt. Bevor die aufgereinigte RNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert wird, erfolgt eine photometrische Konzentrationsbestimmung.

5.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung wird die optische Dichte bei dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA und RNA), das einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm entspricht, gemessen. Eine optische Dichte von eins bei 260 nm entspricht dabei 40 µg/ml RNA. Für die Konzentrationsbestimmung wird eine 1:60 Verdünnung der frisch gewonnen RNA-Probe mit Wasser hergestellt und für die Messung eingesetzt.

Des Weiteren wird eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Es wird ebenfalls die Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm bestimmt, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Der resultierende Quotient aus 260/280 gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der gewonnenen RNA-Fraktion. Ein Wert von 2,0 spricht für eine reine RNA-Probe. Werte unter zwei sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen bzw. genomischer DNA und sollten nicht für die folgende Transkription und qRT-PCR eingesetzt werden.

5.5.3 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wird im nächsten Schritt in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese sog. Transkription wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase durchgeführt. Die eingesetzten Random Primer, die aus zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen, binden an die eukaryotische RNA und dienen als Startpunkt für die Synthese des cDNA-Stranges. Der für die Reaktion verwendete High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit ist von Applied Biosystems® und besteht aus RT-Puffer, Reverse Transkriptase, dNTP-Mix und Random Primer. Die Reaktion wird in einem StepOnePlus™ Real Time PCR Gerät durchgeführt. Der Mastermix für einen Ansatz und das Protokoll für den Cyclor lauten wie folgt:

Pipettierschema eines 20 µl Reverse Transkriptase-Ansatzes:		
10 x RT-Buffer		2,00 µl
dNTP Mix 100 mM		0,80 µl
10 x RT Random Primers		2,00 µl
<u>Reverse Transkriptase</u>	<u>[50U/µl]</u>	<u>1,00 µl</u>
		10,00 µl
RNA-Probe	[2 µg]	10,00 µl

Reverse Transkriptase-Protokoll:

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	∞

Die synthetisierte cDNA dient als Ausgangsmaterial für die anschließende qRT-PCR und kann bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

5.5.4 qRT-PCR

Die Quantifizierung von cDNA erfolgt nach der qRT-PCR Methode von Applied Biosystems®. Die verwendeten TaqMan®-Sonden sind mit einem fluoreszenzmarkierten Reporter-Molekül und einem Quencher-Molekül gekoppelt. Bei einer intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reportes durch den Quencher unterdrückt. Sowohl die Sonde als auch die spezifischen Primer binden nach der Denaturierungsphase an die vorliegende einzelsträngige cDNA. Die Taq-Polymerase nutzt die Primer als Startpunkt für die Synthese des Gegenstrangs. Gleichzeitig baut die Taq-Polymerase die Sonde durch ihre zusätzliche 5'-3'-ExonukleaseAktivität ab. Mit dem Abbau der Sonde wird der Quencher vom Reporter-Molekül gelöst und Fluoreszenzlicht wird frei. Dabei steigt die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR proportional mit der Menge des PCR-Produktes an

(Abbildung 9). Die folgende Datenanalyse erfolgt quantitativ und relativ. Es wird ein sog. Schwellenwert (C_t -Wert) bestimmt, der den PCR-Zyklus angibt, bei dem die Fluoreszenzintensität die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Der C_T -Wert wird sowohl für die untersuchende Probe als auch für eine endogene Kontrolle bestimmt. Als endogene Kontrolle dient die 18S RNA, die konstitutiv in jedem Zelltyp vorliegt. Aus beiden Werten wird ein ΔC_t ermittelt. Zusätzlich wird ein ΔC_t -Wert für eine Referenz-Probe berechnet. Als Referenz wird Gewebe gewählt, von dem bekannt ist, das gewünschte Gen zu exprimieren. In diesem Fall wurde Nierengewebe als Referenz eingesetzt. Der ΔC_T -Wert der zu untersuchenden Probe wird in Relation zum ΔC_t -Wert der Referenz gesetzt. Es resultiert ein $\Delta\Delta C_t$ -Wert aus dem ein RQ-Wert wie folgt ermittelt wird:

$$RQ = \frac{1}{2^{\Delta\Delta C_t}}$$

Der RQ-Wert der Referenz-Probe wird normiert und erhält immer einen RQ-Wert von eins. Neben der relativen Quantifizierung der verschiedenen Gene im Wildtyp werden auch mögliche Expressionsunterschiede zwischen den Geweben von Wildtyp- und Knockout-Mäusen untersucht.

Zur Beantwortung der Frage um ein Wievielfaches größer die Menge an RNA eines Gens in den zwei unabhängigen Proben ist, werden die gemittelten ΔC_T -Werte des Knockout-Gewebes von den jeweiligen mittleren ΔC_T -Werten des Wildtyp-Gewebes für die Berechnung des $\Delta\Delta C_t$ -Wert herangezogen. Das Ergebnis gibt das Verhältnis der RNA-Menge im Gewebe von Knockout-Mäusen zur RNA-Menge im Gewebe von Wildtyp-Mäusen an.

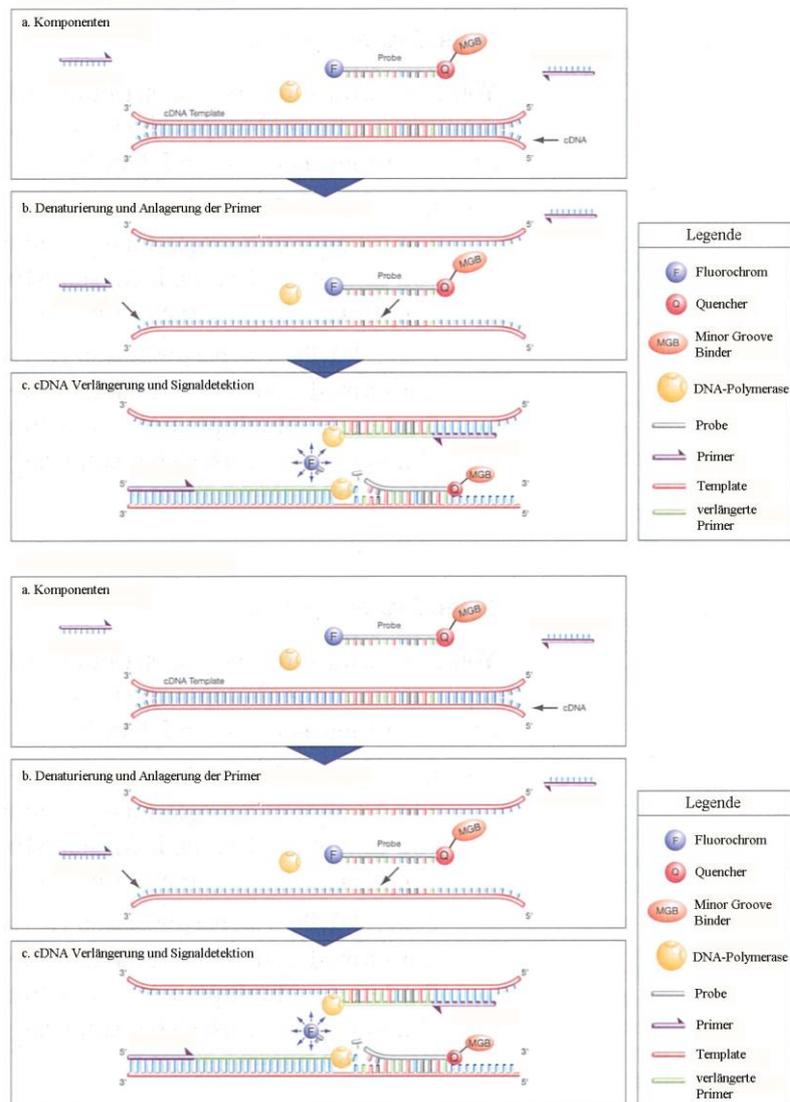


Abbildung 9: Modell der qRT-PCR Methode von Applied Biosystems® (Getting Started Guide, Applied Biosystems®)

Nach der Denaturierungsphase lagern sich die Primer und die TaqMan®-Sonde an die cDNA. Die Fluoreszenz der intakten TaqMan®-Sonde wird zu Beginn durch den Quencher unterdrückt. Die Taq-Polymerase baut während der Nukleinsäuresynthese die Sonde ab und die Fluoreszenz wird frei. Dabei steigt die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR proportional zur Menge des PCR-Produktes an.

Die umgeschriebene cDNA dient als Template für die folgende qRT-PCR. Die Reaktion wird in einem StepOnePlus™ Thermocycler von Applied Biosystems® durchgeführt. Die Mastermixzusammensetzung und das dazugehörige Protokoll lauten wie folgt:

Pipettierschema eines 20 µl qRT-PCR-Ansatzes:		
TaqMan® Fast Advanced Master Mix		10,00 µl
RNase-freies H ₂ O		8,00 µl
CAII/CAIV/CAXIV TaqMan® Gene Expression Assay		1,00 µl
bzw.		
18S RNA Assay		1,00 µl
		19,00 µl
Template		1,00 µl

qRT-PCR Protokoll:			
95°C	20 s		1x
95°C	1 s	}	40x
60°C	20 s		
4°C	∞		

Die anschließende Datenauswertung erfolgt mit der entsprechenden StepOnePlus™ Software von Applied Biosystems®. Für die graphische Darstellung der gemittelten RQ-Werte wird die SigmaPlot® Software verwendet.

5.6 Computer Assisted Sperm Analysis

Die Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) ist die standardisierte und routinemäßige klinische Untersuchung von humanen Ejakulatproben. Sie gibt Aufschluss über die Spermienpopulation hinsichtlich Zellkonzentration, Motilität und Bewegungsmuster und damit über die Fertilität eines Mannes. Die Klassifizierung der Spermienmotilität erfolgt nach folgenden Kriterien der WHO:

Klasse a:	schnell lineare progressive Spermien ($\geq 25 \mu\text{m/s}$ bei 37°C)
Klasse b:	langsam progressive Spermien ($< 20 \mu\text{m/s}$, $\geq 5 \mu\text{m/s}$)
Klasse c:	nicht progressive (ortsständige) Spermien ($< 5 \mu\text{m/s}$)
Klasse d:	immotile Spermien

Durch Änderungen in der CASA Softwareeinstellung, in Hinsicht auf die morphologische Gestalt und Größe der zu messenden Zellen, ist es möglich auch murine Spermatozoen zu analysieren. Die Klassifizierung der Motilität liefert einen Gesamtüberblick der Spermienpopulation.

Das gewaschene Spermienpellet (s. Kapitel 5.2) wird in 100 µl HS/BSA-Puffer aufgenommen und im Heizblock bei 37°C inkubiert. 20 µl der Suspension werden in die

auf 37 °C vorgeheizte CASA Zählkammer pipettiert. Das im Puffer enthaltene BSA sättigt Glykoproteine an der Zelloberfläche ab und verhindert damit das Anhaften der Spermien am Glasboden der Zählkammer. In einer Messung werden insgesamt 200 Spermien aus zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern in 20-facher Vergrößerung gemessen. Dabei ist die MedeaLab CASA Software in der Lage, einzelne Spermienzellen zu detektieren, deren Verlauf zu verfolgen und aufzuzeichnen. Aufgrund der Bewegungsmuster der Spermien werden sie im Folgenden den unterschiedlichen WHO Klassen zugeordnet und prozentual in einem Spermioogramm dargestellt. Die Ergebnisse, die mittels SigmaPlot® graphisch ausgewertet werden, sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

5.7 CA Aktivitätsmessung

Die CA Enzymaktivität wird mit einem Quadrupol Massenspektrometer bestimmt. Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende Probe mittels einer Wolfram Elektrode ionisiert. Die Selektion der entstandenen ionisierten Moleküle erfolgt über deren Flugeigenschaft im Quadrupol. In dem bestehenden Wechselfeld wird das Molekül über sein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis [m/q] detektiert und definiert. Zur Bestimmung der CA Aktivität in Spermatozoen wird die enzymatische Eigenschaft des Proteins ausgenutzt. Durch die Verwendung von markiertem Kohlenstoff (^{13}C) gelöst in schwerem Wasser (H_2^{18}O) kann der CA katalysierte Zerfall während den ablaufenden Hydrations- und Dehydrations-Reaktionen von CO_2 und HCO_3^- verfolgt werden (Badger and Price 1989). Es kommt zum Austausch des markierten ^{18}O Sauerstoffs von $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ über $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ zu $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ und somit zur Massenabnahme des Moleküls. In Abbildung 10 sind die Hydrations- und Dehydrations-Reaktionen von CO_2 und HCO_3^- , sowie die Massenzahlen der Anfangs-, Intermediär- und Endprodukte dargestellt.

Ergebnisteil präsentiert. Der Vergleich zwischen Spermien von Wildtyp- und CAII Knockout-Mäusen gibt Aufschluss über den Einfluss der CAII Aktivität an der CA Gesamtaktivität.

5.8 Schlagfrequenzanalyse

Mit der Schlagfrequenzmessung ist es möglich, die Spermienmotilität auf Einzelzellniveau zu untersuchen. Murine Spermien adhären durch Glykoproteine in der Plasmamembran mit dem Kopf auf Glasoberflächen. Für die Analyse wurden adhärente Spermien, deren Schwanz allerdings frei beweglich war, gewählt. Die Zellen werden mittels kontinuierlicher Perfusion (220 $\mu\text{l}/\text{min}$) stimuliert, was es ermöglicht, schnelle Schlagfrequenzänderungen im zeitlichen Verlauf zu messen. Um den Einfluss von CO_2 an Spermien zu analysieren, wird ein Mikroskop Inkubator System verwendet. Der abgeschlossene Kammerinnenraum wird durch Einleiten von CO_2 gesättigt. Des Weiteren werden die eingeleiteten Puffer mit CO_2 angereichert.

Die Spermien werden, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, präpariert und aufgereinigt. 10 μl der gewaschenen Spermiesuspension werden in eine Fluoro Dish Schale pipettiert. Die Zellen inkubieren 3-4 min, um die Adhärenz der Zellen zu gewährleisten, bevor sie mit 3 ml des gewünschten Puffers vorsichtig umspült werden. Die Messung wird an einem inversen Lichtmikroskop mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv durchgeführt. Nach Auswahl eines geeigneten Gesichtsfeldes erfolgt die Bildaufnahme (1000 x 400 Pixel) mit einer Motion-Scope M3-mono fast speed Kamera. Die Motion Studio 64 Software speichert die mit 300 Hz aufgenommene Bildfolge als Tif Dateien. Aus der aufgenommenen Bildfolge werden im Folgenden einzelne Spermien, sog. „region of interest“ (ROI) mit der Software ImageJ ausgewählt, ausgeschnitten und kontrastiert. In Abbildung 11A ist eine Zeitserie aus fünf Einzelbildern zur Darstellung des periodischen Verlaufs eines Bewegungszyklus nach der Bearbeitung mit ImageJ dargestellt. Mit der MetaMorph Software wird ein Überlagerungsbild aus zwei Einzelbildern erstellt, das den minimalen und maximalen Schwanzausschlag eines Bewegungszyklus definiert. Die anschließende Schlagfrequenzanalyse erfolgt mit einer halbautomatischen Analysesoftware, die für das Programm Igor Pro geschrieben wurde (Wennemuth et al., 2003). Das angefertigte Überlagerungsbild wird geladen und ausgerichtet (Abbildung 11B). Aufgrund der Kontrastunterschiede von Hintergrund und Spermium wird die Lage des Spermiumschwanzes entlang der „check-point“ Linie (Abbildung 11B schwarze Linie) erfasst und für die 300 Einzelbilder analysiert. Die zeitlichen Signale werden mittels

Fast-Fourier-Transformation in einem Frequenzspektrum mit sinusförmigem Verlauf dargestellt, aus dem die Frequenz des Spermischwanzes in Hz berechnet wird (Abbildung 11C). Die Ergebnisse, die mittels SigmaPlot® graphisch ausgewertet werden, sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

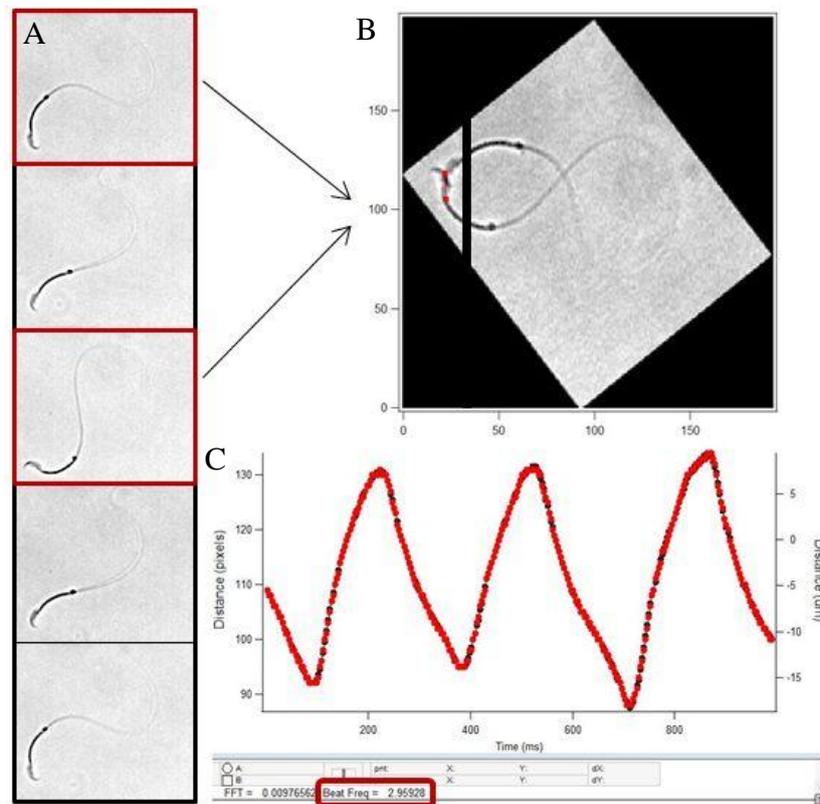


Abbildung 11: Methode der Schlagfrequenzanalyse

In A ist eine Zeitserie von 5 Einzelbildern zur Darstellung des periodischen Verlaufs eines Bewegungszyklus abgebildet. Die Aufnahme der gesamten 300 Einzelbilder erfolgt mit einer Motion-Scope fast speed Kamera. Das mit Metamorph erstellte Überlagerungsbild, das den minimalen und maximalen Schwanzausschlag eines Bewegungszyklus definiert, wird in der Igor Pro Software geladen und ausgerichtet (B). Aufgrund der Kontrastunterschiede von Hintergrund und Spermium wird die Lage des Spermiumschwanzes entlang der „check-point“ Linie (schwarze Linie) erfasst und die zeitlichen Signale mittels Fast-Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt (C).

5.9 Phospholipase C Behandlung der Spermien

Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine können durch Phospholipase C (PLC) Behandlung abgespalten werden (Ikezawa 2002). In den hier durchgeführten Experimenten soll die Inkubation der Spermien mit der aus *Bacillus cereus* gewonnenen PLC (Volwerk et al., 1989) zur Abspaltung der extrazellulär verankerten CAIV führen.

Die isolierten und gewaschenen Spermien werden auf eine Endkonzentration von 1×10^6 in 500 μ l HS-Puffer gebracht. Die Spermiesuspension wird mit 2 Units PLC versetzt und für 90 min im 38 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Kontrollspermien werden ohne Zusatz des Enzyms ebenfalls 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Um die CAIV Abspaltung mittels PLC zu überprüfen, werden zunächst Spermienausstriche angefertigt (s. Kapitel 5.4.3) und für eine immunhistologische CAIV Färbung eingesetzt (s. Kapitel 5.4.5.1). Des Weiteren erfolgt ein CAIV Proteinnachweis mittels Western Blot. Dafür wird die Probe nach der PLC Inkubation 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Da bei erfolgreicher CAIV Abspaltung das Protein im Überstand lokalisiert sein sollte, wird sowohl eine Proteinaufreinigung des Überstandes als auch des Spermienpellets durchgeführt. Nach der Überführung des Überstandes wird dieser, wie auch das Spermienpellet, 1:1 mit Homogenisierungspuffer versetzt. Nach der Proteinaufreinigung (s. Kapitel 5.3.1) erfolgt der Nachweis mittels Western Blot (s. Kapitel 5.3.2-3).

Für die Schlagfrequenzanalyse (s. Kapitel 5.8) wird nach der Inkubation mit PLC ebenfalls ein Zentrifugationsschritt (3 min, 300 x g) durchgeführt. Der Überstand wird verworfen und das Spermienpellet in einem minimalen HS-Puffervolumen aufgenommen.

5.10 [pH]_i Messung

Für die Bestimmung des [pH]_i in Spermatozoen während der Applikation verschiedener Puffer werden die Zellen mit dem pH-sensitiven Fluorescein-Derivat BCECF-AM (Abbildung 12) beladen.

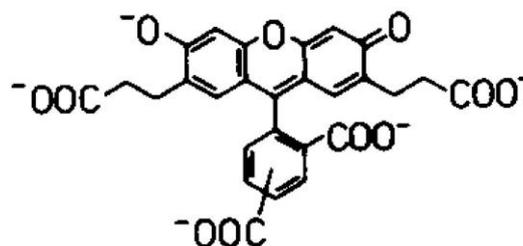


Abbildung 12: Strukturformel von BCECF (Rink et al., 1982)

Das membrangängige AM Derivat ist an den deprotonierten Carboxygruppen (R-COO⁻) mit Acetoxymethylgruppen (R-CH₂OCOCH₃) besetzt, die intrazellulär durch Esterasen abgespalten werden und das BCECF membranundurchlässig machen.

BCECF besitzt die Eigenschaft, bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Fluoreszenz abzugeben. Das Absorptionsmaximum liegt bei 505 nm, das Emissionsmaximum bei 535 nm. Zusätzlich ist BCECF pH sensitiv (Rink et al., 1982). Die pH-Abhängigkeit zeigt sich in der Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Exzitation steigt mit steigendem pH und spiegelt sich in dem resultierenden Emissionsspektrum bei 535 nm wider (Abbildung 13). Bei der Anregungswellenlänge von 436 nm ist der BCECF Farbstoff pH-unabhängig und besitzt somit bei 436 nm seinen isosbestischen Punkt. Die pH-Messung wird aus diesem Grund mit den Exzitationswellenlängen 488 nm und 436 nm durchgeführt. Der Quotient aus der Emission bei pH-abhängiger Anregung (488 nm) und der Emission bei Anregung des isosbestischen Punktes (436 nm) gibt den sog. Ratio-Wert an, der konzentrationsunabhängig und proportional zum pH-Wert ist.

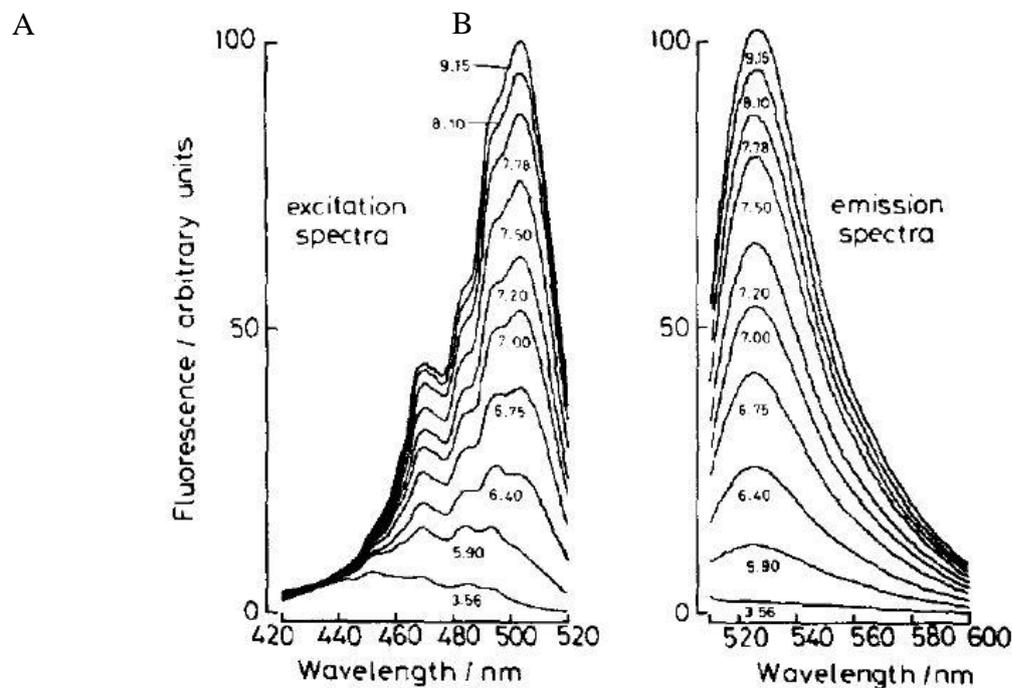


Abbildung 13: Exzitationsspektrum (A) und Emissionsspektrum (B) von BCECF bei gegebenen pH-Werten (Rink et al., 1982)

Bei der Anregungswellenlänge (excitation spectra) von 488 nm zeigt BCECF eine pH-Abhängigkeit. Diese Abhängigkeit ist ebenfalls bei der Emissionwellenlänge (emission spectra) von 535 nm zu verzeichnen. Das Fluoreszenzsignal wird stärker mit steigendem pH und lässt damit Rückschlüsse auf den $[pH]_i$ der Zelle zu.

Als Ausgangsmaterial für die BCECF Beladung dient die gewaschene und gepoolte Spermisuspension (s. Kapitel 5.2). Die Suspension wird auf eine Endkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml gebracht und anschließend 1:1 mit dem separat angesetzten BCECF-AM versetzt. Eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln ermöglicht es dem

membrangängigen Acetoxymethyl (AM) Derivat in die Zelle einzudringen. Ein anschließender Zentrifugationsschritt (300 x g, 3 min) sowie die Resuspendierung des Spermienpellets in frischem HS-Puffer dient zur Entfernung des überschüssigen extrazellulären BCECFs. Die Zellen inkubieren ein weiteres Mal für 20 min im Dunkeln. Während dieser Zeit werden die Acetoxymethylgruppen durch unspezifische eigene Esterasen abgespalten und verhindern somit das Ausschleusen des BCECF. Für die Messung werden 10 µl der Suspension auf ein Glasplättchen pipettiert, welches in eine Attofluor® Cell Chamber eingespannt ist. Die Zellen inkubieren 3 min, um eine Adhärenz zu gewährleisten und werden im Folgenden mit 3 ml des gewünschten Puffers vorsichtig umspült. Die Zellen werden an einem Nikon Eclipse TE2000-U Invertoskop mit einem 40-fach Objektiv untersucht. Für die $[pH]_i$ Analyse eines einzelnen Spermiums wird um den Spermienkopf eine ROI gesetzt, von der das Signal während der Messreihe aufgezeichnet wird. Für die Applikation verschiedener Substanzen wird eine lokal platzierte Perifusion verwendet. Die Anregung erfolgt mit einem Monochromator. Um Phototoxizität und Ausbleichen zu minimieren, wird zur Abschwächung des Anregungslichtes ein „neutral density filter“ zwischengeschaltet. Die Spermatozoen werden in einem 4000 ms Zyklus jeweils für 25 ms mit den Wellenlängen 436 nm und 488 nm angeregt. Das durch einen FITC-Filter geleitete emittierte Licht wird mittels Photomultiplier verstärkt und mit der AxoScope Software aufgezeichnet.

5.10.1 Kalibrierung

Um den Ratio-Werten einen definierten pH-Wert zuordnen zu können, ist zu Beginn eine Kalibrierung des Setups notwendig. Die Kalibrierung erfolgt mit dem Ionophor Nigericin (Thomas et al., 1979; Graber et al., 1986). Nigericin katalysiert den elektroneutralen K^+/H^+ Austausch und bewirkt somit eine Equilibrierung zwischen $[pH]_i$ und $[pH]_{ex}$ (Guffanti et al., 1979). Für die Eichmessung werden K-Puffer mit definierten pH-Werten (pH 5,0, 7,0 und 9,0) angesetzt, die zusätzlich 10 µM Nigericin enthalten. Die BCECF-beladenen Spermien werden mittels Perifusion mit den definierten K-Puffern umspült und das Fluoreszenzsignal nach Erreichen eines Plateaus ($[pH]_i = [pH]_{ex}$) detektiert. Die gemittelten Ratio-Werte aus 436 nm und 488 nm für die jeweiligen pH-Werte werden für die Bestimmung des pK_a herangezogen:

$$pK_a = pH - \log (R_{7,0} - R_{5,0}) / (R_{9,0} - R_{7,0})$$

Der pK_a -Wert ist notwendig, um mit Hilfe der folgenden Gleichung den undefinierten Ratio-Werten einen exakten pH-Wert zu zuordnen:

$$pH = 7,01 + \log (R_{\text{undef.}} - R_{5,0}) / (R_{9,0} - R_{\text{undef.}})$$

Die Eichung wurde einmalig zu Beginn der Versuchsreihe durchgeführt. Für die drei definierten pH-Werte wurden jeweils 25 Einzelzellmessungen analysiert, aus denen schließlich der pK_a -Wert berechnet wurde. Die Gleichung zur Bestimmung des pHs wurde dann im Folgenden für alle $[pH]_i$ Experimente angewendet.

5.11 Charakterisierung der CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse

5.11.1 Generierung der CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse

Für die weitere, detailliertere Analyse der CA in murinen Spermatozoen, im Besonderen der CAII und CAIV, werden CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse generiert. Auf Grund der unterschiedlichen Chromosomenlokalisierung des CAII (Chromosom 8) und des CAIV (Chromosom 17) Gens (Sly and Hu 1995), werden die Allelpaare nach der Unabhängigkeitsregel von Mendel getrennt voneinander weitergegeben. Das resultierende Verpaarungsschema ist in Abbildung 14 dargestellt. Durch die Aufspaltung und unabhängige Aufteilung der Allele entstehen bei der Kreuzung heterozygoter Tiere für beide Gene (F1) vier mögliche Gameten, die in der folgenden F2 Generation 16 mögliche Allelkombinationen zulassen. Die Kombinationsmöglichkeiten führen zu neun verschiedenen Genotypen die im Verhältnis 1:1:2:2:4:2:2:1:1 auftreten. Die Wahrscheinlichkeit das gewünschte CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Tier zu generieren beträgt damit 6,25% (Campbell and Reece 2003).

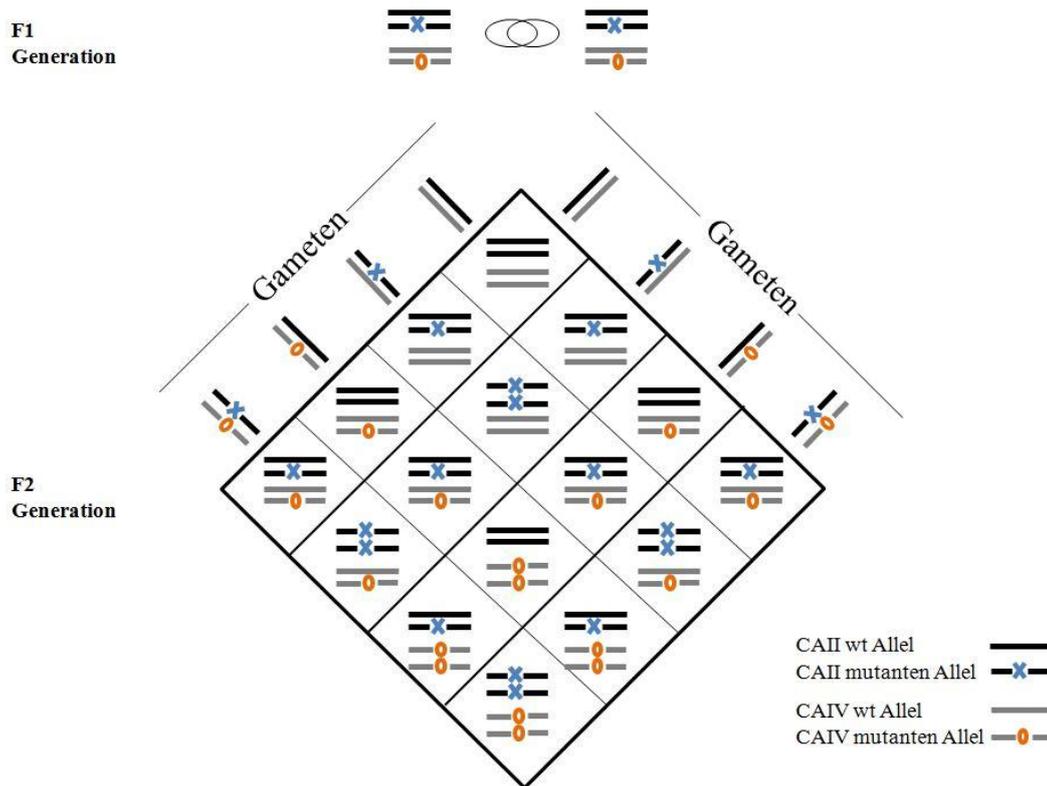


Abbildung 14: Verpaarungsschema mit den dazugehörigen Allelkombinationen zur Generierung von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

Nach der Unabhängigkeitsregel von Mendel entstehen vier unterschiedliche Gameten bei der Verpaarung von heterozygoten CAII CAIV Tieren. In der F2 Generation können 16 verschiedene Allelkombinationen auftreten. Die Wahrscheinlichkeit für ein CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Tier beträgt 6,25%.

5.11.2 Phänotypisierung der CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse

Um den Phänotyp der generierten CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Mäuse zu bestimmen, werden charakteristische Parameter wie Körpergewicht, Körpergröße sowie Organgewicht erfasst. Die Nachkommen werden ab der 3. Woche einmal wöchentlich bis zur 10. Woche gewogen. Zum Vergleich dienen Wildtyp-Nachkommen, die für denselben Zeitraum beobachtet werden. Im adulten Lebensalter werden die Doppelknockout-Tiere getötet und die Körpergröße im direkten Vergleich mit einem gleichaltrigen Wildtyp-Tier bestimmt und dokumentiert. Ebenso werden die Organgewichte von Niere und Hoden gemessen und verglichen.

5.11.3 Bestimmung der Keimepithelhöhe im HE-gefärbten Hodenschnitt

Zur Bestimmung der Keimepithelhöhe im Hoden von Wildtyp- und CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen werden die Gewebe gemeinsam präpariert, bouinfixiert, in Paraffin eingebettet (s. Kapitel 5.4.2) und HE-gefärbt (s. Kapitel 5.4.4). Von den

Präparaten werden lichtmikroskopische Aufnahmen einzelner Hodentubuli gemacht. Die Höhe des Keimepithels wird anschließend mittels Photoshop bestimmt. Hierfür wird ein rechtwinkliges Kreuz in den Hodentubulus eingezeichnet, wobei das Hodenlumen als Schnittpunkt dient. Entlang der Hilfslinien wird nun die Pixellänge von der Basalmembran bis zum Hodenlumen vermessen. Pro Tubulus werden somit vier Epithelstrecken, im Winkel von 90° bestimmt (Abbildung 15). Der berechnete Pixelmittelwert wird anhand eines definierten Pixels pro μm Einheit in die entsprechende Länge umgerechnet. In der 10-fachen Vergrößerung entsprechen 288 Px einer Länge von $100 \mu\text{m}$. Nach diesem Verfahren werden 130 Tubuli aus jeweils drei Tieren vermessen und die durchschnittliche Keimepithelhöhe in μm bestimmt. Die erhaltenen Mittelwerte werden graphisch mittels SigmaPlot® dargestellt.

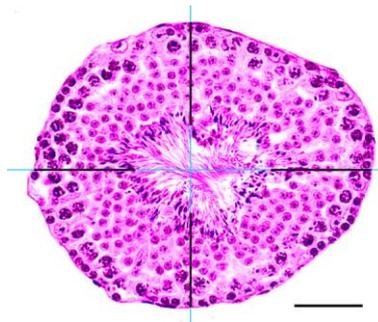


Abbildung 15: Standardisierte Analyse der Keimepithelhöhe in HE-gefärbten Hodenschnitten

Aus HE-gefärbten Hodenschnitten werden lichtmikroskopische Detailaufnahmen einzelner Hodentubuli angefertigt. Entlang der Hilfslinien (blaue Linien), die im 90° Winkel angeordnet sind, werden vier Keimepithelstrecken pro Tubulus (schwarze Linien) bestimmt. Die gemittelten Pixellängen werden in die entsprechende μm Länge umgerechnet. Bar = $50 \mu\text{m}$.

5.11.4 Fertilitätsanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

Um eine Aussage über die Fertilität der Doppelknockout-Mäuse treffen zu können, werden adulte CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Tiere mit Wildtyp-Tieren, gleichen Alters, verpaart. Dabei handelt es sich um Dauerverpaarungen, die für einen Zeitraum von 16 Wochen angesetzt werden. Während dieses Zeitraums wird die Anzahl der Nachkommen sowie der Quotient aus Nachkommen pro Verpaarungswoche als Parameter zur Charakterisierung der Fertilität herangezogen (Weissgerber et al., 2011). Zum Vergleich werden reine Wildtyp-Verpaarungen unter gleichen Bedingungen angesetzt.

5.12 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (\bar{x}) \pm Standardfehler (SEM) des Mittelwertes angeben. Die Mittelwerte und die daraus resultierenden Standardfehler werden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dabei beschreibt x das Ergebnis eines einzelnen Experimentes, n die Gesamtanzahl der Experimente und s die Standardabweichung der Stichprobe. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der ungepaarte t-Test mit Hilfe von SigmaPlot® verwendet. Das Signifikanzniveau (p) ist in den Abbildungen wie folgt angegeben:

signifikant $p \leq 0,05$ mit *

hoch signifikant $p \leq 0,01$ mit **

höchst signifikant $p \leq 0,001$ mit ***

6 Ergebnisse

6.1 CAII Knockout-Mäuse

6.1.1 Molekularbiologische Analysen

6.1.1.1 CAII und CAIV RNA-Expressionsmuster im männlichen Genitaltrakt der Maus

Das CAII Expressionsmuster im männlichen Genitaltrakt der Maus wurde mittels quantitativer Echtzeit PCR nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode ermittelt. In Abbildung 16 sind die gemittelten Ergebnisse mit Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

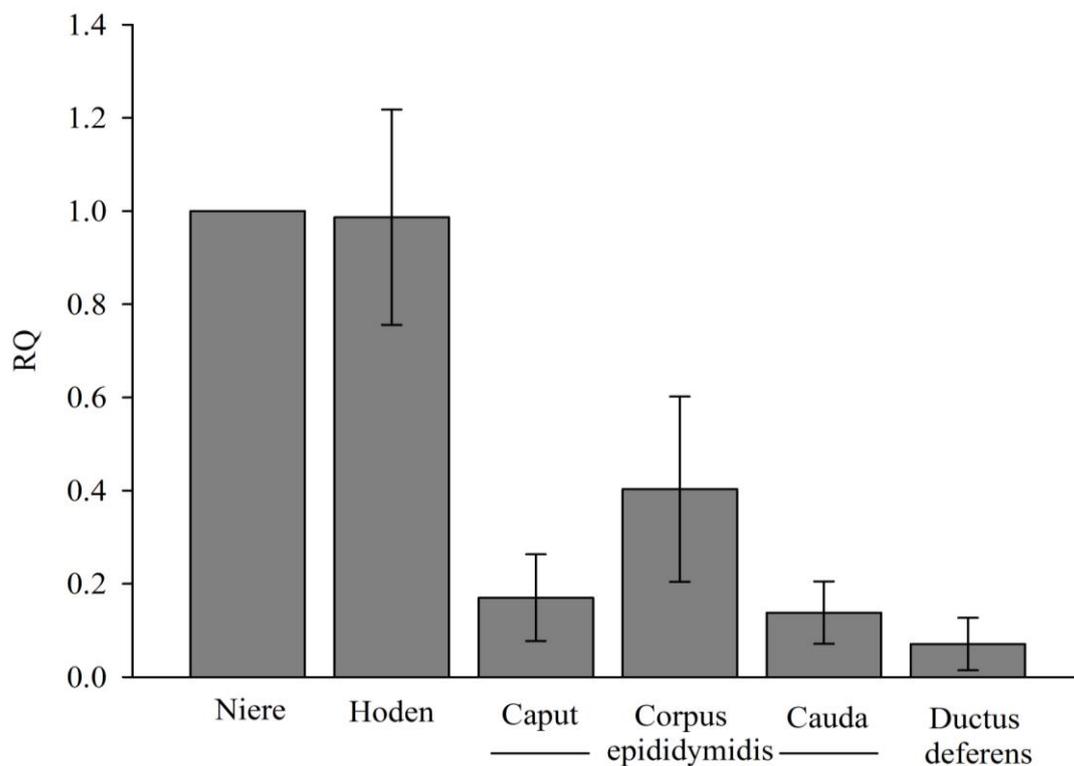


Abbildung 16: Relative CAII Expression im männlichen Genitaltrakt der Maus

Die relative CAII Expression wurde mittels qRT-PCR in den verschiedenen Geweben von Wildtyp-Mäusen ermittelt. Im Vergleich zur Niere, die als Referenz diente, ist sowohl im Hoden als auch in allen Nebenhodenabschnitten CAII mRNA detektierbar ($n = 3$).

Die Nierenreferenz zeigt einen RQ-Wert von eins. Im Vergleich findet eine konsequente CAII Expression sowohl im Hoden, als auch in den drei Abschnitten des Nebenhodens statt. Im Vergleich zur Niere beträgt der CAII spezifische RQ-Wert im Hoden $0,99 \pm 0,23$ und ist damit das Gewebe mit der höchsten CAII Expression im Genitaltrakt von Mäusen. Betrachtet man die RQ-Werte der verschiedenen Nebenhodenabschnitte, zeigt der Nebenhodenkopf mit einem RQ-Wert von $0,4 \pm 0,2$ das höchste CAII Expressionsniveau im Vergleich zur Niere. Der mittlere RQ-Werte im Nebenhodenkopf beträgt $0,17 \pm 0,09$

und im Nebenhodenschwanz $0,14 \pm 0,07$. Im Ductus deferens ist keine spezifische CAII mRNA messbar. Der gegen Null tendierende mittlere RQ-Wert im Ductus deferens beträgt $0,07 \pm 0,06$.

Um eine Überexpression von CAIV in CAII Knockout-Mäusen zu analysieren, wurde zuerst das CAIV Expressionsmuster im männlichen Genitaltrakt von Wildtyp-Mäusen bestimmt. Die gemittelten Ergebnisse mit Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 17 dargestellt. In Relation zum Nierengewebe ($RQ = 1$) ist CAIV nur im Corpus epididymidis exprimiert. Der gemittelte RQ-Wert beträgt $1,66 \pm 0,49$. Die mittleren RQ-Werte von Hoden ($0,016$), Caput ($0,003$) und Cauda epididymidis ($0,005$) und Ductus deferens ($0,014$) tendieren gegen Null.

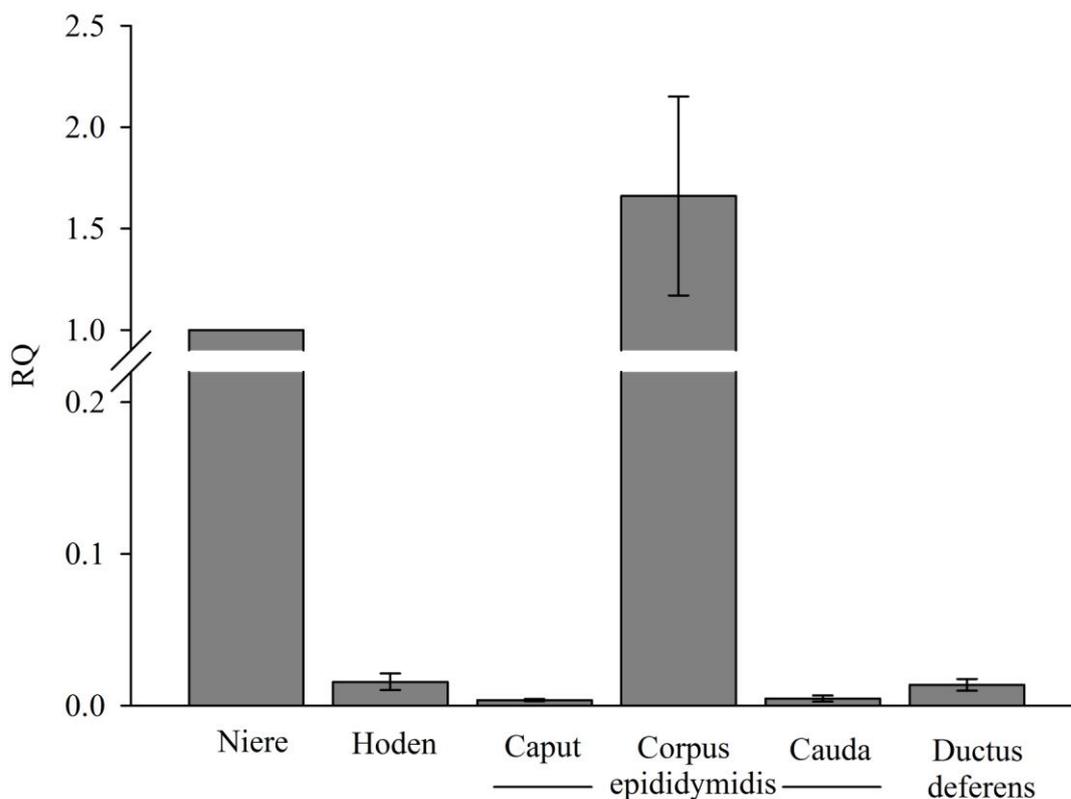


Abbildung 17: Relative CAIV Expression im männlichen Genitaltrakt der Maus
Mittels qRT-PCR wurde die relative CAIV Expression in den verschiedenen Geweben von Wildtyp-Mäusen bestimmt. Als Referenzgewebe diente die Niere, deren RQ-Wert auf eins festgesetzt wurde. Im Vergleich dazu ist nur im Corpus epididymidis eine CAIV Expression ($1,66 \pm 0,49$) nachweisbar ($n = 3$).

Im nächsten Schritt wurde die CAIV Expression in CAII Knockout-Tieren untersucht. Dafür wurde das Verhältnis zwischen den gemittelten ΔC_t -Werten berechnet und verglichen. Die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten für die Gewebe von Wildtyp- bzw. CAII Knockout-Mäusen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Dabei gibt

das Verhältnis an, um wievielfach größer die Expression von CAIV mRNA im Vergleich zum Wildtyp in den entsprechenden Geweben der Knockout-Mäuse ist. In der Niere von CAII Knockout-Mäusen liegt nur eine 0,66-fache CAIV mRNA-Expression vor wie in der vergleichbaren Niere von Wildtyp-Mäusen. Eine weitere CAIV mRNA-Reduktion ist im Hoden (0,42) und im Caput epididymidis (0,93) von CAII Knockout-Mäusen zu beobachten. Im Gegensatz dazu steigt die CAIV mRNA-Menge im Corpus epididymidis (1,17) und im Ductus deferens (1,11) von CAII Knockout-Mäusen leicht an. Der größte Expressionsunterschied ist in der Cauda epididymidis zu erkennen. Hier liegt in CAII Knockout-Tieren eine 5,22-fach höhere CAIV RNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vor.

Tabelle 1: Verhältnis der relativen CAIV mRNA-Mengen zwischen den Geweben von CAII Knockout- und Wildtyp-Mäusen.

	gemittelter ΔCt wt	gemittelter ΔCt ko	Verhältnis $1/2^{\Delta\Delta Ct}$
Niere	12,36 ± 0,19	12,96 ± 0,56	0,66
Hoden	18,53 ± 0,39	19,82 ± 0,15	0,42
Caput epididymidis	20,46 ± 0,37	20,55 ± 2,09	0,93
Corpus epididymidis	11,78 ± 0,29	11,55 ± 2,08	1,17
Cauda epididymidis	23,93 ± 3,30	21,61 ± 1,11	5,22
Ductus deferens	18,93 ± 0,61	18,77 ± 1,03	1,11

6.1.1.2 CAII Proteinnachweis mittels Western Blot

Zum CAII Proteinnachweis in den unterschiedlichen Geweben des männlichen Genitaltraktes der Maus und in isolierten Spermatozoen wurde die Western Blot Methode verwendet. Die aufgereinigten Gesamtproteinfraktionen wurden in einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Nachweis erfolgte mittels Immunreaktion mit einem spezifischen Antikörper gegen CAII. Die folgende Chemilumineszenzdetektion wurde durch Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt den CAII Proteinnachweis in den Geweben Niere, Hoden, Caput, Corpus und Cauda epididymidis, Ductus deferens (jeweils 30 µg Gesamtprotein) und isolierten Spermien aus der Cauda epididymidis und dem Ductus deferens (25 µl Proteinsuspension). Zum Vergleich wurden die Gewebefractionen einer Wildtyp-Maus (wt) und die einer CAII Knockout-Maus (ko) nebeneinander im SDS-Gel aufgetragen. Das CAII Protein besitzt ein Molekulargewicht von 28 kDa und kann sowohl in der

Positivkontrolle als auch in allen Geweben des männlichen Genitaltraktes der Wildtyp-Maus nachgewiesen werden. Auch isolierte Spermien aus der Wildtyp-Maus zeigen ein positives CAII Signal in Höhe von 28 kDa. In den entsprechenden Gewebefractionen der CAII Knockout-Maus und in der Spermienfraktion (ko) ist kein CAII Protein nachweisbar.

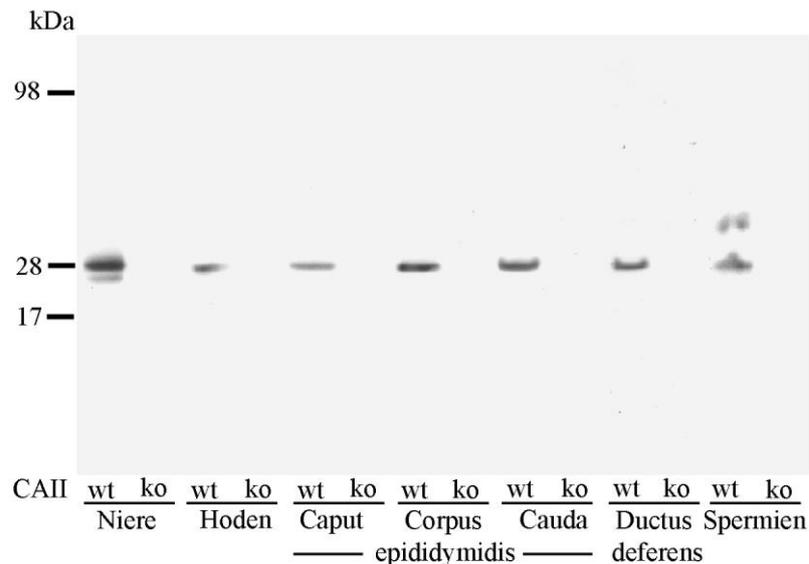


Abbildung 18: CAII Proteinnachweis im männlichen Genitaltrakt und in isolierten Spermien der Maus mittels Western Blot

Der Immunoblot zeigt ein positives CAII Signal in Höhe von 28 kDa in allen Gewebefractionen der Wildtyp-Maus (wt). Ebenfalls ist ein positives CAII Signal in Spermien der Wildtyp-Maus nachweisbar. Die Gewebe und Spermien der CAII Knockout-Maus (ko) zeigen kein CAII Signal.

6.1.1.3 Immunhistochemische CAII Proteinlokalisierung im Gewebe des männlichen Genitaltraktes und in isolierten Spermien

Für die Lokalisationsbestimmung wurde an Gewebeschnitten des männlichen Genitaltraktes der Maus eine immunhistochemische DAB-Färbung durchgeführt. In Abbildung 19 ist der CAII Proteinnachweis an Gewebeschnitten der Niere, die als Positivkontrolle dienen, gezeigt. Die Aufnahmen zeigen das Ergebnis der DAB-Färbung an Gewebe einer Wildtyp- (CAII^{+/+}) und einer CAII Knockout-Maus (CAII^{-/-}). Das Nierengewebe der CAII^{+/+} Maus (A) weist eine deutliche Immunreaktion mit CAII Antikörpern auf. Einzelne Zellen im Tubulussystem der Nierenrinde sind CAII positiv. Anhand der vergrößerten Detailaufnahme (a) ist zu erkennen, dass es sich bei der CAII um ein intrazellulär lokalisiertes Protein handelt. In der Niere der CAII^{-/-} Maus ist keine CAII Immunreaktion nachweisbar (B, b). Es ist nur eine Blaufärbung der Zellkerne durch Hämatoxylin erkennbar.

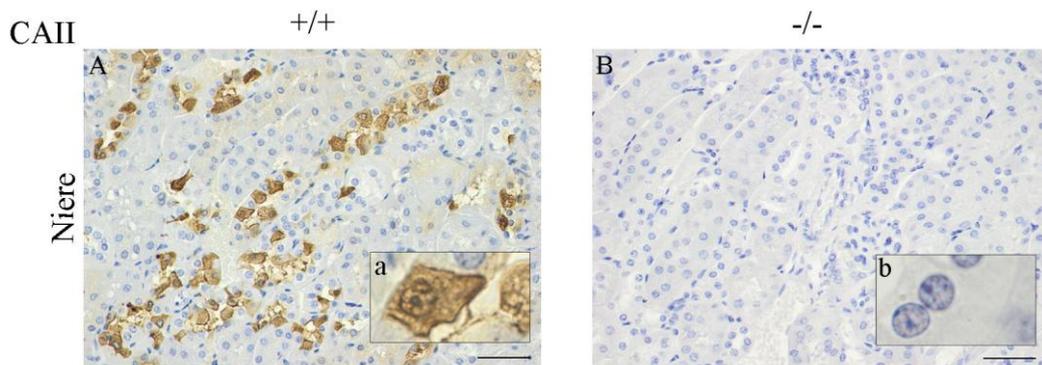


Abbildung 19: Immunhistochemische Lokalisation von CAII in der Niere

Ein positives CAII Signal ist in einzelnen Epithelzellen des Tubulussystems im Nierenrindbereich der Wildtyp-Maus (A, a) nachweisbar. Das Gewebe der CAII Knockout-Maus (B, b) zeigt kein spezifisches CAII Signal. A, B Bar = 50 μm ; a, b Bar = 10 μm .

Die CAII Lokalisation im Hoden und in den einzelnen Abschnitten des Nebenhodens ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Abbildungen in der linken Spalte zeigen das Gewebe der Wildtyp-Maus (CAII^{+/+}: A, a, C, c, E, e, G, g) und sind dem Gewebe der CAII Knockout-Maus in der rechten Spalte (CAII^{-/-}: B, b, D, d, F, f, H, h) gegenübergestellt. Die Inserts (a-h) zeigen höhere Vergrößerungen aus der jeweiligen Übersichtsaufnahme. Ein spezifisches CAII Signal ist im Gewebe der Wildtyp-Maus innerhalb elongierter Spermatozoen (A, a), in vereinzelt Epithelzellen des Caput (C, c) und der Cauda epididymidis (G, g) sowie im gesamten Epithel des Corpus epididymidis (E, e) lokalisiert. Die Betrachtung des Corpus epididymidis in höherer Vergrößerung (e) zeigt des Weiteren ein CAII Signal auf der apikalen Membranoberfläche entlang der Stereozilien. Die im Lumen lokalisierten Spermien zeigen ebenfalls ein CAII Signal. Die korrespondierenden Gewebe aus der CAII Knockout-Maus weisen kein CAII spezifisches Signal auf und zeigen ausschließlich die blaue Kernfärbung.

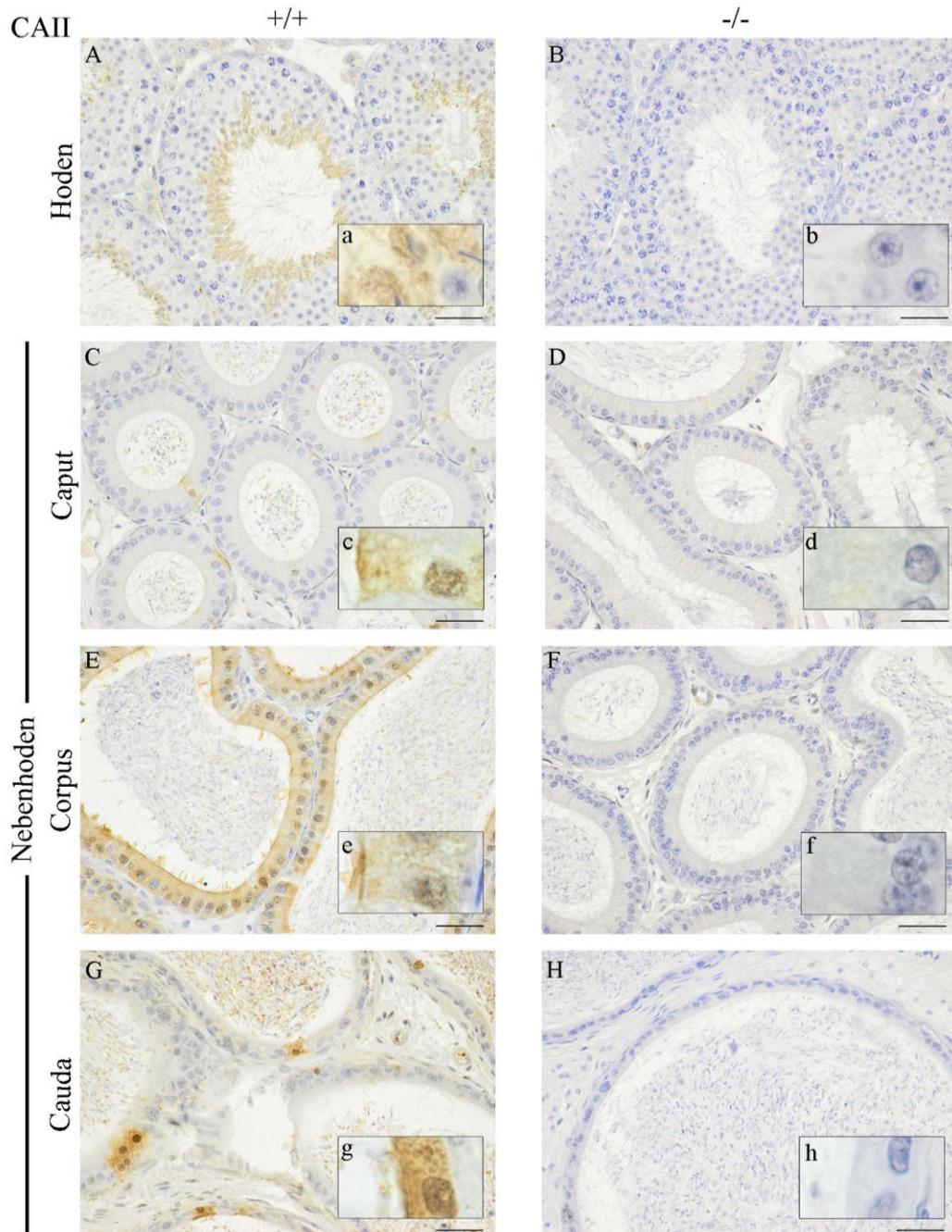


Abbildung 20: Immunhistochemische Lokalisation von CAII im Hoden und Nebenhoden
 Im Gewebe der Wildtyp-Maus ist CAII in elongierten Spermatischen des Hodens (A, a), in vereinzelt Epithelzellen im Caput (C, c) und der Cauda epididymidis (G, g) sowie im gesamten Epithelgewebe und im Stereoziliengeflecht des Corpus epididymidis (E, e) lokalisiert. Adluminal lokalisierte Spermien zeigen ebenfalls ein positives CAII Signal. Keine CAII Detektion ist im Gewebe der CAII Knockout-Maus (B, b, D, d, F, f, H, h) zu erkennen. A-H Bar = 50 µm; a-h Bar = 10 µm.

In Abbildung 21 ist der CAII Proteinnachweis an Gewebeschnitten des Ductus deferens dargestellt. Die Gewebe der CAII^{+/+} (A, a) und der CAII^{-/-} Maus (B, b) zeigen keine spezifische CAII Immunreaktion. Auch in den höheren Vergrößerungen (a, b) ist kein CAII Signal zu erkennen.

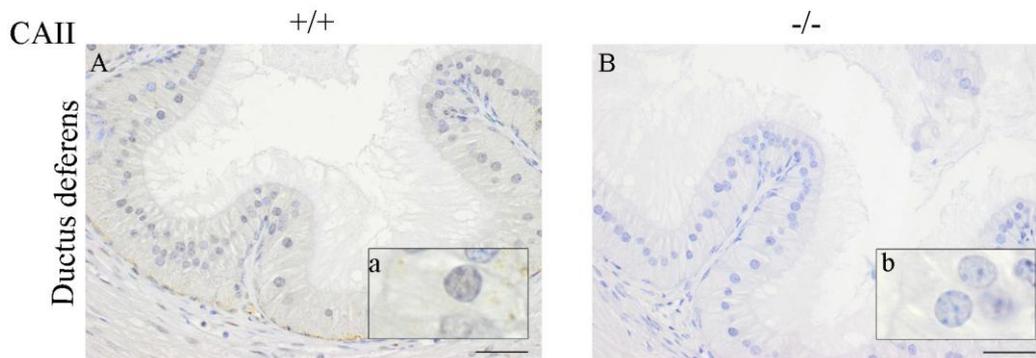


Abbildung 21: Immunhistochemische Lokalisation von CAII im Ductus deferens
Die DAB-Färbung zeigt weder im Gewebe der Wildtyp- (A, a) noch in der CAII Knockout- (B, b) Maus ein spezifisches CAII Signal. A, B Bar = 50 µm; a, b Bar = 10 µm.

Abbildung 22 zeigt das Verteilungsmuster von CAII in Spermien aus den verschiedenen Nebenhodenabschnitten (Caput, Corpus und Cauda epididymidis) einer Wildtyp- und Knockout-Maus. In Spermien der Wildtyp-Maus (CAII^{+/+}: A, a, C, c; E, e) ist das CAII Signal im Haupt- und Endstück nachweisbar. Die höheren Vergrößerungen (a, c, e) zeigen die intrazelluläre Lokalisation des Proteins. In Spermien, welche aus dem Nebenhodenschwanz isoliert wurden, ist CAII auch im Akrosom lokalisiert (E, e). In Spermien einer CAII Knockout-Maus (CAII^{-/-}: B, b, D, d, F, f) kann CAII nicht nachgewiesen werden.

Die molekularbiologischen Analysen zeigen, dass in Spermien von CAII Knockout-Mäusen kein CAII Proteinsignal nachweisbar ist. Aus diesem Grund wird im Folgenden die fachlich korrekte Beschreibung „Spermien von CAII Knockout-Mäusen“ durch „CAII Knockout-Spermien“ bzw. „CAII^{-/-} Spermien“ zur besseren Verständlichkeit teilweise ersetzt. Äquivalent wird für Spermien von Wildtyp-Mäusen der Begriff „Wildtyp-Spermien“ bzw. „CAII^{+/+} Spermien“ verwendet.

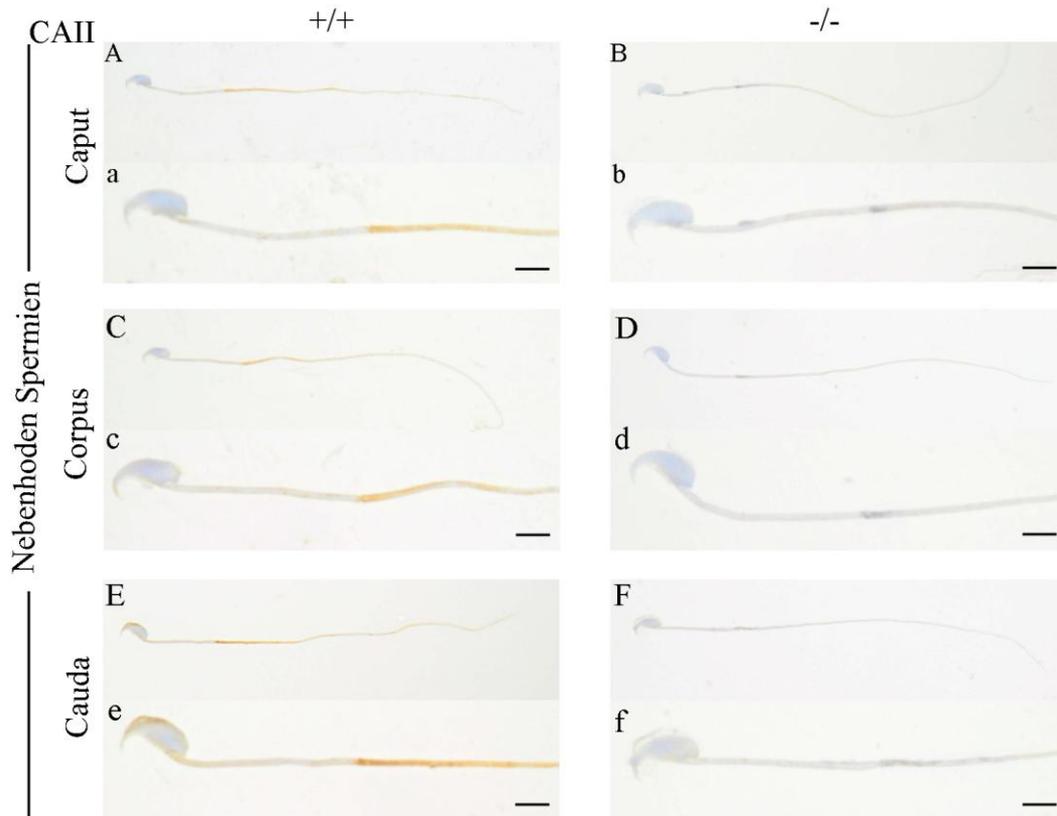


Abbildung 22: Immunhistochemische Lokalisation von CAII in Spermien
Spermien einer Wildtyp-Maus (A, a, C, c, E, e), isoliert aus den Nebenhodenabschnitten Caput, Corpus und Cauda epididymidis, zeigen alle das gleiche CAII Proteinmuster im Zytosol des Haupt- und Endstücks. In den Spermien der CAII Knockout-Maus (B, b, D, d, F, f) ist kein CAII nachweisbar. A-F Bar = 10 µm; a-f Bar = 4 µm.

6.1.2 Funktionsanalytische Methoden

6.1.2.1 Reduzierte CA Gesamtaktivität in Spermien von CAII Knockout-Mäusen

Die Analyse der CA Gesamtaktivität erfolgte mittels Massenspektrometrie. Durch den Einsatz von in schwerem Wasser (H_2^{18}O) gelöstem markiertem Kohlenstoff (^{13}C) wurde über den CA katalysierten Zerfall die Enzymaktivität der CA bestimmt. Zum Vergleich wurden $\text{CAII}^{+/+}$ Spermien für die Bestimmung der Gesamtaktivität und $\text{CAII}^{-/-}$ Spermien für die Bedeutung der CAII an der Gesamtaktivität analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengefasst. Die CA Gesamtaktivität in $\text{CAII}^{+/+}$ Spermien beträgt $5,19 \pm 0,2$ U/ml ($n = 12$). $\text{CAII}^{-/-}$ Spermien weisen eine CA Aktivität von $1,84 \pm 0,07$ U/ml ($n = 16$) auf. Es resultiert in Spermien von CAII Knockout-Mäusen eine höchst signifikante Reduktion der CA Gesamtaktivität um 65%.

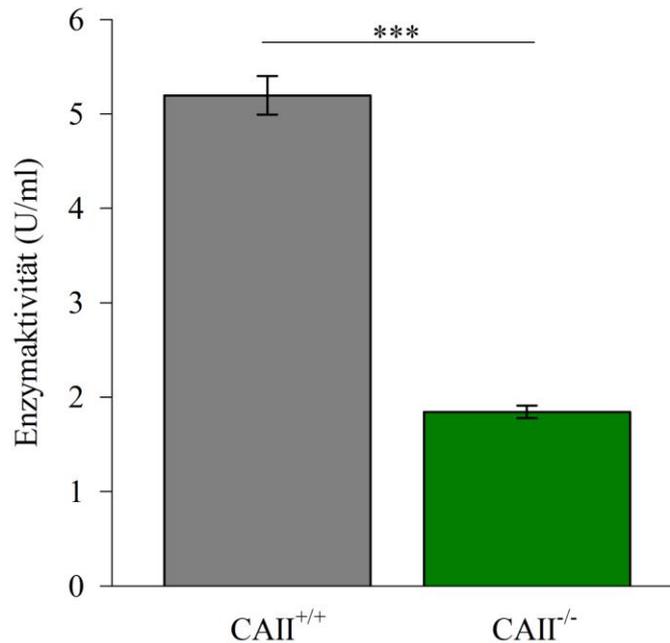


Abbildung 23: CAII Aktivität in murinen Spermien

CAII^{-/-} Spermien zeigen in der massenspektrometrischen Analyse mit $1,84 \pm 0,07$ U/ml eine Reduktion von 65% der CA Gesamtaktivität im Vergleich zu CAII^{+/+} Spermien ($5,19 \pm 0,2$ U/ml) ($n \geq 12$).

6.1.2.2 Signifikante Unterschiede der CAII Knockout-Spermienpopulation in den CASA Parametern

Die CASA Methode dient zur Analyse der Spermiengesamtpopulation. Die automatisierte Software ermittelt verschiedene Parameter hinsichtlich der Spermienmotilität und der Zellzahl. Zum Einsatz kamen sowohl Wildtyp- als auch CAII Knockout-Spermien (Abbildung 24). CAII^{-/-} Spermien ($n = 20$) zeigen im Mittel eine Geschwindigkeit von $19,79 \pm 1,36$ $\mu\text{m/s}$, CAII^{+/+} Spermien ($n = 38$) eine Geschwindigkeit von $28,77 \pm 1,29$ μm . Hinzu kommt, dass der prozentuale Anteil motiler, schnell progressiver und träge progressiver Spermien in CAII^{-/-} Mäusen signifikant um 36% bzw. 46% bzw. 26% reduziert ist. Der Anteil an motilen Spermien in CAII^{-/-} Tieren beträgt $31,45 \pm 2,3\%$ und der Anteil an schnell progressiven $13,45 \pm 1,29\%$. Im Gegensatz dazu steigt im CAII^{-/-} Tier der prozentuale Anteil immotiler Spermien von $14,45 \pm 1,77\%$ in CAII^{+/+} auf $24,7 \pm 2,8\%$ in CAII^{-/-} Mäusen. Dies entspricht einer Erhöhung um 43%. Ein weiterer Parameter, der mittels CASA erfasst wird, ist die Spermienkonzentration in Mio/ml, jedoch zeigt sich kein Unterschied in der Spermienkonzentration zwischen CAII^{+/+} ($27,38 \pm 2,95$ Mio/ml) und CAII^{-/-} ($26,23 \pm 2,11$ Mio/ml) Mäusen.

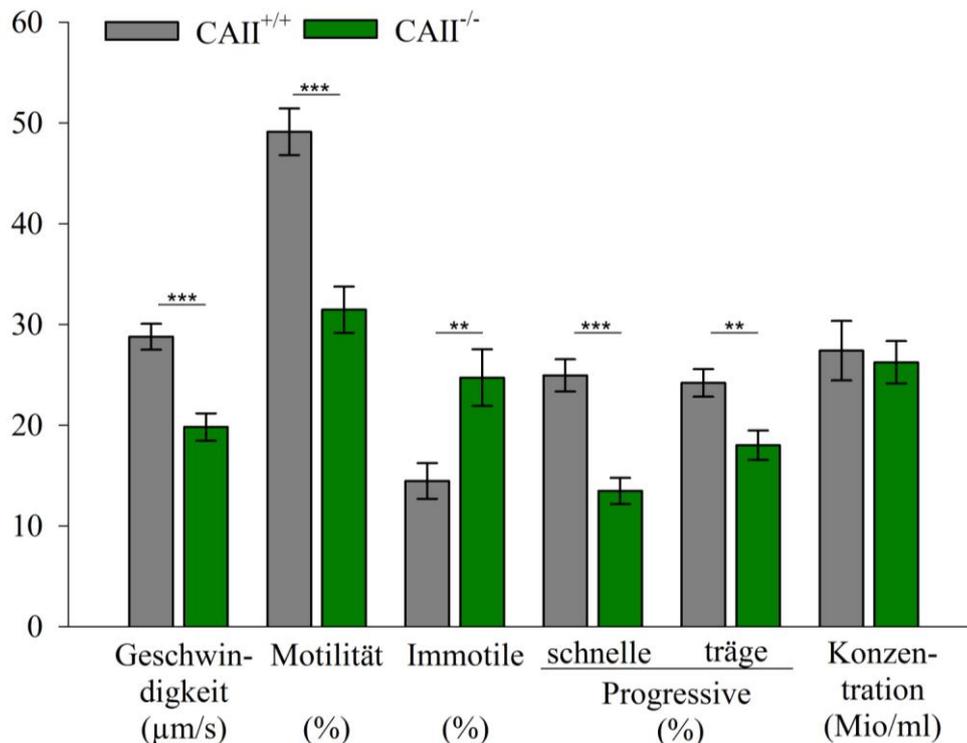


Abbildung 24: Reduzierte Motilität der Spermien von CAII Knockout-Mäusen

In der CASA Analyse zeigen Spermien von CAII Knockout-Mäusen eine Reduktion in der durchschnittlichen Geschwindigkeit (31%), im prozentualen Anteil motiler (36%), schnell progressiver (46%) und träge progressiver (26%) Zellen. Der Anteil immotiler Spermien steigt dagegen in CAII Knockout-Tieren um 43% signifikant an. In der Spermienkonzentration ist kein Unterschied zwischen CAII^{+/+} und CAII^{-/-} Mäusen zu beobachten ($n \geq 20$).

6.1.2.3 Verzögerte HCO₃⁻ und CO₂ Antwort in Spermien von CAII Knockout-Mäusen

Mit Hilfe der Schlagfrequenzanalyse kann die Spermienmotilität auf Einzelzellniveau untersucht werden. Im folgenden Experiment wurde die Änderung der Schlagfrequenz von CAII^{+/+} und CAII^{-/-} Spermien nach dreiminütiger Inkubation in HCO₃⁻-freiem HS-Puffer und nach Stimulation mit HCO₃⁻-haltigem (15 mM) HS-Puffer (Abbildung 25) untersucht. CAII^{+/+} ($n = 35$) und CAII^{-/-} ($n = 35$) Spermien zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Grunds Schlagfrequenz. Die in HS gemessene Grunds Schlagfrequenz beträgt in CAII^{+/+} Spermien $3,18 \pm 0,09$ Hz und in CAII^{-/-} Spermien $2,99 \pm 0,1$ Hz.

Die Inkubation in HCO₃⁻-haltigem HS-Puffer erhöht die Schlagfrequenz. CAII^{+/+} Spermien erreichen nach 3 min eine maximale Frequenz von $7,62 \pm 0,15$ Hz, während CAII^{-/-} Spermien eine Frequenz von $5,73 \pm 0,2$ Hz aufweisen. Es ist somit ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Spermien von Wildtyp- und CAII Knockout-Tieren in der HCO₃⁻ vermittelten Schlagfrequenzerhöhung zu beobachten.

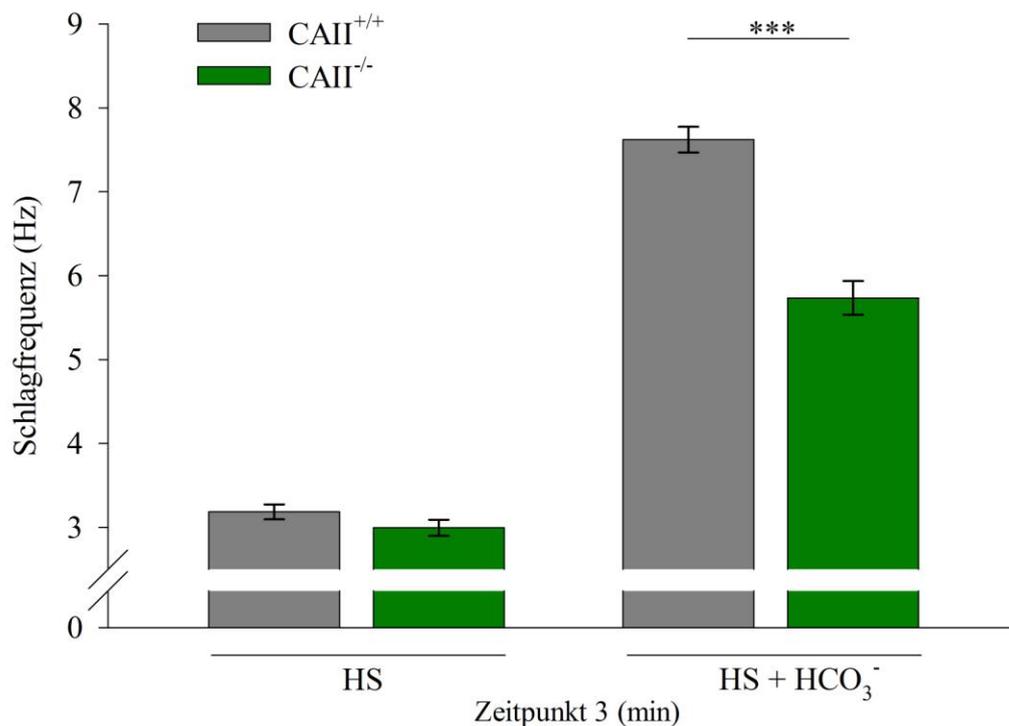


Abbildung 25: Reduzierte Antwort auf HCO₃⁻ in CAII Knockout-Spermien

Auf Einzelzellniveau wurden Schlagfrequenzanalysen von CAII^{+/+} und CAII^{-/-} Spermien nach dreiminütiger Inkubation in HS- oder HCO₃⁻-haltigem HS-Puffer gemessen. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Grundschlagfrequenz zwischen Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien zu verzeichnen. Nach HCO₃⁻ Stimulation erreichen CAII^{+/+} Spermien eine maximale Frequenz von $7,62 \pm 0,15$ Hz ($n = 35$). CAII^{-/-} Spermien zeigen eine signifikant verringerte Frequenz von $5,73 \pm 0,2$ Hz ($n = 35$).

Des Weiteren wurde die HCO₃⁻ Antwort im zeitlichen Verlauf bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mittels Perifusion mit HCO₃⁻-haltigem HS-Puffer stimuliert, wie es in Abbildung 26 dargestellt ist. Das Protokoll startet mit zwei Messpunkten in HS-Puffer ($t = -10, 0$ s). Es folgt eine dreiminütige HCO₃⁻ Applikation. Während der Stimulation wurden die Zeitpunkte $t = 10, 20, 40, 60$ und 180 s gemessen. Nach der dreiminütigen HCO₃⁻ Perifusion schließt eine fünfminütige HS Applikation mit der letzten Messung zum Zeitpunkt $t = 480$ s an. Die komplette Messreihe über 8 min ist in Abbildung 26A gezeigt. Abbildung 26a zeigt den detaillierten Ausschnitt von 0-40 s aus der Gesamtmessreihe (A). Bereits 20 s nach Zugabe von HCO₃⁻ erhöht sich die Schlagfrequenz von CAII^{+/+} Spermien ($n = 51$) von $3,34 \pm 0,09$ Hz auf einen annähernden Maximalwert von $7,04 \pm 0,18$ Hz. Im Gegensatz dazu zeigen CAII^{-/-} Spermien ($n = 41$) eine stark verzögerte HCO₃⁻ Antwort. Dies spiegelt sich besonders in den ersten 40 s wider. Im Vergleich zu CAII^{+/+} Spermien, die bereits nach 10 s HCO₃⁻ Applikation eine Schlagfrequenz von $5,59 \pm 0,21$ Hz

aufweisen, ist bei $CAII^{-/-}$ kein Frequenzanstieg zu beobachten ($t = 10$ s: $2,72 \pm 0,1$ Hz). Der erste messbare Anstieg in $CAII^{-/-}$ Spermien ist nach 20 s mit einer Frequenz von $3,9 \pm 0,18$ Hz zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt $t = 40$ s wird eine Schlagfrequenz von $5,20 \pm 0,16$ Hz beobachtet. Eine maximale Frequenz von $5,86 \pm 0,2$ Hz erreichen $CAII^{-/-}$ Spermien erst nach dreiminütiger Stimulation. Fünf min nach der HCO_3^- Perifusion sinken die Schlagfrequenzen auf einen Wert von $6,13 \pm 0,21$ Hz in $CAII^{+/+}$ bzw. $4,99 \pm 0,18$ Hz in $CAII^{-/-}$ ab.

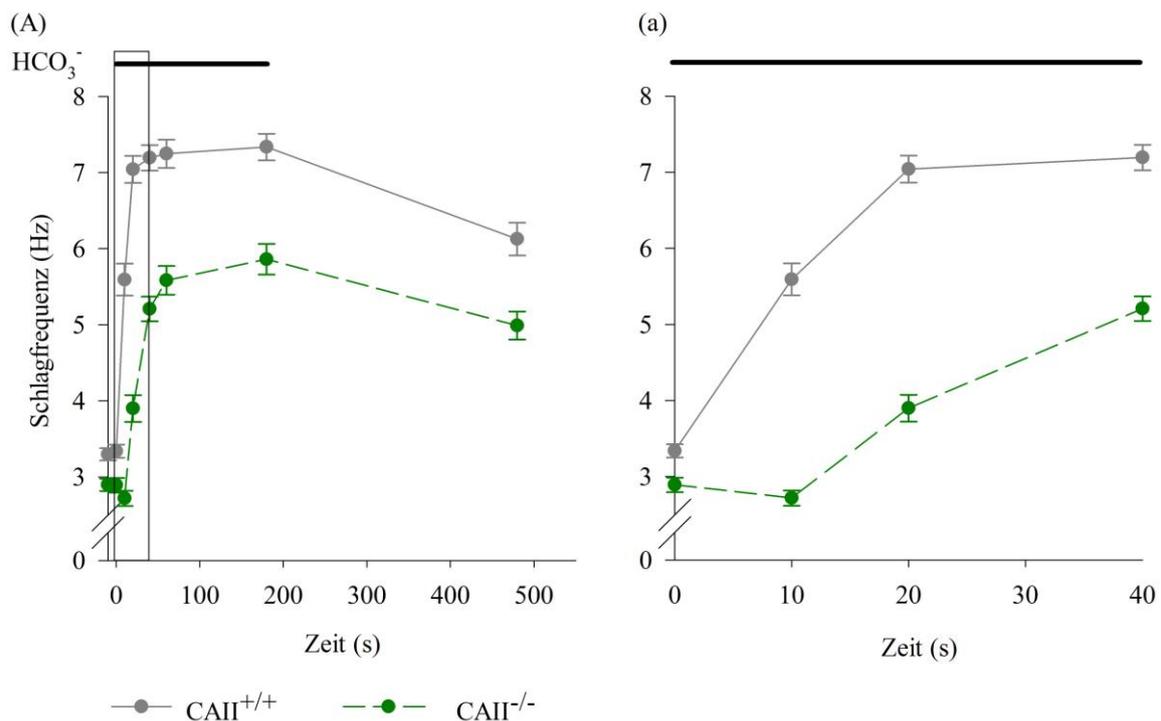


Abbildung 26: Verzögerter Schlagfrequenzanstieg in CAII Knockout-Spermien nach Stimulation mit HCO_3^- . Spermien von $CAII^{+/+}$ und $CAII^{-/-}$ Mäusen wurden für 180 s mit HCO_3^- perifundiert. In (A) ist das gesamte achtminütige Protokoll, in (a) der Ausschnitt von 0-40 s vergrößert dargestellt. 20 s nach HCO_3^- Applikation zeigen $CAII^{+/+}$ Spermien einen Frequenzanstieg von $3,34 \pm 0,09$ Hz auf $7,04 \pm 0,18$ Hz. $CAII^{-/-}$ Spermien weisen eine verzögerte HCO_3^- vermittelte Schlagfrequenzerhöhung auf und erreichen nach 20 s nur eine Frequenz von $3,9 \pm 0,18$ Hz ($n \geq 41$).

Auf Grund der enzymatischen Aktivität der CAII wurde das gleiche Messprotokoll mit 2% CO_2 Stimulation durchgeführt. Hierzu wurde sowohl der HS-Puffer als auch die Messkammer mit CO_2 äquilibriert. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse für $CAII^{+/+}$ ($n = 51$) und $CAII^{-/-}$ ($n = 41$) Spermien dargestellt. Zur besseren Analyse ist in (a) der Zeitausschnitt von 0-40 s aus dem achtminütigen Gesamtprotokoll (A) vergrößert gezeigt. Auch bei CO_2 Stimulation zeigt sich ein Schlagfrequenzanstieg sowohl in Wildtyp- als auch in CAII Knockout-Spermien. Jedoch zeigen $CAII^{-/-}$ im Vergleich zu $CAII^{+/+}$ Spermien

eine verzögerte CO₂ Antwort. Während die Frequenz von CAII^{+/+} Spermien nach 20 s CO₂ Applikation von $3,53 \pm 0,08$ Hz auf $6,51 \pm 0,19$ Hz ansteigt, ist bei CAII^{-/-} lediglich eine Frequenzerhöhung von $2,77 \pm 0,09$ Hz auf $3,72 \pm 0,14$ Hz zu beobachten. Eine maximale Frequenz von $7,2 \pm 0,14$ Hz erreichen CAII^{+/+} Spermien bereits nach 60 s. CAII^{-/-} Spermien dagegen erreichen erst nach 180 s CO₂ Stimulation eine maximale Schlagfrequenz von $6,3 \pm 0,25$ Hz. 5 min nach CO₂ Applikation ist bei beiden Populationen ein ähnlicher Frequenzabstieg zu verzeichnen (t = 480 s CAII^{+/+}: $5,3 \pm 0,12$ Hz, CAII^{-/-}: $5,49 \pm 0,18$ Hz).

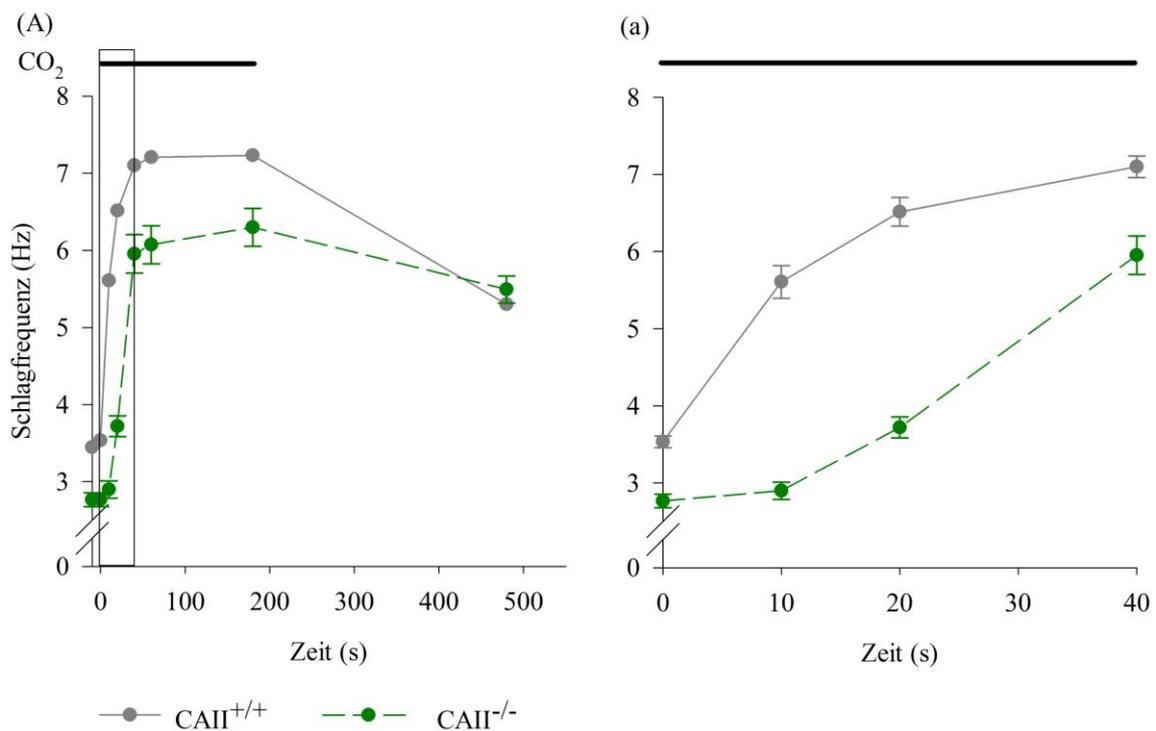


Abbildung 27: Verzögerte CO₂ vermittelte Schlagfrequenzerhöhung in CAII Knockout-Spermien

Spermien von CAII^{+/+} und CAII^{-/-} Mäusen wurden für 180 s mit CO₂ perfundiert. In (A) ist das gesamte achtminütige Protokoll, in (a) der Ausschnitt von 0-40 s dargestellt. 20 s nach CO₂ Applikation zeigen CAII^{+/+} Spermien ein Frequenzanstieg von $3,53 \pm 0,08$ Hz auf $6,51 \pm 0,19$ Hz, während CAII^{-/-} Spermien eine verzögerte CO₂ vermittelte Schlagfrequenzerhöhung aufweisen und nach 20 s nur eine Frequenz von $3,72 \pm 0,14$ Hz erreichen (n ≥ 41).

6.1.2.4 Der $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ hat keinen Einfluss auf die Grundschlagfrequenz muriner Spermien, aber auf die HCO_3^- und CO_2 induzierte Schlagfrequenzerhöhung

Der pH-Wert variiert in den Abschnitten des männlichen und weiblichen Genitaltraktes erheblich. Um den Einfluss des extrazellulären pH-Wertes ($[\text{pH}]_{\text{ex}}$) auf die Grundschlagfrequenz und den HCO_3^- vermittelten Signalweg zu analysieren, wurden im ersten Experiment Spermien von Wildtyp-Mäusen in HS-Puffer verschiedener pH-Werte (pH 6,6, 7,4, 8,2) inkubiert und ein Zeitreihenexperiment über 180 min durchgeführt. Während der Inkubation in dem jeweiligen HS-Puffer wurde die Schlagfrequenz im Abstand von 20 min bestimmt. In Abbildung 28 sind die gemittelten Ergebnisse aus jeweils 10 Einzelzellanalysen dargestellt.

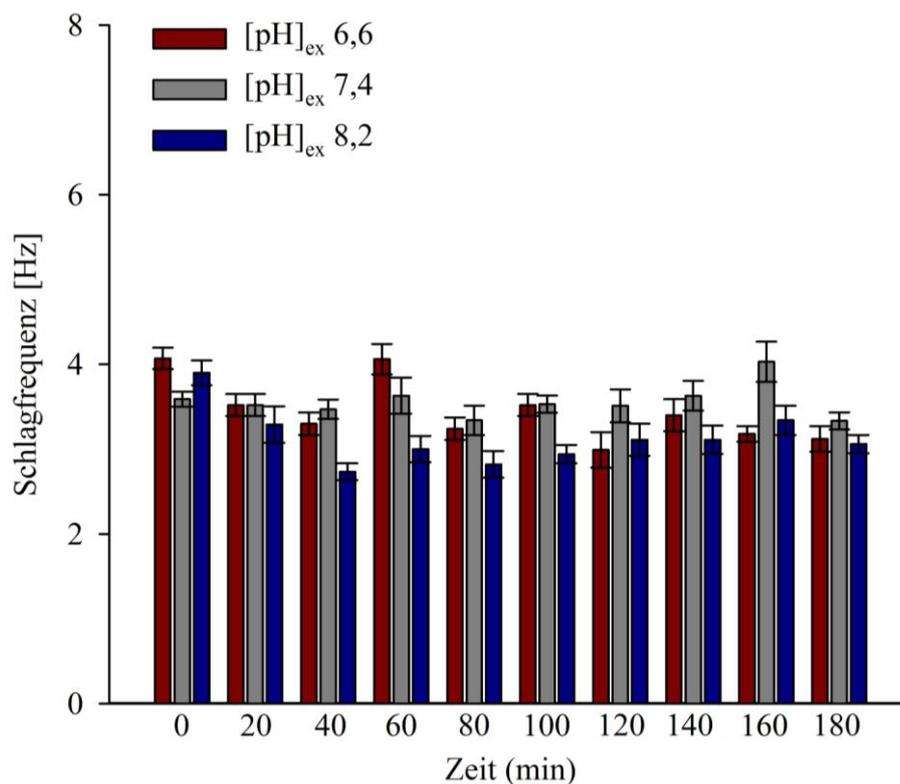


Abbildung 28: Veränderung des $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ hat keinen Einfluss auf die Grundschlagfrequenz muriner Spermien

Spermien von Wildtyp-Mäusen inkubierten über einen Zeitraum von 180 min in verschiedenen HS-Puffern (pH 6,6, 7,4 und 8,2). Alle 20 min wurde die Schlagfrequenz bestimmt, die keine signifikanten Unterschiede aufweist (n = 10).

Die Grundschlagfrequenz ist sowohl im sauren $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ von 6,6 als auch im basischen $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ von 8,2 unverändert. Es ist weder ein signifikanter Anstieg noch ein signifikanter Abfall der Frequenz während der 180 min zu beobachten. Die Frequenz bei $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ von 6,6 schwankt zwischen einem Maximalwert von 4,07 Hz bei t = 0 min und einem Minimalwert von 2,99 Hz bei t = 120 min (n = 10). Die maximale Differenz der gemittelten Frequenzen

beträgt somit 1,08 Hz. Das Differenzmaximum in der $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 7,4 Zeitreihe beträgt 0,7 Hz ($n = 10$) und in der $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 8,2 Zeitreihe 1,17 Hz ($n = 10$).

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ auf die HCO_3^- und CO_2 vermittelte Schlagfrequenzerhöhung untersucht. Dafür wurde der verwendete HCO_3^- -haltige und der mit CO_2 angereicherte HS-Puffer zuvor auf pH-Werte von 6,6, 7,4 oder 8,2 eingestellt. Das Messprotokoll startet in HS-Puffer pH 7,4. Anschließend wurden die Spermien 30 s mit den jeweiligen HS-Puffern pH 6,6, 7,4 oder 8,2 perfundiert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min startete die dreiminütige HCO_3^- (pH 6,6, 7,4, 8,2) bzw. CO_2 (pH 6,6, 7,4, 8,2) Applikation. Das Messprotokoll und die Messzeitpunkte sind die gleichen wie in Kapitel 6.1.2.3 bereits beschrieben. Die Ergebnisse und die daraus resultierenden Graphen sind in Abbildung 29 zusammengefasst. Es ist kein Unterschied in der HCO_3^- Antwort (A) zwischen $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 7,4 und $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 8,2 zu beobachten. Im basischen Milieu reagieren die Spermien äquivalent auf den HCO_3^- Stimulus wie bei einem $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ von 7,4. Bei $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 8,2 wird die maximale Frequenz von $7,39 \pm 0,37$ Hz ($n = 26$) nach 60 s erreicht. Bei $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 7,4 beträgt die maximale Frequenz nach 60 s $7,25 \pm 0,19$ Hz ($n = 56$). Findet die HCO_3^- Perifusion im sauren Milieu statt, zeigt sich eine signifikante Reduktion der Schlagfrequenz. Die Spermien erreichen 60 s nach der HCO_3^- Applikation bei $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 6,6 eine maximale Frequenz von $4,6 \pm 0,27$ Hz ($n = 26$). In Abbildung 29B ist ein vergleichbares Messprotokoll dargestellt. Hier wurden die Zellen jedoch mit CO_2 angereichertem HS-Puffer, der zuvor auf die verschiedenen pH-Werte (6,6, 7,4, 8,2) eingestellt wurde, perfundiert. Bei den pH-Werten 7,4 und 8,2 zeigen sich keine Unterschiede in der CO_2 Antwort. Nach 60 s beträgt die Frequenz $7,21 \pm 0,14$ Hz ($n = 56$) bei $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 7,4 und $7,33 \pm 0,32$ Hz ($n = 26$) bei $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ 8,2. Die CO_2 Applikation bei einem $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ von 6,6 dagegen zeigt eine reduzierte Schlagfrequenzerhöhung. Nach 60 s beträgt die Schlagfrequenz nur $5,52 \pm 0,33$ Hz ($n = 26$). Eine maximale Frequenz von $5,9 \pm 0,21$ wird nach 3 min erreicht. Ein saurer $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ führt zu einer eingeschränkten Schlagfrequenzerhöhung sowohl bei HCO_3^- -haltigem als auch bei CO_2 angereichertem HS-Puffer, während ein basischer $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ keinen Einfluss auf den HCO_3^- induzierten Frequenzanstieg hat.

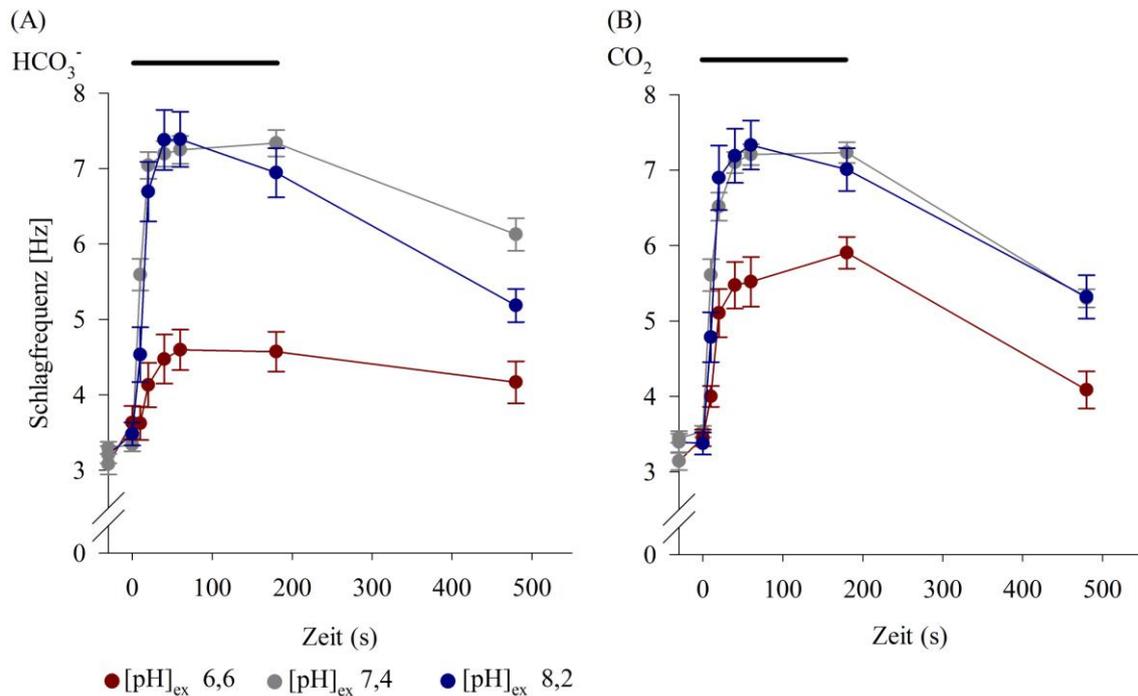


Abbildung 29: Ein saurer $[pH]_{ex}$ wirkt inhibierend auf die HCO_3^- und CO_2 induzierte Schlagfrequenzerhöhung

Wildtyp-Spermien wurden 180 s mit HCO_3^- (A) bzw. mit CO_2 (B) mit verschiedenen pH-Werten (pH 6,6, 7,4, 8,2) perfundiert. Während die induzierte Schlagfrequenzerhöhung bei einem $[pH]_{ex}$ von 8,2 keine Veränderung aufweist, zeigt sich eine inhibierende Wirkung des Signalweges bei einem $[pH]_{ex}$ von 6,6 ($n \geq 26$).

6.1.2.5 Der Einfluss des $[pH]_{ex}$ auf den $[pH]_i$

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass ein saurer $[pH]_{ex}$ Einfluss auf den HCO_3^- vermittelten Schlagfrequenzanstieg in murinen Spermatozoen hat. Ein möglicher Grund für die Inhibierung könnte die Beeinflussung des $[pH]_{ex}$ auf den $[pH]_i$ von Spermien sein, die die Aktivität von Carboanhydrasen beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt der Einfluss des $[pH]_{ex}$ auf den $[pH]_i$ untersucht. Dafür wurden isolierte Spermien von Wildtyp-Mäusen mit dem pH-sensitiven Fluorescein-Derivat BCECF beladen und der $[pH]_i$ bestimmt. Abbildung 30A zeigt die Ergebnisse einer $[pH]_i$ Messreihe im zeitlichen Verlauf. Spermien wurden für 2 min mit HS-Puffer pH 7,4 perfundiert. Es folgte eine achtminütige Applikation (120-600 s) von HS-Puffer pH 6,6 oder 8,2, bevor für weitere 6 min (600-960 s) HS-Puffer pH 7,4 eingeleitet wurde. Es ist zu beobachten, dass der $[pH]_{ex}$ einen direkten und reversiblen Einfluss auf den $[pH]_i$ von Spermien hat. In HS-Puffer pH 7,4 weisen Spermien einen Ausgangs-pH von ~ 6.8 auf. Spermien, die mit HS-Puffer pH 8,2 perfundiert wurden, erreichen nach 120 s Applikation ($t = 240$ s) einen maximalen $[pH]_i$ von $6.94 \pm 0,06$ ($n = 9$). Spermien, die mit HS-Puffer pH 6,6 stimuliert wurden, erreichen nach 320 s nach Applikation ($t = 440$ s) einen minimalen $[pH]_i$ von

$6,43 \pm 0,07$ ($n = 9$). Werden die Zellen anschließend wieder mit HS-Puffer pH 7,4 perfundiert, beträgt der gemittelte $[pH]_i$ zum Zeitpunkt $t = 800$ s $6,61 \pm 0,03$ nach Stimulation mit HS-Puffer pH 8,2 und $6,72 \pm 0,05$ nach Stimulation mit HS pH 6,6.

In Abbildung 30B ist der $[pH]_i$ in Abhängigkeit des $[pH]_{ex}$ über einen Zeitraum von 60 min dargestellt. BCECF-beladene Spermien wurden über eine Zeitspanne von 60 min in den verschiedenen HS-Puffern (pH 6,6, 7,4, 8,2) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die verschiedenen Spermienfraktionen zur Bestimmung des $[pH]_i$ herangezogen. Spermien, die in HS-Puffer pH 6,6 inkubierten, zeigen einen stetig sinkenden $[pH]_i$ bis zu einem Wert von $6,05 \pm 0,11$ ($n = 9$) nach 60 min. Spermien in HS-Puffer 8,2 dagegen erreichen ihren stabilen Maximalwert von $6,96 \pm 0,05$ ($n = 9$) bereits nach 5 min. Der $[pH]_i$ von in HS-Puffer pH 7,4 inkubierten Spermien zeigt über die Zeitspanne keine signifikanten Veränderung und beträgt zum Zeitpunkt $t = 5$ min $6,72 \pm 0,04$ ($n = 9$).

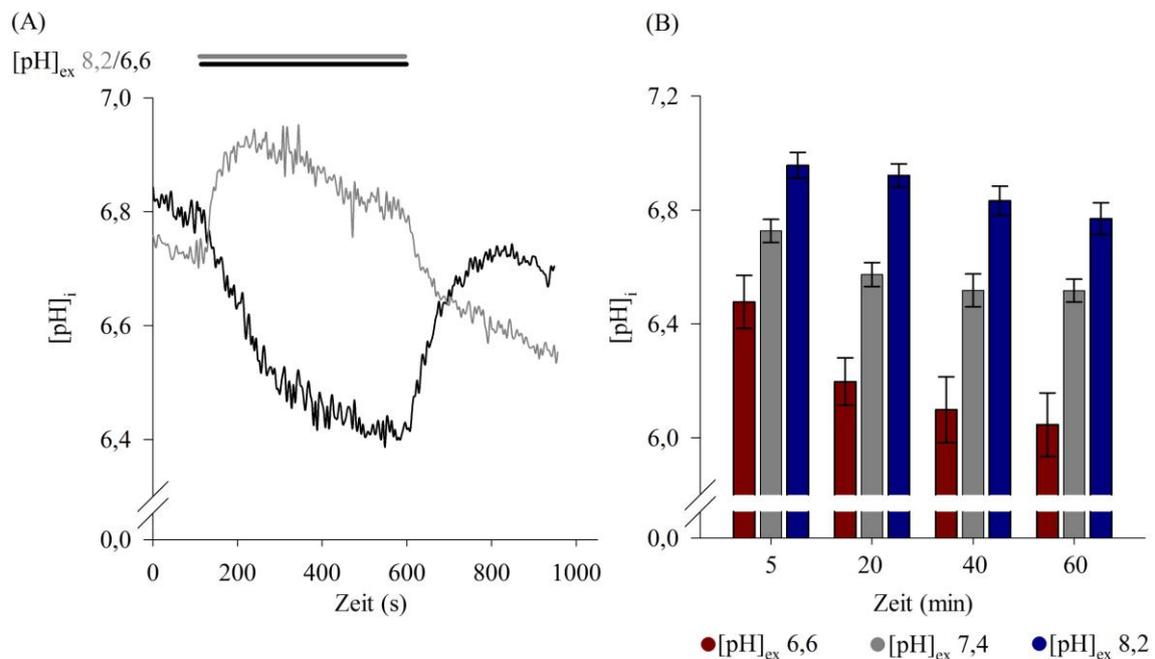


Abbildung 30: Einfluss des $[pH]_{ex}$ auf den $[pH]_i$ von Spermien

BCECF-beladene Spermien wurden mit den verschiedenen HS-Puffern (pH 6,6, 7,4, 8,2) für 8 min perfundiert (A) bzw. in den Puffern inkubiert und zu den dargestellten Zeitpunkten (B) in Einzelzellanalysen photometrisch detektiert. Die Ergebnisse zeigen sowohl einen direkten, reversiblen (A) als auch einen stabilen (B) Einfluss des $[pH]_{ex}$ auf den $[pH]_i$ ($n = 9$).

6.1.2.6 Spermien von CAII Knockout-Mäusen weisen keinen veränderten $[pH]_i$ auf

Eine Erklärung für die verzögerte HCO_3^- und CO_2 Antwort in CAII Knockout-Spermien könnte deren basaler $[pH]_i$ sein. Um zu überprüfen, ob bzw. inwieweit der $[pH]_i$ in CAII Knockout-Spermien von dem $[pH]_i$ der Wildtyp-Spermien abweicht, wurden BCECF-beladene CAII^{+/+} und CAII^{-/-} Spermien nach dreiminütiger Inkubation in

HS-Puffer (pH 7,4) photometrisch detektiert und deren $[pH]_i$ ermittelt (Abbildung 31). Der $[pH]_i$ in $CAII^{+/+}$ Spermien beträgt $6,78 \pm 0,05$ ($n = 19$) und in $CAII^{-/-}$ Knockout-Spermien $6,8 \pm 0,02$ ($n = 17$). Es ist kein signifikanter Unterschied im $[pH]_i$ zwischen beiden Spermienpopulationen zu beobachten.

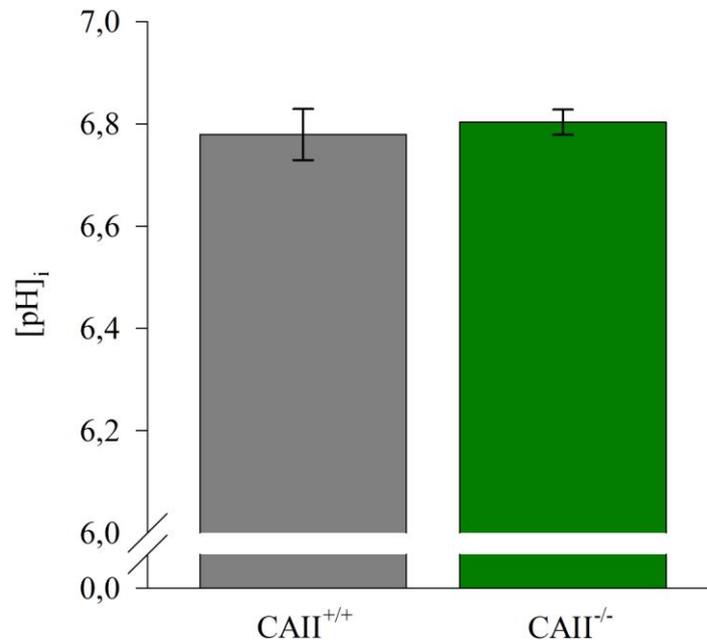


Abbildung 31: Kein veränderter $[pH]_i$ in Spermien von CAII Knockout-Mäusen
Zur Bestimmung des $[pH]_i$ wurden Spermien von $CAII^{+/+}$ und $CAII^{-/-}$ Mäusen mit BCECF beladen und photometrisch ausgewertet. Es zeigt sich kein Unterschied im $[pH]_i$ zwischen Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien ($n \geq 17$).

6.1.2.7 Wiederherstellung des basalen $[pH]_i$ in CAII Knockout-Spermien nach intrazellulärer Alkalisierung

Auf Grund der Tatsache, dass CAs in die Säure-Base-Homöostase von Zellen beteiligt sind, wurde in diesem Experiment die Fähigkeit der Wiederherstellung des $[pH]_i$ in CAII Knockout-Spermien nach intrazellulärer Alkalisierung auf das Ausgangsniveau überprüft. Hierfür wurden Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien mit BCECF-beladen und anschließend mit Ammoniumchlorid (20 mM) zur Erhöhung des $[pH]_i$ stimuliert. Nach der eintretenden Alkalisierung wurde die Dauer bis zur Wiederherstellung des Ausgangs-pHs in der Zelle gemessen. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse für Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien dargestellt.

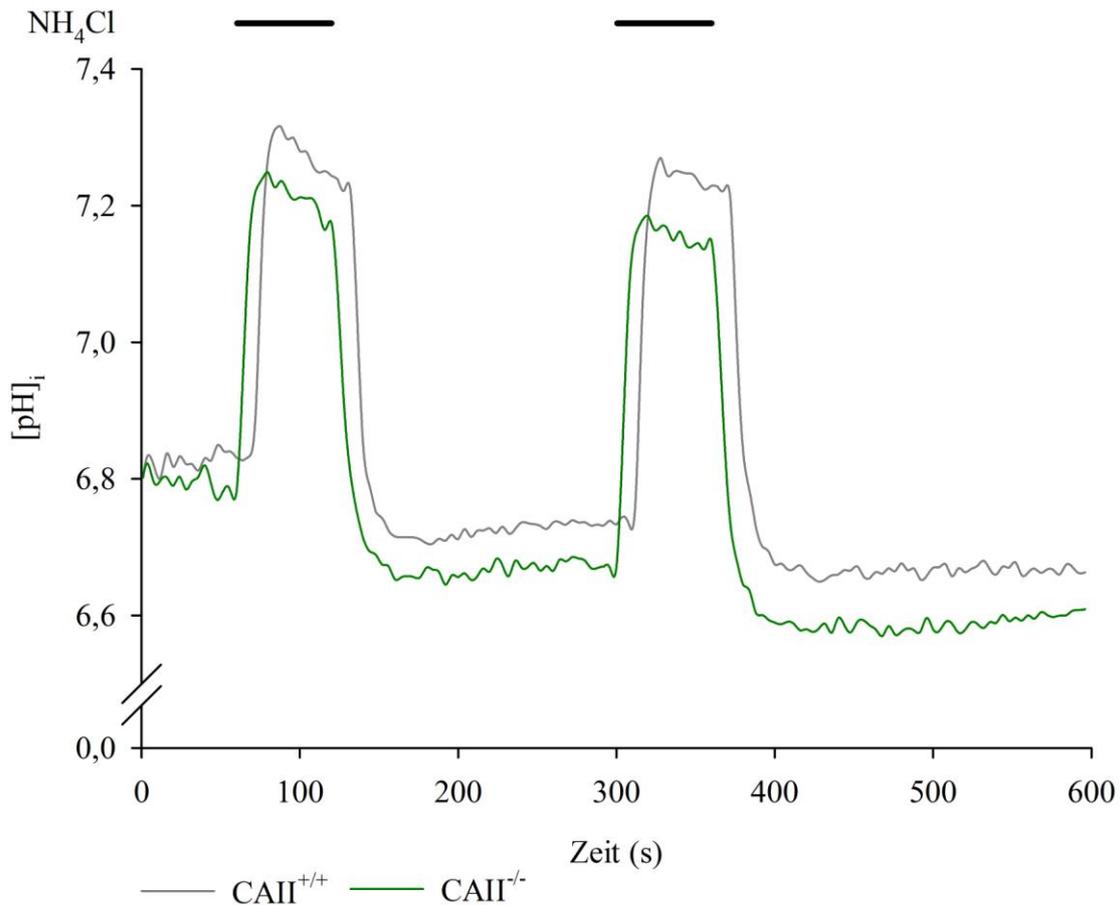


Abbildung 32: Keine Veränderung bei Wiederherstellung des basalen $[pH]_i$ in Spermien von CAII Knockout-Mäusen

BCECF-beladene $CAII^{+/+}$ und $CAII^{-/-}$ Spermien wurden zweimal (60-120 s und 300-360 s) mit Ammoniumchlorid, um den $[pH]_i$ zu erhöhen, stimuliert und in Einzelzellanalysen photometrisch ausgewertet. Der $[pH]_i$ von Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien zeigt keine Unterschiede im Anstieg während der pH-Erhöhung bzw. im Abfall nach der Stimulation ($n = 11$).

Die Zellen wurden zweimal (60-120 s und 300-360 s) für 1 min mit Ammoniumchlorid (20 mM) perfundiert. Zwischen den Stimuli erfolgte die Applikation von HS-Puffer pH 7,4. Beide Zelltypen weisen gleiche Ausgangswerte von $6,8 \pm 0,09$ ($n = 11$) in $CAII^{+/+}$ bzw. $6,8 \pm 0,03$ ($n = 11$) in $CAII^{-/-}$ auf. Wildtyp-Spermien erreichen während der pH-Erhöhung einen maximalen $[pH]_i$ von $7,31 \pm 0,07$ zum Zeitpunkt $t = 84$ s und einen maximalen $[pH]_i$ von $7,27 \pm 0,06$ zum Zeitpunkt $t = 328$ s. $CAII^{-/-}$ Spermien zeigen einen maximalen $[pH]_i$ von $7,23 \pm 0,04$ im ersten ($t = 84$ s) und einen maximalen $[pH]_i$ von $7,17 \pm 0,04$ im zweiten Stimulus ($t = 328$ s). Sowohl Wildtyp- als auch CAII Knockout-Spermien pendeln sich nach der Stimulation auf einem niedrigeren pH-Niveau ein. Im Vergleich zum Ausgangs-pH liegt das $[pH]_i$ Grundniveau nach dem ersten Stimulus bei $6,74 \pm 0,04$ im Wildtyp und bei $6,67 \pm 0,04$ im Knockout (Zeitpunkt 240 s).

Nach dem zweiten Stimulus erreichen Wildtyp-Spermien einen basalen $[pH]_i$ von $6.68 \pm 0,05$ und CAII Knockout-Spermien von $6.58 \pm 0,06$ ($t = 480$ s). Es ist also eine $[pH]_i$ Differenz von 0,12 (CAII^{+/+}) bzw. 0,22 (CAII^{-/-}) zwischen Ausgangs- und End-pH feststellbar. Keine Unterschiede sind im Anstieg, während der intrazellulären Alkalisierung, bzw. im Abfall, nach der Stimulation, zu beobachten. CAII^{+/+} und CAII^{-/-} Spermien reagieren gleich auf die intrazelluläre pH-Veränderung. CAII Knockout Spermien weisen damit im Vergleich zu Wildtyp-Spermien keine Veränderung in der Wiederherstellung des $[pH]_i$ nach Alkalisierung auf.

6.2 CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse

6.2.1 Phänotypisierung von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

Genexpressionsanalysen (Johnston et al., 2005) belegen, dass außer der CAII auch die CA Isoform IV verstärkt im männlichen Reproduktionstrakt der Maus exprimiert wird (http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85293). Eine vorangegangene Analyse und bereits publizierte Studie über die Verteilung und Funktion der CAIV in murinen Spermatozoen bestätigt die Beteiligung des Enzyms am HCO_3^- vermittelten Signalweg (Wandernoth et al., 2010). Auf Grund der Enzymaktivität von CAII und CAIV in Spermien, die nach massenspektrometrischer Bestimmung zusammen 97% der CA Gesamtaktivität ausmachen (Abbildung 23, Wandernoth et al., 2010), war es von großem Interesse, CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse zu generieren und zu analysieren.

Da es sich dabei um eine nicht etablierte Mauslinie handelt, wurden auch Parameter zur Beschreibung des Phänotyps erfasst. Doppelknockout-Nachkommen wurden von der dritten bis zur zehnten Woche (W3-W10) einmal wöchentlich gewogen. Wildtyp-Mäuse dienten als Kontrolle und wurden innerhalb des gleichen Zeitraumes gewogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 zusammengefasst. CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Gewichtszunahme. In allen Wochenstadien ist das Gewicht der Doppelknockout-Nachkommen signifikant geringer als das der korrespondierenden Wildtyp-Tiere. Die größten Gewichtsunterschiede sind in der 4. und 5. Entwicklungswoche zu verzeichnen. CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Nachkommen zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Nachkommen eine Gewichtsreduktion von 66% in der 4. und 63% in der 5. Woche. Adulte Wildtyp-Mäuse erreichen nach 10 Wochen ihr Maximalgewicht von $24,52 \pm 1,09$ g (n = 12), während CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Mäuse nach 10 Wochen nur $16,40 \pm 1,9$ g (n = 8) wiegen.

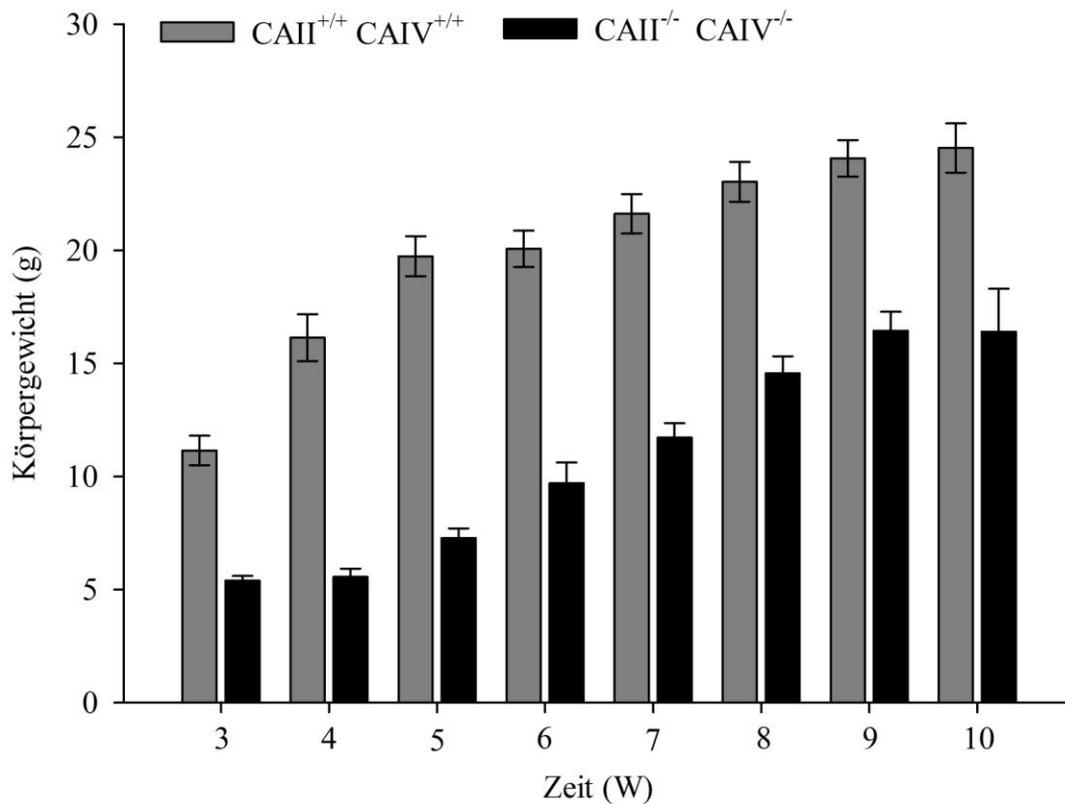


Abbildung 33: Gewichtszunahme der CAII CAIV Doppelknockout-Nachkommen
 Wildtyp- und CAII CAIV Doppelknockout-Nachkommen wurden einmal wöchentlich von W3-W10 gewogen. Die Doppelknockout-Mäuse zeigen in allen Entwicklungsstadien eine Gewichtsreduktion. Im adulten Stadium (W10) ist eine Gewichtsreduktion der CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Tiere von 33% zu verzeichnen (n = 12 wt; n = 8 doppel ko).

Männliche Doppelknockout-Mäuse, die für die Experimente verwendet wurden, wurden am Tötungstag noch einmal vermessen und mit den dazugehörigen Wildtyp-Tieren verglichen. Dabei handelte es sich immer um adulte Tiere, die älter als 16 Wochen waren. Abbildung 34 zeigt für jeden Parameter Mittelwert mit Standardfehler für vier unabhängige Experimente. Zum einen wurden Körpergröße und Körpergewicht bestimmt (Abbildung 34A). Das Foto (Abbildung 34a) zeigt exemplarisch eine Wildtyp-Maus im Vergleich zu einer CAII CAIV Doppelknockout-Maus. Es ist kein Unterschied in der Körpergröße feststellbar (CAII^{+/+} CAIV^{+/+} = 17,08 ± 0,22 cm; CAII^{-/-} CAIV^{-/-} = 16,58 ± 0,55 cm). Jedoch zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Körpergewicht. Adulte CAII^{+/+} CAIV^{+/+} wiegen im Mittel 26,73 ± 0,99 g, während CAII^{-/-} CAIV^{-/-} nur ein Gewicht von 22,25 ± 0,78 g aufweisen.

Neben dem Körpergewicht wurde auch das Organgewicht von Niere und Hoden bestimmt (Abbildung 34B). Die makroskopische Analyse (Abbildung 34b) zeigt keine Auffälligkeiten zwischen den Organen von Wildtyp- und Doppelknockout-Tieren. Bei der

Bestimmung des Hodengewichts ist jedoch ein hoch signifikanter Unterschied messbar. Der Hoden von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen wiegt im Mittel $72,33 \pm 3,51$ mg und zeigt damit eine Gewichtsreduktion im Vergleich zum Hoden von Wildtyp-Tieren ($104,00 \pm 7,21$ mg) von 31%. Das Gewicht der Niere zeigt keinen Unterschied (CAII^{+/+} CAIV^{+/+} = $196,33 \pm 11,36$ mg; CAII^{-/-} CAIV^{-/-} = $215,67 \pm 24,62$ mg). Des Weiteren wurde die Spermien-Zellzahl pro ml bestimmt. Dafür wurden Spermien sowohl von Wildtyp- als auch von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen aus der Cauda epididymidis und dem Ductus deferens präpariert und nach dem Ausschwimmen mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Wildtyp- und Doppelknockout-Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Spermien-Zellzahl (Abbildung 34C). In der Aufnahme 34c ist der gesamte Nebenhoden mit Samenleiter präpariert dargestellt. Makroskopisch sind keine Veränderungen zu beobachten.

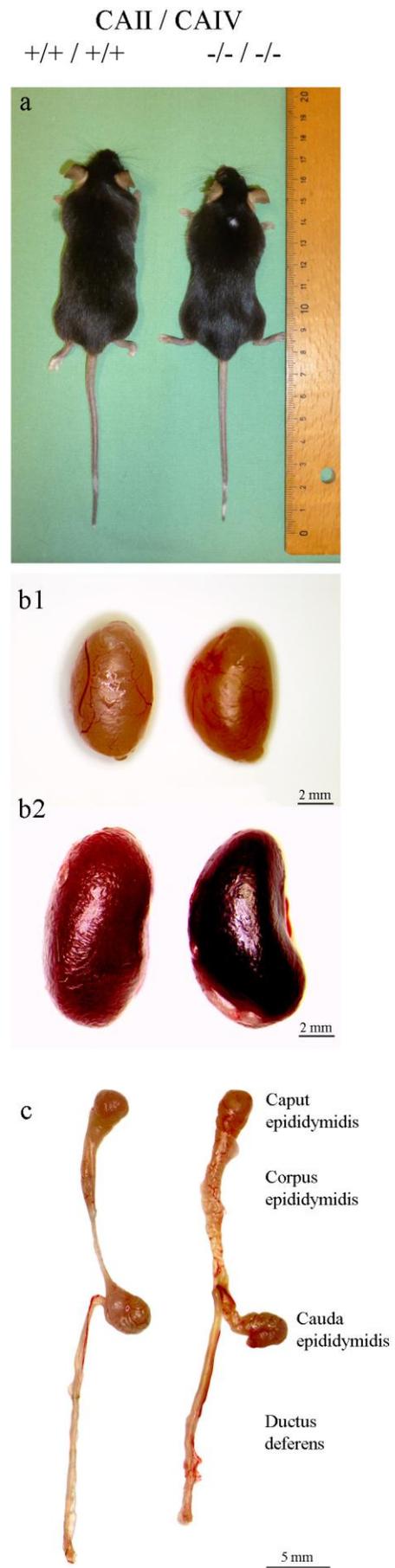
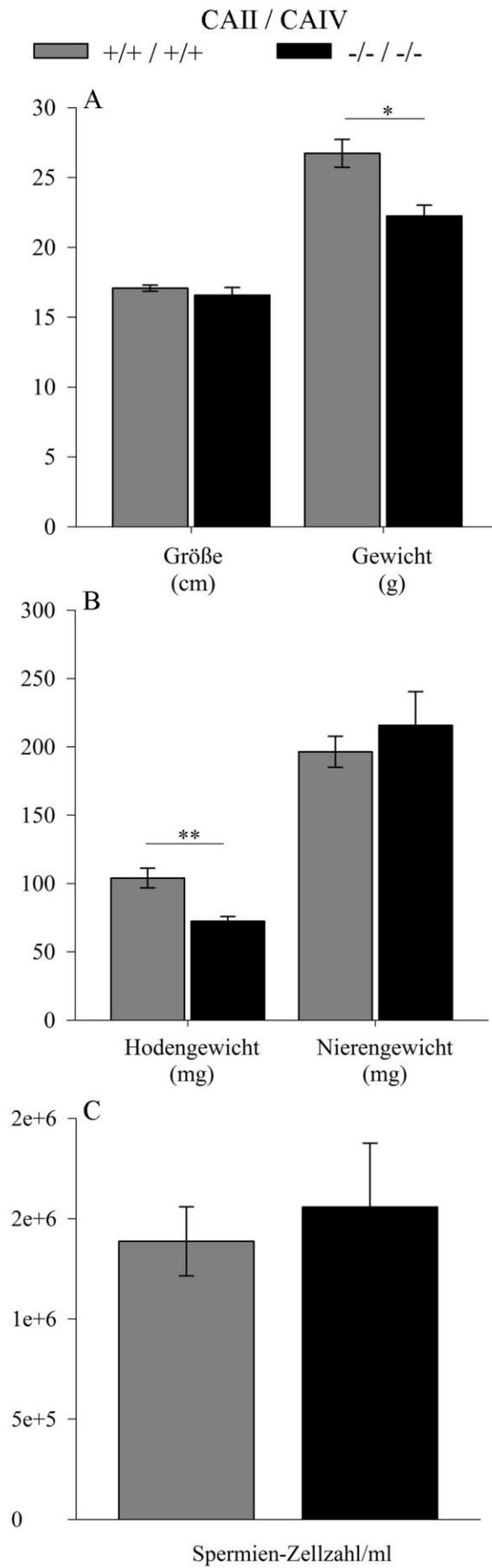


Abbildung 34: Phänotypisierung von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikante Körper- (A) und Hodengewichtsreduktion (B) von 17 bzw. 31%. Keine Unterschiede zeigen sich in der Körpergröße (A), im Nierengewicht (B) und in der Spermien-Zellzahl (C). Makroskopische Auffälligkeiten zwischen beiden Mauslinien (a-c) sind nicht feststellbar (n = 4).

6.2.2 Verringerte Keimepithelhöhe in CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse zeigen, wie bereits beschrieben, eine signifikante Hodengewichtsreduktion. Eine Ursache hierfür könnte eine Veränderung des Hodenparenchyms sein. Aus diesem Grund wurde eine morphologische Charakterisierung an HE-gefärbten Hodenschnitten durchgeführt (Abbildung 35A, B).

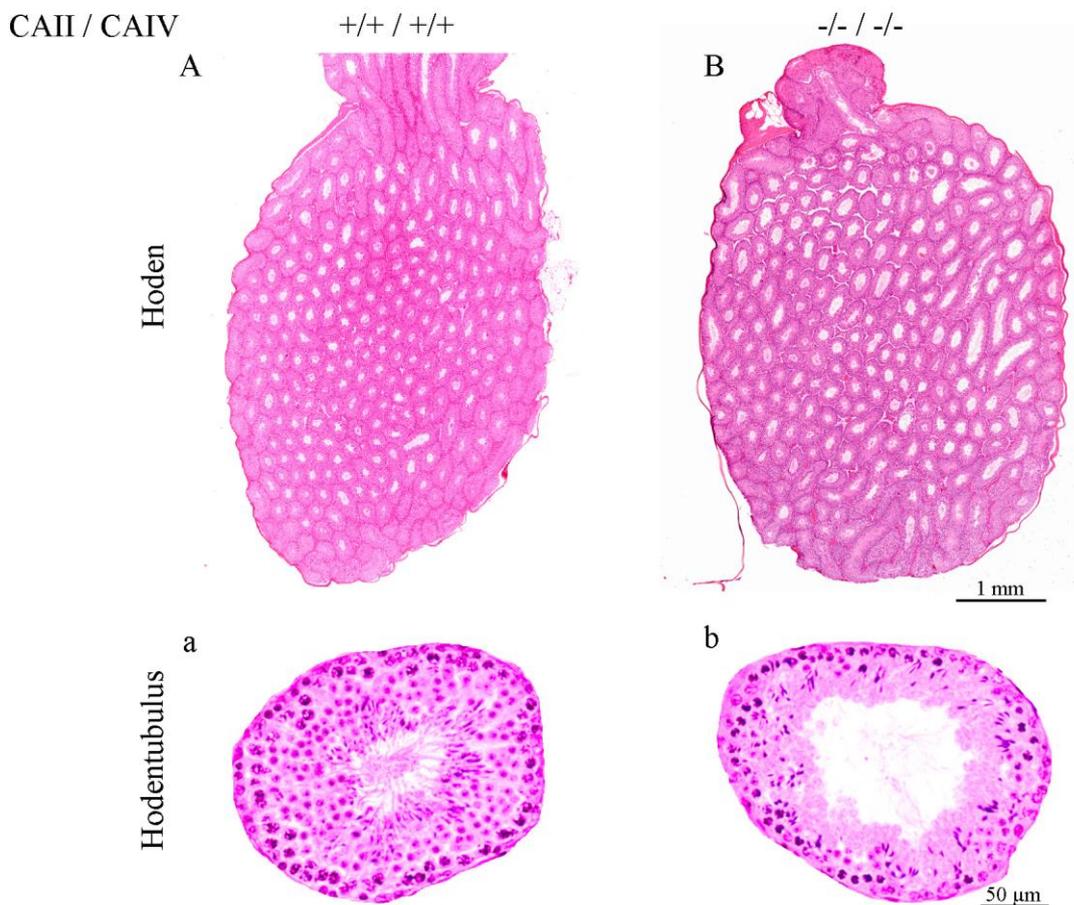


Abbildung 35: Morphologische Charakterisierung des Hodengewebes von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

In A, B ist exemplarisch ein Scan der HE-gefärbten Hodenpräparate dargestellt, während a, b einzelne Hodentubuli in einer höheren Vergrößerung zeigen. Mikroskopisch erscheint die Keimepithelhöhe im Doppelknockout- niedriger als die im Wildtyp-Tier. Zellmorphologisch können keine Unterschiede beobachtet werden.

Bei Betrachtung des ganzen Organs zeigen sich keine Größenunterschiede zwischen Wildtyp- und Doppelknockout-Mäusen. Aus den jeweiligen Präparaten wurden für die Vermessung der Epithelhöhe einzelne Hodentubuli in einer höheren Vergrößerung aufgenommen. Abbildung 35 (a, b) zeigt exemplarisch eine Detailaufnahme eines Hodentubulus von einem Wildtyp- und einem CAII CAIV Doppelknockout-Tier. Mikroskopisch können keine zellmorphologischen Unterschiede beobachtet werden, jedoch ist die Keimepithelhöhe im Doppelknockout-Tier deutlich niedriger als im Wildtyp-Tier. Vier Hodenpräparate des jeweiligen Genotyps wurden für die Bestimmung der Keimepithelhöhe herangezogen. Die berechneten Mittelwerte mit Standardfehlern für Wildtyp- und Doppelknockout-Mäuse sind graphisch in Abbildung 36 dargestellt. Trotz der gleichen Spermienzellzahl (Abbildung 34), die anhand von isolierten Zellen aus der Cauda epididymidis und dem Ductus deferens erfolgte, ist ein höchst signifikanter Unterschied in der Höhe des Keimepithels zwischen den beiden Genotypen zu beobachten. Die durchschnittliche Keimepithelhöhe in Wildtyp-Tieren beträgt $76,00 \pm 0,95 \mu\text{m}$ ($n = 130$). In CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Tieren wird eine durchschnittliche Höhe von $60,97 \pm 0,93 \mu\text{m}$ ($n = 130$) ermittelt. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen liegt damit eine Keimepithelreduzierung von 20% in CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen vor.

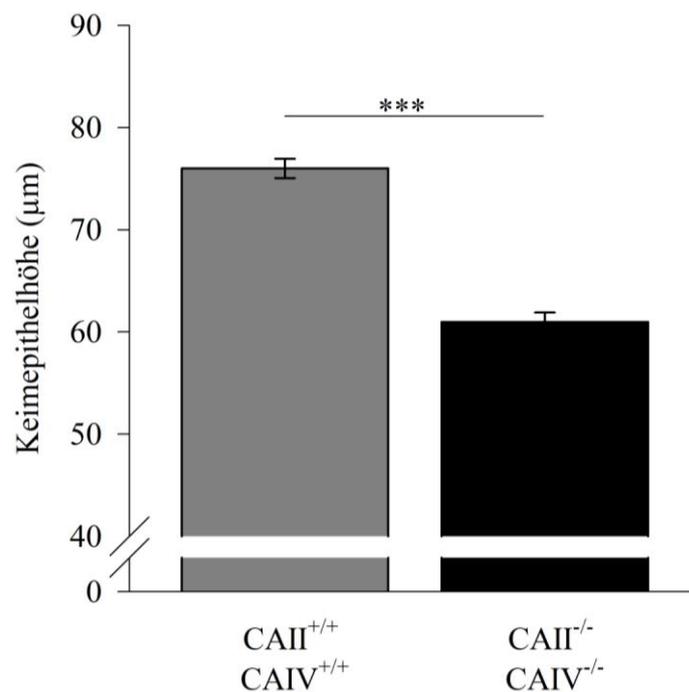


Abbildung 36: Verringerte Keimepithelhöhe in CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen
Einzelne Hodentubuli aus HE-gefärbten Gewebeschnitten von Wildtyp- und CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen wurden für die Bestimmung der Keimepithelhöhe herangezogen. In Doppelknockout-Tieren beträgt die gemittelte Keimepithelhöhe $60,97 \pm 0,93 \mu\text{m}$ und ist damit signifikant niedriger als in vergleichbaren Wildtyp-Tieren ($76,00 \pm 0,95 \mu\text{m}$) ($n = 130$).

6.2.3 Fertilitätsanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

Um die Fertilität der generierten CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse zu untersuchen, wurden Verpaarungsanalysen durchgeführt. Dafür wurden systematische Verpaarungen von Mäusen verschiedener Genotypen angesetzt und die Anzahl der Nachkommen sowie der Quotient aus Nachkommen pro Verpaarungswoche als Parameter zur Charakterisierung der Fertilität herangezogen. In der Tabelle 2 und 3 sind die Ergebnisse der Verpaarungsanalysen dargestellt. Es wurden sowohl Doppelknockout-Männchen mit Wildtyp-Weibchen (Verpaarungstyp 2) als auch Wildtyp-Männchen mit Doppelknockout-Weibchen (Verpaarungstyp 3) verpaart. Jede Verpaarung wurde über einen definierten Zeitraum von 16 Wochen angesetzt. Die Nachkommen der einzelnen Verpaarungen wurden addiert und daraus die Nachkommen pro Verpaarungswoche berechnet. Als Vergleich dienten die Ergebnisse aus reinen Wildtyp-Verpaarungen (Verpaarungstyp 1), die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

Die Verpaarung mit Doppelknockout-Männchen (Tabelle 2) zeigt eine reduzierte Anzahl an Würfen und auch an Nachkommen. Während der Verpaarungsdauer von 16 Wochen sind zwei Würfe mit einer Gesamtnachkommenzahl von zehn Tieren zu vermerken. Die Verpaarung mit Wildtyp-Männchen generierte dagegen fünf Würfe mit einer Gesamtnachkommenzahl von 38. Der ermittelte Quotient aus Nachkommen pro Verpaarungswoche beträgt mit Wildtyp-Männchen 2,38 und mit Doppelknockout-Männchen nur 0,63. Es resultiert eine Verringerung der Nachkommen pro Verpaarungswoche von 74%.

Die gegensätzlichen Verpaarungen, d.h. Doppelknockout-Weibchen mit Wildtyp-Männchen (Tabelle 3), generierten in drei unabhängigen Analysen insgesamt sieben Lebendwürfe. Vier weitere Würfe wurden als Totgeburten verzeichnet. Die Gesamtzahl an lebenden Nachkommen beträgt 20 und der resultierende Quotient $0,41 \pm 0,15$. Im Vergleich zu der Wildtyp-Verpaarung, die einen Quotienten von $2,02 \pm 0,15$ Nachkommen pro Verpaarungswoche aufweisen, zeigt sich eine Reduktion von 80% in den Doppelknockout-Weibchen. Zusammenfassend kann sowohl in den CAII CAIV Doppelknockout-Männchen als auch in den Doppelknockout-Weibchen eine Subfertilität beobachtet werden.

Tabelle 2: Verpaarungsanalysen von Wildtyp-Weibchen mit CAII CAIV Doppelknockout-Männchen

Verpaarungs- typ	Verpaarung				Verpaarungs- anzahl	Verpaarungs- dauer (Wochen)	Würfe (lebend)	Würfe (tot)	Anzahl an Nachkommen (lebend)	Nachkommen/ Verpaarungs- woche
	♂ CAII	♂ CAIV	♀ CAII	♀ CAIV						
1	+/+	+/+	+/+	+/+	1	16	5	0	38	2,38
2	-/-	-/-	+/+	+/+	1	16	1	0	10	0,63

Tabelle 3: Verpaarungsanalysen von Wildtyp-Männchen mit CAII CAIV Doppelknockout-Weibchen

Verpaarungs- typ	Verpaarung				Verpaarungs- anzahl	Verpaarungs- dauer (Wochen)	Würfe (lebend)	Würfe (tot)	Anzahl an Nachkommen (lebend)	Nachkommen/ Verpaarungs- woche
	♂ CAII	♂ CAIV	♀ CAII	♀ CAIV						
1	+/+	+/+	+/+	+/+	3	16	13	0	97	2,02 ± 0,15
3	+/+	+/+	-/-	-/-	3	16	7	4	20	0,41 ± 0,15 **

6.2.4 Molekularbiologische Analysen

6.2.4.1 CAXIV Überexpression im Gewebe von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

Um den CAII und CAIV Genverlust zu kompensieren, könnte es zur Überexpression von anderen CAs im männlichen Genitaltrakt der Maus kommen. CAXIV ist eine weitere CA Isoform, die laut Genexpressionsanalysen (http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85273) und Proteinlokalisationsstudien (Hermo et al., 2005) vor allem im letzten Abschnitt des murinen Nebenhodens vorkommt und deren Enzymaktivität um ein Vielfaches höher ist als das der CAII und CAIV (Whittington et al., 2004). Aus diesem Grund wurden qRT-PCR Analysen für die Bestimmung der CAXIV mRNA im Gewebe von Wildtyp- und Doppelknockout-Mäusen durchgeführt und die relativen CAXIV mRNA-Mengen miteinander verglichen. In Abbildung 37 sind die gemittelten RQ-Werte mit Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten von CAXIV in Wildtyp-Tieren graphisch dargestellt. Die Niere diente wieder als Referenz und erhält den RQ-Wert eins. Eine deutliche CAXIV Expression findet in der Cauda epididymidis und im Ductus deferens statt. Die relativen RQ-Werte betragen $0,68 \pm 0,47$ (Cauda epididymidis) und $1,65 \pm 0,66$ (Ductus deferens). Deutlich geringere RQ-Werte findet man im Hoden ($0,01 \pm 0,002$), Caput epididymidis ($0,08 \pm 0,02$) und im Corpus epididymidis ($0,06 \pm 0,03$).

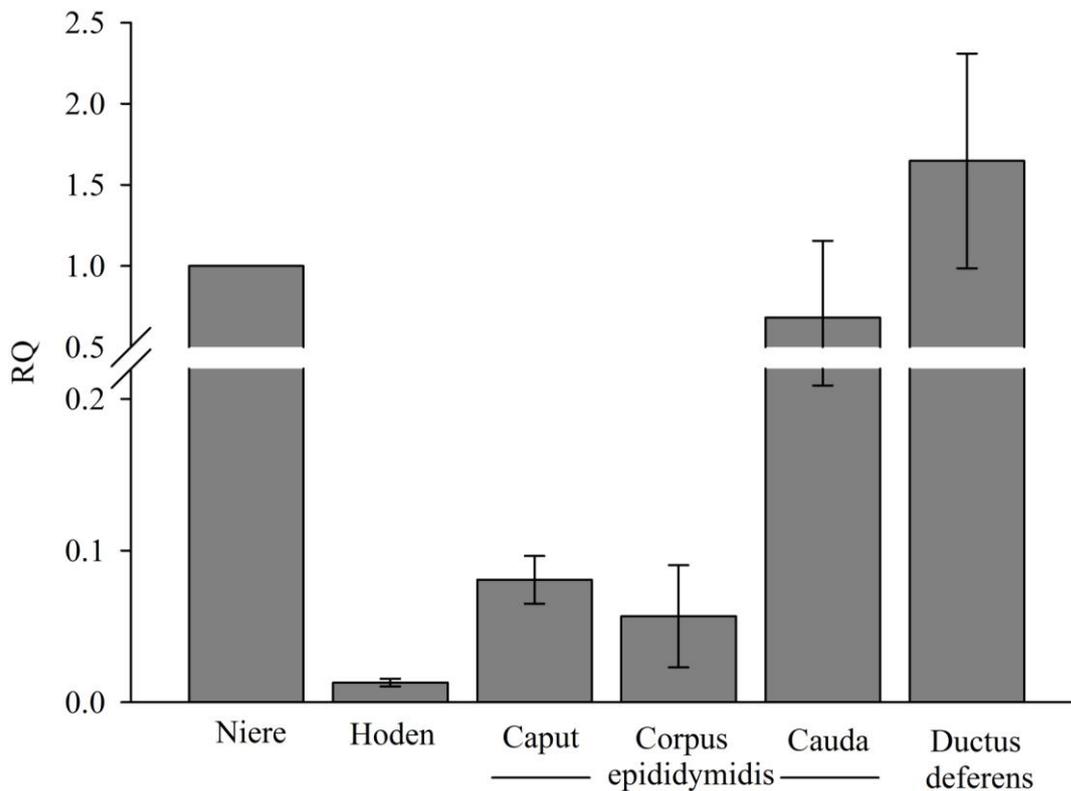


Abbildung 37: Relative CAXIV Expression im männlichen Genitaltrakt der Maus

Die relative CAXIV Expression wurde mittels qRT-PCR in den verschiedenen Geweben von Wildtyp-Mäusen ermittelt. Als Referenzgewebe diente die Niere, deren RQ-Wert auf eins festgesetzt wurde. Im Vergleich dazu ist die höchste CAXIV Expression in der Cauda epididymidis ($0,68 \pm 0,47$) und im Ductus deferens ($1,65 \pm 0,66$) nachweisbar ($n = 3$).

Um im Folgenden eine Aussage über eine Überexpression von CAXIV in CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen treffen zu können, wurde die CAXIV mRNA-Expression im Doppelknockout-Tier untersucht. Die gewonnenen ΔC_t -Werte wurden mit den gemittelten ΔC_t -Werten von Wildtyp-Mäusen verrechnet und ins Verhältnis zueinander gesetzt (Tabelle 4). Da die CAXIV qRT-PCR nur einmal mit Gewebe einer Doppelknockout-Maus durchgeführt wurde, sind in der Tabelle keine gemittelten ΔC_t -Werte (ΔC_t ko) angegeben. Sowohl in der Niere als auch im Caput epididymidis der Doppelknockout-Maus liegen eine deutliche Reduktion der CAXIV mRNA vor. Die CAXIV ist nur 0,42-fach so hoch in der Niere und 0,3-fach so hoch im Caput epididymidis im Vergleich zum Wildtyp exprimiert. Dagegen ist eine CAXIV Überexpression im Corpus epididymidis und im Ductus deferens der Doppelknockout-Maus zu beobachten. Im Corpus epididymidis steigt die CAXIV mRNA-Menge um mehr als das Doppelte an (RQ-Wert = 2,13). Im Ductus deferens findet eine 6,83-fach höhere CAXIV mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen statt.

Tabelle 4: Verhältnis der relativen CAXIV mRNA-Mengen zwischen den Geweben von einer CAII CAIV Doppelknockout-Maus und von Wildtyp-Mäusen.

	gemittelter ΔCt wt	ΔCt ko	Verhältnis $1/2^{\Delta\Delta Ct}$
Niere	12,84 ± 0,06	14,10	0,42
Hoden	19,18 ± 0,32	19,05	1,10
Caput epididymidis	16,52 ± 0,25	18,27	0,30
Corpus epididymidis	17,47 ± 0,81	16,38	2,13
Cauda epididymidis	14,45 ± 1,35	14,69	0,89
Ductus deferens	12,53 ± 0,82	9,76	6,83

6.2.4.2 CAII und CAIV Proteinnachweis mittels Western Blot

Der Proteinnachweis von CAII und CAIV in den verschiedenen Geweben des männlichen Genitaltraktes der Maus erfolgte mittels Western Blot (Abbildung 38). Für die Analyse wurden 30 µg Gesamtprotein der Gewebe von Niere, Hoden, Caput, Corpus und Cauda epididymidis und Ductus deferens eingesetzt. Für die Spermienfraktion wurde ein Gesamtvolumen von 25 µl verwendet. Das CAII Protein weist eine Größe von 28 kDa und das CAIV Protein eine Größe von 38 kDa auf. In der Niere der Wildtyp-Maus (wt), die für beide Proteine als Positivkontrolle dient, sind entsprechende Banden in Höhe von 28 und 38 kDa vorhanden. Im Hoden (wt) und Caput epididymidis (wt) ist ausschließlich ein CAII Signal detektierbar. Ab dem Corpus epididymidis und den folgenden Abschnitten, der Cauda epididymidis und dem Ductus deferens, sind in der Wildtyp-Maus beide Proteine nachweisbar. Auch die isolierten und aufgereinigten Spermien der Wildtyp-Maus zeigen ein positives Signal für beide Proteine. In den entsprechenden Geweben und der Spermienfraktion der CAII CAIV Doppelknockout-Maus ist weder CAII noch CAIV nachweisbar.

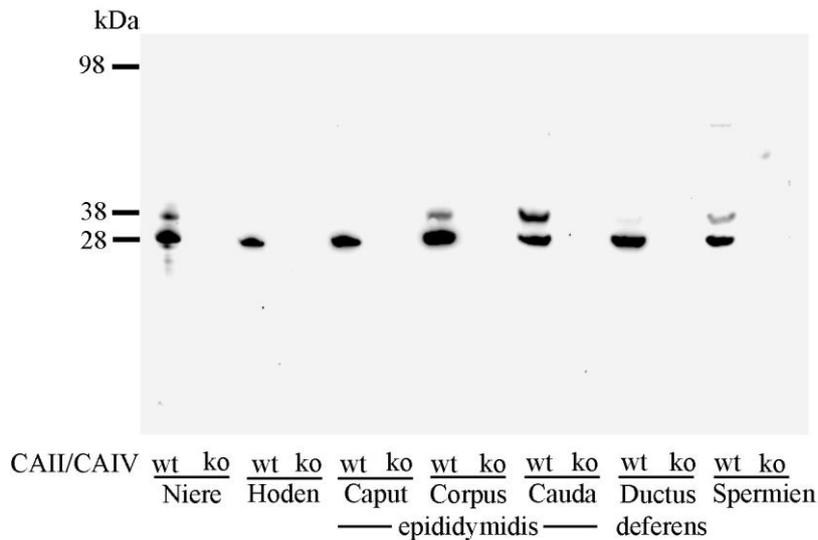


Abbildung 38: CAII und CAIV Proteinnachweis im männlichen Genitaltrakt und in isolierten Spermien mittels Western Blot

Der Immunoblot zeigt ein positives CAII Signal in Höhe von 28 kDa in allen Gewebefractionen der Wildtyp-Maus (wt). Ein zusätzliches CAIV Proteinsignal in Höhe von 38 kDa ist in der Niere, im Corpus und in der Cauda epididymidis und im Ductus deferens der Wildtyp-Maus nachweisbar. Spermien (wt) zeigen sowohl die CAII als auch die CAIV Proteinbande. Die Gewebe und Spermien der CAII CAIV Doppelknockout-Maus (ko) weisen weder ein CAII noch ein CAIV Signal auf.

6.2.4.3 Immunhistologische Doppelfärbung zur Proteinlokalisierung von CAII und CAIV im männlichen Genitaltrakt der Maus

Für den gleichzeitigen Proteinnachweis von CAII und CAIV wurden zwei unterschiedliche enzymatische Farbreaktionen eingesetzt. Die Darstellung von CAII erfolgte mit dem Substrat DAB, das durch die gekoppelte Peroxidase ein bräunliches Endprodukt hervorruft. CAIV wurde mit dem Enzymkomplex der alkalischen Phosphatase, welche ein rotes Färbeprodukt aufweist, detektiert. Zum Vergleich wurde bouinfixiertes Gewebe von Wildtyp- und Doppelknockout-Tieren für die Färbungen eingesetzt.

In Abbildung 39 sind Aufnahmen des Nierengewebes dargestellt, die als Positivkontrolle dienen. Die Niere der Wildtyp-Maus (A) zeigt sowohl ein CAII als auch ein CAIV Signal. CAII ist intrazellulär in den Epithelzellen des distalen Tubulussystems lokalisiert. Das rötliche CAIV Signal ist an der apikalen Membranoberfläche, dem sogenannten Bürstensaum, des proximalen Tubulus zu erkennen. Die beiden Inserts (a) zeigen jeweils eine höhere Vergrößerung einer proximalen (a1) bzw. distalen (a2) Tubulusepithelzelle. Im Gewebe der CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Maus (B, b) konnte keines der beiden Proteine nachgewiesen werden.

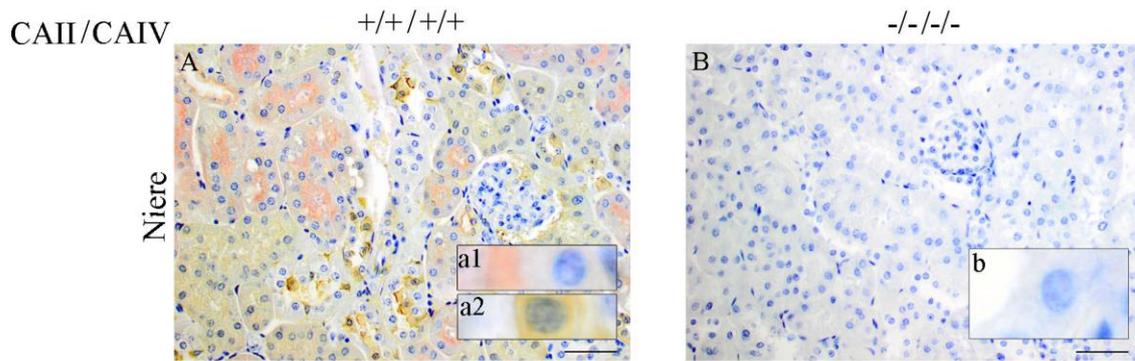


Abbildung 39: Immunhistologische CAII/CAIV Doppelfärbung der Niere
 Im Nierenrindbereich der Wildtyp-Maus (A, a) ist sowohl CAII (braun) in vereinzelt Epithelzellen des distalen Tubulus (a1) als auch CAIV (rot) im Bürstensaum des proximalen Tubulus (a2) nachweisbar. Das Gewebe der CAII/CAIV Doppelknockout-Maus (B, b) zeigt kein spezifisches CAII bzw. CAIV Signal. A, B Bar = 50 μ m; a, b Bar = 10 μ m.

Abbildung 40 zeigt Aufnahmen aus dem Hoden und den unterschiedlichen Nebenhodenabschnitten. Die Doppelfärbung am Gewebe der Wildtyp-Maus ist links (CAII^{+/+} CAIV^{+/+}: A, a, C, c; E, e, G, g), die der Doppelknockout-Maus rechts (CAII^{-/-} CAIV^{-/-}: B, b, D, d, F, f, H, h) dargestellt. In den Gewebeschnitten der Wildtyp-Maus ist ein CAII spezifisches braunes Signal im Hoden in elongierten Spermatisden (A, a) nachweisbar. Des Weiteren sind im Caput (C, c) und in der Cauda epididymidis (G, g) einzelne Epithelzellen CAII positiv. Die meisten CAII positiven Zellen sind im Corpus epididymidis (E, e) zu detektieren. Hinzu kommt ein CAII Signal in den Stereozilien. Bei Betrachtung der adluminalen Spermien ist auch hier ein CAII Signal in allen Abschnitten des Nebenhodens zu sehen. Die CAIV Lokalisation zeigt deutliche Unterschiede im Vergleich zur CAII. In den Geweben der Wildtyp-Maus ist weder im Hoden (A, a) noch im Caput epididymidis (C, c) ein CAIV Signal nachweisbar. Ein spezifisches rotes CAIV Signal tritt erst im Corpus epididymidis (E, e) auf. Die höhere Vergrößerung (e) zeigt ein rotes Signal im Stereoziliennetzwerk. Ein schwächeres CAIV Signal ist ebenso im Stereoziliengeflecht der Cauda epididymidis (G, g) lokalisiert. Im Corpus epididymidis und in weiter distal gelegenen Abschnitten ist auch ein CAIV Signal in den adluminal lokalisierten Spermien nachweisbar. In den Geweben der CAII/CAIV Doppelknockout-Maus ist kein spezifisches CAII bzw. CAIV Signal detektierbar.

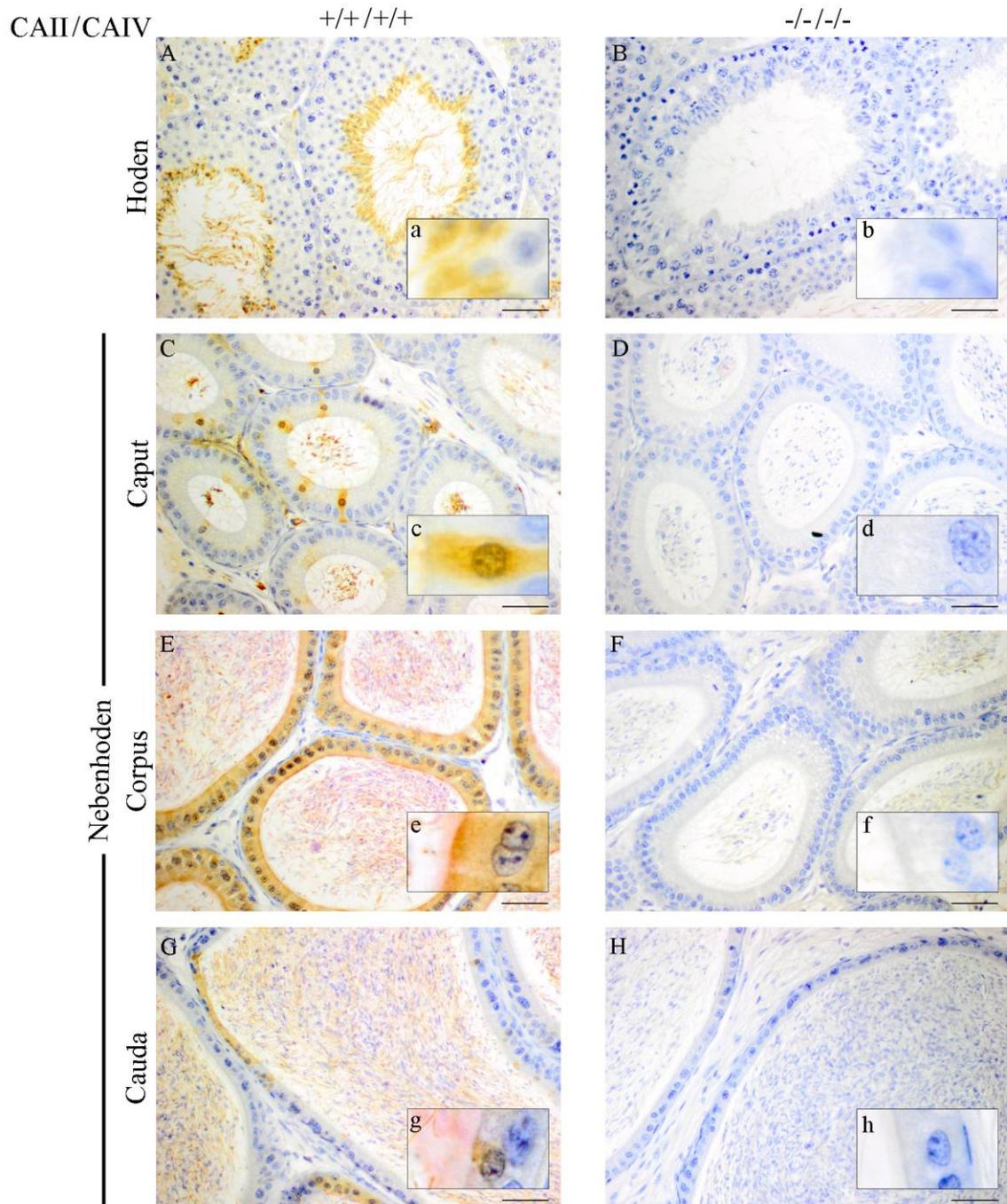


Abbildung 40: Immunhistologische CAII/CAIV Doppelfärbung an Hoden- und Nebenhodengewebe

CAII (braun) ist in elongierten Spermatisden (A, a) und in Epithelzellen des Caput (C, c), Corpus (E, e) und der Cauda epididymidis (G, g) nachweisbar. CAIV (rot) ist im Stereoziliengeflecht des Corpus und der Cauda epididymidis detektierbar. Adluminalen Spermien sind ebenfalls CAII positiv, jedoch erst ab dem Corpus epididymidis CAIV positiv. Weder CAII noch CAIV ist im Gewebe der CAII/CAIV Doppelknockout-Maus (B, b, D, d, F, f, H, h) nachweisbar. A-H Bar = 50 μ m; a-h Bar = 10 μ m.

Die immunhistologische Doppelfärbung wurde ebenfalls an Gewebeschnitten des Ductus deferens durchgeführt und ist in Abbildung 41 dargestellt. Weder das Gewebe der Wildtyp-Maus (A, a) noch das der CAII CAIV Doppelknockout-Maus (B, b) zeigen ein spezifisches CAII bzw. CAIV Signal.

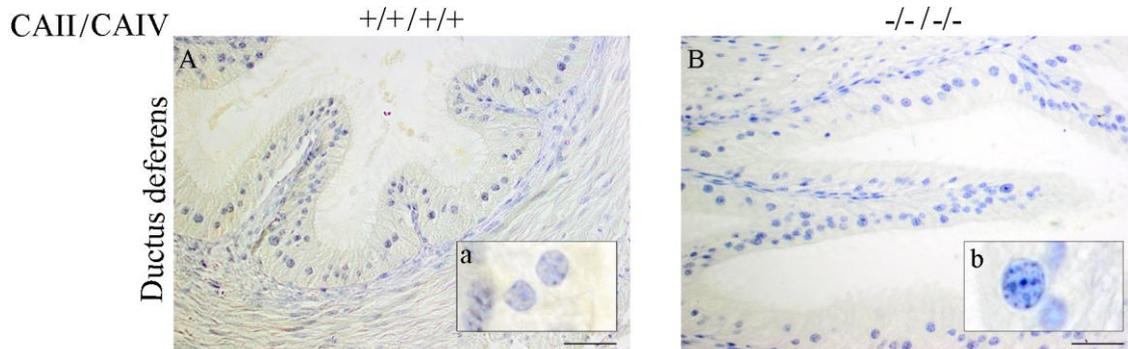


Abbildung 41: Immunhistologische CAII CAIV Doppelfärbung am Ductus deferens
Sowohl im Gewebe der Wildtyp-Maus (A, a) als auch in der CAII CAIV Doppelknockout-Maus (B, b) ist kein spezifisches CAII bzw. CAIV Signal nachweisbar. A, B Bar = 50 μ m; a, b Bar = 10 μ m.

6.2.4.4 CAII und CAIV Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung an murinen Spermien

Für die gleichzeitigen Proteindetektion von CAII und CAIV in Spermien, wurde eine Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. CAII wurde mit Alexa Fluor® 488 (grün) und CAIV mit Cy3 (rot) dargestellt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). In Abbildung 42 sind die Aufnahmen der Doppelfärbung repräsentativer Spermatozoen dargestellt. Die Aufnahmen A-D zeigen exemplarisch ein Spermium aus dem Nebenhodenschwanz einer CAII^{+/+} CAIV^{+/+} Maus in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen. Zum Vergleich zeigen die Aufnahmen E-H ein Spermium einer CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Maus. Abgebildet ist jeweils das gleiche Spermium bei Anregung mit verschiedenen Wellenlängen, um CAII bzw. CAIV einzeln zu dokumentieren, sowie ein Überlagerungsbild (C, c, G, g) zur gleichzeitigen Darstellung beider Signale. Zusätzlich wurden die Zellen im DIC Modus (D, d, H, h) aufgenommen, um die Fluoreszenzsignale Zellkompartimenten zuordnen zu können. Spermien der Wildtyp-Maus zeigen das zytosolische CAII Signal (A, a) im Haupt- und Endstück, wohingegen das membranlokalisierte CAIV Signal (B, b) entlang des gesamten Spermischwanzes detektiert werden kann. Im Vergleich dazu zeigen Spermien der CAII CAIV Doppelknockout-Maus weder CAII (E, e) noch CAIV (F, f) spezifische Signale.

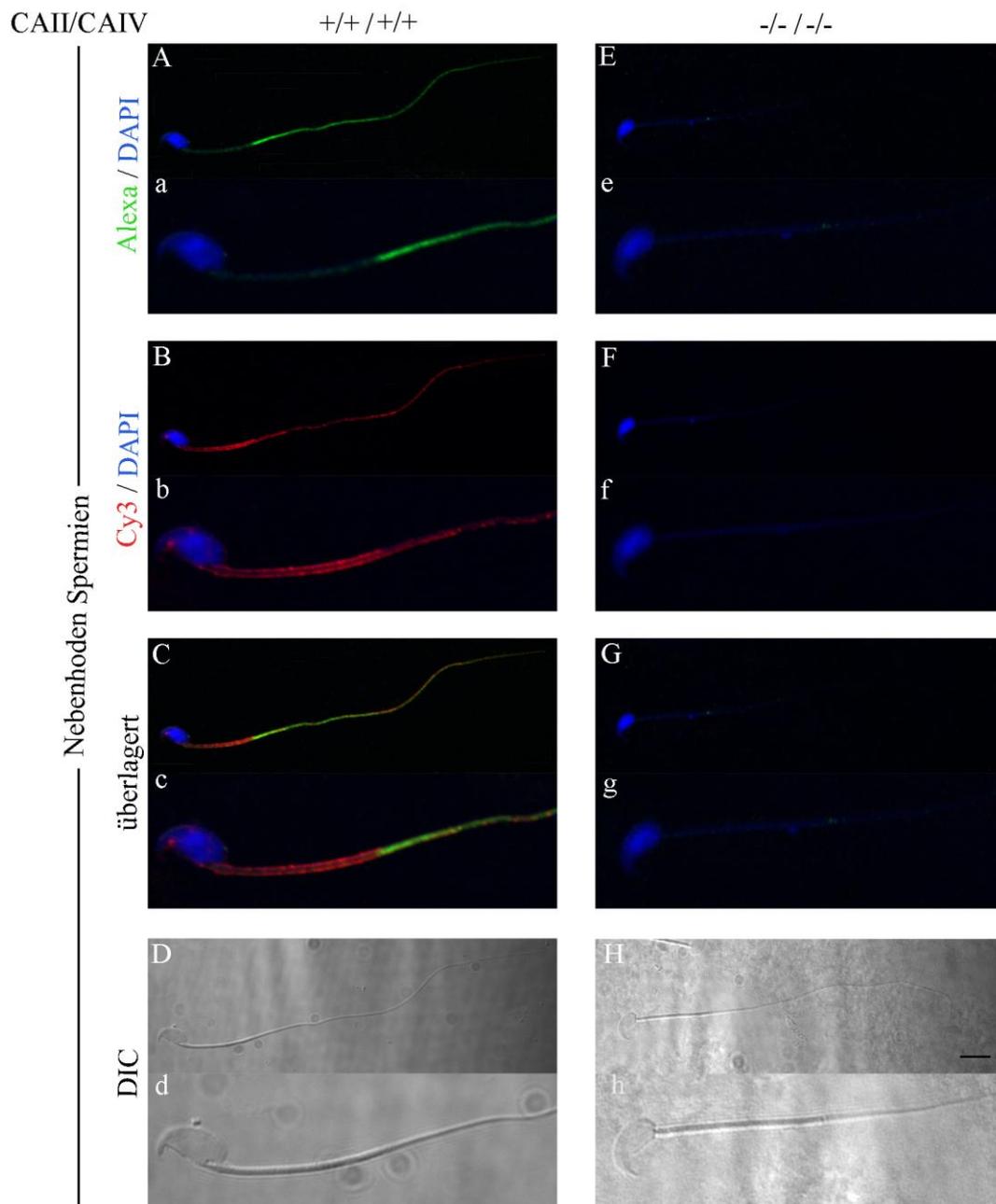


Abbildung 42: CAII CAIV Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung an murinen Spermien
 Spermien der Wildtyp-Maus zeigen sowohl das grün-fluoreszierende CAII Signal (A, a) im Haupt- und Endstück als auch das membranlokalisierte rot-fluoreszierende CAIV Signal (B, b) entlang des gesamten Spermischwanzes. In Spermien der CAII CAIV Doppelknockout-Maus (E-G) ist weder ein spezifisches CAII noch ein CAIV Signal nachweisbar. Aufnahme (C, c) zeigt die Überlagerungsbilder. A-H Bar = 10 µm; a-h vergrößert aus A-H.

In Spermien von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen ist weder CAII noch CAIV nachweisbar. Sowohl im Western Blot (Abbildung 38) als auch in der Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung sind keine spezifischen Proteinsignale zu beobachten.

Aus diesem Grund wird im Folgenden der Begriff „CAII CAIV Doppelknockout-Spermien“ bzw. „CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien“ äquivalent zu dem fachlich korrekten Begriff „Spermien von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen“ verwendet.

6.2.5 Funktionsanalytische Methoden

6.2.5.1 CASA Analyse der Spermien von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen

Isolierte Spermien von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen wurden mittels CASA hinsichtlich wichtiger Motilitätsparameter analysiert. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse von CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien zusammengefasst. Ebenfalls mit abgebildet sind die bereits beschriebenen CASA Ergebnisse für Spermien von Wildtyp- und CAII Knockout-Mäusen aus Abbildung 24.

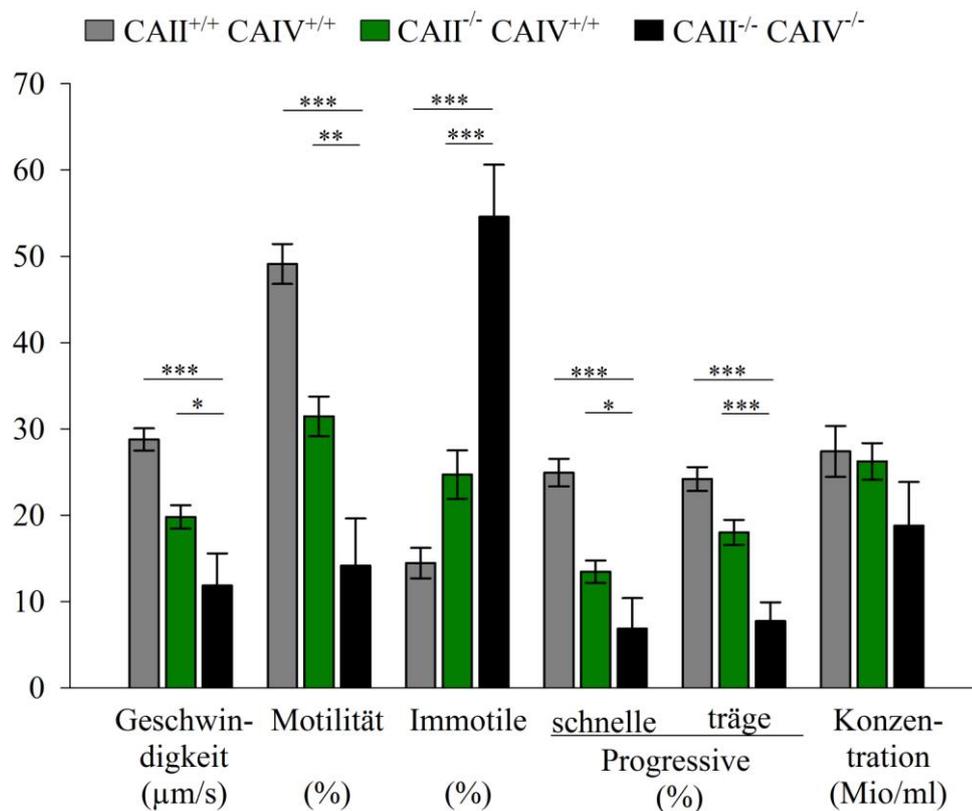


Abbildung 43: CASA Analyse von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien
CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen im Vergleich zu Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien eine stark reduzierte Motilität, während der Anteil an immotilen Spermien sich mehr als verdoppelt. Keine Unterschiede sind in der Spermienkonzentration der verschiedenen Genotypen zu beobachten ($n \geq 7$).

Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ($n = 38$) ist die Geschwindigkeit sowie der prozentuale Anteil an motilen, schnell und langsam progressiven Spermien in der CAII CAIV Doppelmutante ($n = 7$) stark reduziert. Die durchschnittliche Geschwindigkeit von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ist $11,84 \pm 3,72 \mu\text{m/s}$ und die Motilität beträgt

14,14 ± 5,46%. Der Anteil an schnell progressiven und träge progressiven Spermien sinkt auf 6,86 ± 3,54% bzw. 7,71 ± 2,19%. Im Gegensatz dazu steigt der Anteil an immotilen Spermien von 14,45 ± 1,77% im Wildtyp auf 54,57 ± 6,03% im Doppelknockout. Vergleicht man die Ergebnisse der Doppelknockout-Spermien mit den Ergebnissen der CAII Knockout-Spermien (n = 20) sind verstärkt Effekte in den CASA Parametern feststellbar. Durch den zusätzlichen CAIV Genverlust sinkt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien des Doppelknockout-Tieres um 28%, der Anteil an motilen Spermien um 35%, an schnell progressiven um 26% und träge progressiven um 6% gegenüber den Spermien von CAII Knockout-Mäusen. Der Anteil an immotilen Spermien steigt dagegen im Vergleich zu CAII Knockout-Spermien um mehr als das Doppelte an (CAII^{-/-} CAIV^{+/+} = 24,70 ± 2,81%; CAII^{-/-} CAIV^{-/-} = 54,57 ± 6,03%). Der einzige CASA Parameter, der keinen signifikanten Unterschied in allen drei Spermienpopulationen aufweist, ist die Spermienkonzentration (Mio/ml).

6.2.5.2 Schlagfrequenzanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien

Wie bereits für die CAII^{-/-} Spermien beschrieben (s. Kapitel 6.1.2.3), wurde das gleiche Experiment mit CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien in Hinblick auf die HCO₃⁻ Antwort durchgeführt. Dabei wurden die Schlagfrequenzen von CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien nach dreiminütiger Inkubation in HS-Puffer bzw. in HCO₃⁻haltigem (15 mM) HS-Puffer analysiert. In Abbildung 44 sind die Ergebnisse sowohl für die CAII CAIV Doppelmutanten (n = 40) als auch für die bereits gezeigten CAII Mutanten (n = 35) im Vergleich zum Wildtyp (n = 35) dargestellt. Es ist kein Unterschied in der in HS-Puffer gemessenen Grundschlagfrequenz (CAII^{+/+} CAIV^{+/+} = 3,18 ± 0,09 Hz, CAII^{-/-} CAIV^{+/+} = 3,0 ± 0,1 Hz, CAII^{-/-} CAIV^{-/-} = 3,1 ± 0,08 Hz) zu beobachten. Nach dreiminütiger HCO₃⁻ Stimulation spiegelt sich jedoch ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Doppelknockout-Spermien wider. Die Schlagfrequenz in CAII^{+/+} CAIV^{+/+} Spermien beträgt 7,62 ± 0,15 Hz, die Frequenz in CAII^{-/-} CAIV^{-/-} 6,44 ± 0,19 Hz. In CAII Knockout-Spermien beträgt die Schlagfrequenz nach HCO₃⁻ Inkubation 5,74 ± 0,2 Hz. Es ist sowohl in CAII Knockout- als auch in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien eine signifikant verminderte Schlagfrequenzerhöhung nach dreiminütiger HCO₃⁻ Stimulation zu beobachten, wobei der Effekt in CAII Knockout-Spermien am deutlichsten ist.

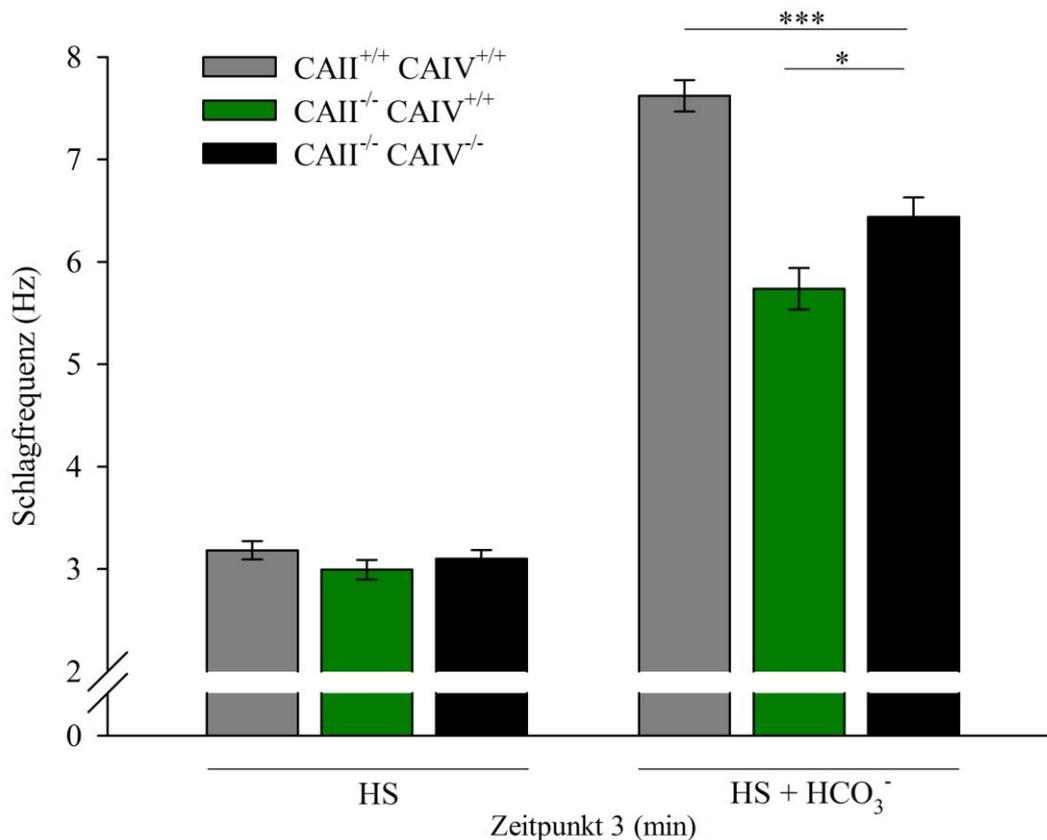


Abbildung 44: Reduzierte HCO₃⁻ Antwort in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien
 Auf Einzelzellniveau wurden Schlagfrequenzanalysen von CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien nach dreiminütiger Inkubation in HS- oder in HCO₃⁻-haltigem HS-Puffer gemessen und mit Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien verglichen. Nach HCO₃⁻ Stimulation zeigen sowohl CAII^{-/-} CAIV^{+/+} (5,74 ± 0,2 Hz) als auch CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien (6,44 ± 0,19 Hz) eine signifikant verringerte Schlagfrequenz (n ≥ 35).

In Abbildung 45 sind die Ergebnisse der Schlagfrequenzen von Doppelknockout-Spermien in der HCO₃⁻ (Abbildung 45A, a) bzw. CO₂ (Abbildung 45B, b) Zeitreihe zusammengefasst. Das Messprotokoll entspricht der Zeitreihe aus den CAII Experimenten (s. Kapitel 6.1.2.3), deren Ergebnisse zum besseren Vergleich in den Graphen integriert sind. In Abbildung 45a und b sind jeweils die detaillierten Zeitabschnitte der ersten 40 s HCO₃⁻ bzw. CO₂ Applikation vergrößert abgebildet. Im Vergleich zu Wildtyp-Spermien (n = 51) ist in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien (n = 40) eine verzögerte HCO₃⁻ und CO₂ Antwort zu beobachten. 20 s nach HCO₃⁻ Applikation erreichen Wildtyp-Spermien eine annähernde Maximalfrequenz von 7,04 ± 0,18 Hz. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Schlagfrequenz in CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien 5,0 ± 0,25 Hz und in CAII^{-/-} CAIV^{+/+} Spermien 3,9 ± 0,18 Hz (n = 40). Eine maximale Frequenz erreichen CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien (6,53 ± 0,23 Hz) nach 60 s und CAII^{-/-} CAIV^{+/+} Spermien (5,86 ± 0,2 Hz) 180 s nach HCO₃⁻ Stimulation.

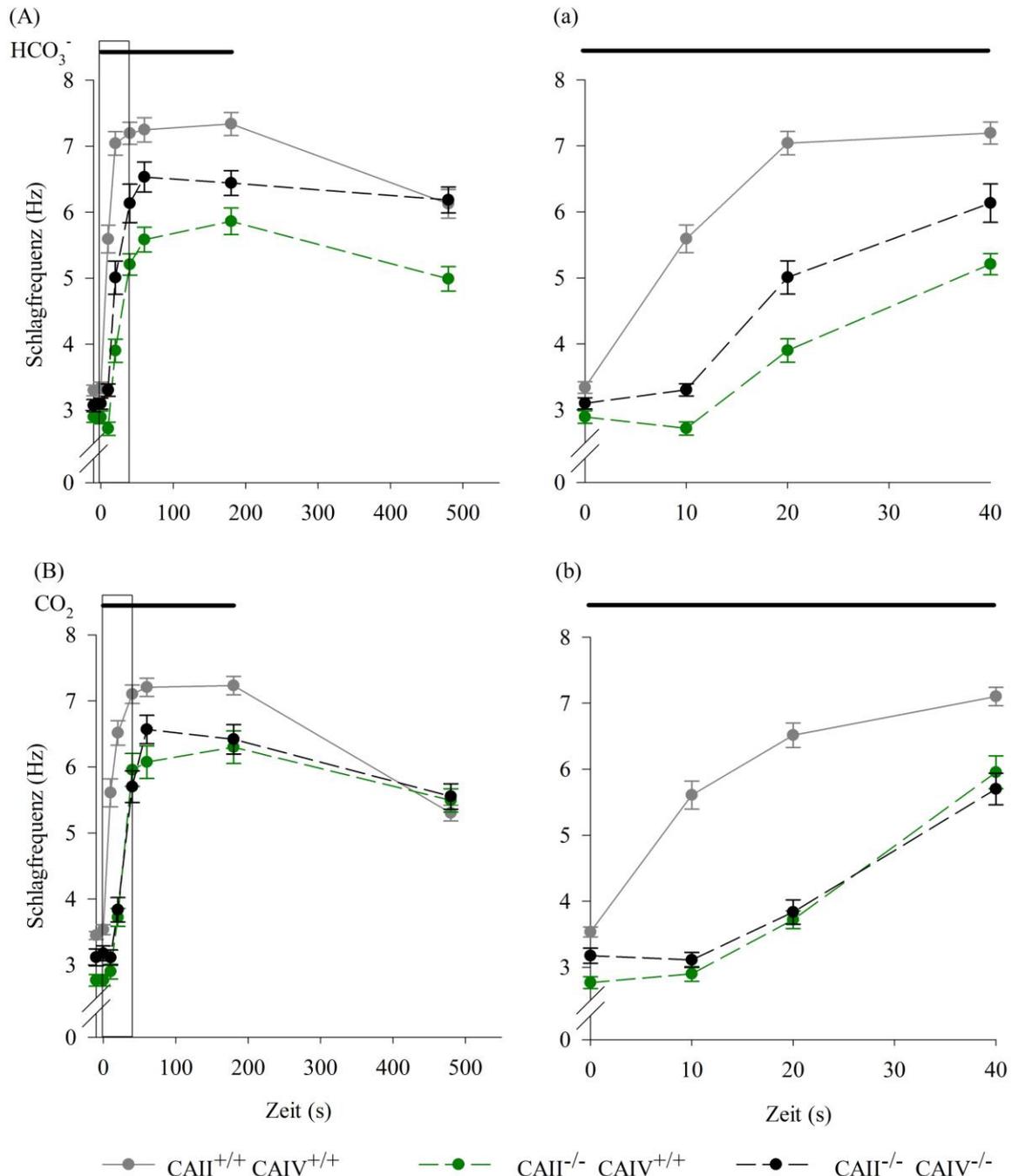


Abbildung 45: Schlagfrequenzanalyse von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien nach Stimulation mit HCO_3^- bzw. CO_2 . CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien wurden für 180 s mit HCO_3^- (A, a) bzw. CO_2 (B, b) perfundiert. In (A, B) ist das gesamte achtminütige Protokoll, in (a, b) der Ausschnitt von 0-40 s vergrößert dargestellt. Im Vergleich zu Wildtyp-Spermien ist in CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien ein verzögerter Schlagfrequenzanstieg sowohl in der HCO_3^- als auch in der CO_2 Antwort zu beobachten. Während in der CO_2 Stimulation der verzögerte Frequenzanstieg in CAII Knockout- und CAII CAIV Doppelknockout-Spermien vergleichbar ist, ist in der HCO_3^- Antwort der reprimierende Effekt in CAII^{-/-} Spermien stärker ($n \geq 40$).

Beobachtet man die Schlagfrequenzen in der CO₂ Zeitreihe (Abbildung 45B, b), zeigen CAII^{-/-} (n = 41) und CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien (n = 40) einen vergleichbaren verzögerten Frequenzanstieg. Wildtyp-Spermien (n = 51) erreichen nach 20 s CO₂ Stimulation eine annähernde Maximalfrequenz von 6,51 ± 0,19 Hz, während CAII^{-/-} CAIV^{-/-} bzw. CAII^{-/-} CAIV^{+/+} Spermien einen Wert von 3,84 ± 0,19 Hz bzw. 3,72 ± 0,14 Hz erreichen. Eine maximale Frequenz von 6,57 ± 0,21 Hz weisen CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien nach 60 s CO₂ Applikation auf. CAII^{-/-} CAIV^{+/+} Spermien benötigen 180 s CO₂ Stimulation, um eine Maximalfrequenz von 6,3 ± 0,25 Hz zu erreichen.

6.2.5.2 CAII CAIV Doppelknockout-Spermien weisen keinen veränderten [pH]_i auf

Da CAs die Säure-Base-Homöostase der Zelle beeinflussen können und ein damit in Verbindung stehender veränderter [pH]_i in Spermien ein Grund für die verzögerte HCO₃⁻ Antwort sein könnte, wurden CAII CAIV Doppelknockout-Spermien mit dem pH-sensitiven BCECF beladen und der basale [pH]_i in HS-Puffer (pH 7,4) bestimmt. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der Spermien von Wildtyp-, CAII Knockout- und CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen dargestellt.

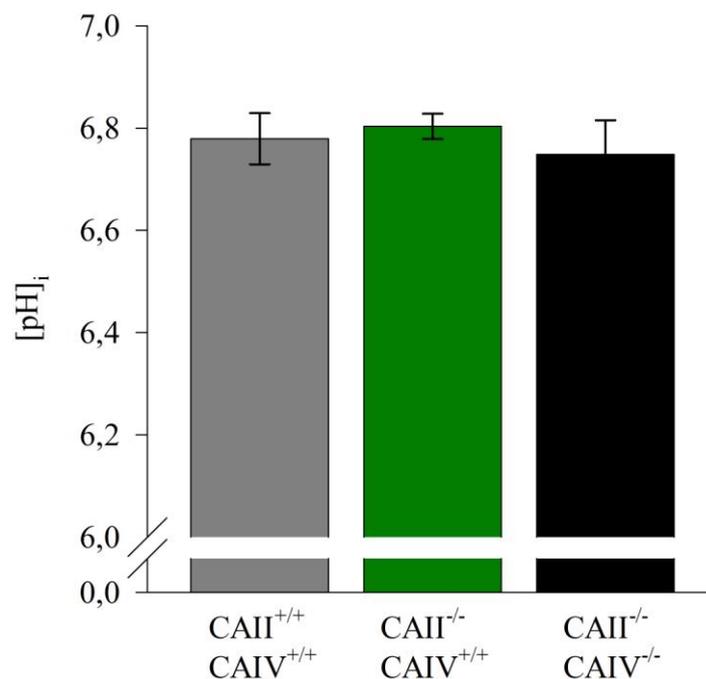


Abbildung 46: Kein veränderter [pH]_i in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien
BCECF-beladene CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien wurden photometrisch ausgewertet und zeigen im Vergleich zu Wildtyp- und zu CAII Knockout-Spermien keinen Unterschied im [pH]_i (n ≥ 12).

Der $[pH]_i$ in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien beträgt $6,75 \pm 0,07$ ($n = 12$) und zeigt damit keinen signifikanten Unterschied zu Wildtyp- ($6,78 \pm 0,05$; $n = 19$) und CAII Knockout- ($6,8 \pm 0,02$; $n = 17$) Spermien.

5.2.5.3 Wiederherstellung des $[pH]_i$ in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien nach intrazellulärer Alkalisierung

Analog zu den Messungen mit CAII Knockout-Spermien (s. Kapitel 6.1.2.7) wurden auch CAII CAIV Doppelknockout-Spermien hinsichtlich der Wiederherstellung des $[pH]_i$ auf das Ausgangsniveau nach intrazellulärer pH-Erhöhung analysiert. Dafür wurden BCECF-beladene CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien zweimal (60-120 s und 300-360 s) für 1 min mit Ammoniumchlorid (20 mM) zur Erhöhung des $[pH]_i$ stimuliert und die Dauer bis zur Wiederherstellung des Ausgangs-pHs gemessen. In Abbildung 47 sind sowohl die bereits beschriebenen Ergebnisse aus Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien (Abbildung 32) als auch die Ergebnisse aus CAII CAIV Doppelknockout-Spermien dargestellt.

Der $[pH]_i$ in Doppelknockout-Spermien beträgt zum Zeitpunkt $t = 0$ $6,74 \pm 0,06$ ($n = 6$) und ist damit um 0,06 pH-Einheiten geringer als in Wildtyp- ($6,8 \pm 0,09$; $n = 11$) und CAII Knockout- ($6,8 \pm 0,03$; $n = 11$) Zellen. Der $[pH]_i$ von CAII CAIV Doppelknockout-Spermien steigt während der ersten Stimulation auf einen Maximalwert von $7,15 \pm 0,12$ ($t = 84$ s) und während der zweiten Applikation auf einen Wert von $7,1 \pm 0,11$ ($t = 328$ s) an. Die intrazelluläre Alkalisierung und die anschließende Wiederherstellung des Ausgangs-pH nach der Stimulation verlaufen äquivalent zum $[pH]_i$ -Verlauf der Wildtyp-Spermien. Wie in Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien, ist auch in Doppelknockout-Spermien eine Veränderung des Ausgangs-pH vor und nach der $[pH]_i$ -Erhöhung zu beobachten. Die CAII CAIV defizienten Zellen pendeln sich nach der ersten Stimulation bei einem $[pH]_i$ von $6,56 \pm 0,05$ ($t = 240$ s) und nach der zweiten Stimulation bei $6,48 \pm 0,05$ ($t = 480$ s) ein. Im Vergleich zum Ausgangs-pH beträgt die Differenz 0,26 pH Einheiten.

In CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ist somit die Säure-Base-Homöostase nicht beeinträchtigt. Trotz des doppelten Enzymverlustes sind die Spermien noch in der Lage, auf eine $[pH]_i$ -Erhöhung zu reagieren und auf ihren Ausgangs-pH zurückzukehren.

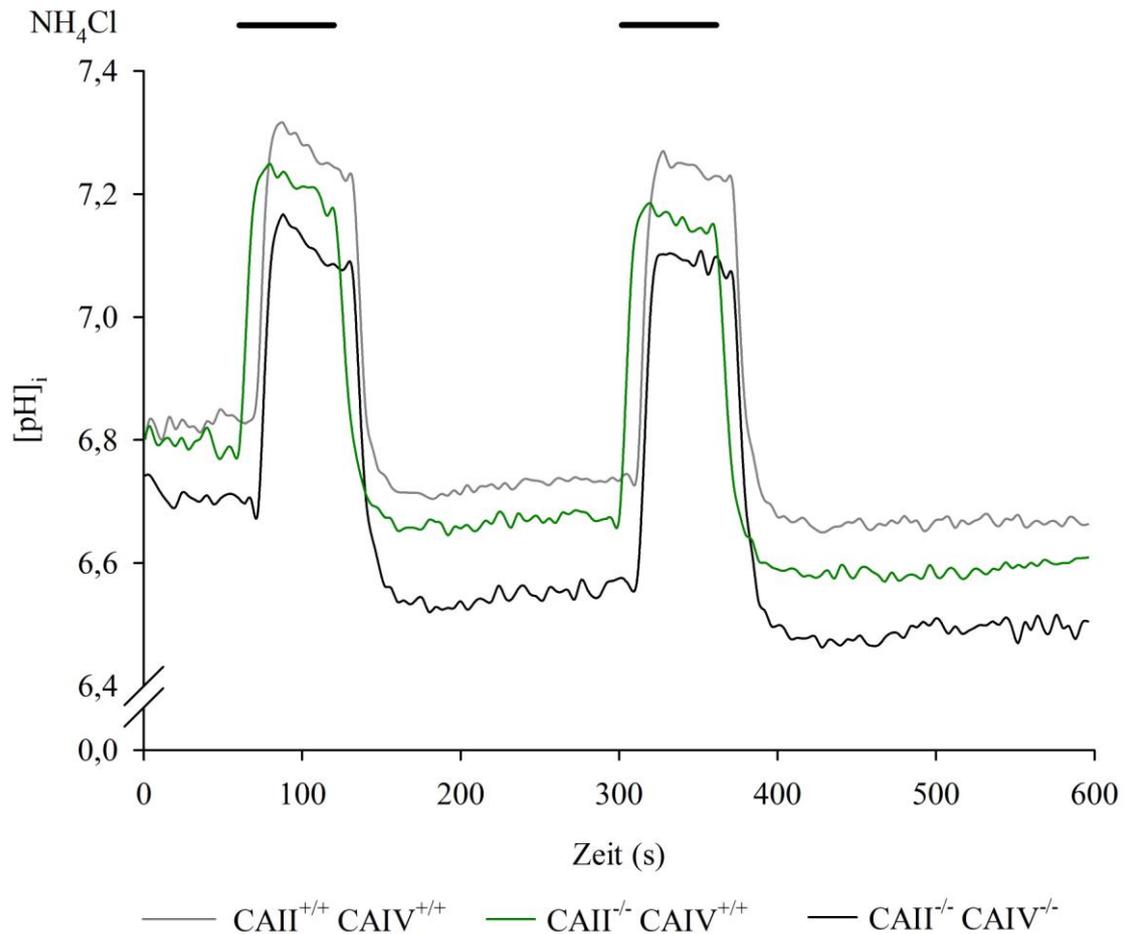


Abbildung 47: Kein Unterschied bei der Wiederherstellung des basalen $[pH]_i$ in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien
 BCECF-beladene CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien wurden zweimal (60-120 s und 300-360 s) mit Ammoniumchlorid, um den $[pH]_i$ zu erhöhen, stimuliert und in Einzelzellanalysen photometrisch ausgewertet. CAII^{-/-} CAIV^{-/-} Spermien weisen im Vergleich zu Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien keine Unterschiede im Anstieg während der pH-Erhöhung bzw. im Abfall nach der Stimulation auf ($n \geq 6$).

6.3 Biochemisch generierte CAII CAIV Doppelknockout-Spermien aus CAII Knockout-Spermien mittels PLC

6.3.1 Molekularbiologische Analysen

6.3.1.1 CAIV Proteinnachweis in biochemisch generierten CAIV Knockout-Spermien

Auf Grund der gezeigten Überexpression von CAIV und CAXIV im Nebenhodengewebe der Knockout-Mauslinien könnte vermutet werden, dass auch in Doppelknockout-Spermien die Expression anderer CA Isoformen den CAII und CAIV Genverlust ausgleichen. Um eine solche genetische Kompensation in Knockout-Spermien zu verhindern, wurde die CAIV Aktivität in Spermien nachträglich biochemisch eliminiert. Durch die Inkubation posttestikulärer Wildtyp-Spermien mit PLC (90 min, 37° C, 2 Units), deren enzymatische Aktivität zur Abspaltung von GPI-verankertem CAIV führt, können phänotypische CAIV Knockout-Spermien generiert werden. Zur Überprüfung der PLC Enzymaktivität wurden die phänotypischen CAIV Knockout-Spermien auf das Vorhandensein des CAIV Proteins analysiert. Da nach einer erfolgreichen CAIV Abspaltung das Protein im Überstand nachweisbar sein sollte, wurden sowohl Spermien als auch der Überstand für eine folgende Proteinaufreinigung verwendet. Für den anschließenden Western Blot wurden 0,8 µg Gesamtprotein und 25 µl des Überstandes eingesetzt (Abbildung 48). In der ersten Linie wurden Spermien einer Wildtyp-Maus aufgetragen, die eine spezifische CAIV Bande in Höhe von 38 kDa aufweisen. Wildtyp-Spermien, die für 90 min bei 37 °C mit PLC inkubierten, zeigen eine deutliche CAIV Bandenreduktion im Vergleich zur Kontrolle, die 90 min bei 37 °C ohne PLC inkubierte. Analysiert man das Bandenmuster im Überstand, ist ein deutliches CAIV Signal in der Fraktion mit PLC detektierbar. Im Kontrollüberstand, welcher ohne PLC inkubierte, ist kein CAIV nachweisbar.

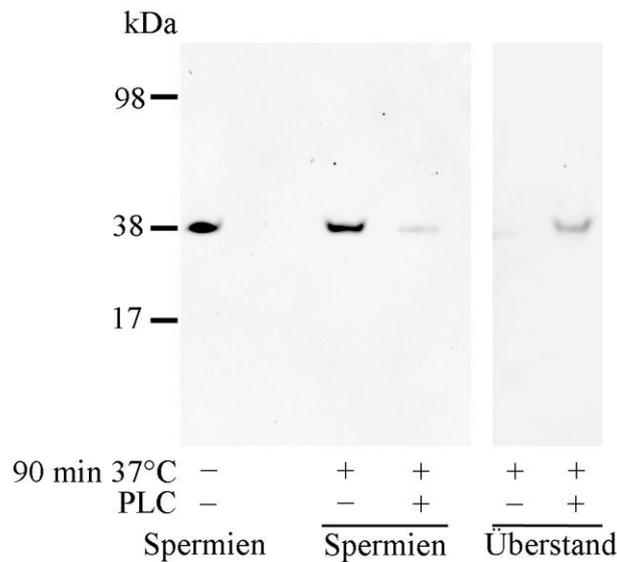


Abbildung 48: CAIV Proteinnachweis in biochemisch generierten CAIV Knockout-Spermien

Die mit Hilfe von PLC gewonnenen phänotypischen CAIV Knockout-Spermien zeigen, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen, eine deutliche Reduktion der CAIV Bandenintensität. Gleichzeitig ist das CAIV Protein im entsprechenden Überstand nachweisbar, während der ohne PLC inkubierte Überstand kein CAIV Signal zeigt.

6.3.1.2 Immunhistologischer CAIV Nachweis in phänotypischen CAIV Knockout-Spermien

Als weiteren Nachweis für die PLC Enzymaktivität wurden Spermienausstriche von biochemisch generierten CAIV Knockout-Spermien angefertigt und für eine immunzytochemische CAIV Färbung eingesetzt (Abbildung 49). Kontrollspermien (A, a), die ohne PLC inkubierten, zeigen das membranlokalisierte CAIV Signal entlang des gesamten Spermenschwanzes. In den biochemischen CAIV Knockout-Spermien (B, b) ist eine deutliche Reduktion des CAIV Signals zu beobachten, dessen Intensität entlang des gesamten Spermenschwanzes abnimmt. Damit beweisen die molekularbiologischen Analysen, dass durch die Behandlung von Wildtyp-Spermien mit PLC die GPI-verankerte CAIV erfolgreich abgespalten wird.

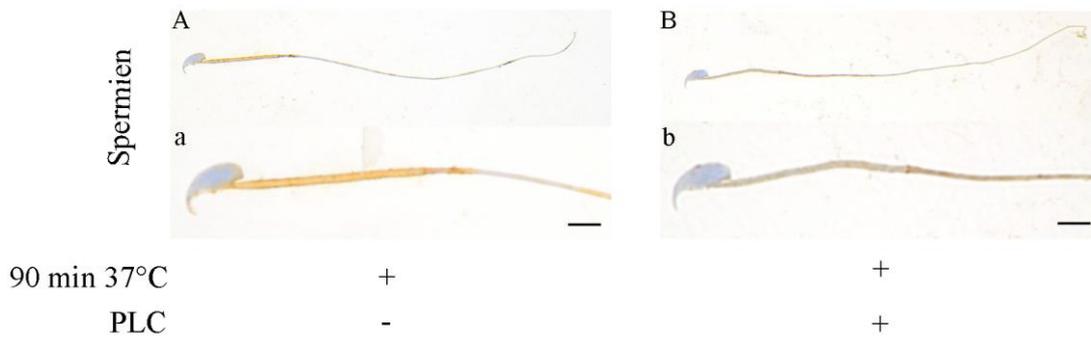


Abbildung 49: Immunhistologischer CAIV Nachweis in phänotypischen CAIV Knockout-Spermien

In biochemisch generierten CAIV Knockout-Spermien ist eine deutliche CAIV Signalabschwächung entlang des gesamten Spermischwanzes im Vergleich zu Kontroll-Spermien (A, a), die ohne PLC inkubierten, zu beobachten. A, B Bar = 10 μm ; a, b Bar = 4 μm

6.3.2 Funktionsanalytische Methoden

6.3.2.1 Verminderte HCO_3^- und CO_2 Antwort in phänotypischen CAII CAIV

Doppelknockout-Spermien

Nachdem die CAIV Abspaltung mittels PLC erfolgreich an Wildtyp-Spermien nachgewiesen wurde, wurde die Enzymaktivität zur Generierung von phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien eingesetzt. Dafür inkubierten Spermien von CAII Knockout-Mäusen mit PLC (2 Units, 90 min, 37° C). Dabei liegt der CAII Verlust durch einen genetischen Defekt vor, während der CAIV Proteinverlust nachträglich biochemisch erzeugt wird. Der Vorteil biochemischer Doppelknockout-Spermien besteht darin, dass kompensatorische Mechanismen, die eventuell in den genetischen Doppelmutanten vorliegen, eliminiert werden können.

In Einzelzellanalysen wurden die biochemischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien in Hinblick auf die Grunds Schlagfrequenz und die HCO_3^- bzw. CO_2 induzierte Schlagfrequenzerhöhung analysiert. In Abbildung 50 sind die Schlagfrequenzen von phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ($n = 30$) nach dreiminütiger Inkubation in HS-Puffer und nach Stimulation mit HCO_3^- -haltigen HS-Puffer zusammengefasst. Als Kontrolle dienten Wildtyp- ($n = 33$) und CAIV Knockout-Spermien ($n = 25$), die ebenfalls für 90 min bei 37 °C mit bzw. ohne PLC inkubierten. Von genetischen CAIV Knockout-Spermien ist bereits bekannt, dass sie mit einem verzögertem Anstieg der Schlagfrequenz auf HCO_3^- und CO_2 reagieren. Um auszuschließen, dass die PLC Behandlung keinen weiteren Effekt auf die Schlagfrequenz durch die Beeinträchtigung oder Abspaltung weiterer Proteine, die für den HCO_3^- induzierten

Signalweg von Bedeutung sind, ausübt, wurden CAIV Knockout-Spermien als weitere Kontrolle eingesetzt. Sowohl PLC-behandelte als auch unbehandelte Wildtyp- und CAIV Knockout-Spermien weisen keine Veränderung ihrer Grundschlagfrequenz auf. Die Grundschlagfrequenz von Wildtyp-Spermien beträgt $3,23 \pm 0,12$ Hz und für aus Wildtyp generierten biochemische CAIV Knockout-Spermien $3,12 \pm 0,12$ Hz. CAIV Knockout-Spermien weisen eine Grundschlagfrequenz von $3,25 \pm 0,19$ Hz (PLC-unbehandelt) und $3,28 \pm 0,17$ Hz (PLC-behandelt) auf. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl der CAIV Genverlust als auch die nachträgliche biochemische Abspaltung des CAIV Proteins keinen Einfluss auf die in HS gemessene Grundschlagfrequenz muriner Spermien hat.

CAII Knockout-Spermien ($3,28 \pm 0,18$ Hz) zeigen ebenfalls keinen Unterschied in ihrer Grundschlagfrequenz. Eine signifikante Reduzierung der Grundschlagfrequenz ist dagegen in phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zu beobachten, die $2,73 \pm 0,21$ Hz beträgt. Damit hat der alleinige CAII Genverlust keinen bedeutenden Einfluss auf die Grundschlagfrequenz muriner Spermien. Die zusätzliche biochemische CAIV Abspaltung in CAII Knockout-Spermien bewirkt jedoch eine signifikante Reduzierung der in HS-Puffer beobachteten Grundschlagfrequenz.

Während der dreiminütigen Stimulation mit HCO_3^- steigt die Schlagfrequenz in Wildtyp-Spermien auf $5,78 \pm 0,19$ Hz an. PLC-behandelte Wildtyp-Spermien, also phänotypische CAIV Knockout-Spermien, zeigen eine vergleichbare verminderte Schlagfrequenzerhöhung wie CAIV Knockout-Spermien. 3 min nach HCO_3^- Stimulation beträgt die Frequenz $5,13 \pm 0,12$ Hz in PLC-behandelten Wildtyp-Spermien, $5,2 \pm 0,23$ in PLC-unbehandelten CAIV Knockout- bzw. $5,04 \pm 0,2$ in PLC-behandelten CAIV Knockout-Spermien. CAII Knockout-Spermien, die ohne PLC inkubierten, erreichen nach dreiminütiger HCO_3^- Inkubation eine Frequenz von $4,8 \pm 0,14$ Hz. Beobachtet man die HCO_3^- Antwort in PLC-behandelten CAII^{-/-} Spermien, also phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien, ist eine höchst signifikante Abschwächung der Schlagfrequenzerhöhung zu beobachten. Die biochemischen Doppelknockout-Spermien erreichen nur eine Frequenz von $3,33 \pm 0,17$ Hz und sind damit nur 0,6 Hz höher als die gemessene Grundschlagfrequenz.

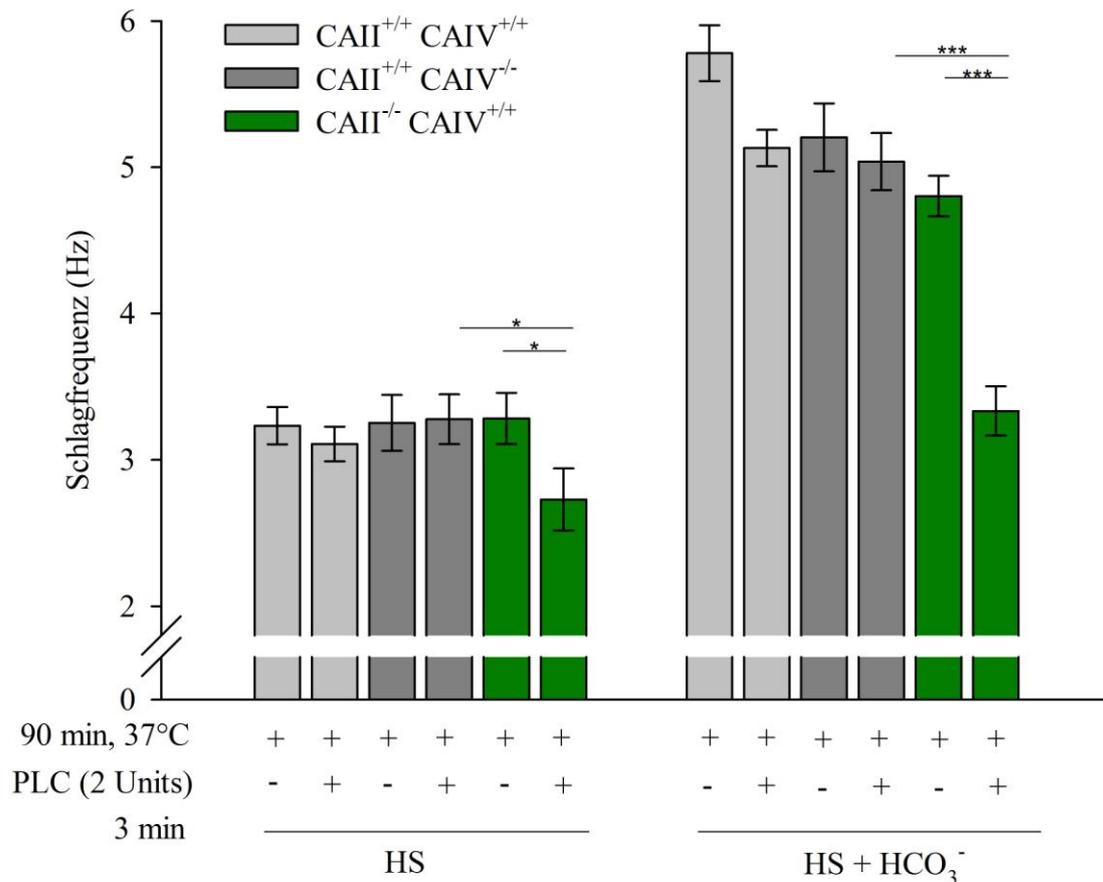


Abbildung 50: Verminderte Grund- und Maximalschlagfrequenz nach HCO_3^- Stimulation in phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien
 Wildtyp-, CAIV und CAII Knockout-Spermien inkubierten in An- bzw. Abwesenheit von PLC. Anschließend wurde auf Einzelzellniveau die Schlagfrequenz nach dreiminütiger Inkubation in HS- bzw. in HCO_3^- -haltigen HS-Puffer gemessen. Die mittels PLC generierten phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine verminderte Grundschlagfrequenz und einen stark eingeschränkten Schlagfrequenzanstieg nach HCO_3^- Stimulation ($n \geq 25$).

Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse von Wildtyp-, biochemischen und genetischen CAIV Knockout-Spermien in der HCO_3^- (Abbildung 51A, a) bzw. CO_2 (Abbildung 51B, b) Zeitreihe. Das Messprotokoll entspricht der Zeitreihe aus den CAII Experimenten (s. Kapitel 6.1.2.3). In Abbildung 51a und b sind die dazugehörigen Detailausschnitte (0-40 s) vergrößert dargestellt.

Wildtyp-Spermien ($n = 17$), die ohne PLC inkubierten, erreichen nach 20 s HCO_3^- Applikation eine Schlagfrequenz von $5,42 \pm 0,25$ Hz und nach 60 s eine Maximalfrequenz von $5,74 \pm 0,34$ Hz. Im Vergleich dazu zeigen PLC-behandelte Wildtyp-Spermien ($n = 18$) einen verzögerten Schlagfrequenzanstieg. Die erzeugten biochemischen CAIV Knockout-Spermien weisen nach 20 s eine Frequenz von $4,85 \pm 0,21$ Hz auf. Eine

Maximalfrequenz von $5,02 \pm 0,23$ Hz wird nach 60 s HCO_3^- Stimulation beobachtet. PLC-behandelte ($n = 24$) und unbehandelte CAIV Knockout-Spermien ($n = 19$) weisen einen vergleichbaren verzögerten Effekt im HCO_3^- Signalweg auf, der Kurvenverlauf ist fast identisch. Die Schlagfrequenz beträgt zum Zeitpunkt $t = 20$ s $4,87 \pm 0,26$ Hz in PLC-unbehandelten CAIV Knockout-Spermien und $4,76 \pm 0,23$ Hz in PLC-behandelten CAIV-Knockout-Spermien. Nach 60 s HCO_3^- Applikation erreichen CAIV Knockout-Spermien ($5,27 \pm 0,23$ Hz) und PLC-behandelte CAIV Knockout-Spermien ($5,23 \pm 0,23$ Hz) ihre Maximalfrequenz.

In der CO_2 Zeitreihe kann ebenfalls ein verzögerter Frequenzanstieg in phänotypischen und genetischen CAIV Knockout-Spermien beobachtet werden. Während Wildtyp-Spermien ($n = 20$) nach 20 s CO_2 Stimulation einen Frequenzanstieg von $3,35 \pm 0,23$ Hz zu $5,65 \pm 0,27$ Hz aufweisen und nach 40 s eine Maximalfrequenz von $6,12 \pm 0,24$ Hz erreichen, zeigen PLC-behandelte Wildtyp-Spermien ($n = 17$) nur einen Schlagfrequenzanstieg von $3,32 \pm 0,21$ Hz zu $4,76 \pm 0,31$ Hz nach 20 s und eine Maximalfrequenz von $4,82 \pm 0,2$ Hz nach 40 s. Auch PLC-behandelte ($n = 24$) und unbehandelte CAIV Knockout-Spermien ($n = 19$) zeigen den gleichen Schlagfrequenzverlauf wie die aus Wildtyp generierten biochemischen CAIV Knockout-Spermien. 20 s nach CO_2 Applikation beträgt die Schlagfrequenz $4,64 \pm 0,32$ Hz in PLC-unbehandelten CAIV Knockout-Spermien und $4,68 \pm 0,26$ Hz in PLC-behandelten CAIV Knockout-Spermien. Eine maximale Schlagfrequenz erreichen beide, ohne PLC ($5,15 \pm 0,21$ Hz) und mit PLC ($4,97 \pm 0,16$ Hz) inkubierte CAIV Knockout-Spermien, nach 60 s.

Dieses Experiment zeigt, dass die PLC Behandlung eine verzögerte Antwort auf HCO_3^- und CO_2 in Wildtyp-Spermien hervorruft, während die Antwort in CAIV Knockout-Spermien unverändert bleibt.

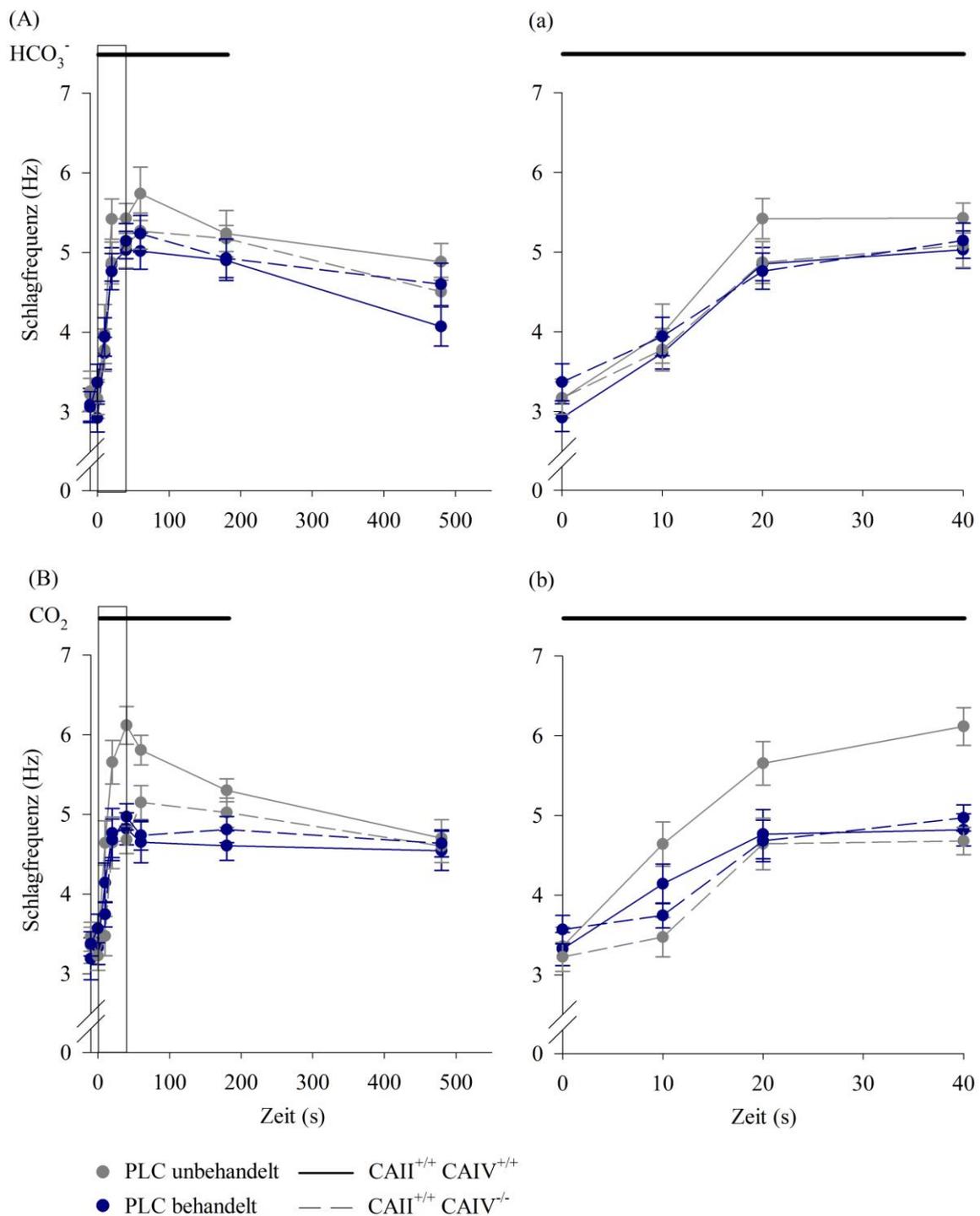


Abbildung 51: Schlagfrequenzanalysen von biochemischen und genetischen CAIV Knockout-Spermien während der Stimulation mit HCO_3^- und CO_2

Wildtyp- und CAIV Knockout-Spermien inkubierten in An- bzw. Abwesenheit von PLC und wurden anschließend für 180 s mit HCO_3^- (A, a) bzw. CO_2 (B, b) perifundiert. In (A, B) ist das gesamte achtminütige Protokoll, in (a, b) die detaillierten Ausschnitte von 0-40 s dargestellt. Sowohl die biochemisch generierten als auch die genetischen CAIV Knockout-Spermien zeigen in der dreiminütigen Stimulation mit HCO_3^- bzw. CO_2 den bereits etablierten verzögerten und reduzierten Frequenzanstieg ($n \geq 18$).

Das gleiche Messprotokoll wurde im Folgenden mit phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien durchgeführt. Die Ergebnisse der HCO_3^- Zeitreihe sind in Abbildung 51A dargestellt. Die Schlagfrequenzen von Wildtyp- und die aus Wildtyp generierten phänotypischen CAIV Knockout-Spermien entsprechen den Werten der vorherigen Abbildung 51. Wie bereits beschrieben erreichen Wildtyp-Spermien ($n = 17$) eine Schlagfrequenz von $5,42 \pm 0,25$ Hz nach 20 s und einen Maximalwert von $5,74 \pm 0,34$ Hz nach 60 s HCO_3^- Applikation. Biochemisch erzeugte CAIV Knockout-Spermien ($n = 18$) zeigen dagegen einen verzögerten Schlagfrequenzanstieg ($4,85 \pm 0,21$ Hz $t = 20$ s, $5,02 \pm 0,23$ Hz $t = 60$ s). Einen stärker verzögerten Frequenzanstieg weisen CAII Knockout-Spermien ($n = 19$) auf, die eine Frequenz von $3,74 \pm 0,19$ Hz nach 20 s und $4,86 \pm 0,24$ Hz nach 60 s HCO_3^- Applikation erreichen. Den stärksten reprimierenden Effekt auf den HCO_3^- vermittelten Frequenzanstieg kann jedoch in PLC-behandelten, also phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ($n = 22$), beobachtet werden. Die biochemischen Doppelknockout-Spermien weisen zum Zeitpunkt $t = 0$ eine verringerte Grundschlagfrequenz von $2,59 \pm 0,28$ Hz auf, die während der ersten 10 s HCO_3^- Stimulation auf $2,37 \pm 0,21$ Hz sinkt. Nach 20 s erreichen phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien eine Schlagfrequenz von $3,25 \pm 0,18$ Hz und nach 60 s eine Frequenz von $3,95 \pm 0,16$. Eine Maximalfrequenz von $4,54 \pm 0,16$ Hz wird erst 5 min nach der HCO_3^- Applikation zum Zeitpunkt $t = 480$ s erreicht.

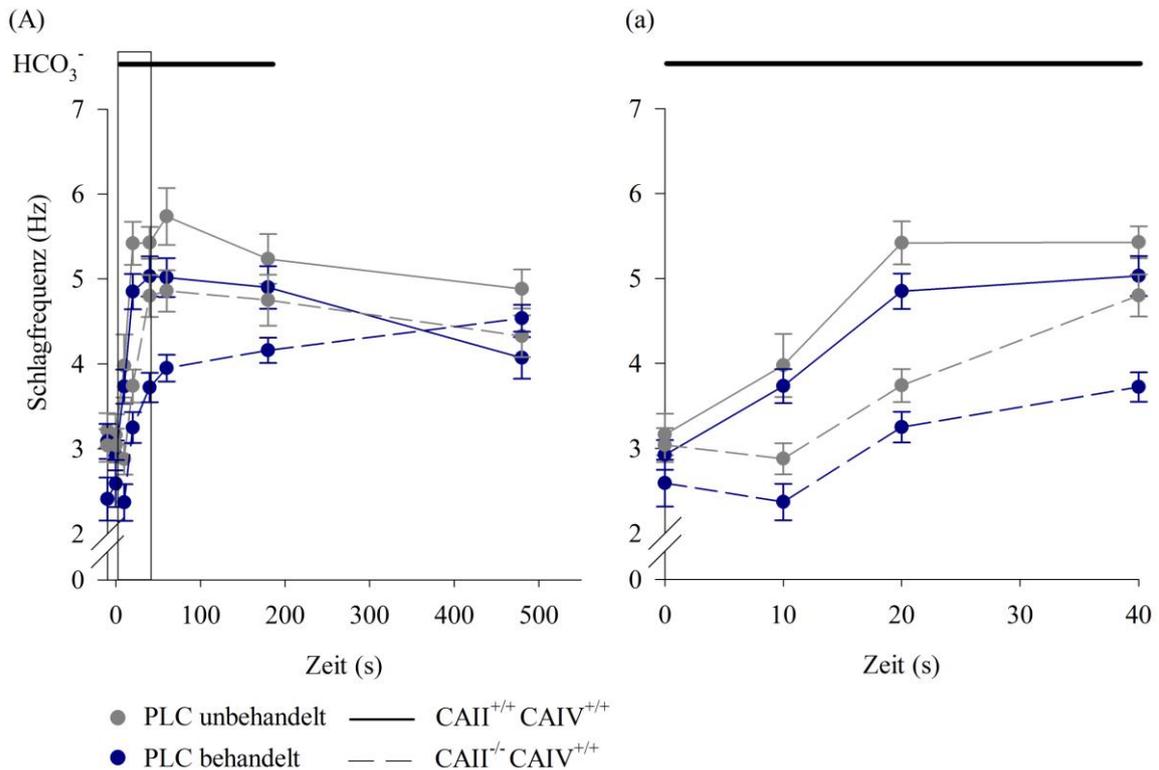


Abbildung 52: Phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen den stärksten verzögerten HCO₃⁻ vermittelten Schlagfrequenzanstieg

Wildtyp- und CAII-Knockout-Spermien inkubierten in An- bzw. Abwesenheit von PLC. Während des achtminütigen Messprotokolls (A) wurden die Spermien für 180 s mit HCO₃⁻ perfundiert. In (b) ist der detaillierte Ausschnitt von 0-40 vergrößert dargestellt. Der stärkste verzögerte Effekt auf den HCO₃⁻ vermittelten Schlagfrequenzanstieg ist in biochemisch erzeugten CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zu beobachten (n ≥ 17).

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der CO₂ Zeitreihe zusammengefasst. Sowohl die bereits beschriebenen Schlagfrequenzen von Wildtyp- und die aus Wildtyp generierten phänotypischen CAIV Knockout-Spermien (Abbildung 51B) als auch die Ergebnisse von CAII Knockout- und phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien sind in der Abbildung 53 dargestellt. Während Wildtyp-Spermien (n = 20), die ohne PLC inkubierten, nach 20 s CO₂ Stimulation eine Schlagfrequenz von 5,65 ± 0,27 Hz und nach 40 s eine Maximalfrequenz von 6,12 ± 0,24 Hz erreichen, ist in biochemisch erzeugten CAIV Knockout-Spermien (n = 17) nur eine Schlagfrequenz von 4,76 ± 0,31 Hz nach 20 s und eine Maximalfrequenz von 4,82 ± 0,2 Hz nach 40 s zu beobachten. In CAII Knockout-Spermien (n = 19) beträgt die Schlagfrequenz nach 20 s CO₂ Applikation 4,08 ± 0,29 Hz. Eine Maximalfrequenz von 5,09 ± 0,34 Hz wird nach 40 s erreicht. Im Vergleich dazu, zeigen phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien (n = 23) die stärkste Verzögerung. Die Schlagfrequenz der Doppelknockout-Spermien steigt in den ersten 20 s von 2,76 ± 0,26 Hz auf 3,58 ± 0,26 Hz an. Zum Messzeitpunkt t = 40 s beträgt die

Schlagfrequenz $3,78 \pm 0,23$ und nach 60 s CO_2 Stimulation erreichen die Spermien einen Maximalwert von nur $3,98 \pm 0,19$ Hz.

Die Ergebnisse zeigen, dass phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien, die durch die Behandlung von CAII Knockout-Spermien mit PLC biochemisch erzeugt wurden, den stärksten verzögerten HCO_3^- vermittelten Schlagfrequenzanstieg im Vergleich zu Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien aufweisen.

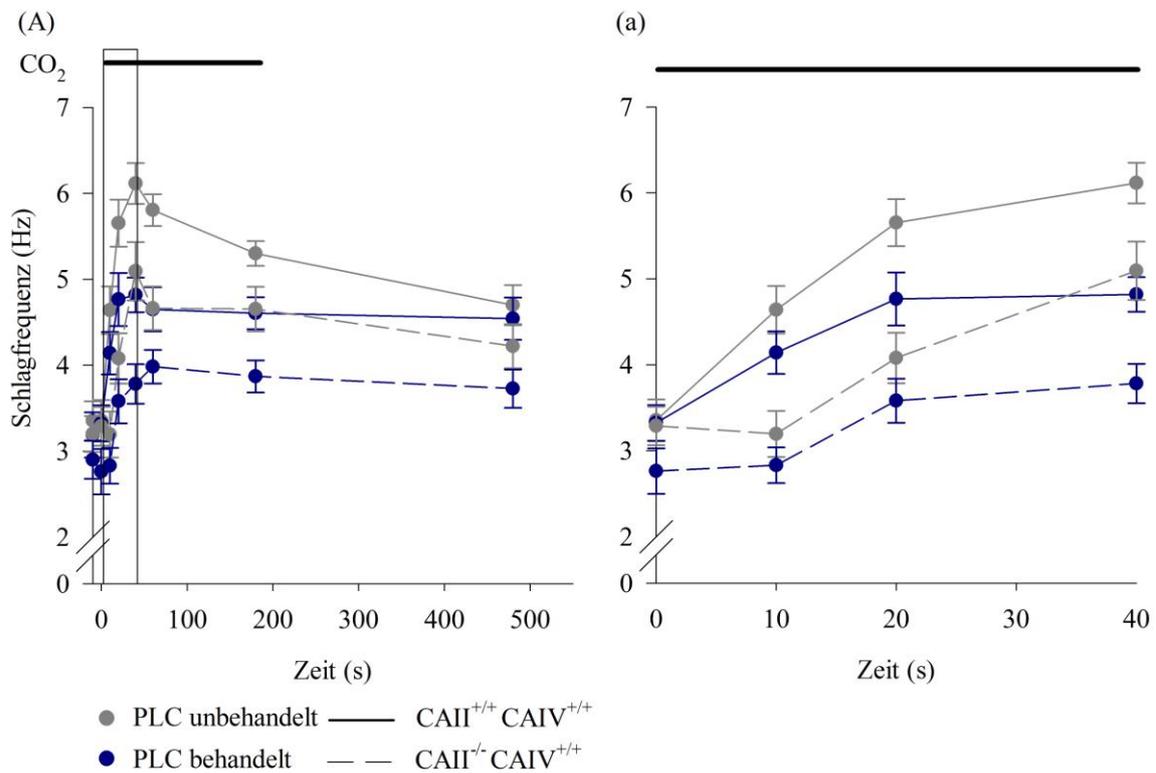


Abbildung 53: Phänotypische CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen den stärksten verzögerten Schlagfrequenzanstieg bei Stimulation mit CO_2 . Wildtyp- und CAII Knockout-Spermien inkubierten in An- bzw. Abwesenheit von PLC und wurden anschließend für 180 s CO_2 perifundiert und die Schlagfrequenzen bestimmt. In (A) ist das gesamte achtminütige Messprotokoll, in (a) der Ausschnitt von 0-40 s vergrößert dargestellt. Die stärkste Verzögerung im CO_2 vermittelten Frequenzanstieg ist in phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zu beobachten ($n \geq 17$).

7 Diskussion

7.1 Verteilung der CAII und CAIV im männlichen Genitaltrakt der Maus und kompensatorische Mechanismen in den Knockout-Linien

Ein saures Umgebungsmilieu im Nebenhoden von Säugetieren ist essentiell für die Reifung passierender Spermatozoen (Levine and Kelly 1978). Ein saurer pH zusammen mit einer geringen HCO_3^- Konzentration im Nebenhodensekret hält die Spermien in einem sog. Ruhezustand (quiescent state) und ist Voraussetzung für eine erfolgreiche SpermienSpeicherung im Nebenhoden (Acott and Carr 1984; Carr et al., 1985; Okamura et al., 1985; Jones and Murdoch 1996; Holm and Wishart 1998). Die Ansäuerung wird durch das Nebenhodenepithel reguliert und beinhaltet sowohl H^+ sezernierende als auch HCO_3^- resorbierende Mechanismen (Breton 2001; Liu et al., 2012). Ein ähnlicher und bereits sehr gut charakterisierter Prozess erfolgt in der Niere bei der Bildung des Sekundärharns. Dort ist die intrazelluläre CAII an der H^+ Generierung beteiligt, während die extrazellulär lokalisierte CAIV für die Ionenresorption mitverantwortlich ist (Dobyan and Bulger 1982; Brown et al., 1988; Brown et al., 1990; Breton 2001). Des Weiteren konnten CAs auch im männlichen Genitaltrakt verschiedener Spezies, z. B. Ratte, Kaninchen, Bulle, Pferd und Mensch, nachgewiesen werden (Goyal et al., 1980; Ekstedt et al., 1991; Ekstedt and Ridderstrale 1992; Parkkila et al., 1993; Asari et al., 1996; Hermo et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde die Verteilung der CAII und CAIV im männlichen Genitaltrakt der Maus analysiert. Die Proteinlokalisierung und das Expressionsmuster wurden in den jeweiligen Geweben von Wildtyp-Mäusen mittels Immunoblot, Immunhistochemie und qRT-PCR bestimmt. Dabei dienten sowohl CAII Knockout- als auch CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse als Kontrolle. Die höchste CAII Expression fand im Hoden ($\text{RQ} = 0,99 \pm 0,23$) statt und entspricht damit der relativen CAII mRNA in der Niere. Die Proteinlokalisierung im Hoden beschränkte sich auf elongierte Spermatozoen. Damit wird CAII während der kontinuierlich ablaufenden SpermioGenese in Spermatozoen transkribiert und translatiert, was die relativ hohe RNA Expression im Hoden erklärt. In dem sich anschließenden Nebenhoden stimmten CAII Protein- und Expressionsstudien überein. Ein CAII Proteinsignal in Höhe von 28 kDa wurde in allen Nebenhodenabschnitten (Caput, Corpus und Cauda epididymidis) von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen. Anschließende immunhistologische Färbungen zeigten eine CAII Lokalisation in Zellen des Nebenhodenepithels. Während im Corpus epididymidis das stärkste Proteinsignal und die höchsten RNA-Werte ($\text{RQ} = 0,4 \pm 0,2$) detektiert wurden, sind in Caput und Cauda

epididymidis nur vereinzelte Epithelzellen CAII positiv und die relativen RNA-Mengen geringer. Zusätzlich ist im Corpus epididymidis CAII auf der apikalen Zellmembranoberfläche entlang der Stereozilien lokalisiert. Analog dazu konnte im Rattenmodell das gleiche CAII Verteilungsmuster im Nebenhoden gezeigt werden (Kaunisto et al., 1995; Hermo et al., 2005). Auf Grund der Zellmorphologie und der hohen Anzahl an gefärbten Zellen im Corpus epididymidis handelt es sich um CAII positive Hauptzellen, da diese den größten Anteil des Epithels ausmachen. Im Ductus deferens wurde weder in der immunhistochemischen Färbung das CAII Protein noch in der qRT-PCR CAII mRNA nachgewiesen. Der gegen Null tendierende mittlere RQ-Wert im Ductus deferens ($0,07 \pm 0,06$) deutet auf ein unspezifisches Signal hin und wird als Hintergrundsignal gedeutet. Die positive Proteinbande im Western Blot kommt durch die im Ductus deferens gespeicherten CAII positiven Spermien zu Stande, die bei der Gewebeaufreinigung nicht entfernt worden sind. Der gleiche Effekt wurde in der Cauda epididymidis festgestellt. Die immunhistochemische Färbung zeigte nur ein schwaches CAII Signal im apikal lokalisiertem Stereoziliengeflecht. Im Western Blot dagegen zeigte die Probe aus der Cauda epididymidis eine starke CAII Proteinbande, die durch die luminal enthaltenen CAII positiven Spermien innerhalb des Gewebes zu erklären ist.

Die Lokalisation von CAII im Nebenhodenepithel deutet auf eine Beteiligung des Enzyms an der Ansäuerung des luminalen Sekrets hin. Die intrazelluläre CAII generiert H^+ , die dann über apikal lokalisierte H^+ -ATPasen und Na^+/H^+ Austauscher in das Lumen sezerniert werden und für das saure Umgebungsmilieu verantwortlich sind (Brown et al., 1992; Breton et al., 1999; Bagnis et al., 2001). Ein weiterer Reifungsprozess, in den CAII involviert sein könnte, ist die Spermienkonzentrierung. Die, vor allem im Caput epididymidis, ablaufende Wasser- und Ionenresorption aus dem Sekret wird durch Aquaporin-Kanäle, CFTR und Na^+/H^+ Austauscher in der Plasmamembran der Epithelzellen gewährleistet (Pastor-Soler et al., 2001; Zhou et al., 2001; Turner 2008). Hier könnte CAII unterstützend bei der Ionen-Rückresorption und der basalen Ausschleusung mitwirken und damit den osmotischen Gradient erhöhen und den passiven Wassertransit fördern.

Im Vergleich zu CAII ist CAIV ein extrazellulär lokalisiertes, GPI verankertes Protein (Zhu and Sly 1990; Waheed et al., 1992). Die CAIV Lokalisation beschränkt sich auf das apikale Stereoziliennetzwerk der Epithelzellen in Corpus und Cauda epididymidis, wobei das stärkste Proteinsignal und auch die höchste RNA-Expression mit einem RQ-Wert von $1,66 \pm 0,49$ im Nebenhodenkörper detektiert wird. Die CAIV Proteinbanden bei 38 kDa im

Western Blot bestätigen die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen. Die CAIV Expression in den restlichen Geweben (Hoden, Caput und Cauda epididymidis und Ductus deferens) ist auf Grund der geringen RQ-Werte wieder als unspezifisches Hintergrundsignal zu deuten. Diese Ergebnisse entsprechen bereits veröffentlichten CAIV Studien im Maus- (Wandernoth et al., 2010) als auch Analysen im Rattenmodell und im Menschen (Parkkila et al., 1993; Kaunisto et al., 1995). Auf Grund der extrazellulären Lokalisation und der bereits nachgewiesenen Funktion in der Niere spielt die CAIV vermutlich eher eine Rolle in der HCO_3^- Resorption (Cordat and Casey 2009). Die starke Ko-Lokalisation von CAII und CAIV in Epithelzellen des Corpus epididymidis deutet darauf hin, dass gerade in diesem Abschnitt des Nebenhodens die luminale Ansäuerung durch intrazelluläre H^+ Generierung und anschließende H^+ Sekretion parallel mit der HCO_3^- Rückresorption abläuft. Au und Kollegen zeigten im Rattenmodell, dass es bei intravenöser Applikation des CA Inhibitors Azetazolamid zu einer gehemmten luminalen Ansäuerung in der Cauda epididymidis und im Ductus deferens kommt (Au and Wong 1980). Eine andere Arbeitsgruppe publizierte jedoch, dass bei oraler Verabreichung von Azetazolamid keine Inhibierung des Ansäuerungsprozesses im Nebenhoden der Ratte beobachtet werden kann (Caflisch and DuBose 1990). Der Grund für die kontroversen Ergebnisse im Rattenmodell könnte die Applikationsart sein, die den Wirkungsgrad des Inhibitors im Zielgewebe beeinflusst. Die hier dargestellten Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass der Ansäuerungmechanismus im Nebenhoden komplex und spezie-abhängig ist.

Auf Grund des starken immunhistochemischen Signals von CAII und CAIV im Nebenhodenepithel wurden CAII Knockout- und CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse für die weitere Analyse generiert und analysiert. Zhou beobachtete makroskopische Gewebeveränderungen im Genitaltrakt von CAII Knockout-Mäusen, wie beispielsweise eine Erweiterung des Rete testis und der Ductuli efferentes sowie eine Anomalität der Hodentubuli während der Pubertät der CAII defizienten Tiere (Zhou et al., 2001). Die in dieser Arbeit analysierten CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse wiesen ebenfalls phänotypische Auffälligkeiten auf. Doppelknockout-Nachkommen zeigten eine starke Einschränkung in ihrer Körpergewichtsentwicklung und auch im adulten Lebensalter ein signifikant verringertes Körpergewicht. Die mikroskopische Analyse des adulten Hodengewebes lieferte auch hier Anomalitäten. Beobachtet wurde eine verminderte Keimepithelhöhe von 20%, die mit einer reduzierten Anzahl an Keimzellen einhergeht und daraus resultiert eine Gewichtsreduktion des gesamten Organs. Zusätzlich bestätigten

Fertilitätsstudien die Annahme, dass CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse subfertil sind. Dabei sind sowohl männliche als auch weibliche Doppelknockouts betroffen. Die Nachkommenzahl pro Verpaarungswoche reduzierte sich um 74% mit männlichen und um 80% mit weiblichen CAII CAIV Doppelknockout-Tieren.

Ob die Fertilitätsstörung der Doppelknockout-Mäuse durch eine Funktionsstörung des Nebenhodenepithels und dessen regulatorischen Einfluss auf die Nebenhodenflüssigkeit zu Stande kommt, bleibt fraglich. Durch den CAII und CAIV Genverlust könnte der Ansäuerungsprozess des Sekrets und die HCO_3^- Resorption beeinflusst und dadurch die Spermienreifung gestört sein.

Im weiblichen Genitaltrakt wurde ebenfalls CA im Epithel nachgewiesen (Lutwak-Mann 1955; Rodriguez-Martinez et al., 1991; Holm and Wishart 1998). Eine erhöhte HCO_3^- Konzentration in der weiblichen Genitalflüssigkeit ist essentiell für die Reifung fertiler Spermien (Zhou et al., 2005; Mannowetz et al., 2011; Miki and Clapham 2013). Hier könnte durch den CAII CAIV Proteinverlust die HCO_3^- Bereitstellung im Uterussekret beeinflusst sein. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Analysen lediglich auf die Bedeutung der CA im männlichen Genitaltrakt beschränkt. Expressionsanalysen sollten Hinweise auf die Rolle von CAII und CAIV im Nebenhodenepithel liefern und die Hypothese einer möglichen Kompensation der verlorengegangenen CAII und CAIV durch andere CA Isoformen überprüft werden. Ein solcher kompensatorischer Mechanismus wurde im Gehirn und im Magenepithel für CAII defiziente Mäuse nachgewiesen (Brion et al., 1994; Pan et al., 2006). Pan und Kollegen zeigten eine CAIX Überexpression im Magen von CAII defizienten Mäusen, während Brion und Kollegen eine Proteinzunahme von CAIV im Zentralnervensystem beobachteten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine leichte CAIV Überexpression im Corpus epididymidis von CAII defizienten Mäusen nachgewiesen. Im Vergleich zum Gewebe von Wildtyp-Mäusen stieg die relative CAII mRNA-Menge um das 1,17-fache in Knockout-Tieren an. Eine 5,22-fach höhere CAIV Expression wurde in der Cauda epididymidis beobachtet. Es ist zu beachten, dass es sich um relative mRNA-Mengen handelt und im vergleichbaren Gewebe von Wildtyp-Mäusen keine CAIV mRNA nachweisbar war. Im Gegensatz dazu wurde in der Niere und im Hoden von CAII Knockout-Mäusen eine Reduktion der CAIV Expression um 34% bzw. 58% gemessen.

In CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen wurde zusätzlich das Expressionsmuster der CAXIV analysiert. Durch vorherige Studien ist bekannt, dass CAXIV sowohl in der Niere (Mori et al., 1999; Kaunisto et al., 2002) als auch verstärkt im Nebenhodenepithel der

Cauda epididymidis (Hermo et al., 2005; Johnston et al., 2005) lokalisiert ist und die Enzymaktivität sogar um ein Vielfaches höher als das von CAII und IV ist (Whittington et al., 2004). Real Time-PCR Analysen in Geweben von Wildtyp-Mäusen bestätigten die Anwesenheit von CAXIV mRNA im Nebenhoden. Die höchste CAXIV Expression wurde in der Cauda epididymidis und im Ductus deferens gemessen. Im Vergleich dazu war in der CAII CAIV Doppelknockout-Maus eine CAXIV Überexpression im Hoden um das 1,10-fache, im Corpus epididymidis um das 2,13-fache und im Ductus deferens um das 6,83-fache zu beobachten. In der Niere und im Caput epididymidis der CAII CAIV Knockout-Maus wurde eine Reduktion der CAXIV Expression um 58% bzw. 70% festgestellt. Der Mechanismus für die Repression von CAIV und CAXIV in den defizienten Geweben ist unklar. Möglicherweise führt der CA Enzymverlust zu einem gestörten Säure-Base-Haushalt der Zelle, was wiederum die Genexpression anderer Proteine, in dem Fall CAIV und CAXIV, reprimiert. Dieses Resultat korreliert nicht mit den Ergebnissen von Pan und Kollegen, die keine veränderte CAIV Expression in der Niere von CAII Knockout-Mäusen beobachtet haben (Pan et al., 2006). Eine Erklärung dafür könnten Unterschiede in der verwendeten Real Time-PCR Methode sein. Im Vergleich benutzten Pan und seine Arbeitsgruppe definierte Primersequenzen, β -Aktin als endogene Kontrolle und Standardkurven für die quantitative Auswertung der RNA Expression. Die hier verwendete 18S RNA als endogene Kontrolle, deren Expression stark variieren kann, könnte bereits ein Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse sein (Vandesompele et al., 2002) und somit Einfluss auf die gewonnenen relativen Expressionswerte haben.

Die Expressionsanalysen von CAIV und CAXIV in den Geweben der verschiedenen Knockout-Linien zeigen, dass kompensatorische Mechanismen im Nebenhoden stattfinden, die den genetischen CAII und CAIV Verlust ausgleichen (Johnston et al., 2005). Die Beobachtung, dass CAII CAIV verstärkt im Nebenhoden von pubertierenden Mäusen exprimiert wird (http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85283, http://mrg.genetics.washington.edu/index.cgi?mrg_id=85293), könnte ein Hinweis für eine hormonregulierte CA Expression sein und wurde schon im männlichen und weiblichen Genitaltrakt der Ratte nachgewiesen (Harkonen and Vaananen 1988; Kaunisto et al., 1999; Caldarelli et al., 2005). Kompensatorische Mechanismen in den Knockout-Linien könnten in diesem Entwicklungsstadium stärker ins Gewicht fallen und die These unterstützen.

7.2 CAII, ein im Hoden konstitutiv exprimiertes Protein, CAIV, ein im Nebenhoden transferiertes Protein in murinen Spermatozoen

Der CAII Proteinnachweis in murinen Spermien erfolgte zunächst mittels Western Blot. In isolierten Spermien von Wildtyp-Mäusen war ein spezifisches CAII Signal in Höhe von 28 kDa nachweisbar. Die immunzytochemischen CAII Färbungen an Spermien bestätigten die Western Blot Ergebnisse. Bereits im Hodengewebe sind die reifenden Spermatiden CAII positiv. Posttestikuläre Spermien, isoliert aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis, zeigten alle das gleiche CAII Verteilungsmuster, wobei CAII im Hauptstück des Spermischwanzes lokalisiert ist. Zusätzlich ist in isolierten Spermien aus dem Nebenhodenschwanz zum Teil auch ein CAII Signal im Akrosom zu beobachten. Im Akrosom detektierte Signale sind jedoch auf Grund der hohen Proteindichte häufig unspezifisch und deshalb kritisch zu beurteilen. Folglich ist CAII ein in Spermien konstitutiv exprimiertes Protein, das während der Spermiogenese synthetisiert wird. Die CAII Lokalisation in murinen Spermien unterscheidet sich damit von derjenigen in Spermien aus Mensch und Ratte. Dort wurde CAII ausschließlich in der akrosomalen Region, aber nicht im Spermischwanz nachgewiesen (Parkkila et al., 1991).

Im Gegensatz dazu ist CAIV kein konstitutiv exprimiertes Protein. Vorherige Studien (Wandernoth et al., 2010) und diese Arbeit bestätigen, dass CAIV während der Spermienreifung im Nebenhoden vom Epithel in die Spermienmembran transferiert wird. Ein CAIV Signal entlang des Spermischwanzes wurde in luminal lokalisierten Spermien in Corpus und Cauda epididymidis detektiert. Spermien im Gewebe des Nebenhodenkopfes dagegen sind CAIV negativ. Da posttestikuläre Spermien translatorisch inaktiv sind, muss CAIV während der Passage durch den Nebenhoden in die Spermienmembran transferiert werden. Immunhistologischen und qRT-PCR Ergebnisse lassen auf einen CAIV Transfer im Corpus epididymidis schließen. Kleine Membranvesikel, sog. Epididymosomen, die vom Nebenhodenepithel apokrin sezerniert werden, wurden bereits für den Transfer vieler Spermienproteine verantwortlich gemacht, z. B. P25b (zona pellucida binding protein), MIF (macrophage migration inhibitory factor) und Spam1 (murine sperm adhesion molecule 1) (Eickhoff et al., 2001; Frenette and Sullivan 2001; Zhang and Martin-Deleon 2003; Sullivan et al., 2007). Dieser vesikuläre Mechanismus könnte auch auf das GPI verankerte CAIV Protein zutreffen.

7.3 Verminderte Spermienmotilität durch den CAII und CAIV Proteinverlust

HCO_3^- und pH sind wichtige Faktoren für die Spermienmotilität (Visconti et al., 2011) und unterliegen einer strengen Regulation. Viele Proteine, die für den HCO_3^- und H^+ Transport verantwortlich sind, wurden bereits identifiziert (Abbildung 55). Trotzdem ist der Mechanismus der HCO_3^- und pH Regulation in Spermien komplex und noch nicht vollständig geklärt. Ein wichtiges Protein für die Regulation der Motilität ist der sNHE (Garcia and Meizel 1999; Wang et al., 2003). Männliche Mäuse, bei denen ein sNHE Genverlust vorliegt sind infertil, auf Grund immotiler Spermien. Jedoch ist in Spermien von sNHE Knockout-Spermien kein veränderter $[\text{pH}]_i$ zu beobachten (Wang et al., 2003). In humanen Spermien ist zusätzlich der Hv1 Kanal mitverantwortlich für den Transport von H^+ (Lishko et al., 2010). Obwohl Hv1 auch in Spermien von Mäusen lokalisiert ist, kann keine Aktivität des Kanal nachgewiesen werden (Lishko et al., 2010). Dies zeigt nicht nur die komplexe sondern auch spezie-abhängige $[\text{pH}]_i$ Regulation in Spermien. In den HCO_3^- Transport sind zum einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (AE) zum anderen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Ko-Transporter (NBC) involviert (Tajima and Okamura 1990; Zeng et al., 1996; Holappa et al., 1999; Demarco et al., 2003). Ebenfalls ist der ATP-abhängige Cl^- Kanal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), der auch für HCO_3^- durchlässig ist (Xu et al., 2007), beteiligt. Ein Nachweis, dass CFTR am HCO_3^- Transport verantwortlich ist, besteht nicht (Mannowetz et al., 2011). Jedoch reguliert CFTR über Cl^- Einstrom die Aktivität der HCO_3^- Austauscher (Chen et al., 2009; Chavez et al., 2012). Eine vorangegangene Studie bestätigt auch die Beteiligung der extrazellulär lokalisierten CAIV am HCO_3^- Haushalt muriner Spermien. In Spermien von CAIV Knockout-Mäusen liegt eine Deregulation der $[\text{HCO}_3^-]$ vor und dies führt zu einer verminderten Spermienmotilität (Wandernoth et al., 2010). In dieser Arbeit wurde die Beteiligung der intrazellulären CAII untersucht. Der Proteinnachweis von CAII in murinen Spermatozoen lässt vermuten, dass auch diese CA Isoform Einfluss auf die $[\text{HCO}_3^-]_i$ und damit auf die Spermienmotilität hat. Die enzymatische Aktivität von CAII in murinen Spermien wurde massenspektrometrisch nachgewiesen und macht zwei Drittel der CA Gesamtaktivität aus. CASA Analysen, die einen Gesamtüberblick der Spermienpopulation liefern, wiesen weitere signifikante Unterschiede auf. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sank der prozentuale Anteil motiler, schnell progressiver und träge progressiver Spermien (36% bzw. 46% bzw. 26%) sowie die durchschnittliche Geschwindigkeit (31%) in CAII defizienten Mäusen, während der Anteil immotiler Spermien um 43% anstieg. Auf Grund der starken Relevanz von CAII und CAIV in murinen Spermien, die nach massenspektrometrischer Analyse zusammen fast

100% der CA Gesamtaktivität ausmachen, wurden CAII CAIV Doppelknockout-Mäuse generiert und die Spermienmotilität untersucht. Durch den zusätzlichen CAIV Proteinverlust sank die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien des Doppelknockout-Tieres gegenüber den Spermien von CAII Knockout-Mäusen um 28%, der Anteil an motilen Spermien um 35%, an schnell progressiven um 26% und träge progressiven um 6%, während der Anteil immotiler Spermien um mehr als das Doppelte anstieg. Unterschiede in der Spermienkonzentration zwischen Wildtyp-, CAII Knockout- und CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen wurden nicht detektiert. Trotz der verringerten Keimepithelhöhe in CAII CAIV Doppelknockout-Tieren, ist die Speicherung posttestikulärer Spermien im Nebenhodenschwanz, aus dem die Spermienpräparation für die Zellzahlbestimmung erfolgte, nicht betroffen. Die Auswirkungen spiegeln sich nur in der Spermienmotilität wider. Ein gestörter HCO_3^- Haushalt und eine damit in Verbindung stehende unvollständige Reifung der Spermien im Nebenhoden ist eine naheliegende Erklärung für die verringerte Motilität von CAII bzw. CAII CAIV defizienten Spermien.

Jedoch wurde weder in CAII Knockout- noch in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ein veränderter $[\text{pH}]_i$ in physiologischem HS-Puffer pH 7.4 gemessen. Auch wurden in den CA defizienten Spermien keine Unterschiede in der Wiederherstellung des $[\text{pH}]_i$ nach intrazellulärer pH-Erhöhung im Vergleich zu Wildtyp-Spermien beobachtet. Die Zellen können trotz des CAII und CAIV Proteinverlustes ohne Einschränkung auf kurzzeitige $[\text{pH}]_i$ Veränderungen reagieren. Damit zeigt sich, dass alternative Mechanismen für die $[\text{pH}]_i$ Regulation in murinen Spermien verantwortlich sind (Visconti et al., 2011; Liu et al., 2012).

Außer dem direkten Einfluss von CAII in den $[\text{pH}]_i$ von Spermien, muss als weitere Erklärung für die verringerte Spermienmotilität auch die regulatorische Funktion des Umgebungsmilieus mit einbezogen werden. In Spermien von Wildtyp-Mäusen wurde ein reversibler und stabiler Einfluss des $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ auf den $[\text{pH}]_i$ über einen Zeitraum von 180 min beobachtet. Wie bereits diskutiert, könnte durch den CAII und CAIV Proteinverlust die Zusammensetzung des Nebenhodensekrets hinsichtlich pH und $[\text{HCO}_3^-]$ modifiziert vorliegen und somit den $[\text{pH}]_i$ der Spermien beeinflussen. Die resultierende Deregulation des Säure-Base-Haushaltes erklärt wiederum die gestörte Spermienreifung, die sowohl vom $[\text{pH}]_{\text{ex}}$ des Sekrets als auch vom $[\text{pH}]_i$ der Spermien abhängig ist und für die verminderte Motilität verantwortlich ist. Da der doppelte Genverlust schwerwiegender ist als der alleinige Knockout von CAII, ist die Spermienmotilität und folglich die Fertilität von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen stärker betroffen.

7.4 CAII und CAIV sind Schlüsselenzyme im HCO_3^- vermittelten Signalweg

Die Kapazitation beschreibt den weiteren Reifungsprozess von Spermien im weiblichen Genitaltrakt und beinhaltet eine Vielfalt von Signalwegen, die letztendlich alle Voraussetzung für eine erfolgreiche Penetration der Eizelle sind (de Lamirande et al., 1997; Visconti et al., 2011). Einer der ersten Schritte in der Kapazitation ist die Spermienaktivierung durch HCO_3^- . Ein $[\text{HCO}_3^-]_i$ Anstieg, induziert durch die erhöhte $[\text{HCO}_3^-]$ im Uterussekret (Mannowetz et al., 2011; Miki and Clapham 2013), führt zu einer Zunahme der Schlagfrequenz und zu einem symmetrischen Schlagmuster des Flagellums (Wennemuth et al., 2003; Wennemuth 2004). Durch lokale Perifusion von murinen Spermien mit 15 mM HCO_3^- kann dieser Effekt *in vitro* simuliert werden. Eine Schlagfrequenzerhöhung von ca. 3 Hz auf ca. 7 Hz wird bereits nach 30 s HCO_3^- Stimulation beobachtet (Wennemuth 2004; Wandernoth et al., 2010). Intrazellulär führt HCO_3^- zur Erhöhung der sAC Aktivität, $[\text{cAMP}]_i$ steigt an und aktiviert PKA, was zur Phosphorylierung von Zielproteinen und unter anderem zu einer Zunahme der Schlagfrequenz führt (Okamura et al., 1985; Visconti et al., 1995; Chen et al., 2000; Nolan et al., 2004). Die Perifusion mit 2% CO_2 bewirkt den gleichen Effekt in murinen Spermien (Wandernoth et al., 2010). Dafür wird CO_2 zunächst extra- oder intrazellulär in HCO_3^- umgewandelt und führt anschließend zur Aktivierung von sAC. Die Anwesenheit und hohe Enzymaktivität von CAII und CAIV in murinen Spermien lässt vermuten, dass beide Enzyme an der Bereitstellung von HCO_3^- beteiligt sind. Die in dieser Arbeit zu untersuchende Hypothese ist in Abbildung 54 schematisch dargestellt. HCO_3^- kann zum einen direkt über HCO_3^- Transporter und Austausch in die Zelle transportiert werden und zum anderen kann CO_2 frei über die Plasmamembran diffundieren und durch intrazelluläres CAII in HCO_3^- umgewandelt werden. Die extrazellulär lokalisierte CAIV unterstützt den Transport bzw. die Diffusion, indem sie durch die reversible Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- ein Equilibrium nahe der Zellmembranoberfläche begünstigt. Der CAII und CAIV Proteinverlust würde sowohl zu einem extrazellulären Ungleichgewicht führen als auch die intrazelluläre HCO_3^- Bereitstellung beeinflussen und zu einem verzögerten und verminderten Schlagfrequenzanstieg durch HCO_3^- bzw. CO_2 Stimulation führen (Abbildung 54B).

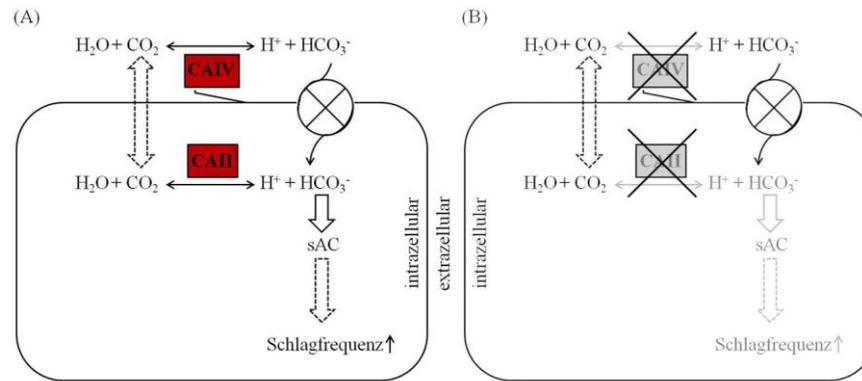


Abbildung 54: Modell der CAII und CAIV Aktivität in murinen Spermatozoen (modifiziert aus Wandernoth et al., 2010)

Der HCO_3^- induzierte sAC Signalweg kann durch extrazelluläres CO_2 oder HCO_3^- ausgelöst werden. Dabei kann CO_2 frei über die Plasmamembran diffundieren und durch CAII in HCO_3^- katalysiert werden. Parallel dazu findet ein HCO_3^- Import über Transporter und Austauscher statt. Extrazelluläres CAIV begünstigt die Diffusion bzw. Transport, indem es nahe der Zelloberfläche für ein Equilibrium zwischen HCO_3^- und CO_2 sorgt (A). CAII CAIV defiziente Spermien (B) weisen einen inhibierten Signalweg auf. Die durch sAC induzierte Schlagfrequenzerhöhung ist reduziert.

Um die Hypothese und den Einfluss von CAII und CAIV auf den Signalweg der Schlagfrequenzerhöhung zu bestätigen, wurden Spermien von CAII Knockout- und CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen mit HCO_3^- und CO_2 stimuliert und die Schlagfrequenzveränderung beobachtet. Die anfängliche Grundschlagfrequenz in HS-Puffer war in CAII Knockout- bzw. CAII CAIV Doppelknockout-Spermien unverändert und entsprach der Grundfrequenz in Spermien von Wildtyp-Mäusen. Jedoch zeigten CAII Knockout- und CAII CAIV Doppelknockout-Spermien signifikante Unterschiede in der Frequenzzunahme während der dreiminütigen HCO_3^- und CO_2 Stimulation im Vergleich zu Wildtyp-Spermien. Dabei wurde sowohl eine verzögerte Schlagfrequenzerhöhung innerhalb der 1. min als auch eine verminderte Maximalfrequenz nach 3 min beobachtet. Durch den CAII Proteinverlust ist die intrazelluläre Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- gestört. Es kommt in CAII Knockout-Spermien zu einem Ungleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- , das sich im Vergleich zu Wildtyp-Spermien, in einem verzögerten und reduzierten Schlagfrequenzanstieg widerspiegelt. Der in CAII CAIV Doppelknockout-Spermien beobachtete verzögerte Schlagfrequenzanstieg während der HCO_3^- und CO_2 Stimulation ist jedoch im direkten Vergleich zu CAII Knockout-Spermien weniger stark ausgeprägt. Es konnte durch den zusätzlichen CAIV Genverlust kein verstärkter reprimierender Effekt im HCO_3^- induzierten Signalweg beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Expression einer anderen CA Isoform sein, die den doppelten Gendefekt in Spermien kompensiert. Einen Hinweis dafür lieferte die CAXIV

Überexpression im Hoden von CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen. Um eine genetische bedingte Kompensation zu verhindern, wurden biochemische Doppelknockout-Spermien erzeugt und deren Antwort auf HCO_3^- und CO_2 untersucht. Dafür wurden Spermien von CAII Knockout-Mäusen mit PLC behandelt, was zur Abspaltung von der GPI-verankerten CAIV führt. Die Abspaltung von GPI verankerten Proteinen mittels PLC wurde bereits an verschiedenen Zelltypen durchgeführt (Volwerk et al., 1989; Zhu and Sly 1990; Waheed et al., 1992; Hutchinson et al., 2005) und ist nicht nur ein biochemischer Prozess, der *in vitro* künstlich erzeugt wird, sondern besitzt auch physiologische Relevanz (Davitz et al., 1989; Metz et al., 1991). Auch während der Kapazitation spielt eine solche Proteinreorganisation eine bedeutende Rolle (Watanabe and Kondoh 2011). Immunzytochemische Färbungen und Western Blot Analysen von PLC-behandelten Spermienproben zeigten eine deutliche Reduzierung des GPI-verankerten CAIV Proteins in murinen Spermien. Um auszuschließen, dass die PLC Behandlung in Spermien keine weitere Auswirkung auf den hier untersuchten HCO_3^- Signalweg hat, wurden als Kontrolle Spermien von Wildtyp- und CAIV Knockout-Tieren in Anwesenheit von PLC inkubiert. Während der HCO_3^- bzw. CO_2 Stimulation wurde ein identischer Kurvenverlauf zwischen biochemischen und genetischen CAIV Knockout-Spermien beobachtet. Es konnte kein zusätzlicher Effekt, außer dem bereits etablierten verzögerten Schlagfrequenzanstieg in CAIV Knockout-Spermien detektiert werden. Durch die zweistündige Inkubation der Spermien mit bzw. ohne PLC ist im Allgemeinen die Maximalfrequenz nach HCO_3^- und CO_2 Stimulation niedriger. Ein Frequenzanstieg während der ersten 30 s der Applikation ist jedoch weiterhin zu beobachten. Die biochemisch generierten und somit phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien zeigen im Vergleich sowohl zu den biochemischen und genetischen CAIV Knockout- als auch zu den genetischen CAII Knockout-Spermien eine signifikante Verringerung in der Grundschriftfrequenz, die nur $\sim 2,6$ Hz betrug. Gleichzeitig wurde in phänotypischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ein höchst signifikanter Unterschied in der Maximalfrequenz nach HCO_3^- und CO_2 Applikation beobachtet. Die zusätzliche biochemische Abspaltung von CAIV in CAII Knockout-Spermien führte somit zu einer verstärkten Deregulation des HCO_3^- Haushaltes in den Zellen, so dass der HCO_3^- induzierte Signalweg fast vollständig blockiert war. Da HCO_3^- auch spontan ohne die katalytische Reaktion der CAs entstehen kann, ist eine vollständige Blockierung des sAC Signalweges unwahrscheinlich.

Somit konnte der verstärkte reprimierende Effekt im HCO_3^- vermittelten Signalweg, der in genetischen CAII CAIV Doppelknockout-Spermien ausblieb, in phänotypischen CAII

CAIV Doppelmutanten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen auf einen kompensatorischen Mechanismus in Spermien von genetischen Doppelknockout-Mäusen schließen. Ob die CAIX den CAII/CAIV Genverlust kompensiert, kann auf Grund der Überexpression im Hoden nur vermutet werden. Möglich wäre auch die Überexpression einer weiteren CA Isoform, die im Folgenden den HCO_3^- induzierten Signalweg in den Doppelknockout-Spermien verbessert.

Abbildung 55 fasst noch einmal die Mechanismen, inklusive die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, für den HCO_3^- vermittelten Signalweg in der frühen Spermienaktivierung zusammen.

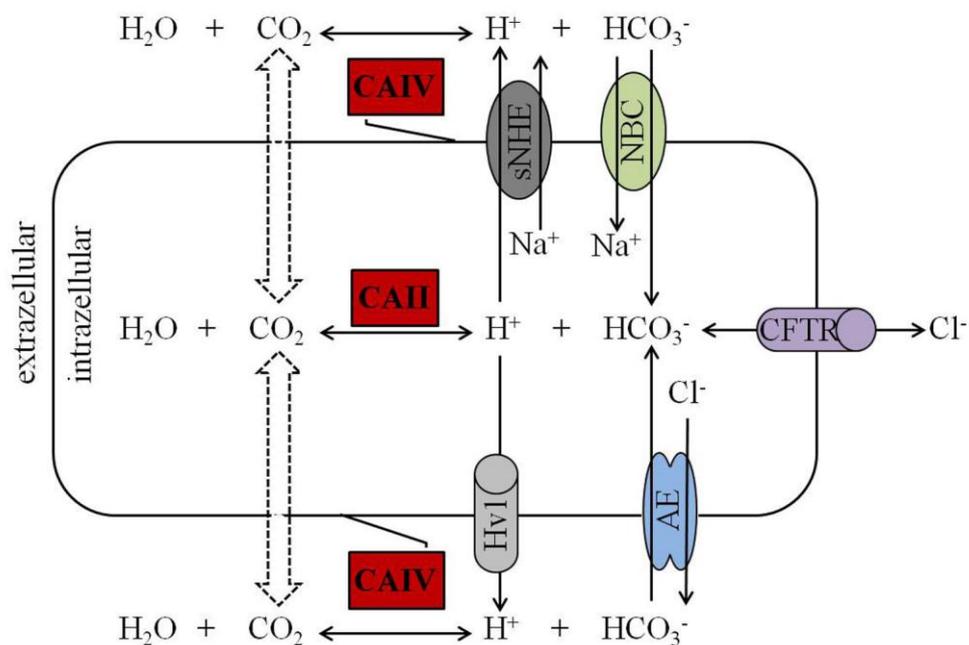


Abbildung 55: Schematische Darstellung der beteiligten Mechanismen am HCO_3^- induzierten Signalweg in Spermatozoen

Der $[\text{HCO}_3^-]_i$ Anstieg während der frühen Spermienaktivierung im weiblichen Reproduktionstrakt kann durch Anionenaustauscher (AE), $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Ko-Transporter (NBC) und dem HCO_3^- durchlässigen CFTR Kanal erfolgen. Ein weiterer Mechanismus ist die freie Diffusion von CO_2 über die Plasmamembran. Dabei spielen die Carboanhydrasen (CA) II und IV eine entscheidende Rolle. Die CAII und CAIV begünstigen die intra- und extrazelluläre HCO_3^- Bereitstellung und aktivieren den HCO_3^- vermittelten Signalweg. Die Protonenausschleusung wird über Na^+/H^+ sowie Hv1, einem protonenselektiven Ionenkanal, gewährleistet.

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (AE), $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Ko-Transporter (NBC) und CFTR sind bereits nachgewiesene Proteine, welche für die Regulation des $[\text{pH}]_i$ und der $[\text{HCO}_3^-]_i$ in Spermien zur Diskussion stehen (Visconti et al., 2011; Liu et al., 2012). Des Weiteren sind zum einen Na^+/H^+ Austauscher (NHE) und zum anderen der in humanen Spermien aktive

Protonenkanal Hv1 involviert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen durch die Analyse von CAII Knockout-Mäusen und der erstmaligen Generierung von CAII CAIV Doppelknock-Mäusen, sowohl die bedeutende Rolle der CAII und CAIV im männlichen Reproduktionstrakt als auch deren Funktion in der Spermienmotilität. Die essentielle HCO_3^- induzierte Schlagfrequenzerhöhung in der frühen Aktivierung ist in Spermien von CAII bzw. CAII CAIV Doppelknockout-Mäusen verringert. Durch den Enzymverlust ist die intrazelluläre Bereitstellung von HCO_3^- , welches aus dem frei diffundierten CO_2 katalysiert wird, verhindert und führt zu verzögertem und vermindertem Frequenzanstieg. Ein kompensatorischer Mechanismus in Spermien von Doppelknockout-Mäusen, der mittels biochemisch generierter CAII CAIV Doppelknockout-Spermien nachgewiesen werden konnte, bestätigt zusätzlich die Hypothese: CAII und CAIV sind Schlüsselenzyme in der HCO_3^- vermittelten Spermienaktivierung und folglich essentiell für die Motilität und Fertilität muriner Spermien.

8 Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and P. Borst (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269(2): 192-200.
- Acott, T. S. and D. W. Carr (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod* 30(4): 926-935.
- Allison, A. C. and E. F. Hartree (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil* 21(3): 501-515.
- Alward, W. L. (1998). Medical management of glaucoma. *N Engl J Med* 339(18): 1298-1307.
- Arcelay, E., A. M. Salicioni, et al. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 52(5-6): 463-472.
- Asari, M., K. Sasaki, et al. (1996). Immunohistolocalization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II, and CA-III) in the reproductive tract of male horses. *Am J Vet Res* 57(4): 439-443.
- Au, C. L. and P. Y. Wong (1980). Luminal acidification by the perfused rat cauda epididymidis. *J Physiol* 309: 419-427.
- Austin, C. R. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4(4): 581-596.
- Avenarius, M. R., M. S. Hildebrand, et al. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet* 84(4): 505-510.
- Babcock, D. F., G. A. Rufo, Jr., et al. (1983). Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(5): 1327-1331.
- Badger, M. R. and G. D. Price (1989). Carbonic-Anhydrase Activity Associated with the Cyanobacterium *Synechococcus Pcc7942*. *Plant Physiology* 89(1): 51-60.
- Bagnis, C., M. Marsolais, et al. (2001). Na⁺/H⁺-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(3): F426-436.
- Becker, B. (1954). Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, diamox; a preliminary report. *Am J Ophthalmol* 37(1): 13-15.
- Bell, S. M., C. M. Schreiner, et al. (1999). Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): C788-795.
- Blackmore, P. F., S. J. Beebe, et al. (1990). Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265(3): 1376-1380.
- Breton, S. (2001). The cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP* 2(4 Suppl): 159-164.

- Breton, S., K. Hammar, et al. (1998). Proton secretion in the male reproductive tract: involvement of Cl⁻-independent HCO₃⁻ transport. *Am J Physiol* 275(4 Pt 1): C1134-1142.
- Breton, S., P. J. Smith, et al. (1996). Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med* 2(4): 470-472.
- Breton, S., R. Tyszkowski, et al. (1999). Postnatal development of H⁺ ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochem Cell Biol* 111(2): 97-105.
- Brion, L. P., C. Suarez, et al. (1994). Up-regulation of carbonic anhydrase isozyme IV in CNS myelin of mice genetically deficient in carbonic anhydrase II. *J Neurochem* 63(1): 360-366.
- Brokaw, C. J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol* 82(2): 401-411.
- Brokaw, C. J. (1987). Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J Cell Biochem* 35(3): 175-184.
- Brokaw, C. J. and R. Kamiya (1987). Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motil Cytoskeleton* 8(1): 68-75.
- Brown, D., S. Hirsch, et al. (1988). Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest* 82(6): 2114-2126.
- Brown, D., B. Lui, et al. (1992). A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *Am J Physiol* 263(4 Pt 1): C913-916.
- Brown, D., X. L. Zhu, et al. (1990). Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19): 7457-7461.
- Bruckert, E. (1991). How frequent is unintentional childlessness in Germany? *Andrologia* 23(3): 245-250.
- Bunge, R. G., W. C. Keettel, et al. (1954). Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril* 5(6): 520-529.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Cafilisch, C. R. and T. D. DuBose, Jr. (1990). Direct evaluation of acidification by rat testis and epididymis: role of carbonic anhydrase. *Am J Physiol* 258(1 Pt 1): E143-150.
- Caldarelli, A., P. Diel, et al. (2005). Effect of phytoestrogens on gene expression of carbonic anhydrase II in rat uterus and liver. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97(3): 251-256.
- Campbell, A. and B. Reece (2003). *Biologie*, Spektrum, 6. Auflage, 3-8274-1352-4.

- Carlson, A. E., B. Hille, et al. (2007). External Ca^{2+} acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 312(1): 183-192.
- Carr, D. W. and T. S. Acott (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol Reprod* 30(4): 913-925.
- Carr, D. W. and T. S. Acott (1989). Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod* 41(5): 907-920.
- Carr, D. W., M. C. Usselman, et al. (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 33(3): 588-595.
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168(4277): 697-698.
- Chavez, J. C., E. O. Hernandez-Gonzalez, et al. (2012). Participation of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl^- channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 86(1): 1-14.
- Chen, W. Y., W. M. Xu, et al. (2009). Cl^- is required for HCO_3^- entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: involvement of a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (SLC26A3) and CFTR. *Biol Reprod* 80(1): 115-123.
- Chen, Y., M. J. Cann, et al. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289(5479): 625-628.
- Chew, S. B., G. P. Leung, et al. (2000). Polarized distribution of NHE1 and NHE2 in the rat epididymis. *Biol Reprod* 62(3): 755-758.
- Cohen, J. P., A. P. Hoffer, et al. (1976). Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol Reprod* 14(3): 339-346.
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl* 13(1): 130-138.
- Cordat, E. and J. R. Casey (2009). Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *Biochem J* 417(2): 423-439.
- Davitz, M. A., J. Hom, et al. (1989). Purification of a glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D from human plasma. *J Biol Chem* 264(23): 13760-13764.
- de Lamirande, E., P. Leclerc, et al. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3(3): 175-194.
- Demarco, I. A., F. Espinosa, et al. (2003). Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278(9): 7001-7009.
- Deng, X., Y. He, et al. (2000). Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. *J Androl* 21(6): 822-832.

-
- Dobyan, D. C. and R. E. Bulger (1982). Renal carbonic anhydrase. *Am J Physiol* 243(4): F311-324.
- Eddy, E. M., K. Toshimori, et al. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 61(1): 103-115.
- Eggert-Kruse, W., A. Kohler, et al. (1993). The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertil Steril* 59(3): 617-628.
- Ehrenwald, E., R. H. Foote, et al. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 25(2): 195-204.
- Eickhoff, R., B. Wilhelm, et al. (2001). Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med* 7(1): 27-35.
- Ekstedt, E., L. Holm, et al. (2004). Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage. *J Mol Histol* 35(2): 167-173.
- Ekstedt, E. and Y. Ridderstrale (1992). Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the rabbit. *Acta Anat (Basel)* 143(3): 258-264.
- Ekstedt, E., Y. Ridderstrale, et al. (1991). Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the boar. *Acta Anat (Basel)* 141(3): 257-261.
- Esposito, G., B. S. Jaiswal, et al. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2993-2998.
- Fleming, R. E., S. Parkkila, et al. (1995). Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *J Clin Invest* 96(6): 2907-2913.
- Flesch, F. M., J. F. Brouwers, et al. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114(Pt 19): 3543-3555.
- Florman, H. M., R. M. Tombes, et al. (1989). An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 135(1): 133-146.
- Frenette, G. and R. Sullivan (2001). Prostate-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* 59(1): 115-121.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127(11): 2407-2420.
- Garcia, M. A. and S. Meizel (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na^{+}/H^{+} exchanger. *Mol Reprod Dev* 52(2): 189-195.

-
- Gatti, J. L., C. Chevrier, et al. (1993). External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 98(2): 439-449.
- Ghandour, M. S., O. K. Langley, et al. (1992). Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6823-6827.
- Goverde, A. J., J. McDonnell, et al. (2000). Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 355(9197): 13-18.
- Goyal, H. O., J. G. Ferguson, et al. (1980). Histochemical activity of carbonic anhydrase in testicular and excurrent ducts of immature, mature intact and androgen-deprived bulls. *Biol Reprod* 22(4): 991-997.
- Graber, M. L., D. C. Dilillo, et al. (1986). Characteristics of Fluoroprobes for Measuring Intracellular Ph. *Analytical Biochemistry* 156(1): 202-212.
- Guffanti, A. A., L. F. Davidson, et al. (1979). Nigericin-Induced Death of an Acidophilic Bacterium. *Journal of General Microbiology* 114(Sep): 201-206.
- Guzick, D. S., S. A. Carson, et al. (1999). Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med* 340(3): 177-183.
- Hamamah, S. and J. L. Gatti (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod* 13 Suppl 4: 20-30.
- Harkonen, P. L. and H. K. Vaananen (1988). Androgen regulation of carbonic anhydrase II, a major soluble protein in rat lateral prostate tissue. *Biol Reprod* 38(2): 377-384.
- Harrison, R. A. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 67(3): 337-352.
- Harrison, R. A. and N. G. Miller (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55(2): 220-228.
- Heming, T. A., E. K. Stabenau, et al. (1994). Roles of intra- and extracellular carbonic anhydrase in alveolar-capillary CO₂ equilibration. *J Appl Physiol* 77(2): 697-705.
- Henderson, L. E., D. Henriksson, et al. (1973). Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase C. *Biochem Biophys Res Commun* 52(4): 1388-1394.
- Hermo, L., D. L. Chong, et al. (2005). Region- and cell-specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53(6): 699-713.
- Hess, K. C., B. H. Jones, et al. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9(2): 249-259.

-
- Hildebrand, M. S., M. R. Avenarius, et al. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 18(11): 1178-1184.
- Hinton, B. T. and M. A. Palladino (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech* 30(1): 67-81.
- Ho, H. C., K. A. Granish, et al. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 250(1): 208-217.
- Holappa, K., M. Mustonen, et al. (1999). Primary structure of a sperm cell anion exchanger and its messenger ribonucleic acid expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 61(4): 981-986.
- Holm, L. and G. J. Wishart (1998). The effect of pH on the motility of spermatozoa from chicken, turkey and quail. *Anim Reprod Sci* 54(1): 45-54.
- Holstein, A. F. and E. C. Roosen-Runge (1981). *Atlas of Human Spermatogenesis*, Grosse Verlag Berlin, 3-88040-027-X.
- Hunnicutt, G. R., D. E. Koppel, et al. (1997). Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev Biol* 191(1): 146-159.
- Hutchinson, T. E., A. Rastogi, et al. (2005). Phospholipase-C sensitive GPI-anchored proteins of goat sperm: possible role in sperm protection. *Anim Reprod Sci* 88(3-4): 271-286.
- Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25(4): 409-417.
- Iwaki, T. (2001). *A color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse*,
- Jaiswal, B. S. and M. Conti (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10676-10681.
- Jensen, L. J., B. M. Schmitt, et al. (1999). Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. *Biol Reprod* 60(3): 573-579.
- Jensen, L. J., A. K. Stuart-Tilley, et al. (1999). Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat and mouse epididymis. *Biol Reprod* 61(4): 973-980.
- Johnston, D. S., S. A. Jelinsky, et al. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 73(3): 404-413.
- Jones, R. C. and R. N. Murdoch (1996). Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reprod Fertil Dev* 8(4): 553-568.

- Junqueira, L. C. U., J. Carneiro, et al. (2005). *Histologie*, Springer, 6. Auflage, 978-3540219651.
- Kaunisto, K., R. E. Fleming, et al. (1999). Regional expression and androgen regulation of carbonic anhydrase IV and II in the adult rat epididymis. *Biol Reprod* 61(6): 1521-1526.
- Kaunisto, K., S. Parkkila, et al. (1995). Expression of carbonic anhydrase isoenzymes IV and II in rat epididymal duct. *Biol Reprod* 52(6): 1350-1357.
- Kaunisto, K., S. Parkkila, et al. (2002). Carbonic anhydrase XIV: luminal expression suggests key role in renal acidification. *Kidney International* 61(6): 2111-2118.
- Kaunisto, K. M. and H. J. Rajaniemi (2002). Expression and localization of the Na⁺/H⁺-exchanger isoform NHE3 in the rat efferent ducts. *J Androl* 23(2): 237-241.
- Khalifah, R. G. (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J Biol Chem* 246(8): 2561-2573.
- Kirichok, Y. and P. V. Lishko (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod* 17(8): 478-499.
- Kirichok, Y., B. Navarro, et al. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 439(7077): 737-740.
- Kivela, A. J., J. Kivela, et al. (2005). Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World J Gastroenterol* 11(2): 155-163.
- Klinke, R., A. C. Pape, et al. (2005). *Physiologie*, Thieme, 5. Auflage, 978-3137960058.
- Krause, W., W. Weidner, et al. (2011). *Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 4. Auflage, 978-3-13-153224-4.
- Kremer, J. (1979). A new technique for intrauterine insemination. *Int J Fertil* 24(1): 53-56.
- Krishnamurthy, V. M., G. K. Kaufman, et al. (2008). Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem Rev* 108(3): 946-1051.
- Kwitny, S., A. V. Klaus, et al. (2010). The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis. *Biol Reprod* 82(4): 669-678.
- Lanzendorf, S. E., M. K. Maloney, et al. (1988). A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 49(5): 835-842.
- Le Pecq, J. B. and C. Paoletti (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem* 17(1): 100-107.

-
- Levine, N. and H. Kelly (1978). Measurement of pH in the rat epididymis in vivo. *J Reprod Fertil* 52(2): 333-335.
- Levine, N. and D. J. Marsh (1971). Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J Physiol* 213(3): 557-570.
- Liljas, A., K. K. Kannan, et al. (1972). Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nat New Biol* 235(57): 131-137.
- Lindemann, C. B. and J. S. Goltz (1988). Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100--extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton* 10(3): 420-431.
- Lindemann, C. B., J. S. Goltz, et al. (1987). Regulation of activation state and flagellar wave form in epididymal rat sperm: evidence for the involvement of both Ca²⁺ and cAMP. *Cell Motil Cytoskeleton* 8(4): 324-332.
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* 74(1): 1-20.
- Lishko, P. V., I. L. Botchkina, et al. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140(3): 327-337.
- Lishko, P. V., I. L. Botchkina, et al. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471(7338): 387-391.
- Litvin, T. N., M. Kamenetsky, et al. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 278(18): 15922-15926.
- Liu, Y., D. K. Wang, et al. (2012). The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biol Reprod* 86(4): 99.
- Lottspeich, F. and J. W. Engels (2012). *Bioanalytik*, 3. Auflage, 978-3-82-74-29-42-1.
- Lucci, M. S., D. G. Warnock, et al. (1979). Carbonic anhydrase-dependent bicarbonate reabsorption in the rat proximal tubule. *Am J Physiol* 236(1): F58-65.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie Taschenlehrbuch*, Thieme, 3. Auflage, 978-3-13-129243-8.
- Lutwak-Mann, C. (1955). Carbonic anhydrase in the female reproductive tract; occurrence, distribution and hormonal dependence. *J Endocrinol* 13(1): 26-38.
- Maas, D. H., B. T. Storey, et al. (1977). Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 28(9): 981-985.
- Mannowetz, N., P. Wandernoth, et al. (2011). Early activation of sperm by HCO₃⁻ is regulated hormonally in the murine uterus. *Int J Androl* 34(2): 153-164.

-
- Marquez, B. and S. S. Suarez (2007). Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biol Reprod* 76(4): 660-665.
- Meldrum, N. U. and F. J. Roughton (1933). The state of carbon dioxide in blood. *J Physiol* 80(2): 143-170.
- Metz, C. N., Y. Y. Zhang, et al. (1991). Production of the glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D by the islets of Langerhans. *J Biol Chem* 266(27): 17733-17736.
- Miki, K. and D. E. Clapham (2013). Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Curr Biol*.
- Mitra, A., R. T. Richardson, et al. (2010). Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. *Biol Reprod* 82(3): 489-496.
- Mori, K., Y. Ogawa, et al. (1999). Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J Biol Chem* 274(22): 15701-15705.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Navarro, B., Y. Kirichok, et al. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol* 52(5-6): 607-613.
- Nieschlag, E. and H. Behre (2000). *Andrologie Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, Springer, 2. Auflage.
- Nolan, M. A., D. F. Babcock, et al. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(37): 13483-13488.
- Nyman, P. O. (1961). Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 52: 1-12.
- Oh, J. S., C. Han, et al. (2009). ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Mol Cells* 28(5): 441-446.
- Okamura, N., Y. Tajima, et al. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 260(17): 9699-9705.
- Owen, D. H. and D. F. Katz (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl* 26(4): 459-469.
- Palermo, G., H. Joris, et al. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810): 17-18.
- Pan, P., M. Leppilampi, et al. (2006). Carbonic anhydrase gene expression in CA II-deficient (Car2^{-/-}) and CA IX-deficient (Car9^{-/-}) mice. *J Physiol* 571(Pt 2): 319-327.

-
- Parkkila, S., K. Kaunisto, et al. (1991). A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* 95(5): 477-482.
- Parkkila, S., A. K. Parkkila, et al. (1993). Location of a membrane-bound carbonic anhydrase isoenzyme (CA IV) in the human male reproductive tract. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41(5): 751-757.
- Parkkila, S., H. Rajaniemi, et al. (1993). Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. *Biol Reprod* 49(2): 326-331.
- Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, et al. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41(4): 683-699.
- Pastor-Soler, N., C. Bagnis, et al. (2001). Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod* 65(2): 384-393.
- Phelps, B. M., D. E. Koppel, et al. (1990). Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J Cell Biol* 111(5 Pt 1): 1839-1847.
- Puscas, I., M. Coltau, et al. (1999). The inhibitory effect of diuretics on carbonic anhydrases. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 105(3): 213-236.
- Ren, D., B. Navarro, et al. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413(6856): 603-609.
- Ren, D. and J. Xia (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 25(3): 165-175.
- Rink, T. J., R. Y. Tsien, et al. (1982). Cytoplasmic Ph and Free Mg-2+ in Lymphocytes. *Journal of Cell Biology* 95(1): 189-196.
- Robert, M. and C. Gagnon (1996). Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod* 55(4): 813-821.
- Rodriguez-Martinez, H., E. Ekstedt, et al. (1991). Histochemical localization of carbonic anhydrase in the female genitalia of pigs during the oestrous cycle. *Acta Anat (Basel)* 140(1): 41-47.
- Salathe, M. (2007). Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol* 69: 401-422.
- Saxena, D. K., T. Oh-Oka, et al. (2002). Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. *Reproduction* 123(3): 435-444.
- Schiebler, T. H. and H. W. Korf (2007). *Anatomie, Steinkopf*, 10. Auflage, 978-3-7985-1770-7.

-
- Schlatt, S., J. Ehmcke, et al. (2009). Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 53(2): 274-280.
- Shah, G. N., B. Ulmasov, et al. (2005). Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46): 16771-16776.
- Shum, W. W., N. Da Silva, et al. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol* 212(Pt 11): 1753-1761.
- Sly, W. S., D. Hewett-Emmett, et al. (1983). Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(9): 2752-2756.
- Sly, W. S. and P. Y. Hu (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem* 64: 375-401.
- Small, C. L., J. E. Shima, et al. (2005). Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod* 72(2): 492-501.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3): 503-517.
- Stephoe, P. C. and R. G. Edwards (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2(8085): 366.
- Storch, V. and U. Welsch (2002). *Kükenthal Zoologisches Praktikum*, 24. Auflage, 3-8274-1111-4.
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 14(6): 647-657.
- Sullivan, R., G. Frenette, et al. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9(4): 483-491.
- Svichar, N., A. Waheed, et al. (2009). Carbonic anhydrases CA4 and CA14 both enhance AE3-mediated Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in hippocampal neurons. *J Neurosci* 29(10): 3252-3258.
- Tajima, Y. and N. Okamura (1990). The enhancing effects of anion channel blockers on sperm activation by bicarbonate. *Biochim Biophys Acta* 1034(3): 326-332.
- Tanious, F. A., J. M. Veal, et al. (1992). Dapi (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) Binds Differently to DNA and Rna - Minor-Groove Binding at at Sites and Intercalation at Au Sites. *Biochemistry* 31(12): 3103-3112.
- Templeton, A. and J. Drife (1992). *The epidemiology of infertility*. Infertility, Springer London: 23-32.

- Thomas, J. A., R. N. Buchsbaum, et al. (1979). Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18(11): 2210-2218.
- Turner, T. T. (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* 29(3): 237-250.
- Usselman, M. C. and R. A. Cone (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. *Biol Reprod* 29(5): 1241-1253.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, et al. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121(4): 1129-1137.
- Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, et al. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19(2): 242-248.
- Visconti, P. E., D. Krapf, et al. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 13(3): 395-405.
- Visconti, P. E., G. D. Moore, et al. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121(4): 1139-1150.
- Visconti, P. E., V. A. Westbrook, et al. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53(1-2): 133-150.
- Volwerk, J. J., J. A. Koke, et al. (1989). Functional-Characteristics of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipases-C from *Bacillus-Cereus* and *Bacillus-Thuringiensis*. *Fems Microbiology Letters* 61(3): 237-242.
- Volwerk, J. J., P. B. Wetherwax, et al. (1989). Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase-C from *Bacillus-Cereus* - Improved Purification, Amino-Acid Composition, and Amino-Terminal Sequence. *Journal of Cellular Biochemistry* 39(3): 315-325.
- Waheed, A., X. L. Zhu, et al. (1992). Rat skeletal muscle membrane associated carbonic anhydrase is 39-kDa, glycosylated, GPI-anchored CA IV. *Arch Biochem Biophys* 294(2): 550-556.
- Waite, L. C. (1972). Carbonic anhydrase inhibitors, parathyroid hormone and calcium metabolism. *Endocrinology* 91(5): 1160-1165.
- Waite, L. C., W. A. Volkert, et al. (1970). Inhibition of bone resorption by acetazolamide in the rat. *Endocrinology* 87(6): 1129-1139.
- Wandernoth, P. M., M. Raubuch, et al. (2010). Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One* 5(11): e15061.

- Wang, D., J. Hu, et al. (2007). A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22): 9325-9330.
- Wang, D., S. M. King, et al. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 5(12): 1117-1122.
- Wassarman, P. M., L. Jovine, et al. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 3(2): E59-64.
- Watanabe, H. and G. Kondoh (2011). Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. *J Cell Sci* 124(Pt 15): 2573-2581.
- Weissgerber, P., U. Kriebs, et al. (2011). Male fertility depends on Ca²⁺ absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Sci Signal* 4(171): ra27.
- Wennemuth, G. (2004). Bicarbonate action on early events in sperm activation. *Ann Anat* 186(4): 293-294.
- Wennemuth, G. (2012). *Taschenatlas Histologie*, Elsevier, 1. Auflage, 978-3-437-41977-5.
- Wennemuth, G., A. E. Carlson, et al. (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺ - channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130(7): 1317-1326.
- Whittington, D. A., J. H. Grubb, et al. (2004). Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J Biol Chem* 279(8): 7223-7228.
- WHO (1987). Task force on the diagnosis and treatment of infertility: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl*.
- Xia, J. and D. Ren (2009). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod* 80(6): 1092-1098.
- Xie, F., M. A. Garcia, et al. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 296(2): 353-362.
- Xu, W. M., Q. X. Shi, et al. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23): 9816-9821.
- Zeng, Y., J. A. Oberdorf, et al. (1996). pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁽⁺⁾-, Cl⁽⁻⁾-, and HCO₃⁽⁻⁾-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 173(2): 510-520.
- Zhang, H. and P. A. Martin-Deleon (2003). Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 24(1): 51-58.

- Zhou, C. X., X. F. Wang, et al. (2005). Bicarbonate secretion by the female reproductive tract and its impact on sperm fertilizing capacity. *Sheng Li Xue Bao* 57(2): 115-124.
- Zhou, Q., L. Clarke, et al. (2001). Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 14132-14137.
- Zhu, X. L. and W. S. Sly (1990). Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. *J Biol Chem* 265(15): 8795-8801.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Mein wichtigster Dank gilt meiner Familie, insbesondere Dir, Mama, du bist die beste Mama der Welt. Egal ob nah oder fern, jung oder alt, danke für Eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Danke!!

Des Weiteren danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Gunther Wennemuth für die wunderbare Betreuung, die vielen Erfahrungen, die ich während meiner Promotion sammeln durfte und für die Erkenntnis, die Du mich lehrtest und mich fortan positiv prägen wird: „Man wächst mit seinen Aufgaben“. Danke!!

Der gesamten Arbeitsgruppe Wennemuth ein großes Dankeschön. Einmal für Eure Hilfestellung im Labor, aber noch viel wichtiger für Eure Freundschaft. Wir hatten eine echt geile Zeit zusammen, will keine Sekunde missen. Unvorstellbar, dass jemand mehr Gaudi auf der Arbeit hat als wir. Danke!!

Zum Schluss noch ein Dankeschön an alle Freunde. Danke für die vielen, unvergesslichen Stunden, die wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche, für Eure Geduld und das lästige Korrekturlesen, für die tatkräftigen Spenden, ... für alles eben. Und denkt dran, wenn Euch Euer Leben nervt, dann streut Glitzer drauf, pinkes Glitzer ☺!!

Danke!!

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Petra Melitta Wandernoth
 Geburtsdatum: 23.01.1985 in Merzig
 Nationalität: deutsch

Ausbildung

8/1995-3/2004 Gymnasium Saarburg
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/2004-3/2005 Studium der klassischen Biologie,
 Universität Mainz

4/2005-9/2009 Studium der Human- und Molekularbiologie,
 Universität des Saarlandes

Diplomprüfung in den Hauptfächern Physiologie,
 Pharmakologie und Entwicklungsbiologie

Diplomarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie,
 Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. G. Wennemuth
 Titel der Diplomarbeit:
 „Verteilung und Funktion der Carboanhydrase IV im
 männlichen Genitaltrakt der Maus“

Abschluss: Diplom Human- und Molekularbiologin
 Note: „sehr gut“ (1,4)

seit 9/2009 Promotionsstudentin am Institut für Anatomie und
 Zellbiologie,
 Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. G. Wennemuth
 Universität des Saarlandes

Publikationen

Wandernoth P, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, Wennemuth G. “*Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm.*” PLoS One. 2010 Nov 24;5(11):e15061

Munger SD, Leinders-Zufall T, McDougall LM, Cockerham RE, Schmid A, **Wandernoth P**, Wennemuth G, Biel M, Zufall F, Kelliher KR. “*An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning.*” Curr Biol. 2010 Aug 24;20(16):1438-44

Mannowetz N, **Wandernoth P**, Hornung J, Ruffing U Raubuch M, Wennemuth G. “*Early activation of sperm by HCO_3^- is regulated hormonally in the murine uterus.*” Int J Androl. 2011 Apr;34(2):153-64

Mannowetz N, **Wandernoth P**, Wennemuth G. “*Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa.*” J Cell Physiol. 2012 May;227(5):2154-62

Publizierte Abstracts

Vortrag: **Wandernoth P**, Mannowetz N, Raubuch M, Wennemuth G. “*Localization and function of carbonic anhydrase II in the murine male reproductive tract.*” 105th Annual Meeting, 2010, Hamburg

Posterpräsentation: **Wandernoth P**, Mannowetz N, Hornung J, Ruffing U, Raubuch M, Wennemuth G. “*Hormonally-regulated CFTR expression in the murine male reproductive tract.*” 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 2010, Würzburg

Posterpräsentation: Mannowetz N, **Wandernoth P**, Hornung J, Ruffing U, Wennemuth G. “*CFTR-mediated early activation of sperm by HCO_3^- is regulated hormonally in the murine uterus.*” 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 2010, Würzburg

Posterpräsentation: **Wandernoth P**, Mannowetz N, Ruffing U, Wolf A, Wennemuth G. “*Effect of pH and temperature on murine sperm motility.*” 28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 2011, Würzburg

Posterpräsentation und Kurzvortrag: Mannowetz N, **Wandernoth P**, Raubuch M, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, Wennemuth G. “*Role of carbonic anhydrase II and IV in the bicarbonate-mediated activation of murine sperm.*” 1st International Caesar Conference –sperm signaling and motility-, 2011, Bonn

Posterpräsentation: Wolf A, Szczyrba J, **Wandernoth P**, Wennemuth G. “ *Ca^{2+} clearance mechanisms in prostate cancer cell line Du145.*” 29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 2012, Würzburg

Posterpräsentation: Szczyrba J, **Wandernoth P**, Aumüller G, Mannowetz N, Wennemuth G. “*Distribution of neuroendocrine cells during prostate development.*” 108th Annual Meeting, 2013, Magdeburg

Vortrag: **Wandernoth P**, Mannowetz N, Szczyrba J, Wennemuth G. “*Carbonic anhydrase II and IV are key enzymes in murine sperm motility and fertility.*” 108th Annual Meeting, 2013, Magdeburg

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....
Homburg, März 2013 Petra Wandernoth