

**Untersuchungen von vierdimensionalen
Bewegungsmustern muriner Spermatozoenflagellen
mittels Digital Holografischer Mikroskopie**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Caroline Wiesehofer
geb. Wenders

aus Düsseldorf
Februar.2020

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen oder an einer anderen gleichwertigen Einrichtung durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gunther Wennemuth

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

3. Gutachter: Prof.‘in Dr. Ingrid Boekhoff

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof.‘in Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juni 2020

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN
Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/72602
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20211213-072805-3

Alle Rechte vorbehalten.

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das möglichste getan hat.“*

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Infertilität.....	3
3.2	Morphologischer Aufbau von Spermatozoen.....	5
3.3	Kapazitation als Reifungsprozess im weiblichen Genitaltrakt.....	6
3.3.1	Frühe Aktivierung.....	6
3.3.2	Späte Aktivierung.....	8
3.4	Fertilisation der Oozyte	10
3.4.1	Zona pellucida.....	12
3.4.2	ZP2 als primärer Zona pellucida Ligand	14
3.5	Selektionsmechanismen im weiblichen Genitaltrakt.....	16
3.5.1	Motilität von Spermatozoen	17
3.5.2	Signaltransduktion zur Motilitätssteuerung	20
3.6	4D Bewegungsanalysen mittels Digital Holografischer Mikroskopie.....	28
4	Zielsetzung.....	33
5	Fragestellung.....	34
6	Material.....	35
6.1	Geräte.....	35
6.2	Chemikalien, Materialien und Reagenzien.....	37

6.3 Puffer und Lösungen	39
6.4 Kits	41
6.5 Größenstandards	42
6.6 Enzyme	43
6.7 Antikörper	43
6.8 Plasmide	44
6.8.1 pGEM [®] -T Vektor	44
6.8.2 pFUSE-hlgG1-Fc2 Vektor	45
6.9 Zelllinien und Kulturmedien	46
6.9.1 CRL-2463 [™]	46
6.9.2 HEK293T Zellen	46
6.10 Bakterienstämme	47
6.11 Oligonukleotide	47
6.12 Software	47
6.13 Versuchstiere	48
7 Methoden	49
7.1 Keimzellen	49
7.1.1 Keimzellpräparation	49
7.1.1.1 Murine Spermatozoenpräparation	49
7.1.1.2 Humane Spermatozoenpräparation	49
7.1.1.3 Zellzählung	50

7.1.1.4	Superovulation und Oozytenpräparation	50
7.1.2	Kapazitation	50
7.1.3	<i>Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)</i>	51
7.1.4	Schlagfrequenzanalyse.....	52
7.1.5	Bindung muriner kapazitierter Spermatozoen an muZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads	54
7.2	DNA-Techniken	54
7.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Boiling Präparation.....	54
7.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Ionenaustauschchromatografie....	55
7.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	56
7.2.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	57
7.2.5	Agarosegelelektrophorese	59
7.2.6	Extraktion von DNA aus einem Agarosegel	59
7.2.7	Restriktion von Plasmid-DNA.....	60
7.2.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	61
7.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	61
7.2.10	Ligation in den Topovektor pGEM [®] -T	61
7.2.11	Ligation in den Zielvektor	62
7.2.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA	63
7.3	RNA-Techniken	63
7.3.1	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	63

7.3.2	Reverse Transkription	64
7.3.3	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (qRT-PCR)	65
7.4	Proteinbiochemische Methoden	67
7.4.1	Proteinaufreinigung aus dem Zellkulturüberstand.....	67
7.4.2	Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinen	68
7.4.3	Rekopplung von Proteinen an magnetische Sepharosebeads	68
7.4.4	Proteinbestimmung mittels des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“	69
7.4.5	Proteinextraktion aus Spermatozoen	69
7.4.6	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE).....	69
7.4.7	Western Blot und Immundetektion	71
7.4.8	Antikörper Isolation, Aufreinigung und Aufkonzentrierung	72
7.4.9	ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	73
7.5	Bakterielle Zellkultur	75
7.5.1	Aufzucht und Lagerung von Bakterien	75
7.5.2	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	75
7.5.3	Blau-Weiß-Selektion	76
7.6	Eukaryotische Zellkultur	76
7.6.1	Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien.....	76
7.6.2	Kultivierung muriner Suspensionszelllinien	77
7.6.3	Auftauen kryokonservierter Zellen	77
7.6.4	Kryokonservierung humaner Zellen	77

7.6.5	Quantifizierung der Zellzahl	78
7.6.6	Stabile Transfektion humaner Zellen	78
7.6.7	Durchflusszytometrie	81
7.7	4D Analysen mittels des Digital Holografischen Mikroskops	82
7.7.1	Prinzip einer digitalen holografischen Messung und Datenverarbeitung	82
7.7.2	Digital holografische Messung von murinen Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte	88
7.7.3	Digital holografische Messung von murinen Spermatozoen mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads	89
8	Ergebnisse	90
8.1	Etablierung der Digital Holografischen Mikroskopie für 4D Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens	91
8.1.1	4D Analyse des Flagellenschlags von freischwimmenden und adhärenen murinen Spermatozoen.....	91
8.1.2	4D Analyse der Schwimmtrajektorie muriner unkapazitierter Spermatozoen.....	95
8.1.3	Untersuchung zum Rollverhalten muriner unkapazitierter Spermatozoen	95
8.1.4	Chiralitätsanalyse der Schwimmtrajektorie muriner unkapazitierter Spermatozoen.....	99
8.2	Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen in 2D und 3D	102
8.3	<i>In-vitro</i> Kapazitation.....	105
8.4	Einfluss des N-terminalen muZP2 Proteins auf das Schwimmverhalten kapazitierter muriner Spermatozoen in 4D	109

8.4.1	Herstellung des muZP2 Glykoproteins.....	109
8.4.1.1	Validierung der Expressionsklone auf RNA-Ebene	109
8.4.1.2	Etablierung des murinen ZP2 Glykoprotein spezifischen Antikörpers IE-3.....	110
8.4.1.3	Gewinnung, Aufreinigung und Umpufferung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins	112
8.4.1.4	Rekopplung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins an Sepharosebeads	114
8.4.2	Kapazitierte murine Spermatozoen binden an muZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads	114
8.4.3	Einfluss des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf das Schwimmverhalten kapazitierter muriner Spermatozoen in 4D	115
8.4.3.1	Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein von kapazitierten Spermatozoen.....	116
8.4.3.2	Anstieg der VCL von kapazitierten murinen Spermatozoen nach Kontakt mit N-terminalem muZP2 Glykoprotein	120
8.4.3.3	N-terminales muZP2 Glykoprotein beeinflusst die innerhalb eines Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von kapazitierten murinen Spermatozoen	123
8.4.3.4	Minimale Änderung der XY-Auslenkung des Kopfs muriner kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein	124
8.4.3.5	MuZP2 Glykoprotein beeinflusst die Flagellenauslenkung kapazitierter muriner Spermatozoen.....	125
8.5	Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf das Schwimmverhalten muriner Spermatozoen in 4D	132

8.5.1	Weder die räumliche Nähe zur Oozyte noch zur Kumuluszellschicht verändert die Chiralität der Schwimmtrajektorie.....	133
8.5.2	Die räumliche Nähe zur Oozyte oder zur Oozyte mit Kumuluszellschicht führt zu einer geringen Änderung der Geschwindigkeit bei kapazitierten Spermatozoen.....	136
8.5.3	Keine Änderungen der lateralen XY-Auslenkung des Spermatozonenkopfs in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht	139
8.5.4	Die räumliche Nähe zur Oozyte oder zur Oozyte mit Kumuluszellschicht führt zu keiner Änderung des Flagellenschlags von kapazitierten murinen Spermatozoen.....	140
9	Diskussion	144
9.1	Die DHM ermöglicht vierdimensionale Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens	145
9.2	Die DHM ermöglicht 4D Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen	152
9.3	Die Induktion der Kapazitation führt zu biochemischen und biophysikalischen Veränderungen.....	155
9.4	Der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein verändert die Schwimmbewegung kapazitierter Spermatozoen	156
9.4.1	Veränderung der Chiralität der Schwimmtrajektorie nach Kontakt zum N-terminalen muZP2 Glykoprotein.....	157
9.4.2	Veränderung der vierdimensionalen Schwimmbewegung muriner kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt zum N-terminalen muZP2 Glykoprotein.....	159

9.5 Bedeutung der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht für das Schwimmverhalten muriner Spermatozoen	165
9.6 Schlussfolgerung.....	172
10 Ausblick	179
Literaturverzeichnis	183
Anhang	215
Danksagung.....	216
Lebenslauf.....	217

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachenverteilung bei ungewollter Kinderlosigkeit (WHO, 1987).....	3
Abbildung 2: Aufbau eines humanen Spermatozoons	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der akrosomalen Reaktion	11
Abbildung 4: Aufbau der murinen Zona pellucida	13
Abbildung 5: Modell zur Gameterkennung an der Zona pellucida	15
Abbildung 6: Periodische Rollbewegung muriner Spermatozoen	19
Abbildung 7: Navigationsmechanismen humaner Spermatozoen	20
Abbildung 8: Modell zur Signaltransduktion in Spermatozoen.....	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung von 2D und 3D Analysen.....	29
Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Transmissionsmikroskops in der <i>on-axis</i> Konfiguration	31
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Transmissionsmikroskops in der <i>off-axis</i> Konfiguration	31
Abbildung 12: 100 bp Plus DNA Leiter (Thermo Scientific)	42
Abbildung 13: Protein Marker VI (10-245) prestained (AppliChem).....	42
Abbildung 14: pGEM [®] -T Vektorkarte (Promega)	44
Abbildung 15: pFUSE Vektorkarte (Invivogen)	45
Abbildung 16: Methode der Schlagfrequenzanalyse	53
Abbildung 17: Prinzip einer digital holografischen Messung.....	83
Abbildung 18: Die holografische Aufnahme ermöglicht ein nachträgliches Refokussieren.....	83

Abbildung 19: Rekonstruktion der vierdimensionalen Schwimmtrajektorie von Spermatozoen	85
Abbildung 20: Rollverhalten entlang der Längsachse muriner Spermatozoen	86
Abbildung 21: Vierdimensionale Flagellenanalyse muriner Spermatozoen mittels DHM	88
Abbildung 22: Auslenkung des Flagellums in der XY-Ebene eines freischwimmenden, unkapazitierten murinen Spermatozoons.....	92
Abbildung 23: Wellenförmige Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene eines freischwimmenden, unkapazitierten murinen Spermatozoons.....	93
Abbildung 24: Wellenförmige Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene eines adhärennten murinen unkapazitierten Spermatozoons	94
Abbildung 25: Schwimmtrajektorie eines unkapazitierten murinen Spermatozoons.	95
Abbildung 26: Rollverhalten entlang der Längsachse muriner Spermatozoen	96
Abbildung 27: Analyse des Rollverhaltens von murinen unkapazitierten Spermatozoen mittels Digital Holografischer Mikroskopie	97
Abbildung 28: Vierdimensionale Darstellung der Schwimmtrajektorie von rollenden und nicht rollenden, unkapazitierten murinen Spermatozoen	98
Abbildung 29: Unkapazitierte murine Spermatozoen zeigen eine Schwimmtrajektorie mit einer Chiralität im Uhrzeigersinn.....	100
Abbildung 30: Procrustesanalysen zeigen eine konservierte Chiralität der Schwimmtrajektorien	101
Abbildung 31: Quantifizierung der Procrustesanalyse	102
Abbildung 32: Schematisches Diagramm der Spermatozoenkinetik	103
Abbildung 33: Geschwindigkeitsanalysen von unkapazitierten und kapazitierten humanen Spermatozoen	104

Abbildung 34: Phosphotyrosin-Immunoblot als Kapazitationsnachweis	106
Abbildung 35: Gesteigerte VCL nach Induktion der Kapazitation	107
Abbildung 36: Zunahme der Schlagfrequenz nach Induktion der Kapazitation.....	107
Abbildung 37: Gesteigerte XY-Auslenkung des Kopfs nach Induktion der Kapazitation	108
Abbildung 38: Expression der ZP2 mRNA in stabil transfizierten HEK293T Zellen	110
Abbildung 39: B-Zell-Rezeptor Nachweis unter Verwendung des Ziege-anti-Ratte Antikörpers	111
Abbildung 40: Nachweis der spezifischen Bindung des IE-3 Antikörpers an das N- terminale muZP2 Glykoprotein	112
Abbildung 41: Aufreinigung und Umpufferung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins aus dem Zellkulturüberstand.....	113
Abbildung 42: Rekopplung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins an Sepharsebeads	114
Abbildung 43: Spezifische Bindung von murinen kapazitierten Spermatozoen an ZP2 Glykoprotein beladene Sepharsebeads.....	115
Abbildung 44: Kein Einfluss der Kapazitation auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie muriner Spermatozoen.....	116
Abbildung 45: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie von kapazitierten Spermatozoen	118
Abbildung 46: Auswertung der Procrustesanalysen von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen	119
Abbildung 47: Quantitative Procrustesauswertung der kapazitierten murinen Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein	120

Abbildung 48: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die VCL von kapazitierten murinen Spermatozoen	121
Abbildung 49: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die VSL von kapazitierten murinen Spermatozoen	122
Abbildung 50: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die zurückgelegte Strecke innerhalb eines Schlagzyklus von kapazitierten murinen Spermatozoen	124
Abbildung 51: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs von kapazitierten Spermatozoen	125
Abbildung 52: Einfluss der Kapazitation auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags	126
Abbildung 53: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags kapazitierter Spermatozoen	128
Abbildung 54: Erhöhte Flagellenauslenkung muriner Spermatozoen in der Z-Ebene nach Induktion der Kapazitation	129
Abbildung 55: Darstellung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von kapazitierten Spermatozoen	130
Abbildung 56: Wirkung des muZP2 Glykoproteins auf die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von kapazitierten Spermatozoen	131
Abbildung 57: Kein Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen	134
Abbildung 58: Auswertung der Procrustesanalysen von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht	135
Abbildung 59: Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die VCL unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen	137

Abbildung 60: Einfluss der Oozyte und der Kumuluszellschicht auf die VSL unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen	138
Abbildung 61: Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die zurückgelegte Strecke pro Schlagzyklus unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen	139
Abbildung 62: Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die XY-Auslenkung des Spermatozonenkopfs unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen	140
Abbildung 63: Effekt von Oozyten und Kumuluszellen auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen.....	141
Abbildung 64: Effekt von Oozyten und Kumuluszellen auf die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen	143
Abbildung 65: Hypothetisches Modell zum Einfluss des ZP2 Glykoproteins auf die Signaltransduktion muriner Spermatozoen.....	178

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	35
Tabelle 2: Chemikalien, Materialien und Reagenzien.....	37
Tabelle 3: Primärantikörper	43
Tabelle 4: Sekundärantikörper.....	44
Tabelle 5: pFUSE-Plasmid	45
Tabelle 6: Oligonukleotide	47
Tabelle 7: WHO Klassifizierung (2010) und WHO Klassifizierung (1999 „4th“ Edition)	51
Tabelle 8: Pipettierschema eines Standard PCR-Ansatzes.....	58
Tabelle 9: Schema eines PCR-Standardprogramms.....	58
Tabelle 10: Restriktionsansatz.....	61
Tabelle 11 Ansatz für die Ligation des Inserts in den pGEM [®] -T Vektor.....	62
Tabelle 12: Ansatz für die Ligation des Inserts in den pFUSE Vektor	62
Tabelle 13: Ansatz des DNaseI-Verdau	64
Tabelle 14: cDNA-Syntheseansatz.....	65
Tabelle 15: qRT-PCR Ansatz	66
Tabelle 16: qRT-PCR Programm.....	66
Tabelle 17: Zusammensetzung der Tricin-Gele für die SDS-PAGE	70
Tabelle 18: Pipettierschema des indirekten Festphasen-ELISA	74
Tabelle 19: Schema der stabilen Transfektion.....	79

Tabelle 20: Schema der Titrationsreihe	80
--	----

Abkürzungsverzeichnis

ABHD2	α/β hydrolase domain-containing protein 2
AK	Antikörper
AP	Aperturblende
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Akrosomreaktion
ART	Assistierte Reproduktionstherapie
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Carboanhydrase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Kalzium
CASA	Computer-Assistierte-Spermien-Analyse
CatSper-Kanal	cationic channel of sperm
CCD-Kamera	charged-coupled device-Kamera
CCW	Counter-clockwise (gegen den Uhrzeigersinn)
cDNA	Complementary (komplimentäre) DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CW	Clockwise (mit dem Uhrzeigersinn)
Ct	Cycle threshold
D _{x,y}	Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DHM®	Digital Holografische Mikroskopie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTPs	Didesoxyribonukleinsäuren
dsDNA	Doppelsträngige DNA
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Floureszenzaktivierte Zellsortierung)
FKS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fps	Frames pro Sekunde
FSC	Forward Angle Light Scatter (Vorwärtsstreulicht)
GC	Guanylatzyklenrezeptor
hCG	human Chorionic Gonadotropine
HCN	Hyperpolarisation aktivierter zyklischer Nukleotid- gesteuerter Kanal
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hv1	Protonenkanal
Hz	Hertz
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IE	Injektionseinheiten
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
ISF-1	Iscove's Medium und Ham's F-12 (1:1)
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
K ⁺	Kalium
Kb	Kilobasen

KCL	Kaliumchlorid
KCNG	Kalium-selektiver zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kanal
kDa	Kilodalton
KOK	Kumulus-Oozytenkomplex
LB	Luria Broth
LCh	Left-cheek downmost
mAb	Monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)
muZP2	Murines Zona pellucida Protein 2
MCS	Multiple cloning site
MO	Mikroskopobjektiv
mRNA	Messenger RNA
MWCO	Molecular weight cut-off
NAADP	nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NBC	$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter
Ni	Nickel
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
O	Objektstrahl
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered system
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropine
Polyfit	Polynomialer Fit
PTK	Protein-Tyrosin-Kinasen
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
R	Referenzstrahl

RCh	Right-cheek downmost
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Spiegel
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sAC	Lösliche Adenylatzyklase
sek.	Sekundär
sNHE	spermatozoenspezifischer Natrium-Protonen (Na^+/H^+)-Austauscher
SOB	Super optimal Broth
SOC	Super optimal Broth with catabolite repression
ssDNA	Einzelsträngige DNA
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
ST	Strahlenteiler
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered system
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr-P	Tyrosin-Phosphorylierung
UV	Ultraviolett
ü.N.	Über Nacht
v/v	Volume per volume (Volumen pro Volumen)
VAP	average path velocity (mittlere Geschwindigkeit entlang der ermittelten Bahn)
VCL	velocity curvilinear (kurvenlineare Geschwindigkeit)
VSL	velocity straight line (Lineargeschwindigkeit)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid
ZP	Zona pellucida
ZP2	Zona pellucida Glykoprotein 2
2AG	2-arachidonoylglycerol

1 Zusammenfassung

Die Infertilität von Paaren ist ein weltweites Problem (Sharlip et al., 2002), das laut WHO in 20% der Fälle auf Fertilitätsstörungen beim Mann zurückzuführen ist (WHO, 1987). Obwohl einige Ursachen männlicher Infertilität und einige für die Spermatozoenmotilität wichtige Signalwege bereits bekannt sind, ist die vierdimensionale Spermatozoenschwimbewegung und deren Bedeutung für die Fertilisation der Oozyte noch nicht vollständig aufgeklärt.

Daher wurden in dieser Arbeit vierdimensionale (4D) Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens mittels Digital Holografischer Mikroskopie (DHM) durchgeführt. Es konnten wellenförmige Auslenkungen des Flagellums von unkapazitierten murinen Spermatozoen in der Z-Ebene identifiziert werden, die eine ähnliche Amplitude wie die Flagellenauslenkungen in der XY-Ebene haben. Die Morphologie des murinen Spermatozoenkopfs erlaubt eine Einteilung der Orientierung als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh, *Right-cheek downmost*) oder „auf der linken Seite liegend“ (LCh, *Left-cheek downmost*). Murine unkapazitierte Spermatozoen zeigen beim Übergang von RCh auf LCh eine Rollbewegung gegen den Uhrzeigersinn (CCW) und beim Übergang von LCh auf RCh eine Rollbewegung im Uhrzeigersinn (CW). Diese alternierende Chiralität deutet auf ein chirales Gedächtnis hin. Zusätzlich zeigen alle untersuchten unkapazitierten Spermatozoen eine Schwimmtrajektorie mit einer CW Chiralität. Eine Änderung des vierdimensionalen Bewegungsmusters kapazitierter muriner Spermatozoen nach Kontakt zum murinen Zona pellucida Protein 2 (ZP2) konnte mittels DHM detektiert werden. Procrustesanalysen ergaben, dass die Kapazitation muriner Spermatozoen die Chiralität der Schwimmtrajektorie nicht verändert. Erstmals konnte eine Chiralitätsänderung nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein bei 50% der analysierten kapazitierten murinen Spermatozoen festgestellt werden. Die Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie könnte eine Voraussetzung für die Durchdringung der Zona pellucida sein. Im Anschluss wurde der Einfluss der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht auf die vierdimensionale Schwimbewegung muriner Spermatozoen untersucht. Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen konnten keine physiologisch relevanten Veränderungen detektiert werden. Somit konnte in dieser Arbeit mit dem ZP2 Glykoprotein erstmals ein Faktor identifiziert werden, der eine Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie kapazitierter muriner Spermatozoen hervorruft.

2 Summary

Infertility of couples is a worldwide problem (Sharlip et al., 2002), which depends to WHO in 20% of these cases on the fertility dysfunction of men (WHO, 1987). Although some causes of male infertility and some important signaling pathways of sperm motility are already known, the fourdimensional sperm movement and its meaning for the fertilization process of the oocyte is not yet fully clarified.

Therefore, fourdimensional (4D) analyses of sperm swimming behavior were done in this work via Digital Holographic Microscopy (DHM). It could be identified wavelike flagellar excursions of uncapacitated murine sperm in the Z-plane nearly comparable to the amplitude of the flagellar waveform projected onto the XY-plane. The headmorphology of murine sperm allows a discrimination of the head orientation as either “right-cheek downmost” (RCh) or “left-cheek downmost” (LCh). Uncapacitated murine sperm show a counter-clockwise (CCW) rolling movement at the RCh to LCh transition and a clockwise (CW) rolling movement at the transition from LCh to RCh. This alternating chirality indicates a chiral memory. In addition, all analyzed uncapacitated murine sperm show a swimming trajectory with a CW chirality. A change of the fourdimensional movement pattern of capacitated murine sperm after contact to the murine zona pellucida protein 2 (ZP2) could be detected. Procrustes analyses showed that capacitation of murine spermatozoa don't change the chirality of the swimming trajectory. For the first time a chirality change of the swimming trajectory of 50% of the analyzed capacitated murine sperm could determined after contact to the muZP2 glycoprotein. Subsequently, the influence of the proximity to the oocyte or the oocyte with cumulus mass to the fourdimensional swimming motion of murine sperm was analyzed. Depending on the given conditions in this work, no physiologically relevant differences could be detected. In this work, the ZP2 glykoprotein was identified as the first factor, which causes a chiralitychange of swimming trajectory of capacitated murine sperm.

3 Einleitung

3.1 Infertilität

In der Klinik wird Infertilität als eine Erkrankung des Reproduktionssystems beschrieben, die durch das Ausbleiben einer Schwangerschaft nach 12 Monaten regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr charakterisiert ist (Zegers-Hochschild et al., 2009). Infertilität ist ein weltweites Problem, das ca. 15% aller Paare betrifft (Sharlip et al., 2002). Auch in Deutschland wird die Infertilitätsrate bei Paaren im reproduktionsfähigen Alter auf 15% geschätzt (Bruckert, 1991). Eine Studie des Allenbachs Instituts aus dem Jahre 2006 konnte ebenfalls nachweisen, dass ca. 17% der Befragten im Alter zwischen 25 und 59 Jahren in Deutschland ungewollt kinderlos sind (Sütterlin und Hoßmann, 2007). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) können Fertilitätsstörungen sowohl bei der Frau (39%), als auch beim Mann (20%) oder bei beiden Geschlechtern (26%) Ursache für die Infertilität der Paare sein (WHO, 1987) (Abbildung 1). Neuere Studien ergaben eine ähnliche Verteilung (Sharlip et al., 2002).

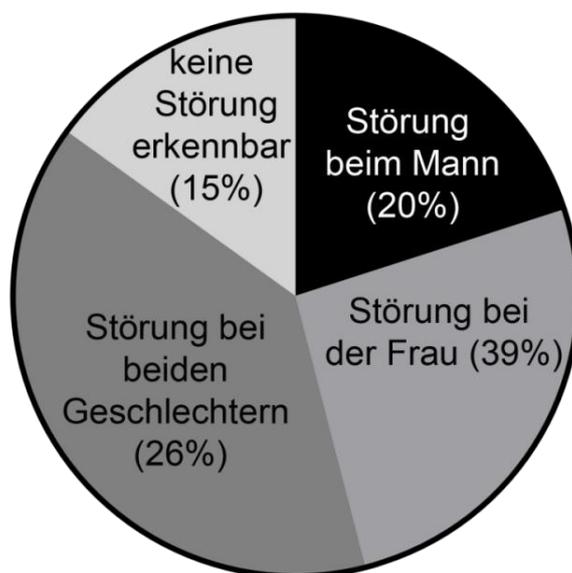


Abbildung 1: Ursachenverteilung bei ungewollter Kinderlosigkeit (WHO, 1987)

Dargestellt ist die Ursachenverteilung bei ungewollter Kinderlosigkeit zwischen den Geschlechtern. Die Ursache für die Infertilität der Paare basiert zu 26% auf einer Störung bei beiden Geschlechtern, zu 39% auf einer Störung bei der Frau und zu 20% auf einer Störung beim Mann. Bei 15% der untersuchten Paare konnte keine Störung ermittelt werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach (WHO, 1987).

Die männliche Infertilität kann durch testikuläre Erkrankungen (z.B. Varikozelen), Lageanomalien und Fehlbildungen der Genitalorgane, durch chromosomale und genetische Defekte (z.B. Kallman's Syndrom, Usher-Syndrom), sowie durch Toxine und Medikamente (z.B. Röntgenbestrahlung, Immunsuppressiva, Chemotherapeutika) hervorgerufen werden (Meistrich, 2013; Nudell et al., 2002). Außerdem können bakterielle und virale Infektionen, wie z.B. Mumps, sowie Störungen des endokrinen Systems (z.B. Östrogenüberschuss, Testosterondefizit) oder der Spermatogenese (Germinalzellaplasie) Ursachen für männliche Infertilität sein (Krisp und Krause, 2002; Nieschlag et al., 2010; WHO, 2000). Die steigende Prävalenz männlicher Infertilität ist ein globales Problem und geht in den westlichen Industrieländern mit einem erhöhtem Bedarf an assistierten Reproduktionstherapieverfahren (ART) einher (Centola et al., 2016; Jensen et al., 2008; Jorgensen et al., 2012; Kupka et al., 2014; Romero-Otero et al., 2015; Swan et al., 2000). Die in der Klinik am Häufigsten angewendeten Verfahren für die Behandlung von männlicher Infertilität sind die Insemination, die konventionelle *in vitro* Fertilisation (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI) (Krause et al., 2011). Obwohl die IVF seit vielen Jahren angewendet wird, liegt die Erfolgsrate je nach Studie nur bei 24-29% beim ersten Versuch (European et al., 2006; McLernon et al., 2016; Pouly, 2014). Zur Diagnostik der ART wird eine Computer-Assistierte-Spermien-Analyse (CASA) verwendet. CASA ist eine standardisierte klinische Untersuchung von Ejakulatproben zur Bestimmung der Zellkonzentration, Motilität und Bewegungsmuster von Spermatozoen (Mortimer, 2000). Sie wurde erstmals von Dott und Foster beschrieben (Dott und Foster, 1979) und kann seit 1985 kommerziell erworben werden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine zweidimensionale (2D) Analyse, welche zunächst nur in humanen, später auch in veterinärmedizinischen andrologischen Instituten eingesetzt wurde (Mortimer und Mortimer, 1988; Verstegen et al., 2002). Erste Hinweise auf die Nutzung von CASA als Methode zur Beurteilung männlicher Infertilität konnten bereits in frühen Studien gewonnen werden (Holt et al., 1985). In der Literatur wird die CASA-Methode für den klinischen Einsatz jedoch weiterhin kontrovers diskutiert, sodass Alternativen zur Erweiterung der CASA Gegenstand aktueller Forschung sind. Eine vielversprechende Erweiterung ist die dreidimensionale (3D) Analyse der Spermatozoenbewegung mittels holografischer Aufnahmen (Di Caprio et al., 2010; Gallagher et al., 2018; Mico et al., 2008).

3.2 Morphologischer Aufbau von Spermatozoen

Nach abgeschlossener Reifung der Spermatozoen im Nebenhoden besitzt das Spermatozoon eine Länge von ca. 60 μm und kann morphologisch in drei Abschnitte eingeteilt werden: Kopf (5 μm), Hals (2 μm) und Schwanz (Flagellum) (50-60 μm). Der Schwanz wird zusätzlich unterteilt in ein Mittelstück (6 μm), ein Hauptstück (53 μm) und ein Endstück (ca. 5–7 μm) (Krause et al., 2011; Serres et al., 1983; Wennemuth, 2017) (Abbildung 2).

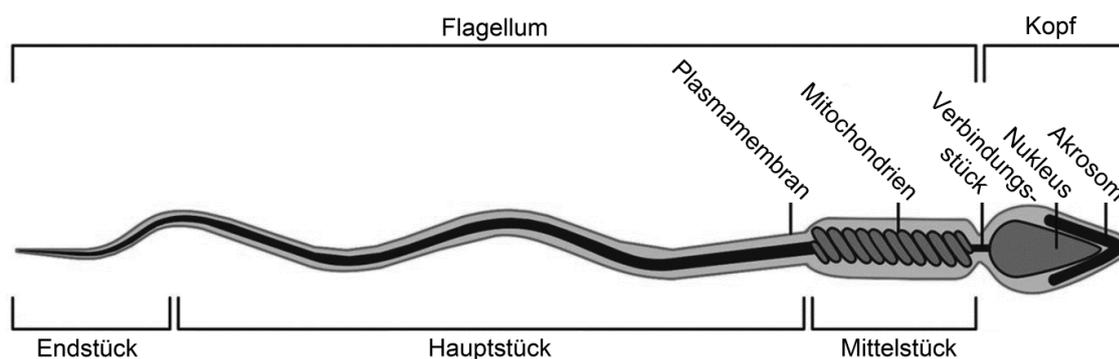


Abbildung 2: Aufbau eines humanen Spermatozoons

Schematische Darstellung eines humanen Spermatozoons in der Seitenansicht. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Borg et al., 2010).

Beim Vergleich verschiedener Spezies konnten Unterschiede in der Länge der einzelnen Abschnitte des Flagellums und in der Morphologie des Kopfes detektiert werden (Rüsse und Sinowatz, 1991; Yanagimachi, 1981). Während murine Spermatozoen einen hakenförmigen Kopf besitzen (Breed, 2004; Breed und Yong, 1986), haben humane Spermatozoen einen scheibenförmigen, ovalen Kopf (WHO, 1999). Der Spermatozookopf ist charakterisiert durch einen Kern mit hochkondensiertem Chromatin und einem am anterioren Ende kappenartig aufliegendem Akrosom (Abbildung 2) (Borg et al., 2010). Das Akrosom besteht aus einer anterioren Kappe und einer posterioren Region, dem sogenannten Äquatoralsegment. Es beinhaltet hydrolytische Enzyme, die eine essentielle Rolle bei der Penetration der Oozyte einnehmen (Wennemuth, 2017; Yanagimachi, 1994a). Die Spermatozoen bewegen sich mittels des Flagellums fort. Dabei handelt es sich meist um eine entlang des Flagellums propagierende wellenförmige Bewegung (Cosson und Prokopchuk, 2014). Das Flagellum ist charakterisiert durch ein zentrales Axonem bestehend aus 9+2-Mikrotubuli, die von neun Außenfasern aus Keratin und der Ringfaserscheide umgeben werden (Krause et al., 2011; Lindemann,

1996; Lindemann und Lesich, 2016; Summers und Gibbons, 1971). Im Mittelstück des Flagellums liegen den Mikrotubuli 15 spiralig angeordnete Mitochondrien an, die die Energie in Form von ATP für die Bewegung liefern (Holstein und Roosen-Runge, 1981; Krause et al., 2011; Schiebler und Korf, 2007; Wennemuth, 2017). Die Mikrotubuli besitzen quervernetzte Dyneinarme (Afzelius, 1959; Gibbons und Rowe, 1965), die nach ATP-Hydrolyse die Gleitbewegung der Filamente durchführen (Brokaw, 1967; Krause et al., 2011; Summers und Gibbons, 1971). Des Weiteren beteiligen sie sich parallel an der Bewegung des Flagellums (Brokaw und Kamiya, 1987).

3.3 Kapazitation als Reifungsprozess im weiblichen Genitaltrakt

Während einer 12-tägigen Passage durch die Nebenhoden reifen Spermatozoen mit Hilfe sezernierter Faktoren des Nebenhodenepithels aus. Sie besitzen jedoch eine unvollständige Befruchtungsfähigkeit (Wennemuth, 2017). Erst durch einen weiteren Reifungsprozess in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts erlangen Spermatozoen die Fähigkeit die Oozyte zu erreichen und diese erfolgreich zu penetrieren (Baldi et al., 2000). Dieser posttestikuläre Reifungsprozess wird als Kapazitation beschrieben und wurde 1951 erstmals von Austin und Chang definiert (Austin, 1951; Chang, 1951). Der Kapazitationsprozess ist charakterisiert durch komplexe biochemische Veränderungen, die bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Diese Veränderungen werden durch die im Ejakulat und der weiblichen Genitalflüssigkeit enthaltenen Faktoren wie Bikarbonat (HCO_3^-), Albumin und Kalzium (Ca^{2+}) hervorgerufen. Die Prozesse der Kapazitation laufen teilweise zeitversetzt ab, sodass zwischen einer frühen und einer späten Aktivierung unterschieden werden kann (Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2002).

3.3.1 Frühe Aktivierung

Die frühe Aktivierung der Spermatozoen beginnt bereits während der Ejakulation. Hierbei führt der höhere pH-Wert der Seminalflüssigkeit zu einem Anstieg der intrazellulären pH-Konzentration der Spermatozoen (Mannowetz et al., 2011; Miki und Clapham, 2013; Zhou et al., 2015). Die Alkalisierung der Spermatozoen erfolgt über die Aktivität eines spermatozoenspezifischen Natrium-Protonen (Na^+/H^+)-Austauschers (sNHE) und eines HCO_3^- -Austauschers (Garcia und Meizel, 1999; Zeng et al., 1996). Ein Einfluss des sNHEs auf die Fertilität wurde durch sogenannte

Funktionsverlustmutationen des *sNHE* Gens in Mäusen identifiziert, wodurch gezeigt werden konnte, dass ohne das funktionsfähige *sNHE* Gen die Mäuse aufgrund fehlender Spermatozoenmotilität infertil waren (Bell et al., 1999; Wang et al., 2007; Wang et al., 2003). Die Neutralisierung des sauren Vaginalsekrets durch die alkalische Seminalflüssigkeit führt zu einem intrazellulären pH-Anstieg und steigert die Spermienmotilität (Babcock et al., 1983; Carr und Acott, 1989). Mehrere Studien konnten zudem zeigen, dass die Zunahme des intrazellulären pH-Werts für die spätere Induktion der Hyperaktivität und der AR essentiell ist (Florman et al., 1989; Marquez und Suarez, 2007; Parrish et al., 1989). In humanen Spermatozoen ist zusätzlich der protonenselektive Ionenkanal Hv1, der am Mittelstück des Flagellums lokalisiert ist, für die Ausschleusung von Protonen und damit für eine Steigerung des intrazellulären pH-Werts verantwortlich (Lishko et al., 2010; Lishko und Kirichok, 2010). Gleichzeitig führt der Efflux von Cholesterin aus der Plasmamembran zu einer Abnahme des Cholesterin-Phospholipidverhältnisses (Ehrenwald et al. 1988, Yanagimachi 1994). Dieser Prozess hat eine Destabilisierung der Plasmamembran zur Folge, wodurch sich ihre Permeabilität erhöht (Zaneveld 1991). Zudem ist der Cholesterolefflux entscheidend beteiligt an der späteren Induktion der Hypermotilität von Spermatozoen (Jones et al 2007, Shadan et al 2004).

Die Kapazitation ist ein HCO_3^- -abhängiger Prozess. Durch die Vermischung des Vaginalsekrets mit der HCO_3^- -reichen Samenflüssigkeit, erhöht sich die extrazelluläre HCO_3^- -Konzentration (Setchell et al., 1994), wobei der HCO_3^- -Transport in die Spermatozoenzelle noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Sowohl $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (NBC) (Demarco et al., 2003; Romero und Boron, 1999), als auch Carboanhydrasen (CA) (Carlson et al., 2007; Ekstedt et al., 2004; Parkkila et al., 1991; Wandernoth et al., 2010), die durch ihre reversible Enzymreaktion den HCO_3^- -Haushalt der Spermatozoen beeinflussen (Wandernoth et al., 2015; Wandernoth et al., 2010) und ein zu den ABC-Transportern zählender Chloridkanal namens CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (Kopelman et al., 1988; Reddy und Quinton, 2001) werden als Modelle für die HCO_3^- -Aufnahme diskutiert. Während Mannowetz und Kollegen eine hormonelle Hochregulation der Expression des CFTR-Kanals im murinen Uterus identifizierten (Mannowetz et al., 2011), konnte eine Studie von Molina und Kollegen 2018 eine Beteiligung des NBCs bei der initialen HCO_3^- -Aufnahme im Menschen nachweisen (Molina et al., 2018). Die HCO_3^- -Aufnahme führt zu einer Zunahme der Schlagfrequenz bei murinen Spermatozoen von 3 Hz auf 9 Hz und bei humanen Spermatozoen von 6 Hz auf 13 Hz

(Wennemuth, 2004). Zusätzlich bewirkt HCO_3^- eine intrazelluläre pH-Zunahme (Parrish et al., 1989; Zeng et al., 1996), eine Aktivierung einer löslichen Adenylatzyklase (engl.: *soluble adenylyl cyclase*, sAC) einhergehend mit einem Anstieg der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration (Chen et al., 2000; Litvin et al., 2003; Okamura et al., 1985; Wennemuth et al., 2003b) und eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine löst die PKA verschiedene Zellantworten aus (Harrison, 2004; Harrison und Miller, 2000; Nolan et al., 2004; Visconti et al., 1995b) wie eine Zunahme der Schlagfrequenz durch die Phosphorylierung von Dyneinketten innerhalb des Axonems (Harrison, 2004; Hess et al., 2005; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Salathe, 2007). Mittels konventioneller Mikroskopie in Kombination mit hochfrequentem Imaging (Stop-Motion Analyse) konnte eine Steigerung der Schlagfrequenz durch HCO_3^- und eine damit verbundene symmetrische, progressive Motilität der Spermatozoen 30 s nach HCO_3^- Kontakt nachgewiesen werden (Wennemuth, 2003). HCO_3^- fördert zusätzlich die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Carlson et al., 2007; Wennemuth et al., 2003b). Ein essentieller Ca^{2+} -Kanal ist der spermien-spezifische CatSper-Kanal (Navarro et al., 2008; Ren et al., 2001). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert ebenfalls den sAC-Signalweg und führt zu einer Zunahme der Schlagfrequenz (Carlson et al., 2007; Jaiswal und Conti, 2003; Visconti et al., 1995b). Motilitätsanalysen von Spermatozoen aus sAC Knockout-Mäusen wiesen die essentielle Bedeutung dieses Signalwegs für die Motilität von Spermatozoen nach, indem die Spermatozoen einen kompletten Verlust der HCO_3^- -vermittelten, progressiven Motilität einhergehend mit dem Unvermögen die Oozyte zu penetrieren zeigten (Esposito et al., 2004; Xie et al., 2006).

3.3.2 Späte Aktivierung

Die molekularen Mechanismen während der späteren Phase der Kapazitation sind verantwortlich für die Induktion der Hypermotilität der Spermatozoen. Diese ist essentiell für die Passage der Kumuluszellschicht, das Erreichen der ZP und damit für die Fertilisation der Oozyte (Quill et al., 2003; Wennemuth, 2017; Yanagimachi, 1994a). Der Weg durch die Tuba uterina führt zu einer Veränderung der Spermatozoenmembran. Eine der wichtigsten Modifikationen der Spermatozoen während der späten Aktivierung ist der in Kapitel 3.3.1 bereits erwähnte Efflux von

Cholesterol aus der Zellmembran. Sie ist eine der Voraussetzungen, die das Spermatozoen in den Zustand der Hypermotilität versetzt (Jones et al., 2007; Shadan et al., 2004) und ist essentiell für die Induktion der Kapazitation (Visconti et al., 1999a; Visconti et al., 1999b). Die Ausschleusung von membranverankertem Cholesterol aus der akrosomalen Region des Spermatozoons steigert zudem die Fluidität der Plasmamembran und erleichtert die Verschmelzung des Spermatozoons mit der Oozyte (Flesch et al., 2001; Gadella und Harrison, 2000). Der wichtigste Cholesterolakzeptor in der follikulären Flüssigkeit ist Albumin (Ehrenwald et al., 1990). Ein weiterer Prozess ist die durch die PKA induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Motorproteinen im Flagellum (Arcelay et al., 2008; Harrison, 2004; Harrison und Miller, 2000). Chan und Kollegen wiesen eine Verbindung der Tyrosin-Phosphorylierungen mit einer wärmeinduzierten Hyperaktivität in humanen Spermatozoen nach (Chan et al., 1998). Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den CatSper-Kanal führt ebenfalls zur Hypermotilität (Carlson et al., 2003), charakterisiert durch die Zunahme der Schlagfrequenzamplitude des Flagellums und einer asymmetrischen Bewegungsform (Brokaw, 1979; Ho et al., 2002; Lindemann et al., 1987; Suarez, 2008). Kirichok und Lishko konnten 2011 zeigen, dass diese asymmetrische Bewegungsform zu einem kraftvolleren Flagellenschlag führt, der notwendig für die Penetration der Kumuluszellschicht ist (Kirichok und Lishko, 2011). Das von den Kumuluszellen sezernierte Progesteron (Schuetz und Dubin, 1981) aktiviert den humanen CatSper-Kanal, wodurch es zum Ca^{2+} -Einstrom während der Penetration kommt (Blackmore et al., 1990; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011). Die essentielle Bedeutung des CatSper-Kanals für die Ca^{2+} -induzierte Hyperaktivität von Spermatozoen konnte anhand von CatSper-defizienten Spermatozoen nachgewiesen werden (Avenarius et al., 2009; Hildebrand et al., 2010; Ren et al., 2001).

Die Kapazitation ist ein bis heute noch nicht vollständig aufgeklärter Prozess bei deren Induktion zahlreiche Faktoren, insbesondere HCO_3^- , Albumin, Ca^{2+} und der pH-Wert eine entscheidende Rolle einnehmen (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2002).

3.4 Fertilisation der Oozyte

Für eine erfolgreiche Fertilisation ist die Induktion der Kapazitation, die zur Induktion einer sogenannten Hypermotilität, die erstmals von Yanagimachi definiert wurde (Yanagimachi, 1969), essentiell. Die Hypermotilität ist charakterisiert durch einen asymmetrischen Flagellenschlag, eine Zunahme der Schlagamplitude und Schlagfrequenz sowie der lateralen Kopfauslenkungen (Brokaw, 1979; Carlson et al., 2007; Carlson et al., 2003; Lindemann et al., 1987; Mortimer und Mortimer, 1990; Yanagimachi, 1969). Diese Änderung des Bewegungsmusters ist entscheidend für die Penetration der Kumuluszellschicht (Quill et al., 2003), wodurch das Spermatozoon an die um die Oozyte liegende Zona pellucida (ZP) binden kann und die Akrosomreaktion (AR) initiiert wird. Die AR ist ein exozytotischer Prozess und essentiell für die Penetration der ZP und für die anschließende Fusion des Spermatozoons mit der Oozyte (Yanagimachi, 1994a). Der Zeitpunkt, an dem die akrosomale Reaktion ausgelöst wird, wird aktuell in der Literatur diskutiert (Bhakta et al., 2019). Die AR kann durch ZP Glykoproteine induziert werden (Florman et al., 2008; Florman und Storey, 1982; Florman und Wassarman, 1985) und erfolgt über einen G-Protein induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und eine erneute intrazelluläre pH-Erhöhung (Florman et al., 1989; Ren und Xia, 2010; Xia und Ren, 2009b). Die pH-Erhöhung führt zur Induktion der AR und zur Hyperaktivierung (Jeon et al., 2001). Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration findet in der akrosomalen Region des Spermatozoonkopfs und im Flagellum statt (Florman, 1994). Dieser Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration wird mit einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) assoziiert (Fukami et al., 2003), die PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu IP₃ (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) und Diacylglycerol hydrolisiert (Goldschmidt-Clermont et al., 1991). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IP₃ an akrosomale IP₃-Rezeptoren bindet (Walensky und Snyder, 1995), wodurch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Akrosom initiiert wird (Rossato et al., 2001; Walensky und Snyder, 1995). Die anschließende Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt einerseits zur Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der Spermatozoenplasmamembran und zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen wie Akrosin und Hyaluronidase (Abbildung 3) (Bleil und Wassarman, 1983; Chiu et al., 2010; Florman et al., 1992) und andererseits zur Erhöhung von Protein-Phosphorylierungen, die zur Initiation der Hypermotilität und der AR führen (Jha und Shivaji, 2002; Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2002).

Sowohl die Hyperaktivierung als auch die AR verstärken den Flagellenschlag, wodurch die Penetration der Oozyte und die Fertilisation ermöglicht wird (Ho et al., 2002; Jeon et al., 2001; Luconi et al., 2006; Revelli et al., 2002; Tasken und Aandahl, 2004). Des Weiteren konnte ein positiver Einfluss von Diacylglycerol auf die Fusion der Plasmamembranen identifiziert werden (Luk et al., 1993; Siegel et al., 1989). Zusätzlich wiesen Arndt und Kollegen eine Beteiligung des sekundären Botenstoffs NAADP („nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate“) und dessen Rezeptor (TPC1, „two-pore channel 1“) für die AR in Säugetierspermatozoen nach (Arndt et al., 2014). Sie konnten zeigen, dass NAADP die AR ohne zusätzliches extrazelluläres Ca^{2+} induziert.

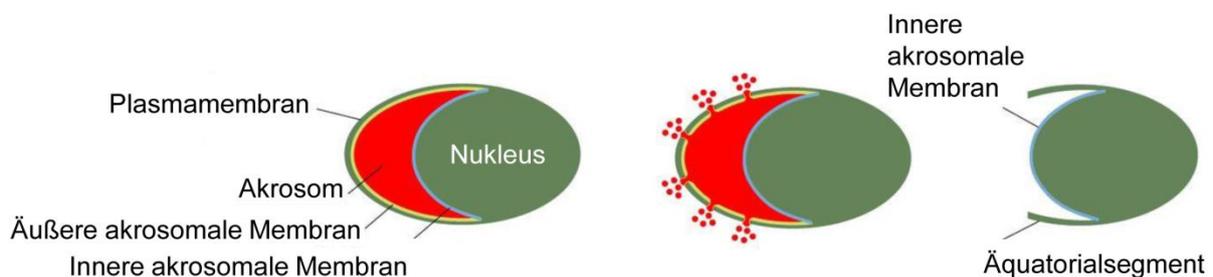


Abbildung 3: Schematische Darstellung der akrosomalen Reaktion

Bei der akrosomalen Reaktion verschmilzt die Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran. Dies führt zur Freisetzung proteolytischer Enzyme, die die ZP auflösen und somit essentiell für eine erfolgreiche Gametenfusion sind. Bei akrosomalreagierten Spermatozoen liegt die innere akrosomale Membran frei. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Bhakta et al., 2019).

Die freigesetzten hydrolytischen Enzyme lösen die ZP an der Stelle, wo das Spermatozoon bindet auf und das Spermatozoon erreicht den zwischen der ZP und der Oozyte liegenden perivitellinen Spalt (Allison und Hartree, 1970; Ren und Xia, 2010; Wassarman et al., 2001). Anschließend bindet das akrosomreagierte Spermatozoon über spezifische Bindeproteine an die Oozytenmembran, wodurch die Zellmembranen von Oozyte und Spermatozoon fusionieren und die paternale DNA in die Oozyte überführt wird. Der Prozess der Befruchtung endet mit der Fusion des männlichen und weiblichen Pronucleus (Aumüller et al., 2017a). Nach der Fusion der Gameten führt eine Exozytose von Proteasen und Glykosidasen aus kortikulären Granula zu einer mechanischen Verhärtung der ZP und damit zur Verhinderung einer Polyspermie (Wolf und Hamada, 1977).

3.4.1 Zona pellucida

Die Zona pellucida, eine extrazelluläre Matrix, umgibt in allen Säugetieren die Oozyte und besteht bei Menschen aus den vier funktionellen Glykoproteinen ZP1 (~100 kDa), ZP2 (~120 kDa), ZP3 (~58 kDa) und ZP4 (~65 kDa) (Bauskin et al., 1999; Lefievre et al., 2004). Die murine Zona pellucida setzt sich aus den drei funktionellen Glykoproteinen ZP1 (~200 kDa), ZP2 (~120 kDa) und ZP3 (~83 kDa) zusammen (Bleil und Wassarman, 1983). ZP4 ist in Mäusen ein Pseudogen (Goudet et al., 2008). Jedes ZP Glykoprotein besitzt ein N-terminales Signalpeptid, eine C-terminale Transmembrandomäne und ein C-terminales Propeptid (Abbildung 4A) (Jovine et al., 2005). Das N-terminale Signalpeptid wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) abgespalten, wodurch der „reife“ N-Terminus des Glykoproteins entsteht. Die Transmembrandomäne verankert das ZP Glykoprotein in das endomembrane System (Boja et al., 2003; Lefievre et al., 2004; Liang et al., 1990). Nach einer spezie-spezifischen Glykosilierung der ZP Glykoproteine mit N- und O-Glykanen im ER (Boja et al., 2003), werden sie zur Zellmembran der Oozyte transportiert, wo das C-terminale Propeptid durch eine Proprotein-Konvertase proteolytisch abgespalten wird, sodass reife ZP Glykoproteine entstehen (Hoodbhoy et al., 2006; Jimenez-Movilla und Dean, 2011; Kiefer und Saling, 2002; Monne und Jovine, 2011). Durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den ZP Glykoproteinen bildet sich schließlich die ZP aus (Kiefer und Saling, 2002). Ultrastrukturelle Analysen von murinen Oozyten ergaben eine Polymerisierung der Glykoproteine ZP2 und ZP3 zu 2–3 µm langen Filamenten, die durch ZP1 Dimere miteinander vernetzt sind (Green, 1997; Wassarman und Mortillo, 1991) (Abbildung 4B).

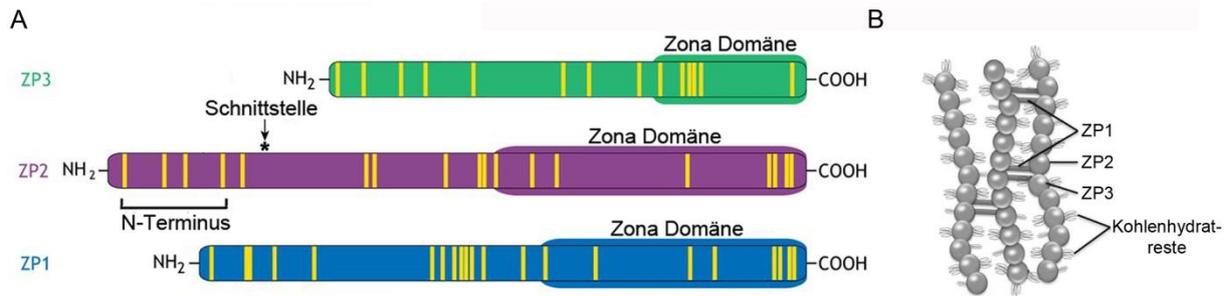


Abbildung 4: Aufbau der murinen Zona pellucida

A. Schematische Darstellung der murinen sezernierten Ektodomänen von ZP1-ZP3. Die gelben Balken geben die Position von Cystein-Resten an und der Stern bei ZP2 repräsentiert die Schnittstelle nach der Befruchtung zur Vermeidung der Polyspermie ($^{166}\text{LA}^+\text{DE}^{169}$ in Mäusen). Die Abbildung wurde modifiziert nach (Bhakta et al., 2019). B. Schematischer Aufbau der murinen ZP. Die ZP ist eine fibrilläre Struktur bestehend aus Filamentketten von sich wiederholenden Dimeren von ZP2 und ZP3 Glykoproteinen. Das Glykoprotein ZP1 kreuzvernetzt diese Filamentketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Dun et al., 2010).

Die Breite der ZP variiert in den verschiedenen Spezies. Für die murine ZP konnte eine Breite von $\sim 6 \mu\text{m}$ bzw. von $\sim 19 \mu\text{m}$ für die humane ZP identifiziert werden (Bertrand et al., 1995; Wassarman et al., 1998). Bei Abweichungen der humanen ZP-Morphologie konnte eine Beeinträchtigung bei der Oozytenentwicklung, sowie bei der Embryoimplantation beobachtet werden. Des Weiteren führte die Morphologieänderung zu einer Reduktion der Schwangerschafts- und Implantationsrate bei der IVF (Dai et al., 2019; Huang et al., 2014; Liu et al., 2017; Sauerbrun-Cutler et al., 2015). Um die Funktion der einzelnen ZP Glykoproteine für den morphologischen Aufbau der ZP zu analysieren, wurden die einzelnen Gene in sogenannten Gen-Knockout-Versuchen vollständig abgeschaltet. Nach Deletion des *ZP1* Gens in transgenen Mäusen, zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine dünnere und stark fragilere ZP Struktur, die mit einer Subfertilität der weiblichen Mäuse verbunden war (Rankin et al., 1999). Bei *ZP3*-Knockout-Mäusen bildete sich während der Oogenese keine ZP aus, woraus eine fehlerhafte Follikelanordnung, ein Mangel an ovulierten Oozyten und eine damit verbundene Infertilität resultierte (Liu et al., 1996; Rankin et al., 1996; Rankin et al., 2001). Während in frühen Follikelstadien von *ZP2* Knockout-Mäusen noch eine sehr dünne ZP, bestehend aus ZP1 und ZP3 detektiert werden konnte, war diese bei den präovulatorischen Oozyten deletiert, wodurch die Mäuse ebenfalls infertil waren (Rankin et al., 2001). Die Ausbildung einer dünnen ZP und einer damit einhergehenden Infertilität, konnte ebenfalls bei Patientinnen detektiert werden, die eine Mutation im *ZP2* Gen besitzen (Dai et al., 2019). Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zwei Glykoproteine ausreichen, um eine ZP zu bilden.

Die ZP nimmt eine entscheidende Rolle bei der Fertilisation der Oozyte ein. Sie gewährleistet eine speziesspezifische Gametenerkennung, vermittelt die initiale Bindung der Spermatozoen an die Oozyte und bildet einen sogenannten „Zona Block“ zur Verhinderung der Polyspermie aus (Bleil et al., 1981; Dean, 1992; Gahlay et al., 2010; Wassarman, 1988). Um eine Fertilisation zwischen verschiedenen Spezies zu verhindern, ist eine speziesspezifische Interaktion zwischen den Spermatozoen und der Oozyte essentiell. Während humane Spermatozoen nicht in der Lage sind an die murine ZP zu binden und diese zu penetrieren, können murine Spermatozoen zwar an die humane ZP binden, sie aber ebenfalls nicht penetrieren (Bedford, 1977). Somit wird bereits an der ZP eine speziesspezifische Gameterkennung gewährleistet.

3.4.2 ZP2 als primärer Zona pellucida Ligand

Aktuell werden in der Literatur mehrere Modelle diskutiert, die entweder das Glykoprotein ZP3 oder das Glykoprotein ZP2 als Zona Spermatozoenliganden beschreiben (Bhakta et al., 2019). Anhand von kompetitiven Spermatozoenbindeassays mit murinen ovulierten Oozyten konnten Bleil und Kollegen zeigen, dass nach Vorinkubation der Spermatozoen mit ZP Glykoproteinen *in vitro* nur ZP3 die Bindung der Spermatozoen an die ZP verhindert (Bleil et al., 1981). Aufgrund dessen wurde zunächst postuliert, dass ZP3 als primärer Spermatozoenligand fungiert (Beebe et al., 1992; Bleil und Wassarman, 1980b, 1983; Gupta und Bhandari, 2011) und ZP2 für die sekundäre Bindung akrosomreagerter Spermatozoen wichtig ist (Bleil et al., 1988; Tsubamoto et al., 1999). Verschiedene Arbeiten liefern Hinweise dafür, dass ZP2 für die primäre Keimzellerkennung verantwortlich ist. Tian und Kollegen konnten zeigen, dass natives gp69/64, ein *Xenopus laevis* ZP2 Homolog, die Bindung an die Oozyte inhibiert (Tian et al., 1997). Des Weiteren konnte mittels humanisierter transgener Maus-Oozyten gezeigt werden, dass humane Spermatozoen nur an Zonae mit humanem ZP2 binden (Baibakov et al., 2012). Weder humane, noch murine Spermatozoen binden an transgene Zonae bestehend aus ZP1, ZP3 und ZP4, sodass die weiblichen Mäuse infertil waren (Avella et al., 2014). Nach Deletion einer spezifischen Region am N-Terminus des ZP2 Glykoproteins fand keine Zona-Bindung muriner Spermatozoen mehr statt und die weiblichen Mäuse waren ebenfalls infertil (Avella et al., 2014). Zusätzlich konnte mit Hilfe von Peptid

beladenen Beads gezeigt werden, dass murine und humane Spermatozoen direkt an den rekombinanten murinen oder humanen ZP2 N-Terminus binden (Avella et al., 2014; Avella et al., 2016; Baibakov et al., 2012). Weiterhin nimmt das ZP2 Glykoprotein eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung einer Polyspermie der Oozyte ein (Tokuhiko und Dean, 2018). Die Fertilisation der Oozyte führt zur Freisetzung einer oozytenspezifischen Endoprotease (Ovastacin) aus kortikulären Granula (Bleil et al., 1981; Moller und Wassarman, 1989; Quesada et al., 2004). Ovastacin spaltet das ZP2 Glykoprotein am N-Terminus ($^{166}\text{LA}^{\downarrow}\text{DE}^{169}$ in Mäusen; $^{171}\text{LA}^{\downarrow}\text{DD}^{174\text{Z}}$ im Menschen) (Abbildung 5), wodurch die Spermatozoen nicht mehr an die ZP binden können und eine Polyspermie der Oozyte verhindert wird (Burkart et al., 2012; Gahlay et al., 2010; Greenhouse et al., 1999; Wolf und Hamada, 1977). Bauskin und Kollegen konnten ebenfalls eine Spaltung des humanen ZP2 Glykoproteins nach Fertilisation der Oozyte nachweisen (Bauskin et al., 1999). Anhand dieser Ergebnisse erstellten Avella und Kollegen ein Modell zur Gameterkennung an die ZP mit ZP2 als primären Spermatozoenliganden (Abbildung 5).

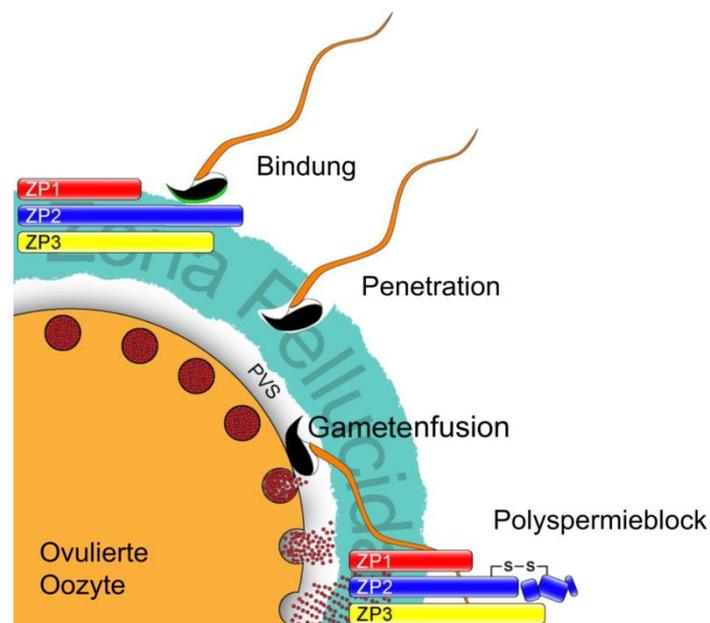


Abbildung 5: Modell zur Gameterkennung an der Zona pellucida

Die murine ZP (aquamarinblau) setzt sich aus den Glykoproteinen ZP1 (rot), ZP2 (blau) und ZP3 (gelb) zusammen und umgibt die ovulierte Oozyte. Kapazitierte Spermatozoen binden über die N-terminale Domäne des ZP2 Glykoproteins an die ZP von unbefruchteten Oozyten. Das Akrosom der Spermatozoen ist grün markiert. Anschließend erfolgt die akrosomale Exozytose von hydrolytischen Enzymen, sodass das Spermatozoon die Matrix der ZP penetrieren kann und die beiden Gameten miteinander fusionieren. Dies fördert die Migration von kortikulären Granula, sowie dessen Fusion mit der Plasmamembran. Durch den sofortigen Polyspermieblock wird einerseits die Penetration der ZP und andererseits eine erneute Fusion eines Spermatozoons mit der Oozyte verhindert. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Avella et al., 2014).

Klinische Relevanz erhalten die ZP2 beladenen Sepharosebeads als Methode, Spermatozoen mit Eigenschaften, die für eine erfolgreiche ART essentiell sind, zu selektionieren und möglicherweise eine Langzeit, reversible Verhütung *in vivo* zu ermöglichen (Avella et al., 2016). Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass nach intrauteriner Applikation von mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads keine Spermatozoen im murinen Ovidukt detektiert werden konnten. Die Verwendung der mit ZP2 Glykoprotein beladenen Beads bietet in Mäusen eine effiziente, nicht-hormonelle und nicht-invasive Langzeitverhütung (Avella et al., 2016). Avella und Kollegen wiesen einen ähnlichen Effekt des N-Terminus von humanem ZP2 Glykoprotein *in vitro* nach (Avella et al., 2016), sodass eine Übertragung in die reproduktive Medizin zur Verwendung als effektives Verhütungsmittel für die Frau möglich erscheint. Des Weiteren konnten Dai und Kollegen zeigen, dass die Infertilität von zwei Patientinnen auf eine Mutation des *ZP2* Gens zurückzuführen ist. Die Durchführung von IVF Behandlungen führte zu keiner Befruchtung der Oozyten. Jedoch konnte mittels einer ICSI Behandlung die Oozyte erfolgreich fertilisiert werden (Dai et al., 2019). Bereits 2017 konnte bei einer Patientin mit jeweils einer heterozygoten Mutation im *ZP2* und *ZP3* Gen mittels ICSI die Geburt eines gesunden Kindes erzielt werden (Liu et al., 2017). Diese Ergebnisse weisen auf das ZP2 Glykoprotein als primären Spermatozoenliganden hin.

3.5 Selektionsmechanismen im weiblichen Genitaltrakt

Fertilisation ist ein komplexer Prozess, der je nach Spezies in unterschiedlichen Umgebungen stattfindet. Während marine Invertebraten oder Fische ihre Gameten in das See- oder Frischwasser abgeben, durchqueren Säugetier-Spermatozoen den weiblichen Genitaltrakt um die Oozyte zu erreichen und erfolgreich zu penetrieren. Nur durch einen komplexen Selektionsprozess eines einzelnen Spermatozoons aus einem Pool von Millionen von Zellen kann Fertilisation erfolgreich mit dem Beginn eines neuen Lebens abgeschlossen werden. Während humane Spermatozoen den weiblichen Genitaltrakt passieren, durchlaufen sie verschiedene Selektionsprozesse, sodass nur 10–20 kapazitierte Spermatozoen die Oozyte erreichen (Chang und Suarez, 2012; Miki und Clapham, 2013). Mehrere Studien konnten zeigen, dass für die Fertilisation auf natürlichem Weg eine geregelte Motilität von Spermatozoen essentiell ist (Hino et al., 2016; Ishikawa et al., 2016; Miki und Clapham, 2013).

3.5.1 Motilität von Spermatozoen

Nachdem die Motilität als essentieller Faktor für eine erfolgreiche Befruchtung erkannt wurde, wurden viele Studien zum Schwimmverhalten (Babcock et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Nosrati et al., 2015), zur Flagellenbewegung (Brokaw, 2009, 2014; Friedrich et al., 2010; Lindemann und Lesich, 2010; Woolley, 2010) und zum Aufbau des Flagellums (Awata et al., 2015; Heuser et al., 2012a; Ounjai et al., 2012; Satir et al., 2014) durchgeführt.

Die Motilität der Spermatozoen basiert auf der Bewegung des Flagellums (Aumüller et al., 2017b). Das Flagellum ist charakterisiert durch ein zentrales Axonem bestehend aus 9+2-Mikrotubuli, die von neun Außenfasern aus Keratin und der Ringfaserscheide umgeben werden (Krause et al., 2011; Lindemann, 1996; Lindemann und Lesich, 2016; Summers und Gibbons, 1971). Bei der Bewegung des Flagellums, dem Flagellenschlag, handelt es sich um eine entlang des Flagellums propagierende wellenförmige Bewegung (Cosson und Prokopchuk, 2014). Wie der Aufbau des Flagellums zur Initiierung und Ausbreitung der wellenförmigen Flagellenbewegung beiträgt, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Brokaw, 2009, 2014; Geyer et al., 2016; Ishijima, 2016; Lindemann und Lesich, 2010, 2016; Woolley, 2010). Die Geschwindigkeit des Flagellenschlags wird durch die Berechnung der Schlagfrequenz, gemessen in Hertz (Hz), bestimmt. Während für murine Spermatozoen eine Schlagfrequenz von ca. 3 Hz detektiert werden konnte, zeigten humane Spermatozoen eine Frequenz von ca. 6 Hz. (Wandernoth et al., 2010; Wennemuth, 2004). Die Bewegung des Flagellums wird unter Anderem durch die intrazelluläre Konzentration von HCO_3^- und Ca^{2+} sowie durch den intrazellulären pH-Wert beeinflusst (Brokaw, 1987; Lindemann und Goltz, 1988; Wennemuth et al., 2003b). Während der frühen Aktivierung bewirken diese Faktoren eine Induktion der Spermatozoenmotilität, gekennzeichnet durch eine Zunahme der Schlagfrequenz (Wennemuth, 2004). Dabei führt HCO_3^- durch die Aktivierung des cAMP- und Ca^{2+} -vermittelten Signalwegs zur Phosphorylierung der Dyneinketten innerhalb des Axonems, die die Zunahme der Schlagfrequenz des Flagellums bewirken (Harrison, 2004; Hess et al., 2005; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Salathe, 2007). Des Weiteren ist für murine Spermatozoen eine Amplitude des Flagellenschlags von ca. 25 μm beschrieben (Wennemuth et al., 2003b). Zusätzlich wiesen die Arbeitsgruppen von Garbers und Brokaw eine entscheidende Bedeutung der Faktoren Mg^{2+} , Ca^{2+} und ATP für einen geordneten Ablauf des Schlagzyklus nach

(Brokaw, 1975; Garbers et al., 1973). Mittels demembrierter und nachfolgend reaktiver Spermatozoen konnte gezeigt werden, dass die Krümmung, die Amplitude und das Drehmoment des Flagellums durch ADP gesteigert wird (Geyer et al., 2016; Lesich et al., 2008).

Neben der Analyse der Flagellenbewegung wurde das Schwimmverhalten von Spermatozoen zusätzlich durch Analysen der Schwimmtrajektorie charakterisiert. Dabei konnten verschiedene Schwimmmuster für Spermatozoen auf ihrem Weg zur Oozyte detektiert werden (Su et al., 2012). Es kann unter anderem zwischen einem typischen, einem helikalen oder hyper-helikalen und einem hyper-aktivierten Bewegungsmuster unterschieden werden. Die typische Schwimmtrajektorie beschreibt das gängige Bewegungsmuster von Spermatozoen und ist charakterisiert durch eine lineare Trajektorie mit minimalen lateralen Auslenkungen (Su et al., 2012). Dabei sind die Bewegungsmuster vom Flagellenschlag abhängig (Eisenbach und Giojalas, 2006). Ein Faktor des extrazellulären Milieus, der die Spermatozoenselektion beeinflussen kann, ist das *in vitro* beobachtete Rollen von Spermatozoen entlang ihrer Längsachse mit vorübergehender Bindung an Strukturen des Umgebungsmilieus (Babcock et al., 2014). Der hakenförmige Kopf (Breed, 2004; Breed und Yong, 1986) muriner Spermatozoen ermöglicht eine Unterteilung in eine rechte und eine linke Seite. Dadurch kann die Orientierung des Kopfs als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh) oder als „auf der linken Seite liegend“ (LCh) beschrieben werden (Babcock et al., 2014). Für murine freischwimmende Spermatozoen konnte eine periodische Reorientierung (Rollbewegung) des Spermatozokopfs identifiziert werden, wobei entweder die rechte oder die linke Seite des Kopfs Richtung Messkammerboden zeigte (Babcock et al., 2014) (Abbildung 6). Diese periodische Rollbewegung entlang der Längsachse ist mit dem Flagellenschlag synchronisiert und kann anhand eines transienten Anstiegs des vom Spermatozokopf gestreuten Lichts detektiert werden (Babcock et al., 2014).

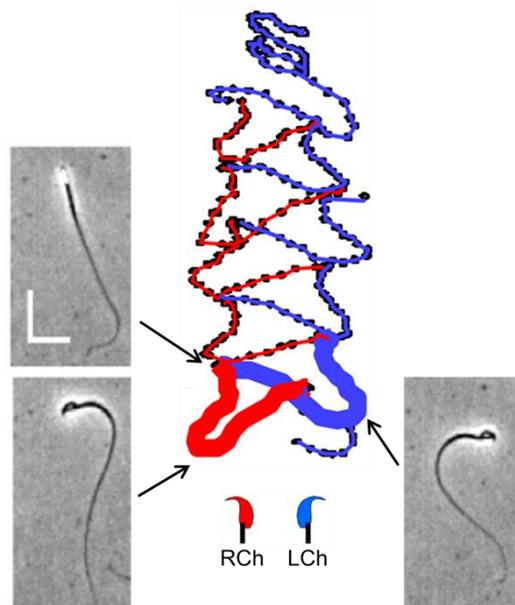


Abbildung 6: Periodische Rollbewegung muriner Spermatozoen

Die Lage des murinen Spermatozoonkopfs kann aufgrund der spezifischen Morphologie als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh) und als „auf der linken Seite liegend“ (LCh) mit Richtung zum Messkammerboden beschrieben werden (RCh= rot, LCh= blau). Die Abbildung zeigt die in einer Zeitspanne von 2 s zurückgelegte Schwimmtrajektorie eines murinen freischwimmenden Spermatozoons (Messbalken= 25 µm). Die Aufnahme erfolgte mit 150 fps. Unterteilt wird die Schwimmtrajektorie in initiale Segmente (dick) und spätere Segmente (dünn). Die Pfeile geben die Lokalisation der drei „stop-motion“ Aufnahmen des Spermatozoons während des Rollvorgangs von RCh auf LCh wieder. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Babcock et al., 2014).

Spermatozoen mit einer zirkulären Schwimmtrajektorie hingegen zeigen keine periodische Rollbewegung und bleiben während ihrer Bewegung auf einer Seite ihres Kopfs (Babcock et al., 2014). Die Orientierung des Kopfs bestimmt dabei die Richtung der zirkulären Schwimmtrajektorie. Für Spermatozoen mit einer RCh-Orientierung des Kopfs konnte eine Schwimmtrajektorie gegen den Uhrzeigersinn detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten Spermatozoen mit einer LCh-Orientierung des Kopfs eine Schwimmtrajektorie im Uhrzeigersinn (Babcock et al., 2014). Eine periodische Rollbewegung entlang der Längsachse konnte ebenfalls für hyperaktivierte (hypermotile) Spermatozoen beobachtet werden (Babcock et al., 2014). Babcock und Kollegen konnten zusätzlich nachweisen, dass eine lineare Trajektorie, bestehend aus alternierenden lateralen Auslenkungen, mit einem asymmetrischen Flagellenschlag einhergeht (Babcock et al., 2014). Die Geschwindigkeit und die Symmetrie des Flagellenschlags werden durch den cAMP- und Ca^{2+} -vermittelten Signalweg reguliert (Carlson et al., 2007; Carlson et al., 2003; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Wennemuth, 2004; Wennemuth et al., 2003b; Wennemuth et al., 2000). Während humane Spermatozoen sich mit einer Geschwindigkeit von 140 µm/s fortbewegen (Su et al., 2012), konnte für murine

Spermatozoen eine durchschnittliche Geschwindigkeit von ca. 180 $\mu\text{m/s}$ beobachtet werden (Chang et al., 2013).

Nachdem die Motilität als essentieller Faktor für eine erfolgreiche Befruchtung erkannt wurde, wurden ebenfalls Studien zu Faktoren des extrazellulären Milieus, die die Spermatozoenselektion beeinflussen können und zum Signalweg, der die Bewegung kontrolliert (Awata et al., 2015; Heuser et al., 2012a; Ounjai et al., 2012; Satir et al., 2014) durchgeführt.

3.5.2 Signaltransduktion zur Motilitätssteuerung

Faktoren des extrazellulären Milieus, die Spermienselektion beeinflussen und die Spermatozoen zur Oozyte navigieren können sind Modifikationen als Antwort auf Flüssigkeitsstrom (Rheotaxis) (Fair et al., 2019; Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Omori und Ishikawa, 2016), Temperatur (Thermotaxis) (Hamano et al., 2016; Mondal et al., 2017) und chemische Gradienten (Chemotaxis) (Eisenbach, 1999; Giojalas und Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999; Ralt et al., 1994) (Abbildung 7), sowie das in Kapitel 3.5.1 beschriebene *in vitro* beobachtete Rollen von Spermatozoen entlang ihrer Längsachse mit vorübergehender Bindung an Strukturen des Umgebungsmilieus (Babcock et al., 2014).

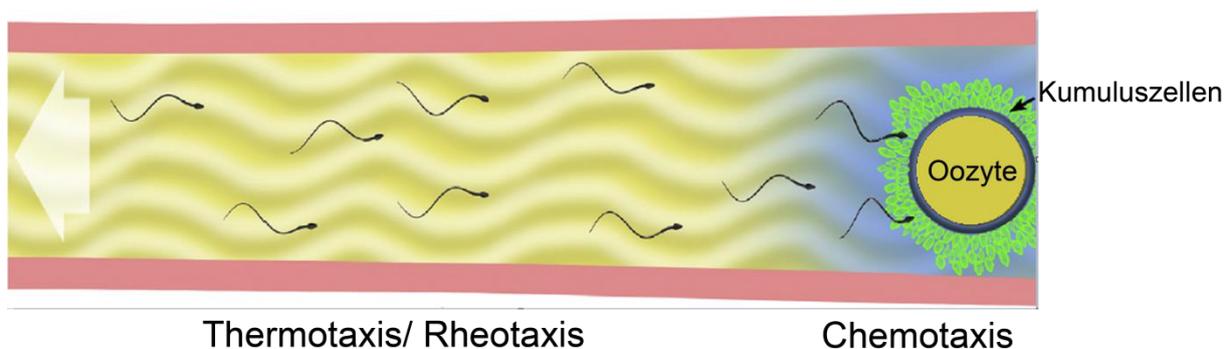


Abbildung 7: Navigationsmechanismen humaner Spermatozoen

Dargestellt sind verschiedene Navigationsmechanismen ausgehend von der humanen Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht. Die Thermotaxis beschreibt eine zielgerichtete Bewegung entlang eines Temperaturgradienten und die Rheotaxis definiert eine gegen den Flüssigkeitsstrom gerichtete Bewegung von Spermatozoen. Chemotaxis ist eine zielgerichtete Bewegung entlang eines chemischen Gradienten hin zum Chemoattraktanten. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Kaupp und Strunker, 2017).

Die Thermotaxis beschreibt die gerichtete Bewegung des Spermatozoons innerhalb des weiblichen Genitaltrakts entlang eines Temperaturgradienten (Bahat et al., 2003; Boryshpolets et al., 2015) (Abbildung 7) und wird als unterstützender Mechanismus

für die Fertilisation in Säugetieren beschrieben (Mondal et al., 2017). Zudem konnte gezeigt werden, dass humane Spermatozoen, die entlang eines Temperaturgradienten schwimmen, eine höhere Schwimgeschwindigkeit, sowie eine Abnahme der lateralen Kopfauslenkungen aufweisen (Boryshpolets et al., 2015). Zusätzlich wiesen Hamano und Kollegen eine Thermotaxis bei murinen Spermatozoen nach und postulierten eine Beteiligung des temperatur-sensitiven Ionenkanals (TRP4, „Transient Receptor Potential Vanilloid“) (Hamano et al., 2016). Eine positive Rheotaxis, definiert als eine gegen den Flüssigkeitsstrom gerichtete Bewegung (Abbildung 7), wurde als ein weiterer möglicher Navigationsmechanismus identifiziert (Fair et al., 2019; Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013). Während humane und murine Spermatozoen eine positive Rheotaxis aufweisen, sind Seeigel-Spermatozoen nicht in der Lage gegen einen Flüssigkeitsstrom zu schwimmen (Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Spermatozoen ohne den CatSper-Kanal ebenfalls nicht in der Lage sind eine gegen den Flüssigkeitsstrom gerichtete Bewegung auszuüben und den Ovidukt zu durchqueren (Chung et al., 2014; Ho et al., 2009; Miki und Clapham, 2013). Dies weist darauf hin, dass für die Ausübung der Rheotaxis ein Ca^{2+} -Influx über den CatSper-Kanal essentiell ist (Kaupp und Strunker, 2017).

Der Prozess der Chemotaxis beschreibt eine Bewegung des Spermatozoons entlang eines durch die Oozyte und die Kumuluszellschicht hervorgerufenen chemischen Gradienten (Eisenbach, 1999; Giojalas und Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999; Ralt et al., 1994) (Abbildung 7). Speziesabhängig sind bereits Moleküle identifiziert worden, die als Chemoattraktanten für Spermatozoen fungieren. Su und Kollegen konnten zeigen, dass sowohl Chemoattraktanten von der humanen Kumuluszellschicht als auch von der humanen Oozyte sezerniert werden (Sun et al., 2005). Dabei handelt es sich unter Anderem um das von den Kumuluszellen sezernierte Stereoid Progesteron (Blackmore et al., 1990; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011) und ein hydrophobes Molekül, welches nachdem es von der Oozyte sezerniert wurde, mit einem Carrier-Protein assoziiert ist (Armon et al., 2014). Chemotaxis, Rheotaxis und Thermotaxis zeigen ebenfalls große Speziesunterschiede, wenn man das Schwimmverhalten von Spermatozoen analysiert (Alvarez et al., 2014; Suarez und Pacey, 2006; Yanagimachi et al., 2013), so konnte z.B. für humane Spermatozoen eine Änderung der Schwimmrichtung nach Kontakt zu Progesteron beobachtet werden (Armon und Eisenbach, 2011).

Um auf Änderungen des pH-Werts, des Ionenmilieus, der Viskosität und der

epithelialen Oberflächen im weiblichen Genitaltrakt zu reagieren, haben Spermatozoen spezies-spezifische Signalmechanismen entwickelt, um die Oozyte zu erreichen und zu befruchten. In humanen Spermatozoen aktiviert das von der Kumuluszellschicht sezernierte Progesteron, sowie Prostaglandine, den humanen CatSper-Kanal und bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom (Brenker et al., 2012; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), der zur Induktion der Hypermotilität führt (Gakamsky et al., 2009; Suarez, 2008; Uhler et al., 1992). Dieser CatSper-abhängige Ca^{2+} -Einstrom wird durch verschiedene Faktoren stimuliert, wie den zyklischen Nukleotiden (cAMP und cGMP) (Chen et al., 2000; Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005), der löslichen Adenylatzyklase (Chen et al., 2000; Esposito et al., 2004), einem Zona pellucida Glykoprotein (Bailey und Storey, 1994; Florman, 1994; Florman et al., 1989), dem Serum Albumin (Bailey und Storey, 1994; Xia und Ren, 2009a), der intrazellulären Alkalisierung (Chavez et al., 2014; Mannowetz et al., 2013) und dem pH-Wert (Lishko et al., 2011; Lishko und Kirichok, 2010). Im Menschen konnte zusätzlich das „ α/β hydrolase domain-containing protein 2“ (ABHD2) als Progesteronrezeptor identifiziert werden (Miller et al., 2016). Nach Progesteronbindung spaltet ABHD2 2-arachidonoylglycerol (2AG) in freies Glycerol und Arachidonsäure (Miller et al., 2016), wodurch die CatSper-Inhibition durch 2AG verhindert und der Kanal geöffnet wird. Im Gegensatz dazu konnte ein Effekt von Progesteron auf CatSper in murinen Spermatozoen nicht beobachtet werden (Lishko et al., 2011). In der Literatur wird postuliert, dass dieser spezies-spezifische Unterschied mit den Unterschieden in der Lipid Homeostasis und Lokalisation von ABHD2 zusammenhängt (Miller et al., 2016). In murinen Spermatozoen ist ABHD2 im Akrosom lokalisiert und weniger im Flagellum, sodass dieser nicht wie bei humanen Spermatozoen mit CatSper kolokalisiert (Miller et al., 2016). Für Invertebratenspermatozoen, wie den Seeigel-Spermatozoen (*Arbacia punctulata*), konnte Resact, das von der Oozyte sezerniert wird, als Signalmolekül identifiziert werden (Seifert et al., 2015). Resact bindet an den Guanylatzyklasenrezeptor (GC) (Kaupp et al., 2003; Wedel und Garbers, 2001), stimuliert die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) (Kaupp et al., 2003), und bewirkt eine Öffnung von Kalium-selektiven zyklischen Nukleotid-gesteuerten (KCNG) Kanälen, die zur Hyperpolarisation der Membran führen (Bohmer et al., 2005; Wiesner et al., 1998). Resact führt über Signalkaskaden zur Aktivierung von CatSper-Kanälen, während beim Menschen Progesteron direkt den CatSper-Kanal aktiviert (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011). Durch die Verwendung eines Resact-Gradienten

wiesen Seifert und Kollegen für Seeigel-Spermatozoen einen durch Resact induzierten Ca^{2+} -Influx über den CatSper-Kanal nach und postulieren eine essentielle Bedeutung dieser intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung für die Navigation der Spermatozoen (Seifert et al., 2015).

Anhand von Bewegungsanalysen konnten für murine Spermatozoen eine alternierende Rollbewegung (180° -Drehung) und für humane Spermatozoen eine 360° -Rollbewegung entlang der Längsachse beobachtet werden (Babcock et al., 2014; Ishijima et al., 1992; Phillips, 1972). Miller und Kollegen wiesen einen Einfluss der asymmetrischen Verteilung der Ionenkanäle CatSper und Hv1 bei humanen Spermatozoen für die Ausübung der 360° -Rotationen entlang der Längsachse nach (Miller et al., 2018). Bisher ist der Einfluss der asymmetrischen Kanalverteilung auf die Chiralität der Rollbewegung und auf die der gesamten Schwimmtrajektorie trotz umfangreicher Forschung unbekannt. Babcock und Kollegen konnten für murine Spermatozoen zeigen, dass die Schwimmtrajektorie von freischwimmenden Spermatozoen durch die Präsenz oder Abwesenheit des Rollvorgangs beeinflusst wird und dass der asymmetrische Flagellenschlag die Drehrichtung (Chiralität) der Schwimmtrajektorie beeinflusst (Babcock et al., 2014).

Sowohl in murinen als auch in humanen Spermatozoen fungiert Slo3 als Kalium (K^+)-Kanal (Brenker et al., 2014; Santi et al., 2010; Zeng et al., 2013; Zeng et al., 2011). Während die Aktivierung von Slo3 in Mäusen pH abhängig ist, ist Slo3 im Menschen nur geringfügig pH abhängig und wird hingegen durch Ca^{2+} reguliert (Brenker et al., 2014; Navarro et al., 2007; Zeng et al., 2011). Mannowetz und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass der Slo3-Kanal spezie-spezifische Eigenschaften besitzt und postulieren daher, dass Slo1 und nicht Slo3 bei humanen Spermatozoen als K^+ -Kanal fungiert (Mannowetz et al., 2013). Zusätzlich konnte eine durch Progesteron ausgelöste Inhibition des K^+ -Stroms bei humanen Spermatozoen gefunden werden (Brenker et al., 2014; Mannowetz et al., 2013). Es wird angenommen, dass die Inhibition des K^+ -Stroms eine Depolarisation der Membran mit anschließender Aktivierung des CatSper-Kanals bewirkt und zur Induktion der Hypermotilität durch den Ca^{2+} -Einstrom führt (Mannowetz et al., 2013). Die Entwicklung der Hyperaktivität während der Kapazitation ist bei Mäusen abhängig von der zytosolischen Alkalisierung und dem anschließenden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Suarez, 2008). In Mäusen vermittelt Slo3 die Hyperpolarisation. Es wird angenommen, dass die Hyperpolarisation durch die Förderung eines intrazellulären pH Anstiegs mittels eines spannungsabhängigen Mechanismus

indirekt den CatSper-Kanal aktiviert (Chavez et al., 2014). Slo3 und CatSper sind in Mäusen die einzigen Ionenkanäle, die das Membranpotential und den Ca^{2+} -Influx regulieren, als Antwort auf eine intrazelluläre Alkalisierung (Zeng et al., 2013). Die Alkalisierung muriner; humaner und Seeigel Spermatozoen erfolgt über die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers sNHE (Garcia und Meizel, 1999; Lee, 1984; Lee und Garbers, 1986; Lee et al., 1983; Zeng et al., 1996), der in einem Proteinkomplex mit der sAC lokalisiert ist (Nomura und Vacquier, 2006; Wang et al., 2007). Es wird angenommen, dass die Öffnung der KCNG und die anschließende Hyperpolarisation zu einer Aktivierung des sNHE Kanals in Seeigel-Spermatozoen führt und eine Alkalisierung des intrazellulären pHs bewirkt (Lee, 1984; Lee und Garbers, 1986; Nishigaki et al., 2001; Solzin et al., 2004). Seeigel-Spermatozoen besitzen zusätzlich einen durch die Hyperpolarisation aktivierten zyklischen Nukleotid-gesteuerten (HCN) Kanal, der das Ruhemembranpotential wiederherstellt (Galindo et al., 2005; Gauss et al., 1998). Die Alkalisierung bei allen drei Spezies bewirkt eine Aktivierung des CatSper-Kanals (Chavez et al., 2014; Seifert et al., 2015; Zeng et al., 2013). In humanen Spermatozoen ist zusätzlich der protonenselektive Ionenkanal Hv1, der am Mittelstück des Flagellums lokalisiert ist, für die Ausschleusung von Protonen und damit für eine Steigerung des intrazellulären pH-Werts verantwortlich (Lishko et al., 2010; Lishko und Kirichok, 2010). In Mäusen ist der Hv1 Kanal funktionell nicht aktiv (Lishko et al., 2010).

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Spermatozoenmotilität ist HCO_3^- . Ein intrazellulärer HCO_3^- -Anstieg über den NBC (Demarco et al., 2003; Romero und Boron, 1999), induziert durch die erhöhte HCO_3^- -Konzentration im Uterussekret (Mannowetz et al., 2011; Miki und Clapham, 2013), führt zu einer Zunahme der Schlagfrequenz und zu einem symmetrischen Schlagmuster des Flagellums (Wennemuth, 2004; Wennemuth et al., 2003a). Sowohl in murinen als auch in humanen Spermatozoen sind NBCs für die initiale HCO_3^- -Aufnahme verantwortlich (Demarco et al., 2003; Puga Molina et al., 2018). Gunaratne und Kollegen wiesen ebenfalls einen NBC in der Plasmamembran des Flagellums von Seeigel-Spermatozoen nach (Gunaratne et al., 2006). Wandernoth und Kollegen konnten zusätzlich für murine und humane Spermatozoen zeigen, dass Carboanhydrasen (CA) durch ihre reversible Enzymreaktion den HCO_3^- -Haushalt während der frühen Spermatozoenaktivierung und somit dessen Spermatozoenmotilität beeinflussen (Wandernoth et al., 2015; Wandernoth et al., 2010). Sie katalysieren die reversible Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- und regulieren die intrazelluläre HCO_3^- -Konzentration.

Dabei kann zwischen einer externen CA (CA IV), die die HCO_3^- - und CO_2 -Konzentration nahe der Spermatozoenoberfläche ausgleicht und einer zytoplasmatischen CA (CAII), die die Reaktion intrazellulär katalysiert, unterschieden werden (Wandernoth et al., 2015; Wandernoth et al., 2010). Die intrazelluläre HCO_3^- -Erhöhung durch CA und über den NBC Kanal führt zu einer intrazellulären pH-Erhöhung (Parrish et al., 1989; Zeng et al., 1996), einer Aktivierung der sAC einhergehend mit einem Anstieg der cAMP-Konzentration (Chen et al., 2000; Litvin et al., 2003; Okamura et al., 1985; Wennemuth et al., 2003b) und einer Aktivierung der PKA. Durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine löst die PKA verschiedene Zellantworten aus (Harrison, 2004; Harrison und Miller, 2000; Nolan et al., 2004; Visconti et al., 1995b) wie eine Zunahme der Schlagfrequenz durch die Phosphorylierung von Dyneinketten innerhalb des Axonems (Harrison, 2004; Hess et al., 2005; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Salathe, 2007). Mittels konventioneller Mikroskopie in Kombination mit hochfrequentem Imaging (Stop-Motion Analyse) konnte ebenfalls eine Steigerung der Schlagfrequenz durch HCO_3^- und eine damit verbundene symmetrische, progressive Motilität der Spermatozoen 30 s nach HCO_3^- -Kontakt nachgewiesen werden (Wennemuth et al., 2003b). HCO_3^- fördert zusätzlich die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Carlson et al., 2007; Wennemuth et al., 2003b). Ein essentieller Ca^{2+} -Kanal ist der spermien-spezifische CatSper-Kanal (Navarro et al., 2008; Ren et al., 2001), der bei Mäusen, bei Menschen und Seeigeln im Hauptstück des Flagellums lokalisiert ist (Chung et al., 2014; Seifert et al., 2015; Servin-Vences et al., 2012). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert ebenfalls den sAC-Signalweg und führt zu einer Zunahme der Schlagfrequenz (Carlson et al., 2007; Jaiswal und Conti, 2003; Visconti et al., 1995b). Es ist bereits bekannt, dass Serumalbumin, Ca^{2+} , HCO_3^- und der pH-Wert essentielle Faktoren für die Induktion der Hypermotilität und der Kapazitation sind (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 2002). Diese Faktoren führen zu einer gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen an der fibrösen Hülle des Flagellums, die einen Anstieg der Schlagfrequenz hervorrufen (Visconti et al., 1995b) und durch den Efflux von Cholesterol aus der Zellmembran zu einer Induktion der Hypermotilität führen (Jones et al., 2007; Shadan et al., 2004). Die Hypermotilität ist charakterisiert durch eine Frequenzzunahme des Flagellenschlags, durch eine Verminderung der Amplitude, einer Steigerung der lateralen Auslenkungen des Spermatozoenkopfs sowie durch eine nicht lineare Schwimmtrajektorie (Baldi et al., 2000; de Lamirande et al., 1997).

Nach Erreichen der Ampulle der Tuba uterina penetrieren die kapazitierten Spermatozoen die um die Oozyte liegende Kumuluszellschicht und binden über Oberflächenproteine an die ZP (Kapitel 3.4.2). In Maus und Mensch ist die konservierte Domäne ZP2⁵¹⁻¹⁴⁹ für die Bindung an die ZP verantwortlich (Avella et al., 2014; Avella et al., 2016). Inoue und Kollegen wiesen bereits 2005 das Rezeptorprotein Izumo1 auf der Spermatozoenmembran nach und konnten zeigen, dass nach Deletion des *Izumo1* Gens die murinen Böcke steril waren (Inoue et al., 2005). Bianchi und Kollegen identifizierten zusätzlich den zum Izumo1-Rezeptor dazugehörigen Liganden Juno auf der Oozytenmembran von Maus und Mensch (Bianchi et al., 2014). Die Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass weibliche Mäuse ohne den Juno-Rezeptor infertil sind und dass die schnelle Abspaltung von Juno vom Oolemma nach der Bindung eines Spermatozoons die Bindung weiterer Spermatozoen (Polyspermie) verhindert (Bianchi et al., 2014; Bianchi und Wright, 2014). Andere Studien wiesen eine entscheidende Rolle von Cd9, einem Oberflächenprotein der Oozyte, für die Gametenfusion nach (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000).

In den letzten Jahren konnten mittels Microarrayanalysen (Quantifizierung der Genexpression) (Amanai et al., 2006; Garrido et al., 2009), der selektiven Genveränderung im Tiermodell (Knockout) (Chung et al., 2011; Wandernoth et al., 2010) und der Etablierung von Einzelzellanalysen (z.B. Patch-Clamp und Schlagformanalyse) (Carlson et al., 2009; Wennemuth et al., 2003b) grundlegende Mechanismen der Signaltransduktion in Spermatozoen identifiziert werden. Das Modell in Abbildung 8 fasst den beschriebenen, aktuellen Forschungsstand der Signaltransduktion zusammen.

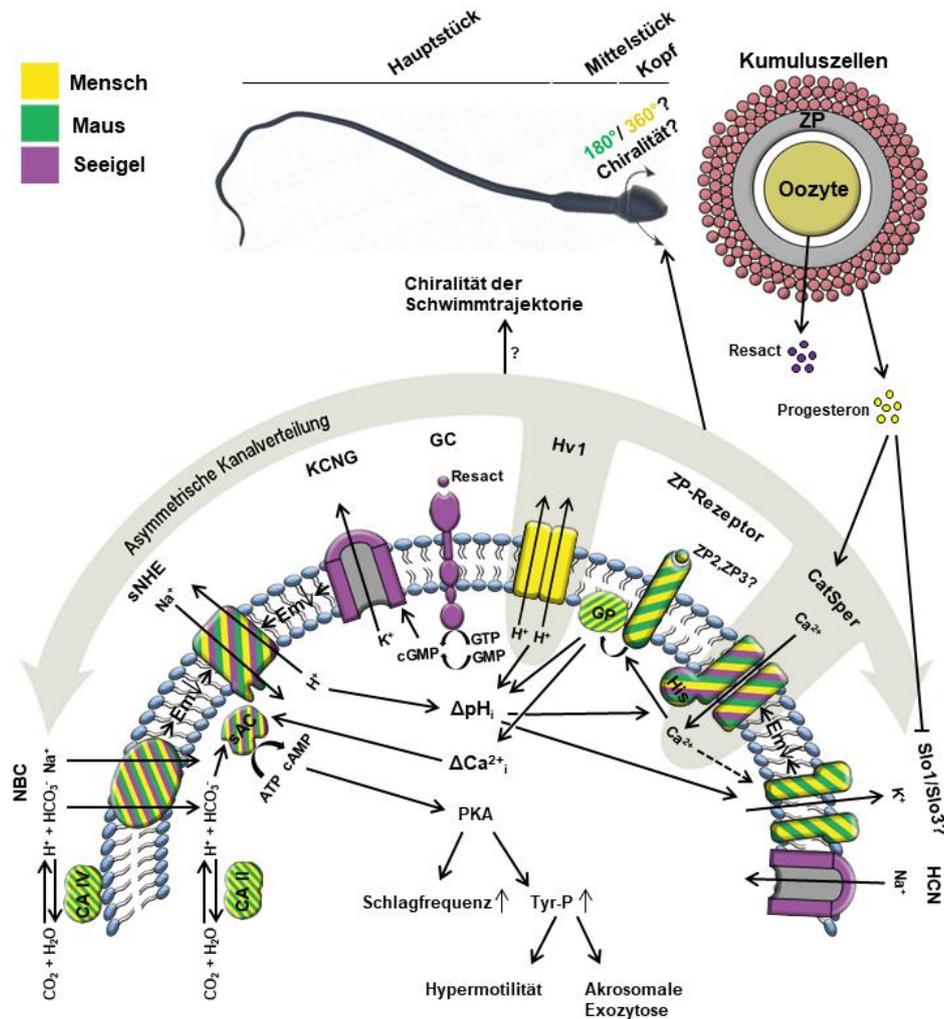


Abbildung 8: Modell zur Signaltransduktion in Spermatozoen

Das Modell zeigt die grundlegenden Mechanismen der Signaltransduktion von humanen, murinen und Seeigel-Spermatozoen. CatSper-Kanäle können entweder über Progesteron, dass von der Kumuluszellschicht sezerniert wird oder über Alkalisierung des Spermatozoencytosols aktiviert werden, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom initiiert wird. Guanylatzyklen (GC) werden über Resact, dass von der Oozyte sezerniert wird, aktiviert und bewirken über cGMP eine Öffnung von Kalium-selektiven zyklischen Nukleotid-gesteuerten Kanälen (KCNG), die zur Hyperpolarisation der Membran und zur Aktivierung des spermatozoenspezifischen Na^+/H^+ -Austauschers (sNHE) führen. Der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (NBC), der sNHE, der Hv1-Kanal und der ZP-Rezeptor, über einen G-Protein (GP) gekoppelten Komplex, fördern die Alkalisierung des intrazellulären pH-Werts. Carboanhydrasen (CA) regulieren durch ihre reversible Enzymreaktion zusätzlich die intrazelluläre HCO_3^- -Konzentration. Slo3 und Slo1 K^+ -Kanäle werden durch die Alkalisierung aktiviert und bewirken eine Hyperpolarisation der Membran. Seeigel Spermatozoen besitzen zusätzlich einen durch die Hyperpolarisation aktivierten zyklischen Nukleotid-gesteuerten Kanal (HCN), der das Ruhemembranpotential wiederherstellt. Sowohl Ca^{2+} als auch HCO_3^- stimulieren die lösliche Adenylatzyklase (sAC) und bewirken eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels. sAC aktiviert die Proteinkinase A (PKA), wodurch verschiedene Substrate, wie die Dyneinketten des Axonems, sowie die Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung der Dyneinketten bewirkt eine Erhöhung der Schlagfrequenz und die PTKs führen durch erhöhte Tyrosin-Phosphorylierungen (Tyr-P) zur Induktion der Hyperaktivität (Hypermotilität), sowie zur Induktion der Akrosomreaktion. Die asymmetrische Kanalverteilung von Hv1 und CatSper bei humanen Spermatozoen scheint verantwortlich für die Rollbewegung zu sein. Die Fragezeichen bedeuten, dass es sich hierbei entweder um eine noch nicht hinreichend untersuchte Annahme oder um in der Literatur kontrovers diskutierte Forschungsergebnisse handelt. Der gestrichelte Pfeil verdeutlicht, dass bisher nur bei humanen Spermatozoen eine Regulation des Slo3-Kanals durch die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gefunden werden konnte. Die spezies-spezifische Farbkodierung ist in der Legende dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Kaupp und Strunker, 2017; Nishigaki et al., 2014).

Bisherige Studien zum Signalweg, der die Bewegung kontrolliert, zum Aufbau des Flagellums (Awata et al., 2015; Heuser et al., 2012a; Ounjai et al., 2012; Satir et al., 2014), zum Spermatozoenschwimmverhalten (Babcock et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Nosrati et al., 2015) und zur Flagellenbewegung (Brokaw, 2009, 2014; Friedrich et al., 2010; Lindemann und Lesich, 2010; Woolley, 2010), erfolgten zweidimensional (Alvarez et al., 2012; Bohmer et al., 2005). Die erste Beschreibung einer dreidimensionalen Spermatozoenbewegung erfolgte durch Jennings, der zeigen konnte, dass Spermatozoen eine helikale Schwimmtrajektorie in 3D besitzen (Jennings, 1901). Eine vielversprechende Erweiterung für die Identifizierung von Signalwegen, die die Bewegungsabläufe eines Spermatozoons während des Fertilisierungsprozesses steuern, kann die Analyse der Spermatozoenbewegungen bzw. des Spermatozoenschwanzschlages in 4D mittels Digital Holografischer Mikroskopie (DHM®) unter definierten Bedingungen während des Fertilisierungsprozesses sein (Muschol et al., 2018).

3.6 4D Bewegungsanalysen mittels Digital Holografischer Mikroskopie

Die Digital Holografische Mikroskopie (DHM®) wurde bereits für Bewegungsanalysen von Spermatozoen eingesetzt (Jikeli et al., 2015; Su et al., 2013; Su et al., 2016; Su et al., 2012). Die Abbildung 9 zeigt einen schematischen Vergleich zwischen einer Geschwindigkeitsanalyse in 2D, wie sie mit CASA durchgeführt werden kann, und einer Analyse in 3D mittels DHM. Unter Einbezug der dritten Dimension kann, im Vergleich zu zweidimensionalen Analysen, eine um den Faktor 2 höhere Geschwindigkeit für Spermatozoen ermittelt werden (Abbildung 9). Hiramoto und Baba wiesen ebenfalls einen Geschwindigkeitsunterschied zwischen freischwimmenden (3D Bewegung) und an einer Oberfläche schwimmenden Spermatozoen (2D Bewegung) nach (Hiramoto und Baba, 1978). Aufgrund dieser Unterschiede postulieren Guerrero und Kollegen, dass eine dreidimensionale Analyse der Flagellenbewegung, der Schwimmtrajektorie und der Chemotaxis essentiell ist, um die Spermatozoenschwimmbewegung vollständig zu verstehen (Guerrero et al., 2011).

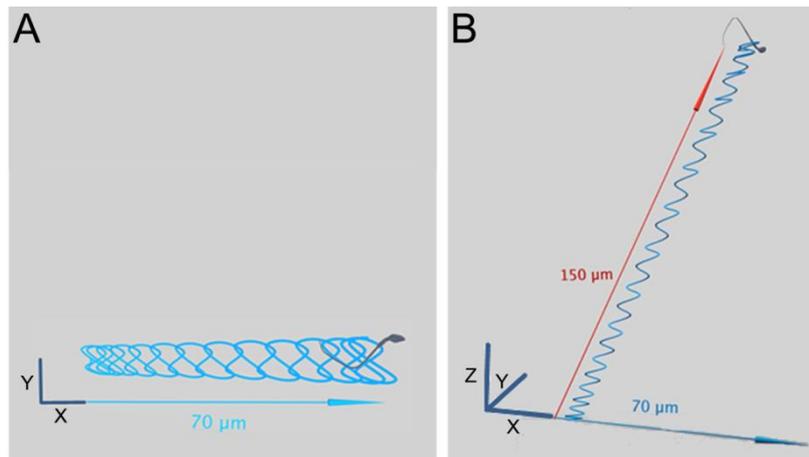


Abbildung 9: Schematische Darstellung von 2D und 3D Analysen

A zeigt den zurückgelegten Weg eines freischwimmenden murinen Spermatozoons in der XY-Ebene (2D Analyse) (blauer Pfeil). Anhand der X- und Y-Koordinaten der Trajektorie wurde die zurückgelegte Strecke pro Zeiteinheit bestimmt. Mittels der 2D Daten, die beispielsweise mittels CASA gemessen wurden, konnte für das Spermatozoon eine Strecke von $70\ \mu\text{m}$ berechnet werden. In B ist der zurückgelegte Weg des Spermatozoons aus A unter Berücksichtigung der dritten Dimension dargestellt (roter Pfeil). Nach Einbezug der dritten Dimension konnte eine Strecke von $150\ \mu\text{m}$ berechnet werden. Die Pfeile geben jeweils die Richtung der Schwimmbewegung an. Die 3D Analyse ergibt eine um den Faktor 2,1 längere Strecke.

Allgemein ist die DHM ein Verfahren zur Erfassung von Wellenfeldern, das Anwendung in der Biophotonik, in den Biowissenschaften und der Medizin findet. Das Verfahren kann ebenfalls für Topografiemessungen oder für Materialprüfungen verwendet werden (Emery et al., 2012; Sandras et al., 2009). Es handelt sich hierbei um eine nicht-invasive, marker- und kontaktfreie hochauflösende Methode (Di Caprio et al., 2015; Leach, 2011; Marquet et al., 2005). Das Mikroskopieverfahren basiert technisch auf dem Prinzip der Holografie und wurde 1948 von Denis Gabor entwickelt (Gabor, 1948a, b). Bei einer holografischen Aufnahme (Hologramm) wird im Gegensatz zu herkömmlichen mikroskopischen Verfahren neben der Intensität und der Frequenz des einfallenden Lichts zusätzlich die Phase aufgenommen. Dabei gibt die Phase die räumliche Position der Wellenfront als Funktion der Zeit wieder (Halliday et al., 2009b). Der quantitative holografische Phasenkontrast ermöglicht es Objekte in 3D darzustellen (Leach, 2011). Digital holografische Aufnahmen können mittels eines Digital Holografischen Mikroskops erzeugt werden. Bei Analysen von transparenten Objekten wird ein Transmissionsmikroskop basierend auf dem Prinzip eines Mach-Zehnder Interferometers verwendet. Hierbei geht die Phasenveränderung auf den Probendurchgang zurück (Marquet et al., 2005; Zernike, 1942a, b). Durch interferierendes Licht, das durch die Überlagerung zweier Teilstrahlen (Wellen) entsteht, wird ein Hologramm erzeugt (Cucho et al., 1999a;

Cuche et al., 1999b). Ausgehend von einer kohärenten, monochromatischen Lichtquelle (Laser) wird der Strahl in einen Objektstrahl, der die Probe passiert, und einen Referenzstrahl, der die Probe nicht durchläuft, aufgeteilt (Marquet et al., 2005). Kohärentes Licht liegt dann vor, wenn zwei Teilstrahlen bei gleicher Frequenz eine konstante Phasendifferenz haben. (Halliday et al., 2009a). Die Teilstrahlen werden nach dem Superpositionsprinzip auf einer Kamera überlagert, sodass ein der Phaseninformation des Objektstrahls entsprechendes zweidimensionales Interferenzmuster entsteht (Halliday et al., 2009b; Schnars und Jueptner, 2005). Dieses Muster entspricht dem Hologramm. Durch anschließende Beleuchtung des Hologramms mit kohärentem Licht, welches demjenigen entspricht, das bereits für die Aufnahme verwendet wurde, lässt sich eine vierdimensionale Darstellung der Probe rekonstruieren. Die ersten Ideen für eine computergestützte Rekonstruktion eines Hologramms wurden bereits 1967 von Godman und Lawrence (Goodman und Lawrence, 1967) und 1972 von Kronrod und Kollegen (Kronrod et al., 1972) entwickelt. Das erste vollständig digitale Setup unter Verwendung einer CCD- (*charged-coupled device*) Kamera wurde von Schnars und Jüptner entwickelt (Schnars und Juptner, 1994). Aktuell werden Rekonstruktionsmethoden verwendet, die auf der Kalkulation des Fresnel'schen Beugungsmusters des Hologramms basieren (Cuche et al., 1999b; Schnars und Jueptner, 2005). Bei der digitalen Holografie kann zwischen einer *on-axis* (*in-line*) und einer *off-axis* Konfiguration unterschieden werden. Bei der *on-axis* Konfiguration befindet sich das Objekt auf der Achse zwischen der Strahlungsquelle (Laser) und der holografischen Schicht (CCD-Kamera) (Abbildung 10). Der Laserstrahl trifft auf eine Aperturblende, wodurch es zunächst zur Beugung des Lichtes kommt und anschließend die Probe beleuchtet wird. Hierbei ist der Objektstrahl der Teil des einfallenden Lichts, der am Objekt gestreut wird, während der Teil des Lichts, der nicht gestreut wird, als Referenzstrahl fungiert. Handelt es sich bei der Lichtquelle um kohärentes Licht, ist eine Aperturblende nicht nötig. Durch die Überlagerung (Interferenz) der einzelnen Teilstrahlen auf der CCD-Kamera wird ein Hologramm erzeugt, welches am Computer numerisch rekonstruiert werden kann (Colomb et al., 2010; Gabor, 1948b; Garcia-Sucerquia et al., 2006; Yu et al., 2014).

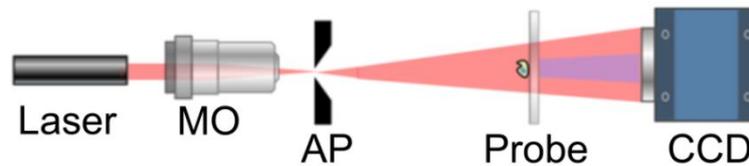


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Transmissionsmikroskops in der *on-axis* Konfiguration

Bei einem Transmissionsmikroskop mit einer *on-axis* Konfiguration passiert der Laserstrahl zunächst das Mikroskopobjektiv (MO) und trifft dann auf eine Aperturblende (AP), wodurch es zur Beugung des Lichts kommt und anschließend die Probe beleuchtet wird. Der Objektstrahl ist der Teil des einfallenden Lichts, der von der Probe gestreut wird, während der Teil des Lichts, der nicht gestreut wird als Referenzstrahl fungiert. Durch die Interferenz der beiden Teilstrahlen entsteht ein Hologramm, das von der *charged-coupled device*- (CCD) Kamera aufgenommen wird. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Yu et al., 2014).

Bei der *off-axis* Konfiguration hingegen liegen der Laserstrahl, die Probe und das Hologramm nicht mehr auf einer Achse (Abbildung 11). Dies geschieht durch einen Winkelversatz zwischen dem Objekt- und dem Referenzstrahl. Der Winkelversatz entsteht durch die Positionierung eines Spiegels im Referenzarm, wodurch die Referenzwelle die CCD-Kamera in einem spezifischen Einfallswinkel erreicht (Cuche et al., 1999b). Die Verwendung der *off-axis* Konfiguration ermöglicht eine aus einem einzigen Hologramm in Mikrosekunden ablaufende numerische Rekonstruktion der 3D Phasen- und Intensitätsbilder des zu analysierenden Objekts (Emery et al., 2006). Abbildung 11 zeigt den schematischen Aufbau eines *off-axis* Digital Holografischen Mikroskops.

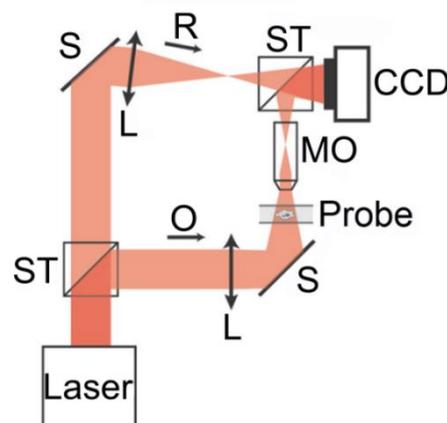


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Transmissionsmikroskops in der *off-axis* Konfiguration

Bei einem Transmissionsmikroskop mit einer *off-axis* Konfiguration wird der Laserstrahl durch einen Strahlenteiler (ST) in einen Objektstrahl (O) und einen Referenzstrahl (R) geteilt. Der Objektstrahl passiert die Probe und das Mikroskopobjektiv (MO). Der Referenzstrahl trifft auf einen Spiegel (S), wodurch es zu einer Änderung des Einfallswinkels kommt. Nach der Überlagerung der beiden Teilstrahlen auf der CCD-Kamera entsteht ein Hologramm. L: Linse; Die Abbildung wurde modifiziert nach (Colomb et al., 2007).

Die ersten digital holografischen Aufnahmen von Spermatozoen gelangen Mico und Kollegen durch die Verwendung eines Transmissionsmikroskops in der *off-axis* Konfiguration (Mico et al., 2008). In der Reproduktionsforschung, insbesondere im Bereich der Spermatozoenforschung, wird die DHM seitdem für vierdimensionale Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens sowie zur Analyse der Spermatozoenmorphologie eingesetzt (Coppola et al., 2014; Crha et al., 2011; Di Caprio et al., 2010; Dubey et al., 2019; Ferrara et al., 2015; Haifler et al., 2015; Merola et al., 2013; Mirsky et al., 2016; Muschol et al., 2018).

Die DHM arbeitet marker- bzw. farbstofffrei, weswegen sie nicht invasiv ist, keine aufwändige Probenvorbereitung erfordert und auch keine Probleme mit Phototoxizität oder Photobleaching hat (Di Caprio et al., 2015; Leach, 2011; Marquet et al., 2005). Es können schnelle dynamische Prozesse beobachtet, aber auch Langzeitmessungen durchgeführt werden (Pan et al., 2012). In dieser Arbeit wurde die DHM verwendet, um erstmals die Flagellenbewegung in 4D und das Schwimmverhalten von freischwimmenden murinen Spermatozoen zu untersuchen sowie um potentielle Änderungen nach Kontakt mit dem Zona pellucida Protein 2 (ZP2) oder in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht zu detektieren.

4 Zielsetzung

Da Veränderungen der Spermatozoenmotilität bis hin zur Immotilität Gründe für die männliche Infertilität sein können, wurden bereits viele Studien zum Schwimmverhalten (Babcock et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Nosrati et al., 2015) und zur Flagellenbewegung (Brokaw, 2009, 2014; Friedrich et al., 2010; Lindemann und Lesich, 2010; Woolley, 2010) durchgeführt. Trotz dieser essentiellen Erkenntnisse ist die Spermatozoenbewegung noch nicht vollständig charakterisiert und ihre Rolle bei der Befruchtung der Oozyte nicht geklärt.

In Vorarbeiten konnte bereits in 2D gezeigt werden, dass das Schwimmverhalten, sowie dessen Änderung wichtige Selektionsmechanismen sind (Babcock et al., 2014). Ziel dieser Arbeit war es daher, aufbauend auf den 2D Analysen, die murine Spermatozoenbewegung in definierten Fertilisationszuständen (nicht kapazitiert, kapazitiert) und nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein sowie in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht in 4D zu untersuchen, um neue Erkenntnisse zum biologischen Grundverständnis der Spermatozoenbewegung, insbesondere der Flagellenbewegung, zu erhalten. Dafür sollte die Digital Holografische Mikroskopie (DHM) etabliert werden, mit der sowohl ein Kopf-Tracking als auch eine Flagellenanalyse in 4D durchgeführt werden konnte. Zusätzlich sollte die Chiralität der gesamten Schwimmtrajektorie mittels Procrustesanalysen untersucht werden. Im Anschluss sollte die DHM ebenfalls für dreidimensionale Geschwindigkeitsanalysen etabliert werden. Anschließend sollte ein Einfluss der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht auf die Schwimmbewegung muriner unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen in 4D analysiert werden. Diese Analyse sollte einen Aufschluss darüber geben, ob die räumliche Nähe der Spermatozoen zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht durch deren Abgabe von Signalmolekülen die vierdimensionale Bewegung direkt beeinflussen kann. Abschließend sollte anhand von digital holografischen Aufnahmen untersucht werden, ob die Bindung kapazitierter Spermatozoen an das Zona pellucida Glykoprotein 2 (ZP2) eine Veränderung in der Spermatozoenschwimmbewegung und in der Chiralität der Schwimmtrajektorie bewirkt. Diese Versuche sollten neue Erkenntnisse über die kurz vor der Befruchtung stattfindenden vierdimensionalen Bewegungsmuster muriner kapazitierter Spermatozoen liefern und zu einem besseren Verständnis des Penetrationsvorgangs durch die Zona pellucida, als Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation, beitragen.

5 Fragestellung

1. Wie ist die vierdimensionale Schwimmbewegung, insbesondere die Bewegung des Flagellums muriner Spermatozoen charakterisiert und welche Faktoren könnten zu einer Änderung der Bewegung führen?
2. Welchen Einfluss hat der Vorgang der Kapazitation durch die dabei stattfindenden Änderungen des intrazellulären Ionenmilieus für die vierdimensionale Bewegung muriner Spermatozoen?
3. Führt die Bindung an das murine Zona pellucida Glykoprotein 2 (ZP2) zu Bewegungsänderungen bei murinen kapazitierten Spermatozoen?
4. Bewirkt die Bindung an ZP2 eine signifikante Änderung der Chiralität der Schwimmtrajektorie?
5. Beeinflusst die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht möglicherweise durch Abgabe von Signalmolekülen die vierdimensionale Bewegung von murinen unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen?

6 Material

6.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Firma	Geräte
B-Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland	Schüttler "Certomat®"
Bandelin, Berlin, Deutschland	Ultraschall-Homogenisator „Sonnoplus HD 2070“
Becton Dickinson + CellQuestPro™, Heidelberg, Deutschland	FACSCalibur FACS Röhren
Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland	PCR-Cycler „T3000 Thermocycler“
BioRad, Hercules, USA	Blotkammer „Mini Trans-Blot® Cell“ Chemilumineszenz-Detektionssystem „ChemiDoc™ Imaging System“ Electrophoresis PowerPac™ Basic Gelelektrophorese-Kammer „Sub-cell® GT“ PAGE-Gelkammer Real-Time PCR-Detektionssystem, „iQ™5“
Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland	Magnetisches Separationsgestell (<i>6-tube magnetic separation rack</i>)
Ehret, Emmerdingen, Deutschland	Sterilbank BioSafe 2
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Heizblock ThermoStat plus Mehrkanalpipette Multipipette plus BioPhotometer (Typ 6131) Pipetten Eppendorf centrifuge 5415D Eppendorf centrifuge 5415R
Göntgen Wägetechnik GmbH, Bottrop, Deutschland	Waage „Galaxy® 400“, OHAUS®
Heraeus, Hanau, Deutschland	Brutschrank „Hera cell 240“
Hirschmann®, Neckartenzlingen, Deutschland	Pipetus®
Imaging Solutions, Ehingen, Deutschland	MotionScope M3-mono fast speed Kamera
Innovatis, Omni life Science, Bremen, Deutschland	Zellzählgerät CASY™-Counter „Model TT“

Intas, Göttingen, Deutschland	UV-Dokumentation „UV Systeme“
ISMATEC®	Peristaltikpumpe Reglo Digital (ISM834C)
Kern, Balingen-Frommern, Deutschland	Analysenwaage (ABS-N/ABJ-NM)
Lab Logistic Group Labware, Meckenheim, Deutschland	Überkopfschüttler LLG uni <i>Rotator</i> 2
Leitz, Leica, Wetzlar, Deutschland	Mikroskop „Labovert FS“
Liebherr, Biberbeach an der Riß, Deutschland	Gefrierschrank (-20°C)
Lyncée tec, Lausanne, Schweiz	Digital Holographisches Mikroskop
Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland	Neubauer-Zählkammer
Medax Nagel GmbH, Neumünster, Deutschland	Wärmeplatte (Typ SP13)
Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Deutschland	Millex®-GV (0,22 µM)
Mettler Toledo, Zürich, Schweiz	pH-Messgerät (SevenCompact™)
Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland	Minitube HAT 50
Molecular Devices, Kalifornien, USA	FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader
Nalgene™, Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland	Kryo 1°C Freezing container
Nikon, Tokio, Japan	Inverses Lichtmikroskop (Diaphot 300) Stereomikroskop (SMZ1270/1270)
NuAire, Minnesota, USA	Sterilbank NU-425-400E
Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland	Wasserbad GFL
Okolab, Pozzuoli, Italien	T-Controller Wärmeplatte
Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	Mikroskop „Olympus CX41“
PHC Europe B.V. Etten-Leur, Niederlande	Brutschrank (MCO-SAC-PE)
Scientific Industries™, Bohemia, USA	VortexGenie 2
Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel	CASA Zählkammer (Counting chamber Makler®)
Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland	Hettich® Rotina 38/38R
Stuart Scientific, Staffordshire. UK	Rotator SB2
Tecan, Männedorf, Schweiz	ELISA Photometer (Sunrise)

Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland	ELISA-Platten (Cliniplate 96 Well) Brutschrank (Hera cell 150i CO ₂ Incubator) TPP™ Filter 99255 (Porengröße 0,22 µm) Heraeus Multifuge 3SR+ Gefrierschrank Forma -86°C ULT Freezer
Thermo Scientific, Vantaa, Finnland	96-Well-Platte (Cliniplate)
Tokai Hit, Bala Cynwyd, USA	Mikroskop-Inkubationssystem
VWR, Radnor, USA	Stickstofftank BSF750
Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Kaltlichtquelle (KL200) Stereomikroskop (Stemi 2000-C)

6.2 Chemikalien, Materialien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien, Materialien und Reagenzien

Firma	Chemikalien/ Materialien/ Reagenzien
AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Acrylamid-(30%)/ Bisacrylamidlösung (37,5:1) DEPC Wasser Glycerin <i>Glycerol anhydrous</i> Glycin Nitrocellulose Transfermembran Schwefelsäure Tricin Triton X-100
Biochrom, Darmstadt, Deutschland	ISF-1 (Iscove's Medium und Ham's F-12 (1:1))
Biotium, Fremont, USA	GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain
Biozym, Oldendorf Deutschland	Agarose
GE Healthcare, Little Chalfont, UK	His Mag Sepharose™ Ni Beads HiTrap™ Protein G HP-Säule Protein G Sepharose™ High Performance Whatman™ Filterpapier
Henry Schein, Dublin, Ohio	Isothesia®
Intervet/MSD, Unterschleissheim, Deutschland	human Chorionic Gonadotropine (hCG) Pregnant mare's serum gonadotropine (PMSG)

InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Zeocin™
Leja Products B.V., GN Nieuw Vennepe, Niederlande	Leja Messkammer
Life Technologies (Gibco), Oberhausen, Deutschland	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>) Fötales Kälberserum (FCS) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml) RPMI 1640 Medium Trypsin/EDTA
Merck, Darmstadt, Deutschland	Ammoniumpersulfat (APS) Chloroform Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) Geneticin (G418) Kaliumchlorid (KCl) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) PonceauS™ Saccharose Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Tween 20
Novagen, Darmstadt, Deutschland	Isopropylthiogalactosid (IPTG)
Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland	Bovines Serumalbumin (BSA)
Qiagen, Hilden, Deutschland	Ni NTA Agarose Polyfect® Transfektionsreagenz
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Ampicillin Calciumchlorid Dialyseschlauch (Porengröße 15,9 mm) Dimethylsulfoxid (DMSO) HEPES LB-Agar LB-Medium Magnesiumchlorid 3-Mercapto-1,2-propandiol Milchpulver Natriumhydroxid (NaOH) Tris-HCl Trypton X-Gal

Sartorius Stedim Lab Ltd., Stonehouse, UK	Vivaspin® Turbo 4 Ultrafiltrationssäulen
Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland	Bromphenolblau Bovine Serumalbumin (BSA) Ethanol Fötale Kälberserum (FCS) Aktivkohle behandelt Glukose Imidazol Isopropanol Natriumbikarbonat Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS) Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄) Pentoxifyllin Sodiumphosphat Sodium Pyruvat Sodium DL-Laktat Lösung Tetramethylethyldiamin (TEMED)
World Precision Instruments, Friedberg, Deutschland	FlouroDish™

6.3 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Komponenten
Anodenpuffer (pH 8,9)	0,2 M Tris
Bindepuffer (pH 7,0)	20 mM Sodiumphosphat
Bindepuffer (pH 7,5)	100 mM Na ₃ PO ₄ (pH 8), 2,5 M NaCl, 150 mM Imidazol (pH 7)
Blockierlösungen	- 5% BSA in TBST - 2,5% BSA in TBST
Blotpuffer	133 mM Glycin ; 12 mM Tris (pH 8,4)
CASYton (5 l; pH 7,3-7,4)	0,68 M NaCl, 6,5 mM EDTA, 27 mM KCl, 7,9 mM NaH ₂ PO ₄ (Monohydrat), 77 mM Na ₂ HPO ₄ (Heptahydrat), 35,7 mM NaF
dNTPs	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DNA-Ladepuffer (10x)	10 % (w/v) SDS; Glycerin; Bromphenolblau; 0,5 M EDTA

Elutionspuffer (pH 2,7)	0,1 M Glycin-HCL
Elutionspuffer (pH 7,2)	20 mM Na ₃ PO ₄ (pH 8), 500 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 7)
FACS-Puffer	20 ml DPBS, 10 ml RPMI, 3% FCS
Gelpuffer (pH 8,45)	0,3% SDS; 3 M Tris-Hcl
HEPES-Saline Puffer (HS) (pH 7,4)	135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 20 mM Hepes, 5 mM Glucose, 10 mM DL-Laktat, 10 mM Pyruvat
HEPES-Saline- Bikarbonat Puffer (HSB) (pH 7,4)	135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 20 mM Hepes, 5 mM Glucose, 10 mM DL-Laktat, 10 mM Pyruvat, 15 mM NaHCO ₃ ⁻
Kapazitationspuffer (pH 7,4)	135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 20 mM Hepes, 5 mM Glucose, 10 mM DL-Laktat, 10 mM Pyruvat, 15 mM NaHCO ₃ ⁻ , 5% BSA, 0,3 mM Pentoxifyllin
Kathodenpuffer (pH 8,3)	0,1 M Tricin; 0,1% SDS; 0,1 M Tris-HCl
Laemmli-Puffer	500 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% (v/v) Glycerol, 15% (w/v) SDS, 0,125 % Bromphenolblau
Magnesiumsalzlösung (2 M)	1 M MgCl ₂ ; 1 M MgSO ₄
Sammelgel	0,25 ml Acrylamid; 0,39 ml Gelpuffer; 0,9 ml VE-Wasser; 12,5 µl APS; 1,25 µl Temed
2X Sample-Buffer	130 mM Tris Hcl (pH 6,8); 6 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) 3-Mercapto-1,2-propandiol; 10 % (w/v) Glycerin
2X Sample-Buffer (blue)	130 mM Tris Hcl (pH 6,8); 6 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) 3-Mercapto-1,2-propandiol; 10 % (w/v) Glycerin; (+0,05 % (w/v) Bromphenolblau)
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt; 0,6 g/l NaCl; 0,2 g/l KCL
SOC-Komplexmedium	1 L SOB-Medium; je 10 ml/l 2M Glukoselösung + 2M Magnesiumsalzlösung
STET-Puffer	10 mM Tris (pH 8,0); 50 mM EDTA (pH 8,0); 0,5% (v/v) Triton X-100; 8% (v/v) Saccharose;
5x TBE (pH 8,4)	54 g/l Tris; 27,5 g/l Borsäure; 2,9 g/l EDTA
10x TBS (pH 7,6)	24,2 g/l Tris-HCl; 80,1 g/l NaCl
TBS-T	100 ml TBS (pH 7,6); 1 ml Tween 20; ad 1 L mit VE-Wasser
Trenngel (9%)	1,5 ml Acrylamid; 1,66 ml Gelpuffer; 1,33 ml VE-Wasser; 0,5 ml Glycerin; 25 µl APS; 2,5 µl Temed
Waschpuffer (pH 7,5)	20 mM Na ₃ PO ₄ (pH 8), 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol (pH 7)

6.4 Kits

Kit	Firma
Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs, Ipswich, USA
NucleoBond® PC100 DNA, RNA and protein purification	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
peqGOLD RNA Pure™	VWR, Radnor, USA
pGEM®-T Vector Systems	Promega, Madison, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Life Technologies (Gibco), Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
USB® VeriQuest® SYBR® Green qPCR Master Mix (2X)	Affymetric, Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland

6.5 Größenstandards

Der Molekulargewichtsstandard *GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder* der Firma Thermo Scientific wurde für die Auswertung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente verwendet (Abbildung 12).

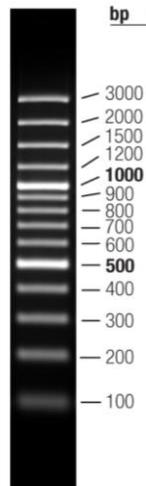


Abbildung 12: 100 bp Plus DNA Leiter (Thermo Scientific)

Das Molekulargewicht von Proteinen wurde mittels des *Protein Markers VI (10-245) prestained* der Firma AppliChem bestimmt (Abbildung 13).

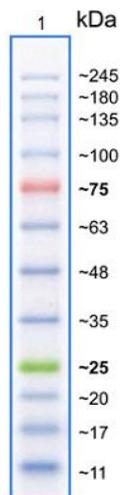


Abbildung 13: Protein Marker VI (10-245) prestained (AppliChem)

6.6 Enzyme

Enzym	Firma
Alkalische Phosphatase FastAP	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
DNAse I (amplification grade)	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Restriktionsendonuklease FastDigest EcoRV FastDigest NheI	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA

6.7 Antikörper

Tabelle 3: Primärantikörper

Spezifität	Organismus	Typ	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
α - β -Aktin	Maus	Monoclonal	1:20.000	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
α -N-terminal ZP2-Protein	Ratte	Monoclonal	1:1000	Eigenherstellung mittels der Zelllinie CRL-2463™ (ATCC®, Manassas, USA)
α -CD34	Ratte	Monoclonal	1:200	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland (Klon MEC14.7)
α -p-Tyr	Maus	Monoclonal	1:1000	Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Deutschland (Klon 4G10)

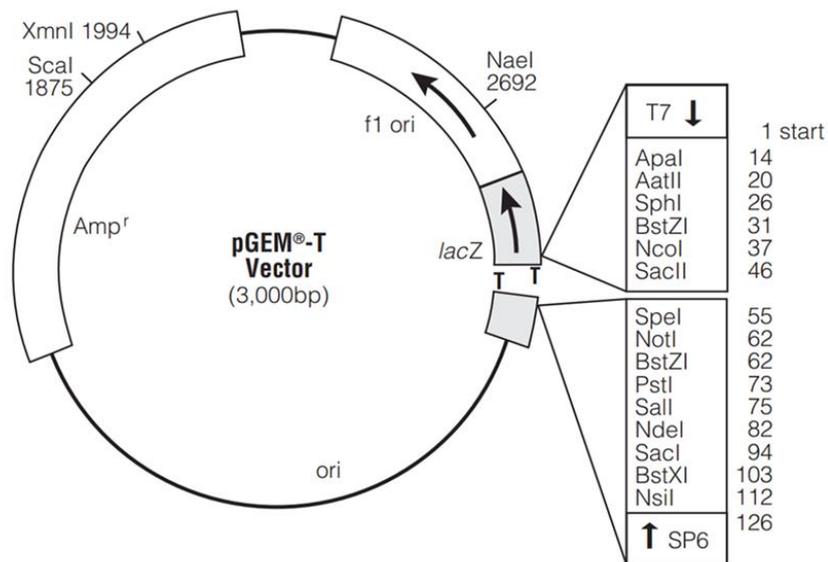
Tabelle 4: Sekundärantikörper

Spezifität	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Ziege- α -Ratte	Meerrettichperoxidase	1:10.000	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
Ziege- α -Maus	FITC	1:50	Jackson Immuno Research, London, England
Ziege- α -Hase	FITC	1:50	Jackson Immuno Research, London, England

6.8 Plasmide

6.8.1 pGEM[®]-T Vektor

In dieser Arbeit wurde während der Klonierung der linearisierte pGEM[®]-T Vektor (Promega) als Zwischenvektor verwendet (Abbildung 14). Der pGEM[®]-T Vektor besitzt 3'-T-Überhänge, die sich an die 3'-A-Überhänge des Inserts anlagern und so die Ligationseffizienz erhöhen. Zusätzlich enthält der Vektor ein Resistenzgen gegen Ampicillin und das *LacZ*-Gen, welches für die Blau-Weiß-Selektion benötigt wird.

Abbildung 14: pGEM[®]-T Vektorkarte (Promega)

6.8.2 pFUSE-hIgG1-Fc2 Vektor

Der Expressionsvektor pFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen) wurde für die Expression des zu untersuchenden murinen Zona pellucida Proteins 2 (ZP2) in der Zelllinie HEK239T verwendet (Abbildung 15). Die verstärkte Expression wird durch den im Expressionsvektor enthaltenen SV40-Promotor gewährleistet. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte über eine ZeocinTM-Resistenz. Die im Vektor enthaltene IL-2 Sequenz diente der Sekretion des Proteins aus den Zellen in den Zellkulturüberstand.

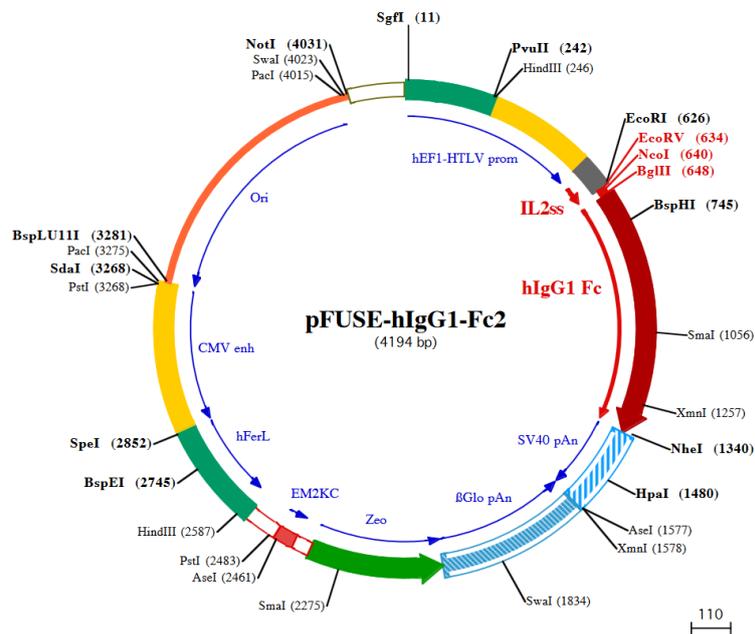


Abbildung 15: pFUSE Vektorkarte (Invivogen)

Die Tabelle 5 zeigt das klonierte pFUSE-Plasmid.

Tabelle 5: pFUSE-Plasmid

Plasmid	Größe	Schnittstellen	Beschreibung	Aminosäuren
pFUSE_muZP2	497 bp	<i>EcoRV / NheI</i>	Basen 187-684 der Wildtypsequenz von muZP2	35-149

6.9 Zelllinien und Kulturmedien

6.9.1 CRL-2463™

CRL-2463™ (ATCC®) ist eine Hybridomazelllinie, die einen gegen das murine Zona pellucida Glykoprotein 2 (Aminosäure 114-129) spezifischen Antikörper (IE-3) produziert. Die Generierung der Zelllinie erfolgte nach dem Prinzip der Hybridoma-Technik (Köhler und Milstein, 1975). Dabei wurden Milzzellen mit Sp2/0 murinen Myelomazellen fusioniert. CRL-2463™ Zellen wurden bei der Firma *American Type Culture Collection* (ATCC®/LGC Standards GmbH) erworben und im *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) der Firma Gibco® (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Das DMEM wurde mit folgenden Zusätzen versetzt: 10 mM HEPES, 0.15 mg/ml Oxaloacetat, 0.05 mg/ml Pyruvat, 0.0082 mg/ml bovines Insulin and 0.05 mM 2-Mercaptoethanol, 20% hitze-inaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) (Life Technologies (Gibco)). Nach einer Adaptationszeit von einer Woche in dem vom Hersteller empfohlenen, oben beschriebenen DMEM-Medium, wurden die Zellen in *Iscove's Medium und Ham's F-12-* (ISF1)-Medium (Biochrom) überführt. Dabei handelt es sich um ein serumfreies Medium, das für Hybridomakulturen standardmäßig benutzt wird. Das serumfreie Medium diente dazu, IgG-Verunreinigungen zu verhindern, wodurch die Spezifität des Antikörpers gewährleistet wurde. Des Weiteren wurde dadurch eine genauere Proteinbestimmung des Antikörpers ermöglicht.

6.9.2 HEK293T Zellen

Die HEK293T Zelllinie ist eine humane, epitheliale, embryonale Nierenzelllinie, die das SV40 T-Antigen enthält. Dadurch ist sie in der Lage Vektoren zu replizieren, die die SV40 Replikationsregion besitzen. HEK293T Zellen wurden bei der Firma *American Type Culture Collection* (ATCC®/LGC Standards GmbH) erworben und im DMEM der Firma Gibco® (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei einer Passage zwischen 20 und 50. Das DMEM wurde zusätzlich mit 10% FKS und mit 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung der Firma Gibco versetzt. Die Selektion von transfizierten HEK293T Zellen erfolgte durch die Verwendung von 350 µg/ml Zeocin™ (Invivogen).

6.10 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde für die Amplifikation von Plasmid-DNA und die Blau-Weiß-Selektion der chemisch-kompetente *E.coli* Stamm DH5 α verwendet. Die Induktion der Kompetenz mittels der Rubidium-Chlorid-Methode nach Kushner (Kushner, 1978) erfolgte bereits in Vorarbeiten. Die Bakterienzellen wurden auf LB-Agar (Roth) Platten oder in LB-Medium (Roth) kultiviert. Durch die Verwendung von Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) (Roth) oder ZeocinTM (25 $\mu\text{g/ml}$) (Invivogen), konnten die jeweiligen Bakterienstämme selektioniert werden.

6.11 Oligonukleotide

In der Tabelle 6 sind die für die Herstellung der pFUSE-hlgG1-Fc2-Expressionsvektoren verwendeten Oligonukleotide und die Oligonukleotide für die Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR dargestellt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen innerhalb der Oligonukleotidsequenz sind unterstrichen.

Tabelle 6: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
5'pFUSE_muZP2_EcoRV	5'- <u>GATATCC</u> GTAAGCCTTCCTCAGTCCGA-3'
3'pFUSE_muZP2_NheI	5'- <u>GCTAGCT</u> TAATGGTGATGGTGATGGTG-3'
5'muZP2_qRT-Primer	5'-CTTCCTCAGTCCGAGAATCCTGC-3'
3'muZP2_qRT-Primer	5'-CGTAAGGGAACTTCAGGACGAACC-3'

6.12 Software

Software	Firma/URL
CellQuestPro TM Version 6	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FastPCR	PrimerDigital, Helsinki, Finnland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
IgorPro TM Version 6.36	Wavemetrics, Lake Oswego OR, USA
ImageJ 1.50i	National Institute of Health, Washington DC., USA

Image Lab™ Touch Software Version 2.3.0.07	BioRad, Hercules, USA
Image Reader LAS-3000	Fujifilm, Tokio, Japan
Koala Version 6	Lyncée Tec., Lausanne, Schweiz
MedeaLab CASA (Version 6.1.0.1.)	Medical Technology GmbH, Erlangen, Deutschland
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmon, USA
MotionStudio 64 Software	Imaging Solutions, Ehingen, Deutschland
NCBI (National Center Of Biotechnology Information)	www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez , Bethesda, USA
Spyder (Python 2.7)	Öffentlich zugänglich
SoftMax Pro 7.0.3	Molecular Devices, Kalifornien, USA
Universal ProbeLibrary	Roche Molecular Systems, Inc., Basel, Schweiz

6.13 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 4-6 Wochen alte weibliche und 22-24 g schwere männliche NMRI Mäuse (Charles River) verwendet. Die Versuchstiere wurden im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 10\%$) in pathogenfreier Umgebung mit reguliertem Tag-/Nachtrhythmus (12 h/12 h) gehalten. Unbegrenzter Zugang zu Nahrung und Wasser war stets gegeben. Es wurden ausschließlich der Richtlinien entsprechende autoklavierte Käfige mit separatem Belüftungssystem verwendet. Alle durchgeführten Eingriffe wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen der Bundesrepublik Deutschland sowie des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführt (LANUV, AZ84-2.4.17.A133).

7 Methoden

7.1 Keimzellen

7.1.1 Keimzellpräparation

7.1.1.1 Murine Spermatozoenpräparation

(Wennemuth et al., 2000; Westenbroek und Babcock, 1999)

Die Gewinnung muriner Spermatozoen erfolgte nach dem sogenannten „swim-out“ Verfahren. Dafür wurden die NMRI Mäuse (Charles River Labs) zunächst mittels Isofluran (Isothesia[®], Henry Schein) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Der Ductus epididymidis und der Ductus deferens wurden präpariert, in HS-Puffer gewaschen und in eine Petrischale mit HSB-Puffer überführt. Der Ductus deferens wurde ausgestrichen und der Ductus epididymidis mehrmals mit einer Schere eingeschnitten. Das Ausschwimmen der Spermatozoen erfolgte während einer 15-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurde die Spermatozoensuspension in zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 1.800 rpm für 5 Min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Das Pellet wurde in 1 ml HS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung in einem 50 ml Probengefäß gelagert.

7.1.1.2 Humane Spermatozoenpräparation

Die Gewinnung humaner Spermatozoen aus dem Ejakulat erfolgte nach dem sogenannten „swim-up“ Verfahren. Bei diesem Verfahren wird 1 ml Ejakulat unter 4 ml HS-Puffer pipettiert. Dafür wurde eine 1000 µl Gilson-Pipette verwendet, bei der die Pipettenspitze mit einer Schere entfernt wurde. Diese Methode erleichtert das Pipettieren des viskösen Ejakulats und reduziert die Scherkräfte, die bei dem Pipettiervorgang auf die Spermatozoen wirken. Während einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank, schwammen die Spermatozoen aus der Ejakulatsschicht in den HS-Puffer. Durch die Abnahme des HS-Pufferhaltigen Überstands konnten die humanen Spermatozoen aus dem Ejakulat gewonnen werden. Bis zur Durchführung des Versuchs wurde die Probe bei RT gelagert.

7.1.1.3 Zellzählung

Die Zellkonzentration der Spermatozoensuspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer (Marienfeld) bestimmt. Dazu wurden 10 μl der Spermatozoensuspension in die Zählkammer pipettiert und die motilen Spermatozoen aus vier Großquadraten (Eckquadraten) gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert bestimmt und mit dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche (1 mm^2) und definierter Kammerhöhe (0,1 mm) multipliziert. Das Ergebnis ergibt die Zellzahl pro Mikroliter.

7.1.1.4 Superovulation und Oozytenpräparation

Der Begriff der Superovulation bezeichnet die Erhöhung der Ausbeute an Oozyten mittels Applikation von Hormonpräparaten. Den 6-8 Wochen alten murinen NMRI Weibchen wurden 10 Injektionseinheiten (IE) PMSG („Pregnant mare's serum gonadotropine“) intraperitoneal (i.p.) injiziert. PMSG dient der Stimulation der Follikelreifung. Die Induktion der Ovulation erfolgte nach 48 h durch die Injektion von 10 IE hCG („human Chorionic Gonadotropine“). Zirka 13 h nach hCG-Injektion erfolgte die Ovulation, die gekennzeichnet ist durch die Ausbildung einer im Eileiter befindlichen Ampulle. In der Ampulle liegen die Kumulus-Oozytenkomplexe (KOK). Für die Oozytenpräparation wurden die weiblichen NMRI Mäuse 15 h nach hCG-Injektion mit Isofluran (Isothesia[®], Henry Schein) betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Zunächst wurden die Ovidukte unter einem Binokular aus den Mäusen präpariert und in 1 ml vorgewärmtes Isolationsmedium (M2 Medium) überführt. Die Ampulle wurde anschließend aufgerissen, sodass die KOKs freigesetzt wurden. Die Kumuluszellen wurden durch Inkubation der KOKs für 3-5 Min in einem Tropfen M2 Medium mit Hyaluronidase (10 mg/ml) verdaut. Anschließend wurden die Oozyten in mehreren Tropfen M2 Medium gewaschen. Die gesamte Präparation erfolgte auf einer 37°C Wärmeplatte. Für die zellbiologischen Messungen wurden die Oozyten mit oder ohne Kumuluszellschicht in HS-Puffer überführt (Tierversuchsantrag Nr. 84-02.04.2017.A133)

7.1.2 Kapazitation

Mit dem Ziel die Kapazitation und Hyperaktivierung muriner und humaner Spermatozoen *in vitro* zu induzieren, wurden die Spermatozoen in ein 1,5 ml

Eppendorfgefäß überführt und für 5 Min bei 1.800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Spermatozoenpellet wurde in Kapazitationspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Spermatozoensuspension in ein 50 ml Probengefäß überführt. Das Endvolumen betrug 3 ml. Um den Gasaustausch während der einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank zu gewährleisten, wurde der Deckel des 50 ml Probengefäß locker angeschraubt und durchlöchert. Nach Waschen der Zellen durch Zentrifugation für 2,5 min bei 1.800 rpm und resuspendieren in 1 ml HS-Puffer, wurden die Spermatozoen in ein 50 ml Probengefäß überführt und bis zur Durchführung der Motilitätsanalysen mittels DHM bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

7.1.3 Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

Bei der *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) handelt es sich um eine objektive Methode, um verschiedene Spermatozoenzellcharakteristika zu untersuchen. Mittels CASA kann die Zellkonzentration, die Bewegung, die Geschwindigkeit und die Morphologie von Spermatozoenzellen ermittelt und als wichtige Parameter für die Beurteilung der Spermatozoenqualität erhoben werden. CASA ist für humane Spermatozoen eine standardisierte und routinemäßig eingesetzte Methode in der andrologischen Diagnostik. Die Tabelle 7 zeigt die Klassifizierung der Spermatozoenmotilität nach den WHO Kriterien 2010 (Gottardo und Prof. Dr. Kliesch, 2011; WHO, 2010) und die ursprüngliche Klassifikation nach den WHO-Kriterien der 4. Edition von 1999 (WHO, 1999).

Tabelle 7: WHO Klassifizierung (2010) und WHO Klassifizierung (1999 „4th“ Edition)

WHO (2010)	WHO (1999, „4th“ Edition)	WHO Kriterien
Progressiv	a	Schnell linear progressive Spermatozoen ($\geq 25 \mu\text{m/s}$ bei 37°C)
	b	Langsam progressive Spermatozoen ($< 20 \mu\text{m/s}$, $\geq 5 \mu\text{m/s}$)
Nicht-progressiv	c	Nicht progressive (ortsständige) Spermatozoen ($< 5 \mu\text{m/s}$)
Immotil	d	Immotile Spermatozoen

Für die Analyse von murinen Spermatozoen wurden die CASA Softwareeinstellungen hinsichtlich einer anderen morphologischen Gestalt und Größe der zu untersuchenden Spermatozoen modifiziert. Die nach der Präparation in HS-Puffer vorliegenden Spermatozoen wurden in 100 µl HS/BSA-Puffer überführt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Das BSA diente der Sättigung von Glykoproteinen an der Zelloberfläche, sodass ein Adhärenzen der Spermatozoen am Glasboden der Zählkammer verhindert wurde. Für die Messung wurden 20 µl der Spermatozoensuspension in die CASA Zählkammer (Sefi-Medical Instruments) übertragen. Insgesamt wurden 200 Spermatozoen aus zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern mit einem 20x Objektiv analysiert. Die Messung erfolgte mit der MedeaLab CASA Software (Version 6.1.0.1). Durch die Verwendung eines Heizsystems (Minitube HT 50) konnte die Messung bei konstanten 37°C durchgeführt werden. Anhand der ermittelten Daten wurden die Spermatozoen den unterschiedlichen WHO Klassen (nach WHO 1999, „4th“ Edition) wie in der Tabelle 7 gezeigt zugeordnet und prozentual in einem Spermogramm dargestellt.

7.1.4 Schlagfrequenzanalyse

Modifiziert nach (Wennemuth et al., 2003b)

Der Begriff Schlagfrequenz definiert die Anzahl der Flagellenschläge eines Spermatozoons pro Zeit und ermöglicht die Untersuchung der Spermatozoenmotilität auf Einzelzellniveau. Während Spermatozoen über Glykoproteine in der Plasmamembran des Spermatozoenkopfs an Glasoberflächen adhären, sind ihre Flagellen freibeweglich. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Schlagfrequenzanalyse (Wennemuth et al., 2003b) die erfolgreiche Induktion der Kapazitation nachgewiesen. Dafür wurden 10 µl der jeweiligen Spermatozoensuspension in die Mitte einer Flourodish™ (World Precision Instruments) Schale pipettiert. Die Flourodish™ Schalen besitzen einen Glasboden. Nach einer Inkubation von 3-5 Min, in der die Spermatozoen an die Glasoberfläche adhären, wurden die Zellen vorsichtig mit 3 ml HS-Puffer umspült. Die Messung erfolgte an einem inversen Lichtmikroskop (Nikon) unter Verwendung des 20x Objektivs. Für die Bildaufnahme (1000 x 400 Pixel) wurde eine MotionScope M3-mono fast speed Kamera (Imaging Solutions) verwendet. Die Aufnahme erfolgte bei 300 Hz. Die verwendete MotionStudio 64 Software (Imaging Solutions) speichert die Bildabfolge als .Tiff-Dateien ab, sodass in der Nachbearbeitung mit Hilfe von ImageJ

(Version 1.50i, National Institute of Health) einzelne Spermatozoen ausgewählt, ausgeschnitten und kontrastiert werden konnten. In der Abbildung 16A ist eine Zeitserie aus drei Einzelbildern dargestellt, die den periodischen Verlauf eines Schlagzyklus widerspiegeln. Für die Schlagfrequenzanalyse wurde ein Überlagerungsbild aus zwei Einzelbildern mittels ImageJ (Version 1.50i) erzeugt. Die zwei Einzelbilder zeigen den minimalen und den maximalen Schwanzausschlag eines Schlagzyklus. Die Schlagfrequenzanalyse erfolgte mittels einer für das Programm IgorPro™ (Version 6.36, Wavemetrics) geschriebenen halbautomatischen Analysesoftware (Wennemuth et al., 2003b). Dafür wurde das Überlagerungsbild zunächst geladen und ausgerichtet (Abbildung 16B). Im Anschluss wurde die Lage des Flagellums entlang einer Kontrolllinie für die 300 Einzelbilder analysiert. Diese Analyse basierte auf den Kontrastunterschieden zwischen dem Hintergrund und dem Flagellum. Für die Berechnung der Schlagfrequenz wurde aus den zeitlichen Signalen mittels Fast-Fourier-Transformation ein Frequenzspektrum mit sinusförmigem Verlauf erstellt (Abbildung 16C). Die Frequenz wurde in Hz berechnet.

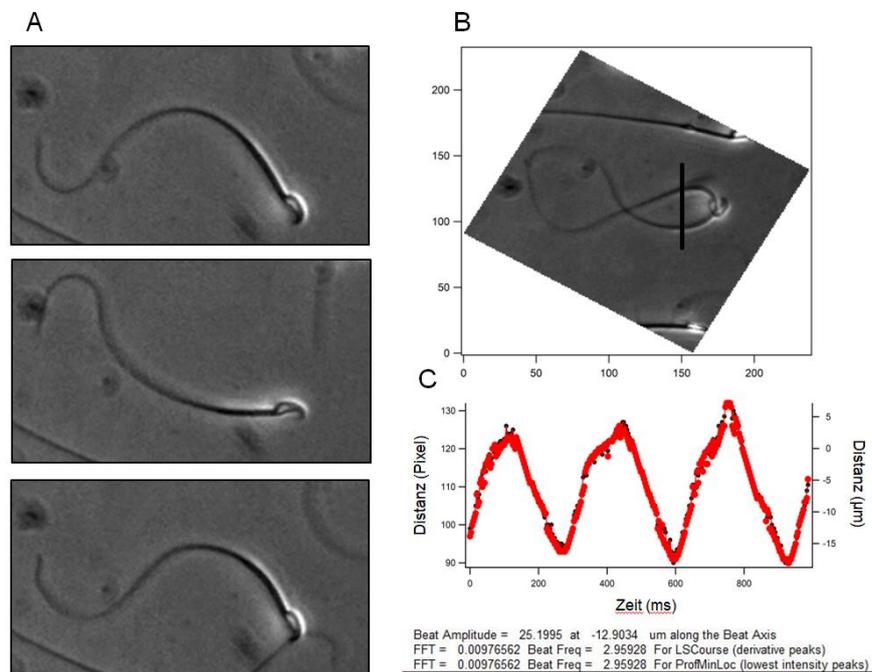


Abbildung 16: Methode der Schlagfrequenzanalyse

A. Die Zeitserie von drei Einzelbildern zeigt repräsentativ den periodischen Verlauf eines Schlagzyklus. Die Aufnahmen wurden mit einer MotionScope M3-mono fast speed Kamera bei 300 Hz erstellt. In B ist das Überlagerungsbild des minimalen und maximalen Flagellenausschlags eines Bewegungszyklus nach Laden und Ausrichten in der IgorPro™ Software (Version 6.36) gezeigt. C zeigt die Fast-Fourier-Transformation, bei der aus den zeitlichen Signalen ein Frequenzspektrum mit sinusförmigem Verlauf erzeugt wurde und sowohl die Schlagfrequenz, als auch die -amplitude berechnet werden konnte.

Neben der Schlagfrequenz berechnet eine in IgorPro™ (Version 6.36, Wavemetrics) programmierter Algorithmus (Wennemuth et al., 2003b) die Amplitude des Flagellenschlags (Abbildung 16C). Die graphische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 7 (Software, Inc.).

7.1.5 Bindung muriner kapazitierter Spermatozoen an muZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads

Zum Nachweis der spezifischen Bindung kapazitierter Spermatozoen an den N-Terminus des muZP2 Glykoproteins, wurden 1×10^6 kapazitierte murine Spermatozoen mit unbeladenen Sepharosebeads (GE Healthcare) oder mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads (GE Healthcare) in Kapazitationspuffer (500 μ l) für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren der Bead-Spermatozoen-Suspensionen wurden unspezifische Bindungen gelöst. Anschließend wurden die Beads mittels eines Magneten (Cell Signaling Technologies) aus der Spermatozoensuspension isoliert. Im Anschluss wurden die Beads in 500 μ l frischen Kapazitationspuffer resuspendiert. Die spezifische Bindung der kapazitierten Spermatozoen an die mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads im Vergleich zu den unbeladenen Sepharosebeads wurde mikroskopisch (Stereomikroskop Typ SMZ1270/1270, Nikon) überprüft.

7.2 DNA-Techniken

7.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Boiling Präparation

Modifiziert nach (Birnboim und Doly, 1979)

Die Boiling Präparation dient der Isolation von Plasmid-DNA aus bakteriellen Zellen. Sie beruht auf dem Prinzip der selektiven alkalinen Denaturierung von chromosomaler DNA. Hierfür wurden 2 ml einer Ampicillin-haltigen LB-Flüssigkultur mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Jeweils 1 ml der Flüssigkultur wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 5 Min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l STET-Puffer (pH 8) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 10 μ l Lysozym während einer 10-minütigen Inkubation auf

Eis. Um Proteine sowie chromosomale DNA zu denaturieren, erfolgte anschließend eine Inkubation für 45 s bei 99°C. Zur Entfernung von Zellresten wurden die Proben nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis zentrifugiert (15 Min, 13.200 rpm, 4°C) und der proteinhaltige Überstand in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mittels der Zugabe von 200 µl Isopropanol und einem Zentrifugationsschritt (15 Min, 13.200 rpm, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 150 µl 70%-igem Ethanol und einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 Min, 13.200 rpm, 4°C) gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das DNA-Pellet für 10 Min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach Größe in 30-80 µl S1-Puffer (+RNase) resuspendiert. Um die in der Probe befindliche RNA abzubauen, wurde die Lösung für 10 Min bei 37°C inkubiert. Zum Schluss erfolgte eine Inkubation für 5 Min bei 50°C, um die DNA zu lösen.

7.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Ionenaustauschchromatografie

Die Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mittels einer Ionenaustauschchromatografie, einer spezifischen Form der Flüssig-Fest-Chromatografie. Die Methode beruht im Allgemeinen auf der reversiblen Ausbildung heteropolarer Bindungen zwischen den an die Matrix des Ionenaustauschers gebundenen Festionen und den mobilen Gegenionen. In dieser Arbeit wurde das „Nucleo Bond® PC100 plasmid DNA Kit“ (Macherey-Nagel) unter Herstellerangaben verwendet. Hierbei bindet das negativ geladene DNA-Rückgrat an die Kieselgelmatrix der Säule (NucleoBond®-AX100). Nach mehreren Waschschritten, die eine hohe Reinheit der DNA gewährleisten, wurde die DNA mittels eines spezifischen Elutionspuffers von der Säule eluiert. Dies basierte auf der Auflösung der ionischen Wechselwirkung zwischen der DNA und der Kieselgelmatrix. Für die Isolierung wurde 50 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Am Folgetag wurde die über Nacht Kultur zunächst für 15 Min bei 5.500 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml S1-Puffer (+ RNase A) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Hinzufügen von 4 ml Natriumhydroxid- und SDS-haltigem S2-Puffer. Dabei wurde sowohl chromosomale, als auch Plasmid-DNA und Proteine denaturiert. Durch die Zugabe von 4 ml Kaliumacetat-haltigem S3 Puffer wurde das Lysat neutralisiert. Die Lösung wurde solange invertiert bis eine homogene Suspension entstand. Während die Probe 5 Min auf Eis inkubierte, bildete sich ein weißes

Präzipitat bestehend aus chromosomaler DNA und denaturierten Proteinen. Die Plasmid-DNA hingegen renaturierte und blieb in der Lösung. Nach der alkalischen Lyse wurde das Lysat filtriert, um das entstandene Präzipitat bestehend aus Zellbestandteilen, denaturierten Proteinen und denaturierter genomischer DNA zu entfernen. Die NucleoBond® AX 100 Säule wurde durch Hinzugabe von 2,5 ml N2 Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das gefilterte Lysat auf die Kieselgelsäule aufgetragen. Bevor die Elution der Plasmid-DNA mittels 5 ml N5 Puffer erfolgte, wurden die Säulen zweimal mit 10 ml N3 Puffer gewaschen. Dies diente der Entfernung unspezifisch gebundener Moleküle. Der zur Elution verwendete N5 Puffer enthält eine hohe Salzkonzentration und erhöht den pH-Wert. Dadurch wurden die positiven Ladungen der Säulenmatrix neutralisiert, wodurch die negativ geladene Plasmid-DNA ihre Bindung verlor und freigesetzt wurde. Die DNA wurde durch Hinzufügen von 3,5 ml Isopropanol (RT) und einem Zentrifugationsschritt bei 4.600 rpm für 60 Min und 4°C präzipitiert. Das DNA Pellet wurde mit 2 ml 70%-igem Ethanol (RT) (4.600 rpm und 30 Min) gewaschen und anschließend für 5-10 Min luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet je nach Größe in 50-200 µl ddH₂O resuspendiert.

7.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

(Maniatis, 1989)

Die Photometrie wird zur Konzentrationsbestimmung gelöster Substanzen benutzt. Das Prinzip beruht auf der Messung der Lichtabsorption dieser Substanzen. Während Nukleinsäuren das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, absorbieren Proteine das Licht bei 280 nm. Die Extinktion der Lösung kann mittels eines Photometers gemessen und die optische Dichte (OD) bestimmt werden. Die OD von 1,0 für doppelsträngige DNA (dsDNA) entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Dagegen entspricht eine OD von 1 für RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Um die Reinheit der Probe zu bestimmen, wurde der Quotient aus der OD bei 260 nm und 280 nm gebildet. Bei reiner DNA sollte der Quotient bei 1,8 liegen. Ein Wert unter 1,8 für DNA zeigt eine Kontamination mit Proteinen oder Lösungsmitteln an, während ein Wert über 1,8 eine mögliche RNA-Verunreinigung angibt. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels eines BioPhotometers (Typ 6131) der Firma Eppendorf.

7.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „Polymerase-Chain-Reaction“) ist eine zyklische *in-vitro* Methode, um spezifisch DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dabei wird ein Abschnitt dsDNA von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase vervielfältigt. Wegen der hohen Temperaturbelastung wird die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Jeder PCR-Zyklus besteht aus jeweils drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA auf 95°C erhitzt, sodass die dsDNA denaturiert und zwei Einzelstränge vorliegen. Anschließend lagern sich spezifische DNA-Oligonukleotide (Primer) um die zu amplifizierende Stelle des DNA-Einzelstranges (ssDNA) an (Annealing). Das Annealing erfolgte in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide bei einer Temperatur zwischen 56°C und 60°C. Die Primer wurden so gewählt, dass sie komplementär zu den Basen eines Einzelstranges sind und sequenzspezifisch binden können. In der letzten Phase, der Elongationsphase, synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase komplementäre Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende des Primers. Die Elongation des DNA-Strangs erfolgte bei 72°C. In dieser Arbeit wurde die „GoTaq® DNA-Polymerase“ (Promega) verwendet. Da es sich bei der PCR um ein zyklisches Verfahren handelt, kann eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erzielt werden. Für die Durchführung der PCR wurde der T3000 Thermocycler der Firma Biometra verwendet. In der Tabelle 8 ist das Pipettierschema eines Standard PCR-Ansatzes dargestellt. Zum Ausschluss einer möglichen Kontamination mit Fremd-DNA wurde bei jeder PCR eine Kontrolle ohne DNA-Matrize mitgeführt.

Tabelle 8: Pipettierschema eines Standard PCR-Ansatzes

Komponenten	Volumen [μ l]	Endkonzentration
5x Reaktionspuffer	10	1x
dNTPs	1	Je 100 mM
5'-Primer	1	0,5 μ M
3'-Primer	1	0,5 μ M
GoTaq [®] DNA-Polymerase	0,5	2,5 U
Matrizen-DNA	X	0,1–0,5 μ g
PCR-H ₂ O	ad. 50 μ l	

Tabelle 9 zeigt das PCR-Programm, wobei die Annealing-Temperatur je nach Schmelztemperatur der verwendeten Primer variierte.

Tabelle 9: Schema eines PCR-Standardprogramms

Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	2
Denaturierung	95	0,5
Annealing	52-62	0,75
Elongation	72	2
Finale Elongation	72	5

} x 40 Zyklen

Die erfolgreiche Amplifikation des PCR-Fragments wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

7.2.5 Agarosegelelektrophorese

(Chaconas und van de Sande, 1980; Gordon et al., 1949)

Die Agarosegelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren, um Nukleinsäurestränge (RNA oder DNA) nach ihrer jeweiligen Größe zu trennen und durch den Vergleich mit einem DNA Standard zu bestimmen. Die im neutralen pH negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA wandern durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von der Anode zur Kathode. Die Auftrennung nach der Größe erfolgt dadurch, dass das Agarosegel wie eine Siebstruktur aufgebaut ist, sodass kleinere DNA-Fragmente schneller zur Kathode wandern als größere. Die Trennschärfe wird durch die Agarosekonzentration im Gel, die Stärke der anliegenden Spannung, sowie der Dauer der Elektrophorese beeinflusst. In dieser Arbeit wurden 2%-ige Agarosegele verwendet. Dafür wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Um später die DNA im UV-Licht zu visualisieren, wurde ein roter, nicht toxischer Fluoreszenzfarbstoff (GelRed™) der Firma Biotium im Verhältnis von 1:20.000 zur Agaroselösung hinzugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA und ändert durch die Wechselwirkung mit dem π -Elektronensystem der Basenpaare ihr Fluoreszenzspektrum. Anschließend wurde die noch flüssige Agarose in eine Gelkammer gefüllt und ein Probenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde es entweder bei 4°C für maximal drei Tage gelagert oder in eine mit TBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt. Bevor nun die DNA-Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurden sie 1:10 mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Der DNA-Ladepuffer enthielt Glycerol, sodass die DNA in die Geltaschen sank. Der blaue Farbstoff des Ladepuffers diente als Lauffront. Neben den Proben wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Anschließend wurde die Spannung von 100 V für ca. 60 Min angelegt. Mittels eines UV-Transilluminators konnten die Banden bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und falls nötig mithilfe eines Skalpellens ausgeschnitten werden.

7.2.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

Für die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde das „Monarch® DNA Gel Extraction Kit“ (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Die Extraktion beruht auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatografie. Zunächst wurde das Gelfragment

mit einem Skalpell herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, gewogen und das entsprechende vierfache Volumen an Auflösungspuffer hinzugegeben. Durch Erwärmen (37°C) der Probe löste sich das Gelstück auf und die DNA-enhaltene Lösung konnte auf eine Kieselgelsäule aufgetragen werden, wobei die Bindung der DNA an die Säule auf dem Prinzip ionischer Wechselwirkungen beruht. Um unspezifisch gebundene Moleküle zu entfernen, erfolgten mehrere Waschschriffe. Anschließend wurde die DNA von der Säule eluiert.

7.2.7 Restriktion von Plasmid-DNA

(Maniatis, 1989)

Restriktionsendonukleasen dienen in Mikroorganismen der Phagenabwehr, indem sie fremde DNA am fehlenden Methylierungsmuster erkennen und hydrolysieren. Man unterscheidet in der Molekularbiologie vier verschiedene Typen von Restriktionsendonukleasen, wobei der Typ II, der am Häufigsten benutzte Restriktionsendonukleasen-Typ ist. Die Nuklease schneidet hierbei die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe zur Erkennungssequenz, einer meist palindromischen Sequenz. Dafür benötigt sie weder ATP noch eine Methyltransferase-Aktivität. Werden direkt gegenüber liegende Basenpaare geschnitten, entstehen so genannte stumpfe Enden („blunt ends“), während überhängende Enden („sticky ends“) durch ein versetztes Schneiden am 5'- bzw. 3'-Ende entstehen. In dieser Arbeit wurden die „FastDigest™“ (Thermo Scientific) Restriktionsendonukleasen *EcoRV* (*Eco321*) und *NheI* verwendet, um das Insert aus dem Vektor zu schneiden. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Dabei wurde die Rezirkulierung des Plasmids durch den Einsatz von alkalischer Phosphatase verhindert. Die Tabelle 10 zeigt den verwendeten Reaktionsansatz, der für 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert wurde. Die erfolgreiche Restriktion wurde elektrophoretisch überprüft. Anschließend konnte die DNA aus dem Agarosegel herausgeschnitten werden.

Tabelle 10: Restriktionsansatz

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
10x Restriktionspuffer	2	1x
Plasmid-DNA	x	2 μ g
Restriktionsenzym(e)	1-2	1-2 U
H ₂ O	ad. 20	

7.2.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

(Bolivar et al., 1977; Chaconas und van de Sande, 1980)

Ziel dieser Methode ist es, die Rezirkulierung der linearisierten Plasmid-DNA durch die Entfernung der reaktiven Phosphatgruppe am 5'-Ende mittels alkalischer Phosphatase „FastAP™“ (Thermo Fisher Scientific) zu verhindern. Dafür wurde 1 μ l FastAP™ zum Restriktionsansatz hinzugefügt. Weder die Inkubationszeit noch die Temperatur der Restriktion musste geändert werden.

7.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

(Dugaiczky et al., 1975; Sgaramella et al., 1970)

Der Prozess der Ligation beschreibt die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels DNA-Ligasen unter ATP-Verbrauch. Dabei wird die freie 5'-Phosphat-Gruppe eines DNA-Doppelstrangs mit seiner freien 3'-OH-Gruppe oder einer 3'-OH-Gruppe eines anderen Stranges verbunden. Es entsteht ein funktionsfähiger, rekombinanter Doppelstrang. In diesem Projekt wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die sowohl ssDNA als auch dsDNA ligiert.

7.2.10 Ligation in den Topovektor pGEM®-T

Bei dem pGEM®-T (Promega) Vektor handelt es sich um einen TA-Klonierungsvektor. TA-Vektoren sind lineare DNA-Moleküle, die an der entsprechenden Insertionsstelle 5'-Thymidin-Überhänge besitzen. Während der PCR generiert die *Taq*-Polymerase 3'-Adenin-Überhänge an die PCR-Produkte, die mit den 5'-T-Überhängen hybridisieren können. Die Ligation erfolgte mittels der T4-DNA-

Ligase nach Herstellerangaben. Die Tabelle 11 zeigt den verwendeten Ansatz für die Ligation des Inserts in den Zwischenvektor pGEM[®]-T. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert und am Folgetag dazu verwendet chemisch kompetente *E.coli*-Zellen zu transformieren. Mittels der Blau-Weiß-Selektion konnten Plasmid-tragende Bakterien identifiziert und die erfolgreiche Transformation verifiziert werden.

Tabelle 11 Ansatz für die Ligation des Inserts in den pGEM[®]-T Vektor

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
2x Ligationspuffer	5	1x
pGEM [®] -T Vektor	1	50 ng
Insert	x	30-80 ng
T4-DNA-Ligase	1	3 U
H ₂ O	ad. 10	

7.2.11 Ligation in den Zielvektor

Die Ligation des Inserts in den Zielvektor pFUSE (Invivogen) erfolgte mittels der T4-DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 4°C. Das Insert wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* (*Eco321*) und *NheI* aus dem Zwischenvektor pGEM[®]-T geschnitten, über ein Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Es wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Das Pipettierschema ist in der Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Ansatz für die Ligation des Inserts in den pFUSE Vektor

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
10x Ligationspuffer	1	1x
pFUSE Vektor	x	50 ng
Insert	x	30-80 ng
T4-DNA-Ligase	1	3 U
H ₂ O	ad. 10	

7.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

(Sanger et al., 1977)

Bei der DNA-Sequenzierung handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Nukleotidsequenz eines DNA-Abschnitts. In dieser Arbeit wurde die sogenannte Didesoxymethode oder auch Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Dafür wurden zunächst vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleinsäuren (ddNTPs) zu einem PCR-Ansatz hinzugefügt. Die DNA-Polymerase kann aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe an den ddNTPs den DNA-Strang nicht weiter synthetisieren, sodass es zu einem Kettenabbruch kommt. Dadurch werden unterschiedlich lange, mit unterschiedlichen Markierungen versehene DNA-Fragmente synthetisiert, wodurch die Sequenz des DNA-Moleküls ermittelt werden kann. Die Durchführung der Sequenzierung nach Sanger erfolgte durch „LGC Limited“ (Wesel). Im Anschluss wurden die Nukleotidsequenzen mit Hilfe von „BLAST“ (U.S. National Library of Medicine) mit den nativen DNA-Sequenzen verglichen, um Mutationen ausschließen zu können.

7.3 RNA-Techniken

7.3.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte mittels des „peqGOLD RNAPure™“ Kits von VWR, einer Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode. Diese Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Die Monolayer-Zellen wurden zunächst durch die Zugabe von 1 ml peqGOLD RNA-Pure™ (pro 10 cm² Oberfläche des Kulturgefäßes) lysiert und für 5 Min bei RT inkubiert. Dies diente der Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Die Ausbildung dreier Phasen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml Reagenz, einer Inkubation von 10 Min auf Eis und einer anschließenden 5-minütigen Zentrifugation bei 13.200 rpm (4°C). Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, während die untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, sowie die Interphase DNA und Proteine enthielt. Die RNA Präzipitation erfolgte durch Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und der Zugabe von Isopropanol im Verhältnis von 1:1. Nach einer Inkubation der Probe für 15 Min auf Eis, folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C. Nach Entfernen des Überstandes wurde das

RNA-Präzipitat zweimal mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen (10 Min, 13.200 rpm, 4°C). Anschließend wurde das RNA-Pellet für ca. 10 Min an der Luft getrocknet. Die RNA wurde je nach Pelletgröße durch Zugabe von 50-80 µl DEPC-H₂O und einer Inkubation von 20 Min bei 55°C gelöst. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

7.3.2 Reverse Transkription

Die Durchführung einer reversen Transkription ermöglicht es eine zur RNA-Matrize komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Diese Reaktion wird durch das Enzym RNA-abhängige DNA Polymerase Reverse Transkriptase katalysiert. Die entstandene cDNA kann in einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) für Expressionsanalysen verwendet werden. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurde zunächst ein DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA mittels der „DNaseI (amplification grade)“ von Invitrogen durchgeführt. Der Verdau erfolgte während einer 15-minütigen Inkubation bei RT. Anschließend wurde 1 µl 25 mM EDTA zu allen Proben hinzugefügt und die Proben für 10 Min bei 65°C inkubiert, wodurch die DNaseI inaktiviert wurde. EDTA diente bei dieser Reaktion als Chelator für zwei-wertige Ionen. In der Tabelle 13 ist der Ansatz des DNaseI-Verdaus dargestellt.

Tabelle 13: Ansatz des DNaseI-Verdaus

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
10x DNaseI Reaktionspuffer	0,5	1x
RNA	x	1 µg
DNaseI (amplification grade)	0,5	3 U
H ₂ O	ad. 5	

Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte nach modifizierten Herstellerangaben mittels des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ (AB). Die Tabelle 14 zeigt den verwendeten cDNA-Syntheseansatz. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C wurde durch das Erhitzen des Ansatzes auf 85°C für 5 Min, die Reverse Transkriptase deaktiviert und die cDNA-Synthesereaktion beendet. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 14: cDNA-Syntheseansatz

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
10x RT-Puffer	1	1x
25x dNTP Mix (100 mM)	0,4	4 mM
10x RT Random Primer	1	
Multiscribe™ Reverse Transcriptase	0,5	1 U
H ₂ O	ad. 4	
DNase-Verdau	6	

7.3.3 Quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR)

Die Quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) basiert auf dem Prinzip einer gewöhnlichen PCR. Zusätzlich ist mit der qRT-PCR eine Quantifizierung der Produktzunahme in Echtzeit möglich. Die Quantifizierung erfolgte durch die Verwendung von Fluorochromen. In dieser Arbeit wurde das Fluorochrom SYBR-Green I verwendet, welches nur fluoresziert, wenn es in die kleine Furche der DNA interkaliert. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde nach jedem Amplifikationsschritt gemessen, sodass eine Korrelation zwischen der Zunahme des Fluoreszenzsignals und der Menge des PCR-Produkts entstand. Das verwendete Fluorochrom SYBR-Green I absorbiert blaues Licht ($\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$). Für die Expressionsanalyse von Genen wurde bei der qRT-PCR cDNA als Matrize verwendet. Zusätzlich zur Expressionsanalyse wurde eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dies diente der Reinheits- und Spezifitätsüberprüfung der PCR-Produkte. Dafür wurde nach dem letzten Extraktionsschritt die Temperatur alle 15 s um 10°C von 55°C auf 95°C erhöht. Nach jeder Temperatursteigerung wurde die Fluoreszenz ermittelt. Die schrittweise Denaturierung der Doppelstränge führte zu einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Somit konnten unspezifische Nebenprodukte wie Primer-Dimer identifiziert werden. Die Schmelzkurve wurde aus der ersten Ableitung der Funktion dF/dT (Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur) berechnet. Die Messung erfolgte unter Einhaltung der Herstellerangaben mittels des Light-Cycler iQ5 (BioRad) mit dem „USB® VeriQuest® SYBR® Green qPCR Master Mix (2X)“. Die Tabelle 15 zeigt einen qRT-PCR Ansatz.

Tabelle 15: qRT-PCR Ansatz

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
2x SYBR Green qPCR Master Mix	12,5	1x
10 μ M je Primer	1,25 /Primer	500 nM
cDNA	1	50 ng
H ₂ O	ad. 25	

Die Quantifizierung der veränderten Expression erfolgte mittels Referenzgenen. Dafür wurde als interner Standard die 18S rRNA mitgemessen. Zusätzlich zum internen Standard wurde eine Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Das verwendete qRT-PCR Programm ist in der Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: qRT-PCR Programm

Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	
Initiale Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	15 s	} x45 Zyklen
Annealing	58	45 s	
Extension	60	1 min	
Schmelzkurve	55–95	1 $^{\circ}$ C alle 15 s	

Für die relative Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens auf die Expression des verwendeten Referenzgens bezogen. Dafür musste ein sogenannter Schwellenwert bestimmt werden. Dieser C_T -Wert definiert den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Um die C_T -Werte unterschiedlicher Proben vergleichen zu können, fand zunächst eine Normierung auf das Referenzgen statt:

$$\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_T (\text{Zielgen}) - \text{Mittelwert } C_T (\text{Referenzgen})$$

Anschließend konnte die Differenz zwischen zwei unterschiedlichen Proben ermittelt werden. Dafür wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe A}) - \Delta C_T (\text{Probe B})$$

Der relative Expressionsunterschied zwischen dem Ziel- und Referenzgen wurde wie folgt berechnet (Livak und Schmittgen, 2001):

$$\text{Relatives Expressionslevel} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

7.4 Proteinbiochemische Methoden

7.4.1 Proteinaufreinigung aus dem Zellkulturüberstand

Die Aufreinigung des N-terminalen ZP2-Glykoproteins aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mittels einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Affinitätschromatografie. Die Nickel-NTA-Affinitätschromatografie beruht auf der Bildung eines Chelatkomplexes. Dieser bildet sich zwischen dem am C-Terminus des N-terminalen muZP2 Glykoproteins befindlichen Polyhistidin-Tag und der Nickel-NTA (Ni-NTA) aus. Das Ni-NTA ist wiederum über einen Spacer mit Agarose Beads verbunden. Die Elution erfolgte mittels Imidazol, welches mit dem Imidazolring der Histidine um den immobilisierten Metallliganden (Ni-NTA) konkurriert (Porath et al., 1975).

Zur Vorbereitung der Proteinaufreinigung wurden die Ni-NTA-Beads (Qiagen) dreimal mit PBS 1:1 (v/v) gewaschen (1 Min, 6.000 rpm). Der zuvor gesammelte Zellkulturüberstand (Kapitel 7.6.2) mit dem N-terminalen muZP2 Glykoprotein wurde mittels eines TPP™ Vakuum Filters der Firma Thermo Fisher Scientific (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert. Es wurden 40 ml des sterilen Zellkulturüberstands in ein 50 ml Probengefäß überführt und mit 10 ml Bindepuffer (pH 7,5) und 250 µl Ni-NTA-Beads (50-%ig) versetzt. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (LLG) mit anschließender Zentrifugation (2.000 rpm) für 5 Min. Um Mediumsreste zu entfernen, wurde das Ni-NTA-Pellet dreimal mit 45 ml Waschpuffer (pH 7,5) gewaschen (5 Min, 2.000 rpm). Die Elution erfolgte mittels 2 ml Elutionspuffer (pH 7,2) und einer Inkubation von 30 Min bei 4°C auf einem Rotator (Stuart Scientific). Nach erneuter Zentrifugation (5 Min, 2.000 rpm) wurden die proteinhaltigen Überstände in ein 15 ml Probengefäß überführt und bei -20°C gelagert.

7.4.2 Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinen

Nach der Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand liegt das muZP2 Protein in imidazolhaltigem Elutionspuffer (1M) vor. Da Imidazol eine zytotoxische Wirkung besitzt, muss das Protein für die anschließenden Zellversuche in PBS umpuffert werden. Ein weiterer Grund für die Umpufferung des ZP2-Glykoproteins ist die Verwendung des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“ (Thermo Fisher Scientific) (Kapitel 7.4.4) zur Proteinkonzentrationsbestimmung. Dies ist nur bei einer Imidazolkonzentration unter 50 mM möglich. Für die Umpufferung wurde zunächst das Eluat auf Vivaspin® Turbo 4 Ultrafiltrationssäulen (Sartorius Stedim Lab Ltd.) mit einem Molekulargewicht von 5 kDa aufgetragen und das Volumen mittels einer Zentrifugation bei 3.000 rpm für 60 min von 4 ml auf 500 µl reduziert. Die Konzentrierung des Proteins erfolgte aufgrund der Molekularmasse des Proteins von 19 kDa und der verwendeten Porengröße von 5 kDa der Vivaspin® Turbo 4 Ultrafiltrationssäulen. Nach dreimaligem Waschen des Proteins mit jeweils 4 ml PBS (3.000 rpm, 60 Min) wurde die Proteinlösung auf ein Volumen von 500 µl konzentriert. Im Anschluss erfolgte die Proteinbestimmung mittels des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“ (Thermo Fisher Scientific). Das umpufferte Protein wurde bei -20°C gelagert.

7.4.3 Rekopplung von Proteinen an magnetische Sepharosebeads

Für die anschließenden Zellversuche wurde das umpufferte muZP2 Glykoprotein an magnetische His Mag Sepharose™ Ni-Beads (GE Healthcare) gebunden. Die Bindung beruhte auf der Ausbildung eines Chelatkomplex zwischen dem am C-Terminus des N-terminalen muZP2 Glykoproteins befindlichen Polyhistidin-Tag und der mit einem Spacer an Sepharosebeads verbundenen Ni-NTA. Zur Vorbereitung der Rekopplung wurden die Sepharosebeads dreimal mit PBS 1:1 (v/v) gewaschen (1 Min, 6.000 rpm). Für die Rekopplung des muZP2 Glykoproteins an magnetische Sepharosebeads wurden die Beads in einem Puffer mit 200 µg/ml N-terminalem muZP2 Glykoprotein über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (Stuart Scientific) inkubiert. Die Bindung an die Beads wurde am Folgetag mittels Western Blot überprüft.

7.4.4 Proteinbestimmung mittels des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“ der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben. Dabei wurde das Protokoll für Mikroplatten verwendet. Die Absorption wurde bei 562 nm mit dem „FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader“ (Molecular Devices) gemessen. Mit Hilfe der Software SoftMax Pro 7.0.3 (Molecular Devices) konnte im Anschluss die Konzentration der Proben unter Einbezug einer Standardkurve bestimmt werden.

7.4.5 Proteinextraktion aus Spermatozoen

Für die Proteinextraktion aus murinen Spermatozoen wurde die zuvor gewonnene Spermatozoensuspension (Kapitel 7.1.1.1) zunächst dreimal gewaschen (5 Min bei 1.800 rpm). Das Pellet wurde im Verhältnis von 1:1 mit 2x Laemmli Puffer versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Inkubation bei 99°C für 10 Min im Heizblock und dem anschließenden Zentrifugationsschritt (11.800 rpm, 4°C, 5 Min). Der proteinhaltige Überstand wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert. Der 2x Laemmli Puffer enthält SDS, ein anionisches Tensid (Detergenz), welches alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen zerstört und ein ausgeglichenes Masse-/Ladungsverhältnis erzeugt. Dies ist entscheidend für die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Größe in der anschließenden SDS-PAGE. Neben 2x Laemmli Puffer wurden 5% β -Mercaptoethanol zur Probe hinzugegeben, wodurch die Disulfidbrücken reduziert und die Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst wurden.

7.4.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

(Laemmli, 1970; Maniatis, 1989)

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Die Trennung richtet sich nach der unterschiedlichen Molekülmasse der einzelnen Proteine. Die Proben wurden 1:1 mit dem 2x Sample-Buffer blue gemischt. Durch das im 2x Sample-Buffer blue und im Tricin-Gel enthaltene SDS, einem anionischen Tensid (Detergenz), können die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Somit wurde eine konstante negative Ladungsverteilung erzielt. Zusätzlich zum SDS enthält der 2x Sample-Buffer blue β -

Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken reduziert. Anschließend wurden die Proben für 5 Min auf 95°C erhitzt, um die Sekundär- und die Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen. Die Trennung der denaturierten Proteine erfolgte mittels einer Matrix bestehend aus polymerisiertem Acrylamid und dem Anlegen einer elektrischen Spannung. Die negativ geladenen Proteine wandern Richtung Kathode. Die Porengröße der Matrix wird durch die Quervernetzung des Acrylamids durch N,N'-Methyl-Bisacrylamid bestimmt. Eingeleitet wird die Polymerisation der Matrix durch Ammoniumpersulfat (APS), wobei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator dient. Das verwendete SDS-Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Bei dem Sammelgel handelt es sich um ein grobporiges Acrylamidgel, in dem sich die Proteine sammeln und so eine einheitliche Lauffront erzielt werden kann. Das Trenngel hingegen ist feinporiger, wodurch nach Anlegen der Spannung die Trennung der Proteine hinsichtlich ihrer Größe erfolgt. In dieser Arbeit wurden 12%-ige Trenngele verwendet, die, wie in der Tabelle 17 angegeben, gegossen wurden. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Lauffront zu erzielen. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels, wurde das Acrylamidgel in eine Elektrophoresekammer überführt. Während die Kammer zwischen den zwei Gelen mit Kathodenpuffer gefüllt wurde, wurde die Elektrophoresekammer mit Anodenpuffer befüllt. Anschließend wurden die denaturierten Proteine zusammen mit einem Protein-Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann bei einer Spannung von 100 V für ca. 2,5 h.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Tricin-Gele für die SDS-PAGE

Reagenzien	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
30% Acrylamid und Bisacrylamidlösung (im Verhältnis 37,5:1)	2 ml	0,25 ml
SDS-haltiger Gelpuffer	1,66 ml	0,3875 ml
VE-Wasser	0,83 ml	0,9 ml
Glycerin	0,5 ml	-
APS 10% (w/v)	25 µl	12,5 µl
TEMED	2,5 µl	1,25 µl

7.4.7 Western Blot und Immundetektion

(Laemmli, 1970; Maniatis, 1989)

Beim Western Blot werden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Blotten). Dies geschieht durch das Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feldes. Die Immobilisierung der Proteine auf der Membran erfolgt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Bei der Immobilisierung behalten die Proteine sowohl ihre funktionelle Aktivität, als auch ihre Immunreaktivität. In dieser Arbeit erfolgte das Blotten für 1 h bei 100 V. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut:

- Ein dicker Watteschwamm
- Zwei Filterpapiere
- Die Nitrocellulosemembran
- Das Polyacrylamidgel
- Ein Filterpapier
- Ein dünner Watteschwamm

Mittels einer PonceauSTM (Merck) Färbung kann der Transfer auf die Membran kontrolliert werden. Dabei handelt es sich um eine unspezifische Färbung. Das Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch die Inkubation der Nitrocellulosemembran in einer Blockierlösung für 30 Min bei RT. Anschließend wurde die Membran in 3 ml Blockierlösung und dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran am Folgetag dreimal mit TBST-Lösung für jeweils 10 Min gewaschen. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mittels einen gegen den Primärantikörper gerichtetem Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppeltem Sekundärantikörper (1:10000). Dafür wurde die Membran für 1 h bei RT auf einem Rollermixer in der jeweiligen Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschsritten konnte der Sekundärantikörper mittels des „AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagenz“ der Firma GE Healthcare detektiert werden. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Lumineszenz-Bildanalysegerät „ChemiDocTM Imaging System“ (BioRad) detektiert und mittels des Programms „Image LabTM Touch Software“ (Version 2.3.0.07, BioRad) visualisiert.

7.4.8 Antikörper Isolation, Aufreinigung und Aufkonzentrierung

Die Hybridomazelllinie CRL-2463TM (ATCC[®]) (Kapitel 6.9.1) wurde für die Produktion des gegen das murine Zona pellucida Glykoprotein 2 (Aminosäure 114-129) spezifischen Antikörpers (IE-3) verwendet. Für die Isolation und Aufreinigung des IE-3 Antikörpers wurde der Zellkulturüberstand wie in Kapitel 7.6.2 beschrieben geerntet und mittels eines TPPTM Vakuum Filters der Firma Thermo Fisher Scientific sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm). Dies diente der Entfernung von toten Zellen oder Zellschrott. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie-Säule („HiTrapTM Protein G HP-Säule“ der Firma GE Healthcare). Die Affinitätschromatographiesäule ist beladen mit 1 ml „Protein G SepharoseTM High Performance“, die aus biokompatiblen Polypropylen besteht und für die Isolation von monoklonalem und polyklonalem IgG verwendet wird. Polypropylen ist biokompatibel und nicht-interaktiv mit Biomolekülen. Das Protein G, ein Oberflächenprotein, ist ein Typ 3 Fc-Rezeptor, das an die Fc-Region von IgG bindet. Des Weiteren wurde die Albumin-Binderegion genetisch deletiert, um eine Kreuzreaktion mit Albumin zu verhindern. Für die Isolation des Antikörpers wurde zunächst die Affinitätschromatographiesäule mit 10-fachem Volumen an Bindepuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0) gewaschen. Dies erfolgte mittels einer Peristaltikpumpe (ISMATEC[®]) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Anschließend wurde eine mit sterilem Zellkulturüberstand gefüllte 500 ml Schottflasche über Schläuche an die Pumpvorrichtung angeschlossen. Somit wurde der Überstand über Nacht kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 11,9 ml/h über die „HiTrapTM Protein G HP“-Säule in die Ursprungsschottflasche gepumpt, sodass der IgG-Antikörper im Überstand an die Säule binden konnte. Durch diesen Versuchsaufbau wurde ein geschlossenes, steriles System gewährleistet. Am Folgetag wurde die Säule erneut mit PBS (10-faches Volumen) gewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines Elutionspuffers (0,1 M Glycin-HCl Lösung, pH 2,7) in einem Reaktionsgefäß (FACS-Röhrchen, CellQuestProTM), das mit 1 M TRIS-HCl Lösung (pH 9) zuvor befüllt wurde. Dies diente der Neutralisierung des niedrigen pHs des Elutionspuffers. Um das im Elutionspuffer enthaltene Glycin, welches ebenfalls an Fc-Regionen bindet aus der Antikörper enthaltene Lösung (Fraktion) zu waschen, um den pH zu neutralisieren und um die Reinheit zu erhöhen, wurde im Anschluss eine Dialyse durchgeführt. Dafür wurde die aufgefangene Fraktion in einen Dialyseschlauch mit der Porengröße 15,9 mm (Roth) überführt. Der Dialyseschlauch wurde zuvor durch

eine Inkubation von 20 Min in destilliertem Wasser aktiviert und anschließend zweimal gewaschen. Dies diente der Entfernung der freigesetzten Weichmacher. Die Dialyse erfolgte über Nacht in einem mit PBS befülltem Becherglas auf einem Magnetrührer. Am Folgetag wurde die Antikörperlösung aus dem Dialyseschlauch in 15 ml Probengefäß überführt und die OD am Photometer (Eppendorf) gemessen. Die IE-3 Antikörper enthaltene Fraktion wurde mittels Zentrifugens (Amicon Ultra, 10 kDa) auf 100 µl aufkonzentriert (2540 g für 20 Min). Im Anschluss wurde die Lösung erneut sterilfiltriert (0,22 µm Filter, Millex®-GV) und die OD bestimmt. Der Antikörper wurde im ELISA (Kapitel 7.4.9) und im Western Blot (Kapitel 7.4.7) getestet.

7.4.9 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Mithilfe eines qualitativen indirekten Festphasen-ELISAs wurde die spezifische Bindung des produzierten IE-3 Antikörpers nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um einen IgG-Antikörper aus der Ratte, der gegen die N-Domäne des murinen Zona pellucida Glykoproteins 2 (Aminosäure 114-129) gerichtet ist. Um die Fragestellung zu beantworten, ob der produzierte IE-3 Antikörper spezifisch den N-Terminus des muZP2 Glykoproteins erkennt, wurde in dieser Arbeit ein qualitativer Festphasen-ELISA verwendet, bei dem im Gegensatz zum quantitativen Festphasen-ELISA kein Standard benötigt wird. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der OD der einzelnen Proben. Das Prinzip des indirekten Festphasen-ELISAs basiert zunächst auf der Detektion des immobilisierten Antigens mit einem nicht-gekoppelten spezifischen Erstantikörper. Nachdem ein HRP gekoppelter Zweitantikörper spezifisch an den Erstantikörper bindet, wird als Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt. Die HRP setzt das Substrat unter Freisetzung einer Farbreaktion (Blaufärbung) um. Durch die Zugabe von Schwefelsäure wird diese Reaktion gestoppt. Dieser Vorgang ist gekennzeichnet durch einen erneuten Farbumschlag von blau zu gelb.

Für die Durchführung des ELISAs wurde zunächst eine 96-Well Platte (Thermo Scientific) mit N-terminalem muZP2 Glykoprotein beschichtet. Die Tabelle 18 zeigt die verwendeten Wells der 96-Well Platte.

Tabelle 18: Pipettierschema des indirekten Festphasen-ELISA

	1	2	<u>Primärer Antikörper</u>	<u>Sekundärer Antikörper</u>
A	muZP2	muZP2	←IE-3/ 0,5% BSA/PBS	←Ziege- α -Ratte HRP
B	muZP2	muZP2	←MEC14.7/ 0,5% BSA/PBS	←Ziege- α -Ratte HRP
C	muZP2	muZP2	←0,5% BSA/PBS	←Ziege- α -Ratte HRP
D	PBS	PBS	←0,5% BSA/PBS	←Ziege- α -Ratte HRP

Es wurden jeweils 5 μ g aufgereinigtes muZP2 Glykoprotein aufgetragen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde die 96-Well Platte ausgeschlagen und mit 1% BSA/PBS pro Well für 2 h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Platte erneut ausgeschlagen, zweimal mit PBS gewaschen und mit 17 μ g/ml IE-3 Antikörper in 0,5% BSA/PBS beladen. Der Antikörper bindet an das Epitop des muZP2 Glykoproteins. Die Proteinbestimmung wurde im Zweifachansatz durchgeführt. Als Isotypkontrolle wurde der MEC14.7 Antikörper (ImmunoTools) verwendet, ein Ratte-anti-Maus IgG2a-Antikörper, der murines CD34 erkennt. Die Isotypkontrolle diente dem Ausschluss, dass das muZP2 Glykoprotein vom Ratten-Fc-Teil des Antikörpers detektiert wird und nicht vom spezifischen Epitop. Zusätzlich sollte ausgeschlossen werden, dass der sekundäre Antikörper bereits an das Protein bindet. Dafür wurde nur der Zweitantikörper in 0,5% BSA/PBS aufgetragen. Eine mögliche unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die 96-Well Platte wurde ebenfalls untersucht. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT, wurde die Platte erneut ausgeschlagen und dreimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde der HRP-gekoppelte Ziege-anti-Ratte Antikörper (Thermo Fisher Scientific) verwendet und in einer Konzentration von 1:10.000 in 0,5% BSA/PBS eingesetzt. Es wurden jeweils 100 μ l pro Well aufgetragen und für 90 Min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut ausgeschlagen, viermal mit PBS gewaschen und 100 μ l TMB pro Well hinzugefügt. Das TMB diente als Substrat für die HRP. Nach ca. 5 Min Inkubation bei RT war eine deutliche Blaufärbung zu erkennen, sodass die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Schwefelsäure abgestoppt werden konnte. Die Bestimmung der OD erfolgte bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mittels eines ELISA Photometers (Tecan).

7.5 Bakterielle Zellkultur

7.5.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung des Bakterienstammes *E.coli Dh5 α* erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten. Das LB-Medium wurde mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (160 U/min) inkubiert. Nach Ausstreichen einer Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten, erfolgte ebenfalls eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Gelagert wurden die LB-Agar-Platten, die zuvor mit Parafilm verschlossen wurden, bei 4°C. Voraussetzung für eine Langzeitlagerung der Bakteriensuspension bei -80°C ist die Zugabe von 20% DMSO (v/v).

7.5.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

(Lederberg und Cohen, 1974)

Die Transformation ist ein molekularbiologisches Verfahren bei dem Plasmide in chemisch-kompetente *E.coli Dh5 α* Zellen eingeschleust werden. Die *Dh5 α* Zellen besitzen eine Mutation im *endA1* Gen und eine weitere im *recA1* Gen, wodurch die Ausbeute, die Qualität und die Stabilität der Plasmide erhöht wird. Die transformierten Klone besitzen das *lacZ Δ M15* Gen, welches für die β -Untereinheit der β -Galaktosidase kodiert. Dadurch ist eine Blau-Weiß-Selektion der Klone möglich. Für die Transformation wurden 50 μ l chemisch kompetente *E.coli* Zellen für 10 Min auf Eis angetaut und mit 1 μ g Plasmid-DNA oder 5 μ l Ligationsansatz versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock für 30 s bei 42°C im Wasserbad. Die Permeabilität der Bakterienzellwand wurde dadurch kurzzeitig erhöht, sodass die Bakterien die Plasmid-DNA aufnehmen. Nach einer 5-minütigen Inkubation der Bakterienkultur auf Eis, wurden 100 μ l antibiotikafreies SOC-Medium hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation der Bakteriensuspension für 60 Min bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm), wodurch die Bakterien sich erholen konnten und die Resistenz, welche auf dem Plasmid kodiert ist, ausbildeten. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte mit 0,1 % (w/v) Ampicillin ausplattiert oder zum Inokulieren einer Flüssigkultur (LB-Medium mit 0,1 % [w/v] Ampicillin) verwendet. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Die

Selektion der transformierten Bakterien erfolgte mittels der auf dem Plasmid befindlichen ZeocinTM-Resistenz.

7.5.3 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion ist eine schnelle und effiziente Methode, um rekombinante Bakterien zu identifizieren, die das gewünschte Insert tragen. Voraussetzung für die Selektion ist die Verwendung von Plasmiden, die an der Insertionsstelle (MCS, „Multiple Cloning Site“) das Gen für die β -Galaktosidase (*lacZ*) besitzen. Das Enzym katalysiert das Substrat X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG zu einem blauen Produkt, wodurch blaue Kolonien entstehen. *E.coli Dh5 α* - Zellen sind β -Galaktosidase defizient und besitzen nur das *lacZ Δ M15* Gen, das für die β -Untereinheit der β -Galaktosidase kodiert. Bei Bakterienzellen, die ein nicht-rekombinantes Plasmid tragen, wird ein kurzes Peptid der Galaktosidase (α -Peptid) exprimiert, welches die mutierte genomische Peptidsequenz ersetzen kann und mit dem β -Peptid eine funktionsfähige Galaktosidase bildet. Dadurch kann das Protein synthetisiert werden und die Kolonien färben sich blau. Bei einer erfolgreichen Insertion des DNA-Fragments in die MCS wird kein α -Peptid synthetisiert und die Kolonien bleiben weiß.

7.6 Eukaryotische Zellkultur

7.6.1 Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien

In dieser Arbeit wurde für die Expression von rekombinantem Protein die humane Zelllinie HEK293T verwendet. Hierbei handelt es sich um Monolayer-Zellen, die zunächst in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² kultiviert wurden. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, 5%-iger CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das FKS-haltige DMEM-Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90% passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Dies diente der Entfernung möglicher Mediumsreste, welche die Aktivität der Protease inhibieren würden. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA Lösung auf den Zellrasen pipettiert und für 5 Min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die verwendete Serinprotease Trypsin spaltet Adhäsionsproteine, mit denen die Zellen in der Lage sind, sich an die Zellkulturflasche anzuheften. EDTA ist ein Chelator und wird zum

Komplexieren von Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet. Da diese Ionen wichtig für Zell-Zell-Verbindungen sind, kann so eine erneute Zelladhäsion verhindert werden. Diese proteolytische Reaktion wurde durch Zugabe von 8 ml FKS-haltigem DMEM-Medium gestoppt. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in eine mit bereits 9 ml frischem Medium befüllte Zellkulturflasche überführt.

7.6.2 Kultivierung muriner Suspensionszelllinien

Für die Produktion des gegen das murine Zona pellucida Glykoprotein 2 (Aminosäure 114-129) spezifischen Antikörpers (IE-3) wurde die Hybridomazelllinie CRL-2463TM (ATCC[®]) verwendet. Die Hybridomazelllinie ist eine murine Suspensionszelllinie, die in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in einem Brutschrank kultiviert wurde. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90% passagiert. Nach Resuspension der Zellen, wurde 1 ml der Zellsuspension in eine neue, mit 25 ml ISF-1 Medium (Biochrom) befüllte Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die restlichen 24 ml der Zellsuspension wurden für 20 Min bei 4.000 rpm (Hettich[®] Rotina 38/38R Zentrifuge, Sigma Aldrich) zentrifugiert. Der antikörperhaltige Überstand wurde anschließend in eine 200 ml Schottflasche überführt und bis zur Antikörperisolation (Kapitel 7.4.8) bei 4°C gelagert.

7.6.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Eukaryotische Zelllinien werden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Nach Entnahme des Kryogefäßes aus dem Stickstofftank, wurde dieses bei 37°C im Wasserbad solange erwärmt, bis ca. 90% der Zellsuspension flüssig war. Im Anschluss konnte die Zellsuspension in eine mit 10 ml Medium vorbereitete T75-iger Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert werden. Um das zytotoxische DMSO aus dem Medium zu entfernen, erfolgte je nach Zelllinie ein Mediumwechsel nach ca. 24-48h.

7.6.4 Kryokonservierung humaner Zellen

Für die Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen wurden die Zellen zunächst wie in Kapitel 7.6.1 und 7.6.2 beschrieben geerntet und abzentrifugiert. Nachdem das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen und in 3 ml 10%-igem DMSO-haltigem Medium resuspendiert wurde, konnte die Zellsuspension in Kryogefäße aliquotiert werden.

Durch das DMSO können sich keine Eiskristalle bilden, wodurch Schädigungen der Zellmembran verhindert werden. Zur Kryokonservierung wurden die Aliquots zunächst in einem Gefrierbehälter über Nacht langsam auf -80°C heruntergekühlt. Die langfristige Kryokonservierung erfolgte in einem Stickstofftank bei -196°C .

7.6.5 Quantifizierung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung wurde mit dem CASY 1 (CASYTM-Counter „Model TT“, Innovatis) durchgeführt. Das Messprinzip fundiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore, wobei der Widerstand der Zellsuspension erfasst wird. Durch die Verwendung der sogenannten Pulsflächenanalyse können eine Million Messpunkte pro Sekunde ausgewertet werden. Mittels des CASY 1 kann die Zellzahl, der physiologische Zustand und das Volumen der Zellen ermittelt werden. Durch die Verwendung von sogenannten „Gates“, die in den generierten Histogrammen gezielt gesetzt werden können, kann zwischen vitalen Zellen, Zelldebris und toten Zellen unterschieden werden. Somit lässt sich die Anzahl der vitalen Zellen bestimmen. Für die Zellzahlbestimmung wurde zunächst ein CASY-Gefäß mit 9,9 ml Elektrolyt-Lösung (CASY-Ton) befüllt, 100 µl der zu messenden Zellsuspension hinzugefügt, das Gefäß verschlossen, mehrfach invertiert und mit Hilfe des CASY 1 bestimmt.

7.6.6 Stabile Transfektion humaner Zellen

Die stabile Transfektion beschreibt den dauerhaften Einbau eines Vektors in das Genom einer Wirtszelle. Diese Technik wurde für die permanente Herstellung des rekombinanten muZP2 Glykoproteins in den HEK2930T Zellen verwendet. Hierzu wurde die für das murine N-terminale ZP2 Glykoprotein spezifische cDNA in den pFUSE-hlgG1-Fc2 (Invivogen)-Vektor kloniert (pFUSE-muZP2). Anschließend wurde über die stabile Transfektion die Plasmid-DNA in das Genom der Zelllinie HEK293T integriert. Als Kontrolle für die Überexpression des murinen ZP2 Glykoproteins wurde auch der Leervektor in die HEK293T Zellen transfiziert. Für die Selektion der stabil transfizierten Zellen wurde das Selektivum ZeocinTM (InvivoGen) verwendet. Zur Bestimmung der einzusetzenden Konzentration des Selektivums wurden 5×10^5 HEK293T Zellen in eine 6-Well-Platte (VWR[®]) ausgesät und für 24 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen ZeocinTM-Konzentrationen (0 µg/ml bis 2000 µg/ml) versetzt. In einem Zeitraum von zwei

Wochen wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Die minimal eingesetzte Konzentration an Zeocin™, bei der alle Zellen innerhalb von zwei Wochen starben, wurde im Folgenden für die Selektion benutzt. In dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 400 µg/ml Zeocin™ verwendet.

Durchgeführt wurde die stabile Transfektion der HEK293T Zellen mit dem pFUSE-muZP2 bzw. dem Leervektor mittels des Transfektionsreagenz Polyfect® (Qiagen). Polyfect® besteht aus dendrimeren Molekülen. Die Transfektion der Zellen beruht auf der Interaktion der geladenen Aminogruppen des Polyfects® mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Der so entstandene Komplex bindet an die Zelloberfläche und wird mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen. Am Vortrag der stabilen Transfektion wurden 5x10⁵ Zellen pro Ansatz ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach 24 h wurden die Transfektionsansätze wie in der Tabelle 19 beschrieben angesetzt und die Zellen transfiziert.

Tabelle 19: Schema der stabilen Transfektion

Ansatz	Funktion	Polyfect [µl]	DNA [µg]	PBS [µl]
A	Selektionskontrolle	-	-	200
B	Reagenzkontrolle	20	-	180
C	DNA-Kontrolle	-	2	200
D	Transfektionsansatz Vollvektor	20	2	180
E	Transfektionsansatz Leervektor	20	2	180

Dafür wurden 2 µg DNA mit den entsprechenden Mengen an PBS in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß verdünnt. Im Anschluss wurden 20 µl des Polyfect® Reagenz zu den jeweiligen Ansätzen pipettiert. Die Komplexbildung zwischen dem Transfektionsreagenz Polyfect® und der DNA erfolgte während einer Inkubation für 20-30 Min bei RT. Die Transfektionsansätze wurden tropfenweise auf die HEK293T Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation der 6-Well-Platten für 48-72 h bei 37°C und anschließend eine Titrationsreihe, wobei die Ansätze B und C (Tabelle 19), die als Kontrolle der Transfektionseffizienz dienten, nicht weitergeführt wurden. Für die Titrationsreihe wurden die Zellen der übrigen Ansätze geerntet (Kapitel 7.6.1) und in

einer Verdünnungsreihe (Tabelle 20) in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Ziel der Titrationsreihe war eine Selektion von Einzelzellkolonien.

Tabelle 20: Schema der Titrationsreihe

Verdünnung	Medium [ml]	Zellsuspension [ml]
1:10	9	1
1:20	9,5	0,5
1:50	9,8	0,2
1:100	9,9	0,1
1:200	9,95	0,05
1:300	9,97	0,03
1:500	9,98	0,02
1:1000	9,99	0,01

Nach einer Inkubation der Verdünnungen bei 37°C für 24 h wurde das Selektivum Zeocin™ (400 µg/ml) hinzugefügt. Es folgte eine Kultivierung über zwei Wochen. In dieser Zeit wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel inklusive Selektivum durchgeführt. Die Zellen aus Ansatz A (Tabelle 19) dienen als Selektionskontrolle. Nachdem alle Wildtyp-Zellen abgestorben waren, wurden die einzelnen Klone mit Hilfe von Transfektionszylindern isoliert. Dafür wurden die Transfektionszylinder zunächst mit Vaseline beschichtet und anschließend mit einer sterilen Pinzette über die Einzelklone gelegt. Nach Waschen der Zellen mit PBS, wurden die Zylinder mit 40 µl Trypsin befüllt, die Zellen geerntet und in eine 96-Well-Platte umgesetzt. Durch die Zugabe von 100 µl 10% FKS-haltigem DMEM-Medium wurde das Trypsin inhibiert und die Zellen kultiviert. Weiterhin wurden die Zellen durch das im Medium enthaltene Zeocin™ (400 µg/ml) unter Selektionsdruck gehalten. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen jeweils in ein nächst größeres Zellkulturgefäß überführt (48-Well-, 24-Well-, 12-Well-, 6-Well-Platte, T25-, T75-Zellkulturflasche). Der erfolgreiche Einbau des Vektorkonstrukts in das Genom der Zellen, sowie die Expression des muZP2 Glykoproteins wurde auf RNA- und Proteinebene überprüft. Ausgewählte Klone dienen dann der Herstellung des murinen N-terminen ZP2 Glykoproteins. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, abzentrifugiert

(2.000 rpm, 5 Min), sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert. Die weitere Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand ist in dem Kapitel 7.4.1 beschrieben.

7.6.7 Durchflusszytometrie

Allgemein findet die Durchflusszytometrie (FACS, "Fluorescence Activated Cell Sorting") Anwendung im Zählen und Analysieren von physikalischen sowie molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Dabei fließen die zu untersuchenden Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln über eine Kanüle in das Messgerät (FACS Calibur, Becton Dickinson). Das verwendete FACS besitzt einen 488 nm Argonlaser. Wenn das Licht des Lasers auf eine Zelle trifft, wird es abhängig von verschiedenen physikalischen Eigenschaften der Zelle mit unterschiedlicher Quantität und Qualität gestreut. Die Streuung ist am Größten im sogenannten Kleinwinkelbereich (0-10°), dem Vorwärtsstreulicht (FSC, „Forward Angle Light Scatter“). Durch die Beugung des Lichts kann eine Größenbestimmung der Zelle über die FSC-Diode durchgeführt werden. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, „Side Scatter“) definiert den geringen Anteil des Lichts, das seitwärts im 90° Bereich gestreut wird. Mittels des SSC können Aussagen über die Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zellen getroffen werden. Außerdem ist eine Messung von Fluoreszenzen möglich, sofern die Zellen mit Fluorochromen markiert sind. In dieser Arbeit wurde das FACS für den Nachweis des B-Zellrezeptors auf der Oberfläche der Hybridomazellen (CRL-2463TM, ATTC) verwendet. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 7.6.2 beschrieben geerntet. Der Antikörpernachweis (IE-3) im zellfreien Überstand erfolgte mittels ELISA (Kapitel 7.4.9) und Western Blot (Kapitel 7.4.7). Das Zellpellet wurde in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl dieser Zellsuspension in ein mit 200 µl FACS-Puffer befülltes Reaktionsgefäß (FACS-Röhrchen, CellQuestProTM) überführt. Um den Stoffwechsel der Zellen zu inhibieren, wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Zunächst wurde eine Autofluoreszenz der Hybridomazellen ausgeschlossen, indem eine FACS-Messung ohne Zugabe des FITC gekoppelten Sekundärantikörpers („(FITC)-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)“, Jackson Immuno Research) durchgeführt wurde. Zusätzlich erfolgte eine Isotypkontrolle mittels eines anderen Sekundärantikörpers („(FITC)-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)“, Jackson Immuno Research). Für den Nachweis, dass die Hybridomazellen den B-Zellrezeptor auf der

Oberfläche besitzen, wurde nun der Sekundärantikörper („(FITC)-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)“, Jackson Immuno Research) verwendet. FITC ist ein Fluorochrom, welches ein Absorptions- bzw. Emissionsmaximum bei 495 nm/ 519 nm besitzt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird über ein optisches System detektiert und die gemessene Lichtintensität wird dann in Histogrammen oder Punktdiagrammen dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch das Programm „CellQuestPro™“ (Becton Dickinson, Version 6).

7.7 4D Analysen mittels des Digital Holografischen Mikroskops

7.7.1 Prinzip einer digitalen holografischen Messung und Datenverarbeitung

Die Verwendung eines Digital Holografischen Mikroskops ermöglicht eine vierdimensionale Analyse (X, Y, Z und t) der Schwimmtrajektorie eines einzelnen Spermatozoons. Dafür wurden anhand von quantitativen Phasenkontrastbildern Serienaufnahmen durchgeführt. Im Anschluss konnte die Trajektorie des Spermatozoons in einem dreidimensionalen Koordinatensystem visualisiert werden. In dieser Arbeit wurde ein Digital Holografisches Mikroskop des Typs DHM™ T-1000 der Firma Lyncée Tec. SA verwendet. Hierbei handelt es sich um ein *off-axis* Transmissionsmikroskop mit einem 666 nm Laser.

Das Prinzip einer Digital Holografischen Messung muriner Spermatozoen ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Messung humaner Spermatozoen erfolgte analog. Für die vierdimensionale Analyse der Spermatozoenschwimmbewegung mittels DHM wurden die Spermatozoen zunächst wie in dem Kapitel 7.1.1.1 beschrieben präpariert, gewaschen und in HS-Puffer gelagert. Anschließend wurden 30 µl der Spermatozoensuspension in eine Messkammer (Leja Products B.V.) mit einer Kammertiefe von 100 µm überführt (Abbildung 17A) und analysiert. Die digital holografische Aufnahme (Hologramm) (Abbildung 17B) erfolgte mittels der Software Koala (Version 6) der Firma Lyncée Tec. SA und einem 20x Objektiv mit einer Aufnahmezeit von 100 Hologrammen pro Sekunde. Durch die kurzen Belichtungszeiten wird das System unempfindlich gegenüber äußeren Störungen, Vibrationen oder Bewegungsunschärfen. Im Gegensatz zu herkömmlichen bildgebenden Verfahren, bei denen lediglich die Intensität und die Frequenz des einfallenden Lichts aufgezeichnet werden, speichert ein Hologramm zusätzlich die Phase (Abbildung 17C). Der quantitative holografische Phasenkontrast ermöglicht es Objekte in 3D darzustellen (Leach, 2011). Im Anschluss wurde durch numerische

Kalkulation der XY-Ebene in verschiedenen Fokalebene mittels der Koala-Software (Version 6) eine Projektion erstellt, in der alle Objekte in eine Ebene projiziert wurden (Abbildung 17D). Entsprechend der verwendeten CCD-Kamera (avA1000-100gm, Basler AG) wurden die Zeitserien der rekonstruierten XY Projektionen (8-Bit TIFF Format, 100 Fps) im 800 x 800 Pixelformat dargestellt.

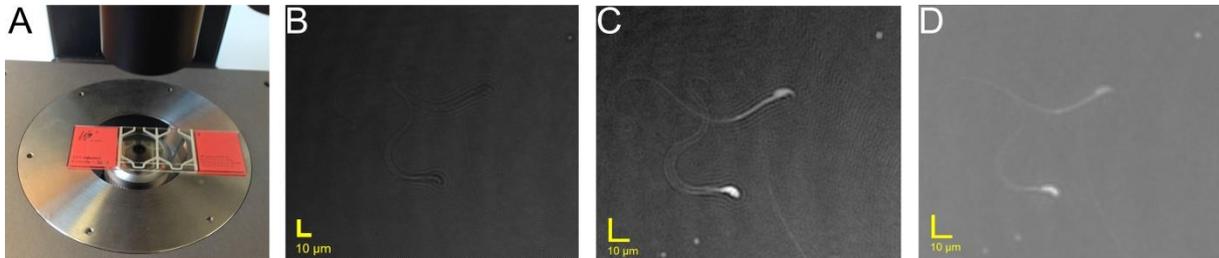


Abbildung 17: Prinzip einer digital holografischen Messung

A zeigt die für die holografische Messung verwendete Messkammer (Leja Products B.V.) mit einer Kammertiefe von 100 µm. In B ist das mittels DHM aufgezeichnete Hologramm muriner Spermatozoen dargestellt. Neben der Intensität und der Frequenz des einfallenden Lichts, speichert das Hologramm zusätzlich die Phase. C zeigt das Phasenbild der holografischen Aufnahme. In D ist die Projektion ausgehend von dem Phasenbild dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten mittels eines 20x Objektivs.

Die DHM ermöglicht durch die Aufnahme von Hologrammen ein Durchscannen der Aufnahme in der Z-Richtung, sodass ein Refokussieren möglich ist (Abbildung 18). Dadurch können unterschiedliche Spermatozoen oder Abschnitte eines Spermatozoons in verschiedenen Fokalebene nachträglich numerisch fokussiert werden. Während in Abbildung 18A der Kopf des Spermatozoons scharf abgebildet ist, wurde durch Änderung der Rekonstruktionsparameter in Spyder (Python 2.7) in Abbildung 18B das Flagellum scharf dargestellt.

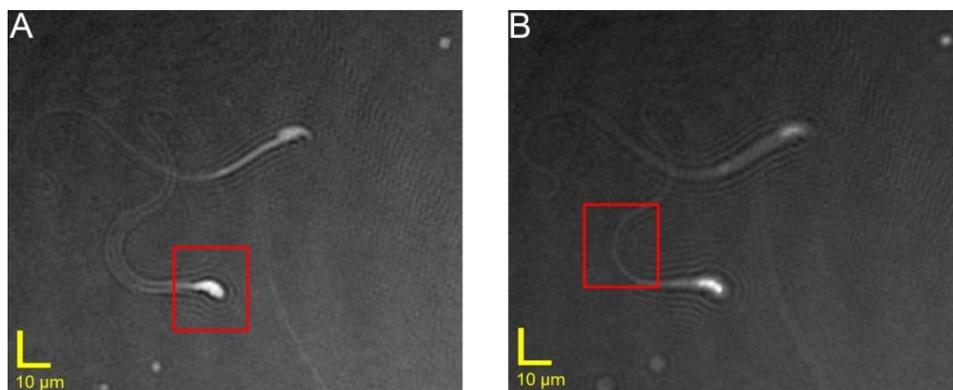


Abbildung 18: Die holografische Aufnahme ermöglicht ein nachträgliches Refokussieren

A zeigt ein Phasenbild bei dem mittels Spyder (Python 2.7) der Kopf des Spermatozoons fokussiert wurde. In B wurde durch Änderung der Rekonstruktionsparameter das Flagellum scharf abgebildet. Die Aufnahmen erfolgten mittels eines 20x Objektivs.

Die Rekonstruktion verschiedener Objektebenen aus einem Hologramm, sowie die Verarbeitung der gespeicherten Hologramme erfolgten computergestützt mit Hilfe von Koala (Version 6) und einem anwendungsspezifischem Spyder Skripts (Python 2.7). Spyder ist eine frei zugängliche, plattformübergreifende, integrierte Entwicklungsumgebung, die für wissenschaftliche Programmierungen in der Programmiersprache Python genutzt wird. Mittels der Projektion konnte der nun in allen Einzelframes eines Videos scharf abgebildete Spermatozoonkopf getrackt werden (Abbildung 19A), sodass der Weg, den der Spermatozoonkopf und damit auch das Spermatozoon, in 3D zurücklegt nachverfolgt und ausgewertet werden konnte. Das X-, Y- und Z-Tracking der Spermatozoonköpfe basierte auf der Detektion der XY Position eines Partikels in jedem Bild der Serienaufnahme, sowie auf der Detektion der Fokusposition Z und der Wegverfolgung des Partikels anhand der X- und Y-Koordinaten in Abhängigkeit von der Zeit. Daraus resultierte eine Textdatei mit den X-, Y- und Z-Daten für jedes Partikel und für jede Projektion. Die Kalkulation der XY-Ebene der Projektionen in verschiedenen Fokalebene mittels der Koala-Software (Version 6) erfolgte anhand der von den Spermatozoonköpfen erzeugten höheren Phasenverschiebung (Colomb et al., 2010; Rappaz et al., 2005). Der höhere Brechungsindex des Spermatozoonkopfs im Vergleich zum Medium resultiert in einer Erhöhung des Phasensignals. Anhand der X-, Y- und Z-Koordinaten wurde die Trajektorie des Spermatozoons rekonstruiert und in einem dreidimensionalen Koordinatensystem visualisiert (Abbildung 19B). Die 3D Visualisierung der Schwimmtrajektorie erfolgte zusätzlich durch die Verwendung einer Gizmo Funktion in IgorPro™ (Version 6.36) nach Einstellung der Schwimmtrajektorie in die Frontalansicht (Abbildung 19C).

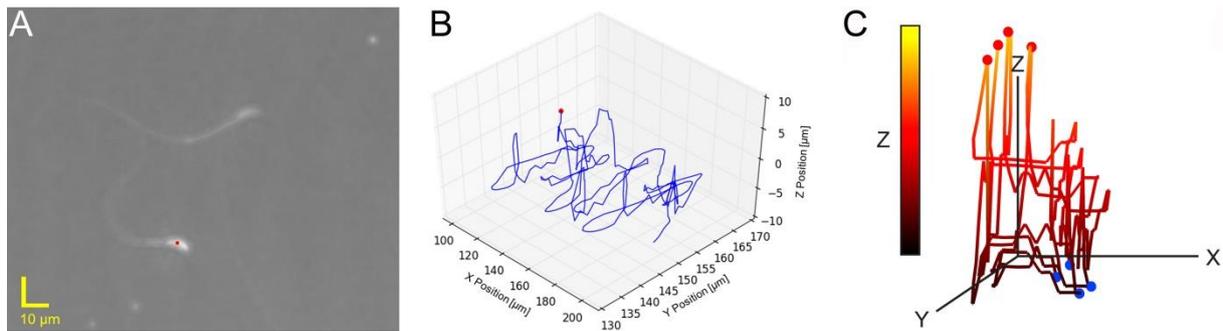


Abbildung 19: Rekonstruktion der vierdimensionalen Schwimmtrajektorie von Spermatozoen

A zeigt die Projektion eines murinen Spermatozoons in dem der rote Punkt die Koordinaten des Trackings markiert. Das Tracking erfolgte mittels Koala (Version 6) und einem Spydskript (Python 2.7), wodurch die X-, Y- und Z-Koordinaten der Schwimmtrajektorie des Spermatozoons ermittelt wurden. Die Aufnahme erfolgte mittels eines 20x Objektivs. In B ist die mittels der Tracking-Koordinaten erstellte dreidimensionale Trajektorie dargestellt. Die Visualisierung erfolgte mittels Koala (Version 6). Der rote Punkt markiert den Spermatozoenkopf zu Beginn der Aufnahme. C zeigt eine mittels IgorPro™ (Version 6.36) erstellte 3D Darstellung der Schwimmtrajektorie in der Frontalansicht. Die roten Bälle geben den Rollvorgang von LCh zu RCh wieder, die blauen Bälle zeigen die Änderung der Orientierung von RCh zu LCh. Der sich wiederholende Charakter der Schwimmtrajektorie ist durch die Farbkodierung der Z-Achse verdeutlicht.

Die DHM erlaubt ebenfalls die Analyse der Drehbewegung des nicht symmetrischen murinen Spermatozoenkopfs (Abbildung 20A) entlang der Längsachse. Somit kann untersucht werden, ob es sich um eine 360°- oder eine alternierende 180°-Drehung (Rotation) des Kopfs entlang der Längsachse handelt. Der murine hakenförmige Kopf (Breed, 2004; Breed und Yong, 1986) ermöglicht eine Unterteilung in eine konkave sowie konvexe und in eine rechte bzw. eine linke Seite (Abbildung 20A). Dadurch kann die Orientierung des Kopfs als „auf der linken Seite liegend“ (LCh) (Abbildung 20B) oder als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh) beschrieben werden (Abbildung 20D). Der Vorgang des Rollens wird in den rekonstruierten digital holografischen Aufnahmen als „Lichtblitz“ sichtbar (Abbildung 20C). Dabei kommt es zu einer Intensitätszunahme des vom Spermatozoenkopf reflektierten Lichts. Das Rollverhalten entlang der Längsachse von murinen Spermatozoen wurde zusätzlich anhand von Intensitätsmessungen mittels eines Plug-Ins aus der MBF Kollektion für ImageJ (Version 1.50i) untersucht.

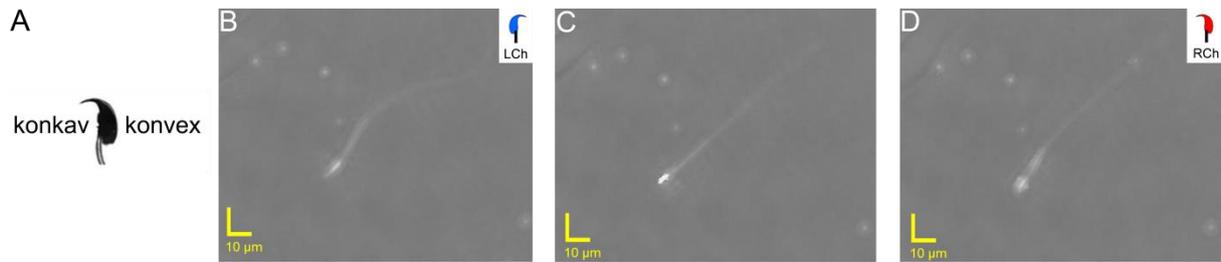


Abbildung 20: Rollverhalten entlang der Längsachse muriner Spermatozoen

A gibt schematisch die Morphologie des murinen Spermatozoonkopfs wieder, welche eine Unterscheidung in eine konkave und konvexe Seite erlaubt. In den Abbildungen B-D sind Projektionen dargestellt, in denen der Rollvorgang eines murinen Spermatozoonkopfs von der linken Seite des Kopfes auf die rechte Seite zu sehen ist. Die schematische Darstellung des Kopfes gibt jeweils die Orientierung als „auf der linken Seite liegend“ (LCh) oder als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh) wieder. Die Orientierung wurde zusätzlich farblich unterschieden (blau= LCh, rot= RCh). Die Aufnahmen erfolgten mittels eines 20x Objektivs.

Des Weiteren kann die Drehrichtung (Chiralität) der Rollbewegung um die Spermatozoonachse beurteilt werden. Dafür wurden Videosequenzen anhand der rekonstruierten Projektionen erstellt und durch drei unabhängige Beobachter beurteilt. Bei der Chiralität wurde unterschieden zwischen einer Drehung des Spermatozoonkopfs im Uhrzeigersinn (CW, „Clockwise“) oder einer Drehung gegen den Uhrzeigersinn (CCW, „Counter-Clockwise“). Die Beurteilung der Chiralität erfolgte aus der Perspektive, dass das Spermatozoon auf den Beobachter zu schwimmt. Anhand der hakenförmigen Morphologie des Spermatozoonkopfs konnte visuell bestimmt werden, ob es sich um eine CW oder CCW Rollbewegung handelte. Die Ermittlung der Chiralität der gesamten Schwimmtrajektorie erfolgte mittels Procrustesanalysen, die häufig für morphometrische Analysen verwendet werden (Klingenberg, 2016). Dafür wurden die zu vergleichenden Formen mittels Symmetrieverfahren (Translation, Rotation und Skalieren) übereinandergelegt, sodass der minimalste Abstand (Procrustes Abstand) zwischen den beiden Formen erreicht wurde. Anschließend wurden die ersten X- und Y-Koordinaten jedes Rollzyklus in den Ursprung verlagert. Die Chiralitätsbestimmung der Schwimmtrajektorie erfolgte zunächst visuell. Anschließend wurden die Zeitpunkte der Änderungen gegen dessen Winkel (θ) bestimmt und die Mittelwerte der zeitlichen Ableitung des Winkels ($d\theta/dt$) in Radian/s ermittelt. Ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert gibt eine CW Chiralität und ein negativer gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert eine CCW Chiralität der Schwimmtrajektorie wieder.

Neben der Analyse der Schwimmtrajektorie wurden ebenfalls Bewegungsanalysen des Flagellums durchgeführt. Die Ermittlung der X-, Y- und Z-Koordinaten des Flagellums erfolgte anhand der rekonstruierten XY Projektionen (Abbildung 21A).

Dafür wurden der Kontrast und die Helligkeit der XY-Projektionen mittels der Auto-Anpassungsfunktion von ImageJ (Version 1.50i) bearbeitet (Abbildung 21B). Um die X- und Y-Positionen des Flagellums zu erhalten, wurde eine Schritt-für-Schritt („frame-by-frame“)-Analyse des Flagellenschlags unter Verwendung eines spezifischen Makros in IgorPro™ (Version 6.36, Wavemetrics) durchgeführt. Bei Verwendung des 20x oder 40x Objektivs wurde ein P/U-Wert von 3,74654 bzw. 7,4931 eingesetzt. Der P/U Wert ist definiert als der Quotient der verwendeten Vergrößerung des Mikroskops und der Pixelgröße der CCD-Kamera (avA1000-100gm, Basler AG). Dafür wurde das Flagellum auf den kontrastoptimierten Projektionen in Form von 1 μm weit auseinanderliegenden Punkten in IgorPro™ (Version 6.36) markiert (Abbildung 21C). Die Generierung der Z-Koordinaten des Flagellums erfolgte anhand der X- und Y-Koordinaten mittels eines spezifischen Skripts in Spyder (Python 2.7) und unter Verwendung der Koala-Software (Version 6). Neben der Generierung der Z-Koordinaten wurde eine Projektion erstellt, bei der die Tracking-Punkte entlang des Flagellums mit dem Phasenbild überlagert wurden (Abbildung 21D). Anschließend wurden die Z-Werte des Flagellums durch die Verwendung eines polynomialen Fits (Polyfit) (7. Polynom) in IgorPro™ (Version 6.36) geglättet. Zuletzt kann anhand der dreidimensionalen Daten die Flagellenbewegung mittels DHM in allen drei Ebenen (XY, XZ und YZ) dargestellt werden (Abbildung 21E). Des Weiteren ermöglicht der Einbezug der vierten Dimension (Zeit), eine vierdimensionale Visualisierung der Flagellenbewegung. Für die Analyse der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene können die geglätteten Z-Werte gegen die kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$) mittels IgorPro™ (Version 6.36) aufgetragen werden.

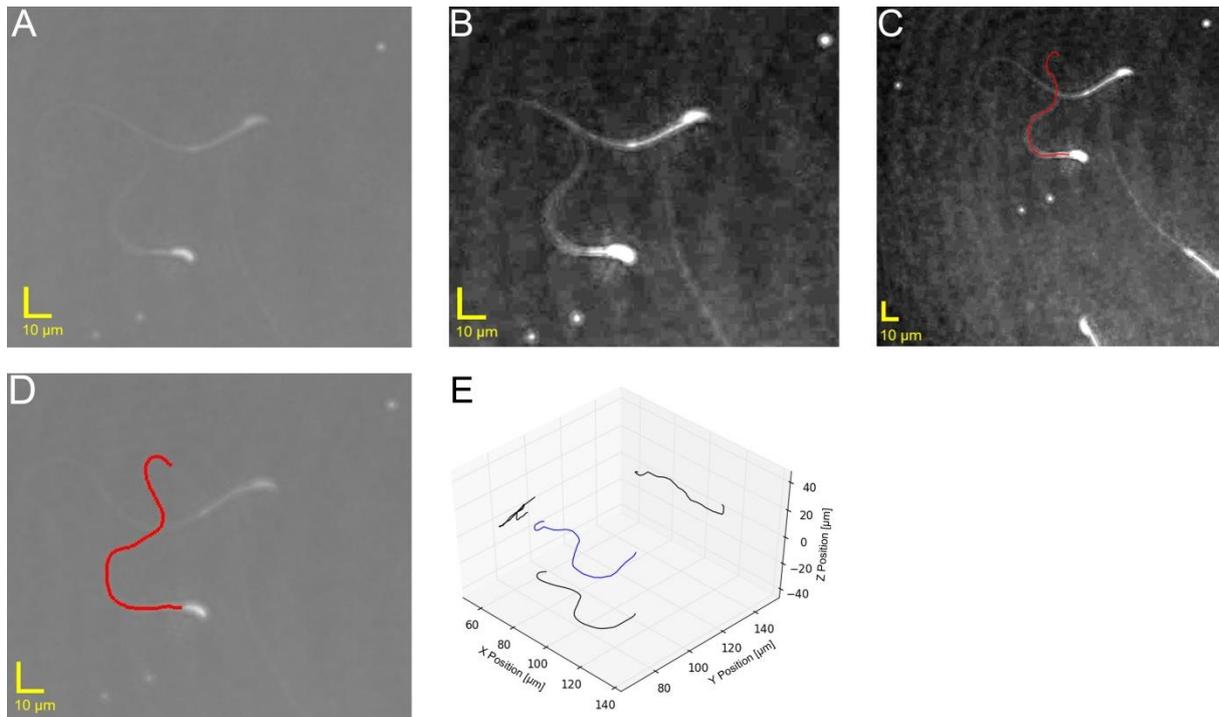


Abbildung 21: Vierdimensionale Flagellenanalyse muriner Spermatozoen mittels DHM

A zeigt die Projektion eines murinen Spermatozoons ausgehend von dem Phasenbild. In B ist die mittels ImageJ (Version 1.50i) kontrast- und helligkeitsoptimierte Projektion dargestellt. C zeigt das Tracking des Flagellums anhand der kontrastoptimierten Projektionen mittels IgorPro™ (Version 6.36). In D ist eine Projektion dargestellt, bei der die Tracking-Punkte entlang des Flagellums mit dem Phasenbild überlagert wurden. Dies erfolgte unter Verwendung der Koala (Version 6) und der Spyder Software (Python 2.7). E stellt die Flagellenbewegung in allen drei Ebenen (XY, XZ und YZ) mittels DHM dar.

7.7.2 Digital holografische Messung von murinen Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte

Für die Analyse des Schwimmverhaltens von murinen unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte sowie zur Oozyte mit Kumuluszellschicht wurden die Spermatozoen zunächst aus dem Ductus epididymidis und dem Ductus deferens präpariert (Kapitel 7.1.1.1). Die Hälfte der Spermatozoensuspension wurde für 1 h kapazitiert (Kapitel 7.1.2). Währenddessen erfolgte die Messung der unkapazitierten Spermatozoen in HS-Puffer. Dafür wurde jeweils eine Oozyte mit oder ohne Kumuluszellen in eine Messkammer mit einer Kammertiefe von 100 μm (Leja Products B.V.) übertragen. Nach Zugabe von 15 μl der Spermatozoensuspension (5×10^6 Zellen/ml) erfolgte die Messung am Digital Holografischen Mikroskop. Nach 1 h wurden die kapazitierten Spermatozoen zunächst in HS-Puffer überführt (2,5 min bei 1.800 rpm) und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Messung der kapazitierten Spermatozoen mittels

DHM erfolgte analog zu der Messung der unkapazitierten Spermatozoen. Alle Aufnahmen wurden mit einem 20x Objektiv auf einer Wärmeplatte (Okolab) bei 37°C aufgenommen.

7.7.3 Digital holografische Messung von murinen Spermatozoen mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads

Um den Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf das vierdimensionale Schwimmverhalten von murinen kapazitierten Spermatozoen zu untersuchen, wurden die zuvor präparierten Spermatozoen (Kapitel 7.1.1.1) wie in Kapitel 7.1.2 beschrieben kapazitiert und die Zellzahl auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Für die Messung am Digital Holografischen Mikroskop wurden 15 μ l der mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beadsuspension (Kapitel 7.4.3) in eine Messkammer mit einer Kammertiefe von 100 μ m (Leja Products B.V.) überführt und 15 μ l der Spermatozoensuspension hinzugefügt. Analog wurde die Messung mit unbeladenen Sepharosebeads durchgeführt. Anschließend wurden 4D Aufnahmen von kapazitierten Spermatozoen in Kapazitationspuffer mit 100 μ g/ml muZP2 Glykoprotein durchgeführt, um den Einfluss des muZP2 Glykoproteins ohne Sepharosebeads zu analysieren. Alle Aufnahmen erfolgten mittels eines 20x Objektivs, bei RT und in Kapazitationspuffer.

8 Ergebnisse

Veränderungen in der Spermatozoenmotilität bishin zur Immotilität können Gründe für die männliche Infertilität sein (Nieschlag et al., 2010; WHO, 2000). Voraussetzung für die Fertilisation, die Fusion von Spermatozoon und Oozyte, ist ein komplexer Selektionsprozess eines einzelnen Spermatozoons aus einem Pool von Millionen von Zellen (Miki und Clapham, 2013). Für die Fertilisation auf natürlichem Wege ist eine geregelte Motilität von Spermatozoen essentiell (Hino et al., 2016; Ishikawa et al., 2016; Miki und Clapham, 2013). Nachdem die Motilität als essentieller Faktor für eine erfolgreiche Befruchtung erkannt wurde, wurden viele Studien zum Schwimmverhalten (Babcock et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Nosrati et al., 2015), zur Flagellenbewegung (Brokaw, 2009, 2014; Friedrich et al., 2010; Lindemann und Lesich, 2010; Woolley, 2010), zum Signalweg, der die Bewegung kontrolliert und zum Aufbau des Flagellums (Awata et al., 2015; Heuser et al., 2012a; Ounjai et al., 2012; Satir et al., 2014) durchgeführt. Trotz dieser essentiellen Erkenntnisse ist die Spermatozoenselektion noch nicht vollständig charakterisiert und ihre Rolle bei der Befruchtung der Oozyte nicht geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Flagellenbewegung sowie das Bewegungsmuster muriner unkapazitierter Spermatozoen in 4D zu untersuchen. Für diese Analyse wurde die DHM als Methode für vierdimensionale Bewegungsanalysen von Spermatozoen in dieser Arbeit etabliert. Die Etablierung der DHM ist im Methodenteil im Kapitel 7.7.1 dargestellt. Im Anschluss sollte anhand von digital holografischen Aufnahmen der Einfluss von rekombinantem murinen ZP2 Glykoprotein auf das vierdimensionale Schwimmverhalten muriner kapazitierter Spermatozoen analysiert werden. Abschließend wurden mögliche Veränderungen des Bewegungsmusters von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht untersucht.

8.1 Etablierung der Digital Holografischen Mikroskopie für 4D Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens

8.1.1 4D Analyse des Flagellenschlags von freischwimmenden und adhärenen murinen Spermatozoen

Detaillierte Erkenntnisse über die Architektur des Spermatozoenflagellums und sein 9+2 Axonem konnten bereits gewonnen werden (Heuser et al., 2012a; Heuser et al., 2012b; Inaba, 2011; Lindemann, 1996; Ounjai et al., 2012). Wie dieser Aufbau zur Initiierung und Ausbreitung der wellenförmigen Flagellenbewegung beiträgt, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Brokaw, 2009, 2014; Geyer et al., 2016; Ishijima, 2016; Lindemann und Lesich, 2010, 2016; Woolley, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde der Flagellenschlag von Mäusen in 4D analysiert sowie quantitative Untersuchungen der vierdimensionalen Wellenform des Flagellums durchgeführt, um Hinweise auf unterschiedliche Schlagmuster der Flagellen zu erhalten. Diese Analysen sollen dazu beitragen, die Flagellenbewegung genauer zu charakterisieren, um zu einem besseren Verständnis der fundamentalen Prinzipien des Selektionsprozesses beizutragen. Für diese 4D Analysen des Flagellenschlags wurden mittels DHM Hologramme muriner unkapazitierter Spermatozoen aufgenommen. Die Projektionen wurden verwendet, um den Weg eines freischwimmenden, unkapazitierten Spermatozoons innerhalb einer 2,2 s langen holografischen Aufnahme zu analysieren (Abbildung 22A). Dafür wurde jeweils der Mittelpunkt des Kopfs über die gesamte Zeitspanne der Aufnahme markiert (getrackt, Tracking). Abbildung 22A zeigt das letzte rekonstruierte Bild („Frame“) der Aufnahme und die während dieser Zeit zurückgelegte Trajektorie des Spermatozoons (grüne Linie). Die Analyse des Flagellums erfolgte durch eine Schritt-für-Schritt („frame-by-frame“) Markierung. Abbildung 22B zeigt die XY-Auslenkungen des Flagellenschlags innerhalb eines Schlagzyklus (0,32 s), wodurch eine Schlagfrequenz von 3 Hertz (Hz) ermittelt wurde. Die Distanz zwischen der maximalen und minimalen Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene lag bei 18 μm (weiße Linien).

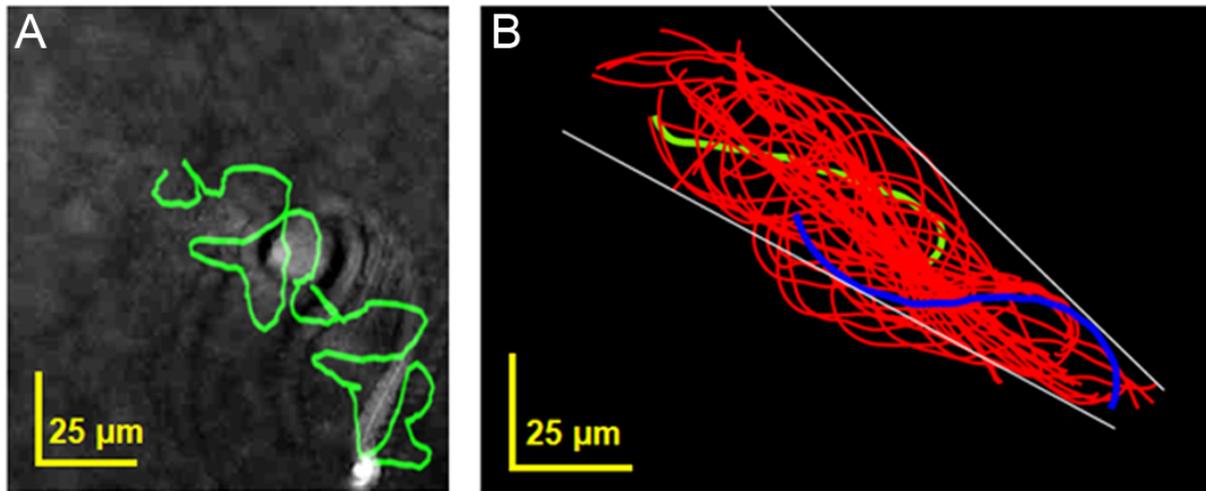


Abbildung 22: Auslenkung des Flagellums in der XY-Ebene eines freischwimmenden, unkapazitierten murinen Spermatozoons

A. Abgebildet ist repräsentativ der zurückgelegte Weg in der XY-Ebene eines unkapazitierten Spermatozoons ($n=15$, vier biologische Replikate). Die XY-Koordinaten des Mittelpunkts des Spermatozoenkopfs wurden über die gesamte Zeitspanne von 2,2 s mittels ImageJ (Version 1.50i) detektiert. Anschließend wurde die Trajektorie mittels Photoshop auf das letzte rekonstruierte Bild der 2,2 s langen Aufnahme übertragen. B. Die Abbildung zeigt die Auslenkungen des Flagellenschlags innerhalb eines Schlagzyklus (0,32 s) in der XY-Ebene, aufgenommen mit 100 fps. Die grüne Linie gibt die erste und die blaue Linie die letzte Flagellenauslenkung innerhalb des Schlagzyklus wieder. Die Distanz zwischen der maximalen Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene liegt bei 18 μm (weiße Linien).

Anschließend wurden die Z-Werte anhand der X- und Y-Daten aus dem manuellen Flagellen-Tracking mittels eines Skripts in der Spyder-Software (Python 2.7) und unter Verwendung der Koala-Software (Version 6) berechnet, um den Flagellenschlag muriner unkapazitierter Spermatozoen weiter zu charakterisieren. In Abbildung 23A ist die Z-Auslenkung des Flagellenschlags gegen die kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$), gemessen in μm , aufgetragen. Die Auslenkung in der Z-Ebene für das erste Frame des Schlagzyklus ist grün und die der weiteren Frames (2 bis 21) sind schwarz dargestellt. Abbildung 23A zeigt eine wellenförmige Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene. Die Amplitude des Flagellenschlags in der Z-Ebene lag bei 19 μm und ist mit der Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene (18 μm) vergleichbar. Die Flagellenauslenkungen der rekonstruierten Aufnahme aus Abbildung 22 erzeugen eine Matrix aus x-, y-, z- und t-Werten, wodurch eine vierdimensionale Darstellung des Flagellums möglich ist. Abbildung 23B zeigt die Flagellenauslenkung zu Beginn der Aufnahme ($t=0$ s). Die blaue Linie gibt die Bewegung des Flagellums im dreidimensionalen Raum wieder, während die schwarzen Linien die Projektionen der Bewegung des Flagellums in der XY-, XZ- und YZ-Ebene zeigen. Es konnte für

freischwimmende, unkapazitierte Spermatozoen eine nicht-planare, wellenförmige Flagellenbewegung detektiert werden.

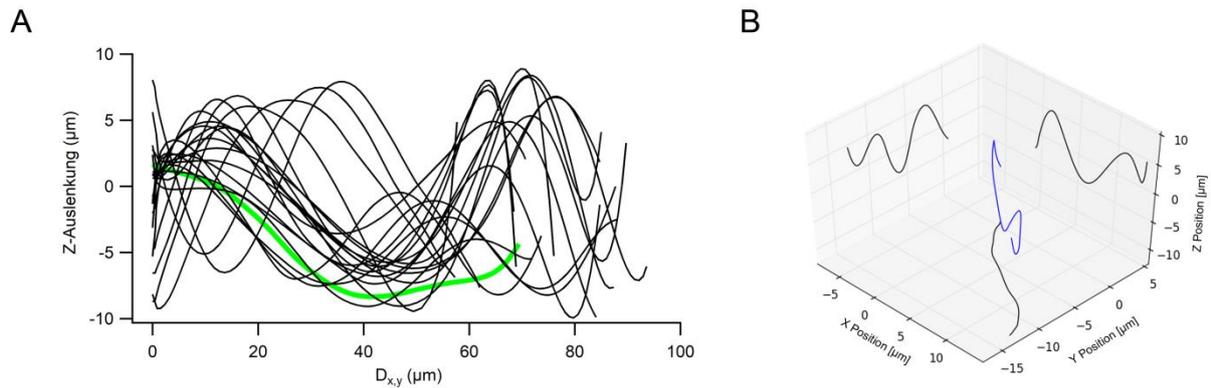


Abbildung 23: Wellenförmige Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene eines freischwimmenden, unkapazitierten murinen Spermatozoons

A. Abgebildet ist die wellenförmige Z-Auslenkung eines repräsentativen freischwimmenden, unkapazitierten Spermatozoons ($n=15$, vier biologische Replikate). Die Z-Werte wurden anhand der XY-Koordinaten aus dem Flagellen-Tracking (Abbildung 22B) und der holografischen Aufnahmen mittels eines Skripts in Spyder rekonstruiert. Die Z-Werte wurden durch die Verwendung eines Polyfits des 7. Polynoms geglättet und gegen die kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$) aufgetragen. Die Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene für das erste Frame des Schlagzyklus ist grün und die der weiteren Frames (2 bis 21) sind schwarz. B. Dargestellt ist das Flagellum im dreidimensionalen Raum desselben Spermatozoons (blau) und seine Projektionen in der XY-, XZ- und YZ-Ebene (schwarz).

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte anhand von 2D Hochgeschwindigkeitsaufnahmen („High-speed“-Aufnahmen) gezeigt werden, dass der Weg, den ein Spermatozoon zurücklegt, durch vorübergehendes Andocken und Loslösen an bzw. von Umgebungsstrukturen bestimmt wird (Babcock et al., 2014). Um ein besseres Verständnis dieses Prozesses zu erlangen, wurde der dreidimensionale Flagellenschlag adhärenter muriner unkapazitierter Spermatozoen mittels DHM untersucht. Diese Spermatozoen binden mit dem Kopf an die Oberfläche der Messkammer und sind somit nicht mehr in der Lage sich frei zu bewegen. In der oberen Grafik der Abbildung 24A sind die XY-Auslenkungen innerhalb eines Schlagzyklus (0,38 s) eines adhärenten Spermatozoons dargestellt, wodurch eine Schlagfrequenz von 3 Hz ermittelt wurde. Die Distanz zwischen der maximalen Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene lag bei $14 \mu\text{m}$. Der Kopf des adhärenten Spermatozoons bewegte sich bogenförmig, ohne dass eine Fortbewegung des Spermatozoons detektiert werden konnte (Abbildung 24A, untere Grafik). Die Berechnung der Z-Werte des Flagellums erfolgte für adhärenente Spermatozoen analog zu der Berechnung der Z-Werte von freischwimmenden Spermatozoen. In Abbildung 24B ist die Z-Auslenkung des Flagellums gegen die

kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$) aufgetragen. Analog zu freischwimmenden murinen Spermatozoen konnte eine wellenförmige Bewegung des Flagellums in der Z-Ebene detektiert werden (Abbildung 24B). Die maximale Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene lag für adhärenente Spermatozoen bei $12\ \mu\text{m}$ und war damit vergleichbar mit der Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene ($14\ \mu\text{m}$). Während für freischwimmende Spermatozoen sowohl positive als auch negative Z-Auslenkungen am proximalen Teil des Flagellums detektiert werden konnten (Abbildung 23A), zeigten adhärenente Spermatozoen ausschließlich eine negative Auslenkung (Abbildung 24B). Es konnten Auslenkungen des Flagellenschlags in der Z-Ebene sowohl bei freischwimmenden als auch bei adhärenenten Spermatozoen detektiert werden.

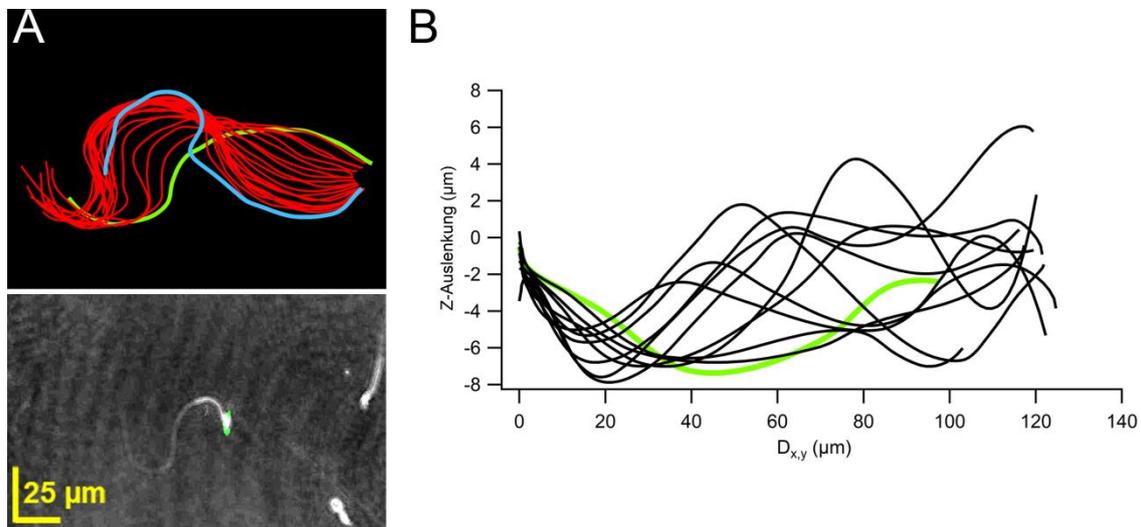


Abbildung 24: Wellenförmige Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene eines adhärenenten murinen unkapazitierten Spermatozoons

A. Die obere Abbildung zeigt repräsentativ die Auslenkungen des Flagellums innerhalb eines Schlagzyklus ($0,38\ \text{s}$) in der XY-Ebene eines adhärenenten Spermatozoons ($n=9$, vier biologische Replikate), aufgenommen mit $100\ \text{fps}$. Die grüne Linie gibt die erste und die blaue Linie die letzte Flagellenauslenkung innerhalb des Schlagzyklus wieder. Die maximale Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene liegt bei $16\ \mu\text{m}$. Die untere Abbildung zeigt den zurückgelegten Weg in der XY-Ebene eines unkapazitierten adhärenenten Spermatozoons innerhalb einer $3\ \text{s}$ langen holografischen Aufnahme (grüne Linie). B. Dargestellt ist die Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene (Y-Achse) eines adhärenenten unkapazitierten Spermatozoons für einen Schlagzyklus. Auf der X-Achse ist die kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$) aufgetragen. Die Auslenkung in der Z-Ebene für das erste Frame des Schlagzyklus ist grün und die der weiteren Frames ($40, 42, \dots, 60$) sind schwarz.

8.1.2 4D Analyse der Schwimmtrajektorie muriner unkapazitierter Spermatozoen

Die DHM ermöglicht neben der Analyse des Flagellenschlags, ebenfalls die vierdimensionale Analyse der Schwimmtrajektorie von Spermatozoen mittels eines Kopf-Trackings. Durch die lichtbrechenden Eigenschaften des Spermatozoenkopfs ist ein direktes Tracken des Kopfs im dreidimensionalen Raum möglich. Anhand der X, Y- und Z-Daten kann die Trajektorie von Spermatozoen rekonstruiert werden. Abbildung 25 zeigt die Schwimmtrajektorie eines unkapazitierten, freischwimmenden murinen Spermatozoons während einer 1,8 s langen holografischen Aufnahme in der XY-Ebene (A), YZ-Ebene (B) und der XZ-Ebene (C). Die Auslenkungen in der Z-Ebene sind durch den farblichen Verlauf von dunkel-rot (niedrige Z-Werte) nach gelb (hohe Z-Werte) dargestellt.

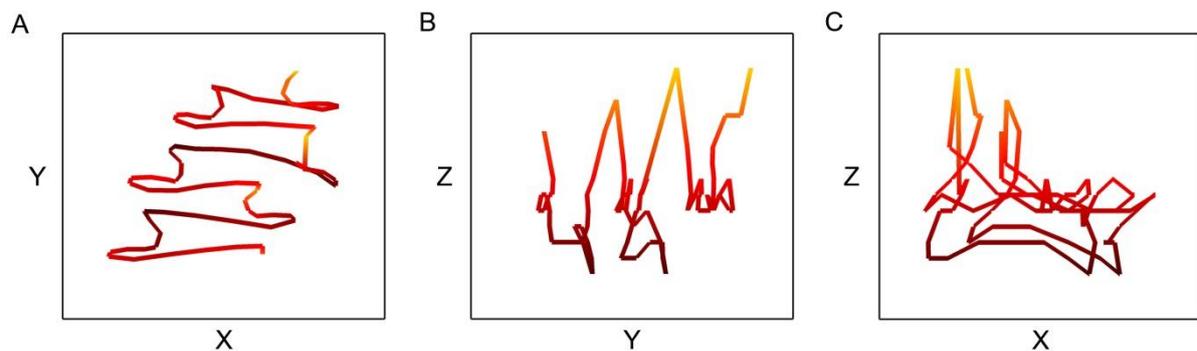


Abbildung 25: Schwimmtrajektorie eines unkapazitierten murinen Spermatozoons

A-C. Die Abbildungen zeigen den Weg des Kopfs eines linear schwimmenden murinen Spermatozoons innerhalb der 1,8 s langen holografischen Aufnahme. Das Kopf-Tracking in der X-, Y- und Z-Ebene erfolgte mittels der Koala-Software. Dargestellt ist die Schwimmtrajektorie in der XY-Ebene (A), der YZ-Ebene (B) sowie in der XZ-Ebene (C).

8.1.3 Untersuchung zum Rollverhalten muriner unkapazitierter Spermatozoen

Die Analyse des Rollverhaltens muriner unkapazitierter Spermatozoen erfolgte anhand der spezifischen Morphologie des Spermatozoenkopfs. Der murine hakenförmige Kopf ermöglicht eine Unterteilung in eine konkave sowie konvexe bzw. in eine rechte und in eine linke Seite (Abbildung 26A). Dadurch kann die Orientierung des Kopfs als „auf der linken Seite liegend“ (LCh) (Abbildung 26B) oder als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh) (Abbildung 26D) beschrieben werden. Der Vorgang des Rollens wird in den rekonstruierten digital holografischen Aufnahmen als „Lichtblitz“ sichtbar (Abbildung 26C).

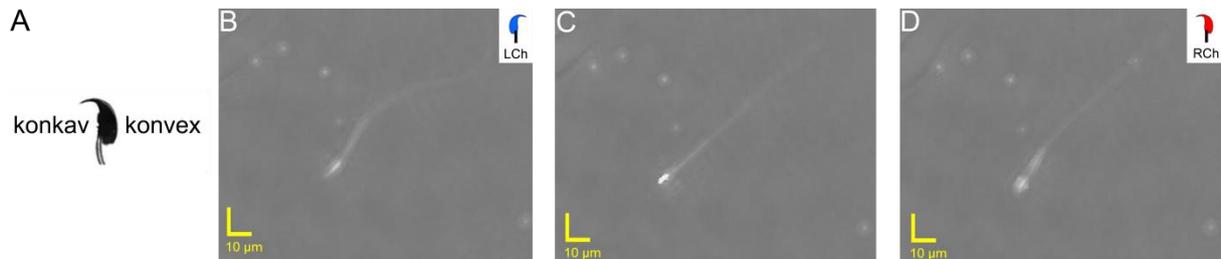


Abbildung 26: Rollverhalten entlang der Längsachse muriner Spermatozoen

A. Schematische Darstellung der Morphologie eines murinen Spermatozoenkopfs, welche eine Unterscheidung in eine konkave und konvexe Seite erlaubt. B-D. In den Abbildungen sind Projektionen dargestellt, in denen der Rollvorgang eines murinen Spermatozoons von der linken Seite des Kopfes auf die rechte Seite zu sehen ist. Die schematische Darstellung des Kopfes gibt jeweils die Orientierung als „auf der linken Seite liegend“ (LCh) oder als „auf der rechten Seite liegend“ (RCh) an. Die Orientierung wurde zusätzlich farblich unterschieden (blau= LCh, rot= RCh). Die Aufnahmen erfolgten mittels eines 20x Objektivs.

Beim Rollvorgang kommt es zu einer Intensitätszunahme des vom Spermatozoenkopf reflektierten Lichts (Abbildung 27A). Diese Beobachtung konnte bereits in Vorarbeiten anhand von konventionellen mikroskopischen Aufnahmen gemacht werden (Babcock et al., 2014). Abbildung 27A zeigt die Intensitätsmessung eines linear schwimmenden unkapazitierten Spermatozoons innerhalb der 3 s langen holografischen Aufnahme. Die roten Balken geben eine RCh-Orientierung des Kopfes und die blauen Balken eine LCh-Orientierung wieder. Die Analyse erfolgte anhand der rekonstruierten Projektionen aus Kapitel 8.1.2. Es konnte eine Intensitätszunahme während des Rollvorgangs detektiert werden (Abbildung 27A). Die DHM ermöglicht durch die Aufnahme von Hologrammen eine Rekonstruktion der Z-Ebene. Dies erlaubt die Analyse der Drehbewegung des nicht symmetrischen murinen Spermatozoenkopfs und somit die Beurteilung der Drehrichtung (Chiralität) der Rollbewegung um die Spermatozoenachse. Bei der Chiralität wurde unterschieden zwischen einer Drehung im Uhrzeigersinn (CW) oder einer Drehung gegen den Uhrzeigersinn (CCW). Für die Bestimmung der Chiralität wurden Videosequenzen anhand der rekonstruierten Projektionen erstellt und durch drei unabhängige Beobachter beurteilt. Die Beurteilung der Chiralität erfolgte aus der Perspektive, dass das Spermatozoon auf den Beobachter zu schwimmt. In Abbildung 27A geben die Pfeile die Chiralität des Rollvorgangs wieder. Die Analyse ergab, dass murine unkapazitierte Spermatozoen beim Übergang von RCh auf LCh gegen den Uhrzeigersinn und beim Übergang von LCh auf RCh im Uhrzeigersinn rollen. Murine unkapazitierte Spermatozoen zeigen keine komplette 360°-Drehung um ihre Längsachse, sondern eine über die konvexe Seite des Spermatozoenkopfs ablaufende 180°-Drehung im Uhrzeigersinn gefolgt von einer 180°-Drehung

entgegen dem Uhrzeigersinn. Somit kann eine alternierende Bewegung des Spermatozoonkopfs detektiert werden (Abbildung 27A). In Abbildung 27B ist das Ergebnis der Intensitätsmessung eines nicht rollenden murinen unkapazitierten Spermatozoons dargestellt. Während der gesamten Aufnahme blieb der Spermatozoonkopf in einer Orientierung (LCh), sodass keine Zunahme der Lichtintensität gemessen werden konnte (Abbildung 27B).

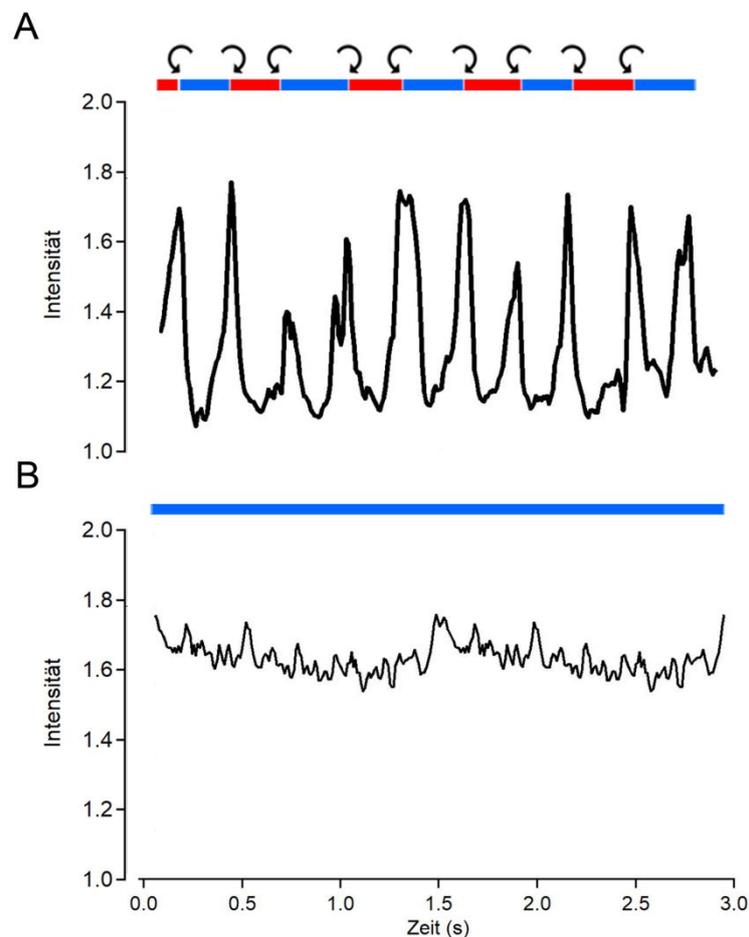


Abbildung 27: Analyse des Rollverhaltens von murinen unkapazitierten Spermatozoen mittels Digital Holografischer Mikroskopie

A. Abgebildet ist die oszillierende Lichtintensität (Y-Achse), des vom rollenden Spermatozoonkopf gestreuten Lichts pro Zeit eines repräsentativen freischwimmenden, unkapazitierten murinen Spermatozoons ($n=10$, vier biologische Replikate). Die daraus resultierenden roten und blauen Balken zeigen die Zeit mit einer RCh- oder LCh-Orientierung an, die weißen Felder die Bereiche in denen das Spermatozoon weder eine RCh-, noch eine LCh-Orientierung besitzt und die Pfeile jeweils das Rollverhalten entlang der Längsachse im oder gegen den Uhrzeigersinn. B. Repräsentative Darstellung eines nicht rollenden Spermatozoons ($n=5$, drei biologische Replikate) ohne transientser Intensitätszunahme des reflektierten Lichts mit Verbleib in einer LCh-Orientierung (blauer Balken).

Vorarbeiten an murinen freischwimmenden Spermatozoen konnten zeigen, dass der asymmetrische Spermatozoonkopf durch alternierendes Rollen eine lineare Bewegungsrichtung sicherstellen kann und dass ein Spermatozoon, das keine

alternierende 180°-Drehung des Kopfs zeigt, eine kreisförmige Trajektorie besitzt (Babcock et al., 2014). In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Rollvorgangs auf die dreidimensionale Schwimmtrajektorie muriner unkapazitierter Spermatozoen mittels der am Digital Holografischen Mikroskop generierten Kopf-Tracking-Daten untersucht. Abbildung 28A zeigt die dreidimensionale Schwimmtrajektorie des unkapazitierten, freischwimmenden, rollenden murinen Spermatozoons aus Abbildung 27A. Die roten Bälle geben einen Rollvorgang von LCh nach RCh wieder, die blauen Bälle eine Änderung der Orientierung von RCh nach LCh. Die zusätzliche Verwendung eines Farbverlaufs für die Z-Auslenkung, von dunkel-rot (niedrige Z-Werte) zu gelb (hohe Z-Werte), gibt den sich wiederholenden helikalen Charakter der Schwimmtrajektorie wieder. Abbildung 28B zeigt die rekonstruierte Schwimmtrajektorie des nicht rollenden Spermatozoons aus Abbildung 27B. Die dreidimensionale Visualisierung verdeutlicht, dass nicht rollende Spermatozoen eine kreisförmige Schwimmtrajektorie besitzen und dass eine LCh-Orientierung mit einer CW-Bewegung korreliert. Es konnten geringere Auslenkungen des Kopfs in der Z-Ebene für nicht rollende Spermatozoen im Vergleich zu rollenden Spermatozoen identifiziert werden (Abbildung 28).

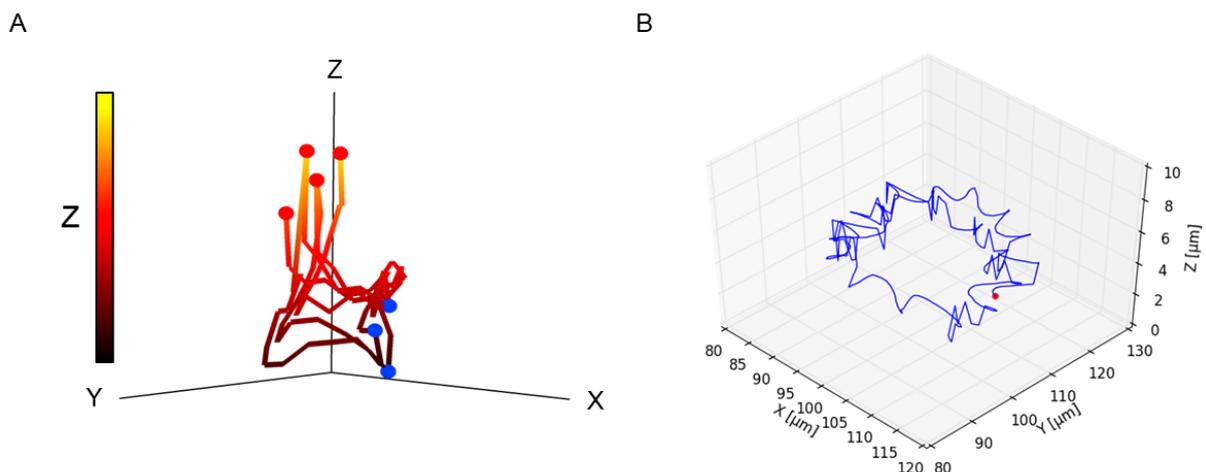


Abbildung 28: Vierdimensionale Darstellung der Schwimmtrajektorie von rollenden und nicht rollenden, unkapazitierten murinen Spermatozoen

A. Repräsentative Darstellung der Schwimmtrajektorie eines freischwimmenden, rollenden Spermatozoons in 3D (n=15, vier biologische Replikate). Die roten Bälle geben den Rollvorgang von LCh zu RCh wieder, die blauen Bälle zeigen die Änderung der Orientierung von RCh zu LCh. Die Trajektorie ist in der Frontalansicht dargestellt. Der sich wiederholende Charakter der Schwimmtrajektorie ist durch die Farbkodierung der Z-Achse verdeutlicht. Skalierung der Achsen: X: -20-30 µm, Y: -2-8 µm, Z: -8-15 µm. B. Gezeigt ist eine zirkuläre Schwimmtrajektorie eines repräsentativen freischwimmenden, nicht rollenden Spermatozoons in 3D (n=5, drei biologische Replikate). Das Spermatozoon bleibt während der 3 s langen Aufnahme in der LCh-Orientierung und zeigt eine Trajektorie im Uhrzeigersinn.

Um den Zeitpunkt des Rollens genauer zu charakterisieren, wurde das Ergebnis der Intensitätsmessung (Abbildung 27) mit der dreidimensionalen Trajektorie (Abbildung 28) verglichen. Hierbei zeigt sich, dass der Rollvorgang von RCh nach LCh (blaue Bälle) bei der maximalen negativen Auslenkung in der Z-Ebene stattfindet. Äquivalent dazu erfolgt die Änderung von einer LCh- auf eine RCh-Orientierung (rote Bälle) bei der maximalen positiven Auslenkung in der Z-Ebene (Abbildung 28). Es konnte gezeigt werden, dass der Rollvorgang der Spermatozoen entlang der Längsachse mit den Bewegungen in der Z-Ebene koordiniert wird.

8.1.4 Chiralitätsanalyse der Schwimmtrajektorie muriner unkapazitierter Spermatozoen

Mittels der dreidimensionalen Koordinaten des Kopf-Trackings kann ebenfalls die Chiralität der gesamten Schwimmtrajektorie analysiert werden. In Abbildung 29A ist die Schwimmtrajektorie des Spermatozoons aus dem Kapitel 8.1.2 in der XY-Ebene dargestellt. Die Trajektorie besteht aus drei Rollzyklen, wobei ein Rollzyklus als die Änderung der Kopforientierung von RCh zu LCh zu RCh definiert ist (Abschnitt zwischen zwei roten Bällen, 180°). Die Ermittlung der Chiralität der Schwimmtrajektorie erfolgte mittels Procrustesanalysen, die häufig für morphometrische Analysen verwendet werden (Klingenberg, 2016). Es handelt sich hierbei um eine statistische Methode, um zwei oder mehr Formen miteinander zu vergleichen. Eine Form ist hierbei definiert als die Konfiguration von Datenpunkten in einer Matrix. Die zu vergleichenden Formen wurden mittels Symmetrieverfahren (Translation, Rotation und Skalieren) so übereinandergelegt, dass der minimalste Abstand (Procrustes-Abstand) zwischen den beiden Formen erreicht wurde. Bei der Translation handelt es sich um eine geometrische Transformation, bei der jeder Punkt einer Form um dieselbe Distanz und in dieselbe Richtung bewegt wird, sodass beim Vergleich verschiedener Formen, alle denselben Flächenmittelpunkt (Zentroid) besitzen. Beim Skalieren werden Formen durch einen spezifischen Streckfaktor in alle Richtungen vergrößert oder verkleinert, bis sie alle dieselbe Zentroidgröße besitzen. Zusätzlich werden die Formen um einen fixen Punkt bewegt bis die minimalste Distanz zwischen den korrespondierenden Datenpunkten der jeweiligen Formen erreicht ist (Rotation) (Gower, 1975; Mitteroecker et al., 2013; Rohlf, 1999). Um eine Procrustesanalyse durchführen zu können, wurden zunächst die ersten X- und Y-Koordinaten jedes Rollzyklus in den Ursprung verlagert. Anschließend wurde

durch die verschiedenen Symmetrieverfahren die Ähnlichkeit des zweiten Rollzyklus mit dem ersten Rollzyklus maximiert (Abbildung 29B). Abbildung 29B zeigt, dass jeder Rollzyklus mit einer CW Krümmung beginnt, eine hohe Symmetrie zwischen den einzelnen Rollzyklen besteht und dass die Schwimmtrajektorie eine Chiralität im Uhrzeigersinn (CW) aufweist.

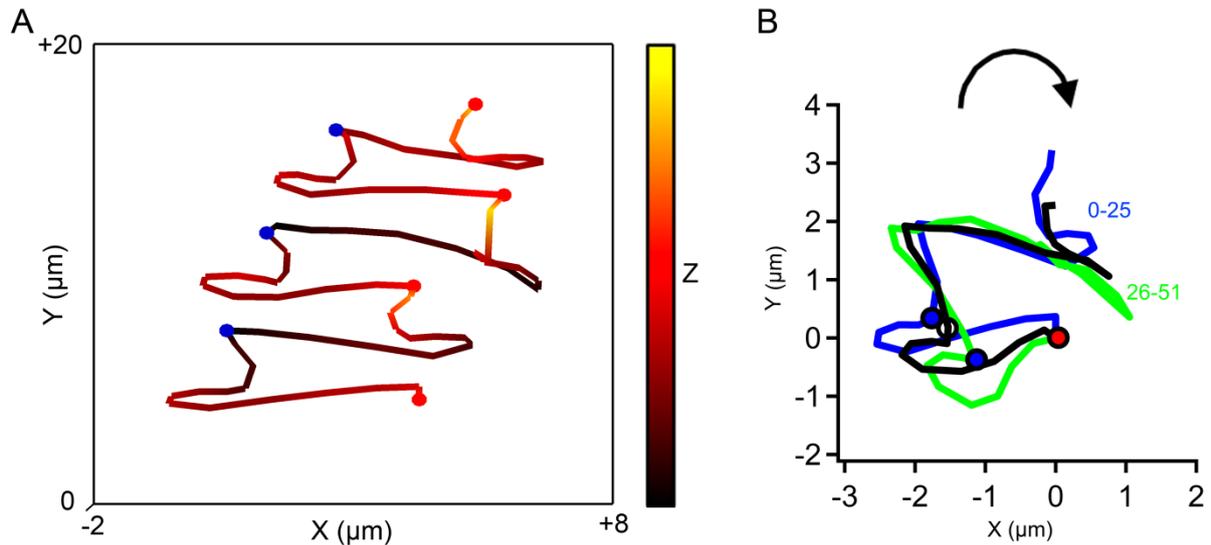


Abbildung 29: Unkapazitierte murine Spermatozoen zeigen eine Schwimmtrajektorie mit einer Chiralität im Uhrzeigersinn

A. Abgebildet ist die Schwimmtrajektorie eines freischwimmenden, rollenden murinen Spermatozoons in 3D aus Abbildung 28A. Die roten Bälle geben den Rollvorgang von LCh zu RCh wieder, die blauen Bälle die Änderung der Orientierung von RCh zu LCh. Die Trajektorie besteht aus drei Rollzyklen. Der sich wiederholende Charakter der Schwimmtrajektorie ist durch die Farbkodierung der Z-Achse verdeutlicht. Auf den Koordinatenachsen sind jeweils die X- und Y-Werte des Kopf-Trackings in µm aufgetragen. B. Dargestellt sind die Procrustesanalysen der Schwimmtrajektorie für die ersten beiden Rollzyklen in der XY-Ebene. Die blaue Trajektorie gibt den ersten (Frame 0-25), die grüne Trajektorie den zweiten Rollzyklus (Frame 26-51) und die schwarze Trajektorie die aus den Einzeltrajektorien gemittelte Trajektorie wieder. Der rote Punkt definiert den Ursprung, während die blauen Punkte und der schwarze Kreis auf der gemittelten Trajektorie den Zeitpunkt des Rollvorgangs darstellen. Auf den Koordinatenachsen sind jeweils die X- und Y-Werte des Kopf-Trackings in µm aufgetragen. Es kann eine hohe Symmetrie der einzelnen Rollzyklen detektiert werden.

Um die CW Chiralität der Schwimmtrajektorie unkapazitierter Spermatozoen als konserviertes Bewegungsmuster zu identifizieren, wurden im Anschluss Procrustesanalysen von unkapazitierten, freischwimmenden Spermatozoen durchgeführt. In Abbildung 30 sind in jedem Koordinatensystem (A-C) jeweils fünf gemittelte Schwimmtrajektorien aus den Procrustesanalysen dargestellt. Die Trajektorien unterscheiden sich im Einzelnen, zeigen jedoch alle zu Beginn des Rollzyklus eine CW Bewegung, gefolgt von einer CCW Bewegung. Durch die Betrachtung der einzelnen gemittelten Schwimmtrajektorien, konnte für alle

untersuchten Spermatozoen eine Chiralität der Schwimmtrajektorie im Uhrzeigersinn identifiziert werden (Abbildung 30).

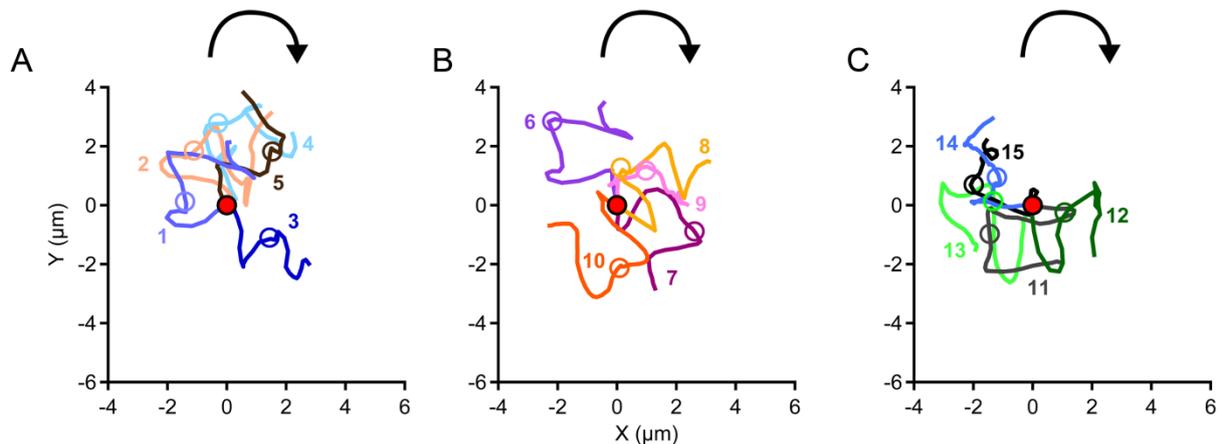


Abbildung 30: Procrustesanalysen zeigen eine konservierte Chiralität der Schwimmtrajektorien

A-C. Dargestellt sind jeweils die gemittelten Schwimmtrajektorien aus der Procrustesanalyse von jeweils fünf untersuchten unkapazitierten murinen Spermatozoen ($n=15$, vier biologische Replikate). Die Schwimmtrajektorie jedes analysierten Spermatozoons ist gekennzeichnet durch zunächst einen Rollzyklus im Uhrzeigersinn, gefolgt von einem Rollzyklus gegen den Uhrzeigersinn. Die Kreise in den Trajektorien geben den Zeitpunkt des Rollvorgangs wieder. Um die Chiralität der einzelnen Schwimmtrajektorien zu verdeutlichen, wurden alle Trajektorien mit ihrem Startpunkt in den Ursprung gelegt (roter Punkt). Die Pfeile geben die Chiralität der Schwimmtrajektorie an. Auf den Koordinatenachsen sind jeweils die X- und Y-Werte des Kopf-Trackings in μm aufgetragen. Für alle untersuchten unkapazitierten murinen Spermatozoen kann eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie nachgewiesen werden.

Für eine objektivere Bestimmung der Chiralität der Trajektorie, wurden die Koordinaten der gemittelten Procrustestrajektorien in Polarkoordinaten umgerechnet. Abbildung 31A zeigt die gemittelte Procrustestrajektorie des ersten Spermatozoons aus Abbildung 30A, übertragen in ein Polarkoordinatensystem. Im Anschluss wurden die Zeitpunkte der Änderungen gegen dessen Winkel (θ) bestimmt und die Mittelwerte der zeitlichen Ableitung des Winkels ($d\theta/dt$) ermittelt, um eine objektivere Analyse der Chiralität zu gewährleisten. In Abbildung 31B sind die gemittelten ($d\theta/dt$)-Werte, gemessen in Radian/s dargestellt. Ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert zeigt eine CW Chiralität an. Die gewählte Farbkodierung aus Abbildung 31B entspricht der Farbkodierung in Abbildung 30. Für alle untersuchten Spermatozoen konnte ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert bestimmt werden (Abbildung 31B). Diese Analyse weist die CW Chiralität der Schwimmtrajektorie als ein gemeinsames Merkmal der unter diesen Bedingungen gemessenen murinen unkapazitierten Spermatozoen nach.

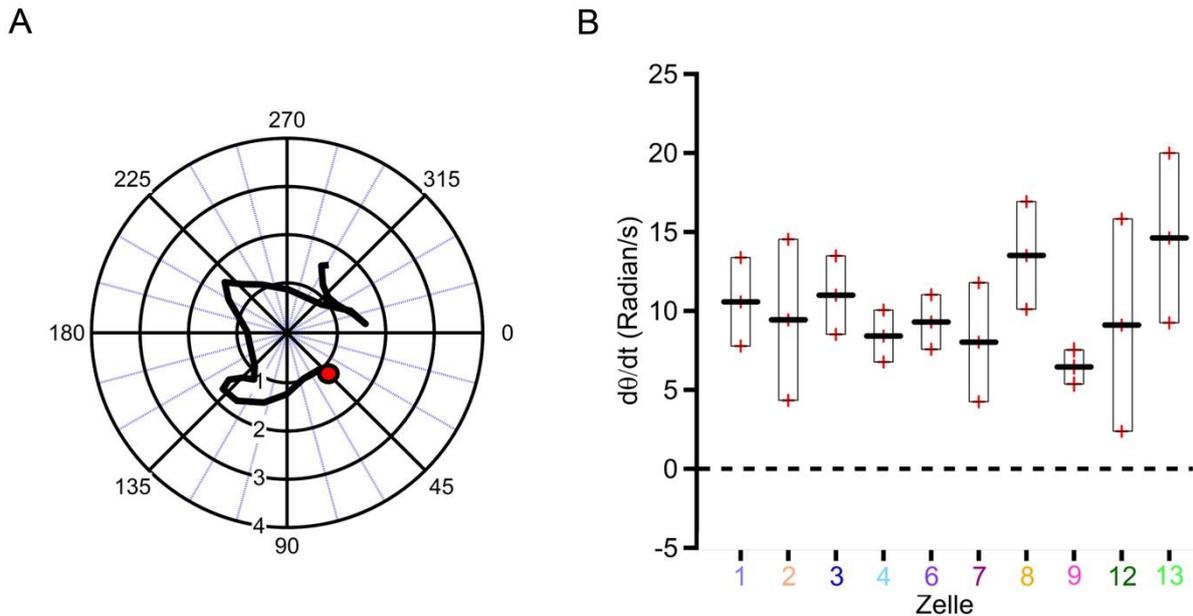


Abbildung 31: Quantifizierung der Procrustesanalyse

A. Gezeigt ist die gemittelte Schwimmtrajektorie des ersten Spermatozoons aus Abbildung 30 in einem Polarkoordinatensystem, wobei die Polarkoordinaten aus den gemittelten X- und Y-Werten der Schwimmtrajektorie berechnet wurden. B. Dargestellt sind die gemittelten $(d\theta/dt)$ -Werte in Radian/s (Y-Achse). Die X-Achse zeigt die einzelnen Spermatozoen mit derselben Farbkodierung aus Abbildung 30. Für alle gemessenen Spermatozoen kann ein positiver gemittelter $(d\theta/dt)$ -Wert bestimmt werden, der mit einer Chiralität der Schwimmtrajektorie im Uhrzeigersinn korreliert.

8.2 Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen in 2D und 3D

In der Klinik wird routinemäßig CASA, eine standardisierte Methode zur Bestimmung der prozentualen Motilität, der Spermatozoenbewegung, der -geschwindigkeit sowie der Spermatozoendichte eingesetzt, um die Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen zu untersuchen. Hierbei handelt es sich um eine zweidimensionale Analyse, die eine objektive Messung verschiedener Spermatozoenbewegungsparameter ermöglicht (Davis und Siemers, 1995). Mittels CASA kann die tatsächlich zurückgelegte Strecke pro Sekunde anhand der kurvenlinearen Geschwindigkeit (VCL) bestimmt werden. In der Literatur wird die VCL als der charakteristischste Bewegungsparameter für die Spermatozoenfunktion beschrieben (De Geyter et al., 1998). Zusätzlich ermöglicht CASA die Ermittlung der mittleren Geschwindigkeit entlang einer ermittelten Strecke (VAP) und der linearen Geschwindigkeit, die den Weg pro Sekunde entlang einer geraden Linie (VSL) darstellt (Davis und Siemers, 1995). Die Abbildung 32 zeigt ein schematisches Diagramm der Spermatozoenkinetik.

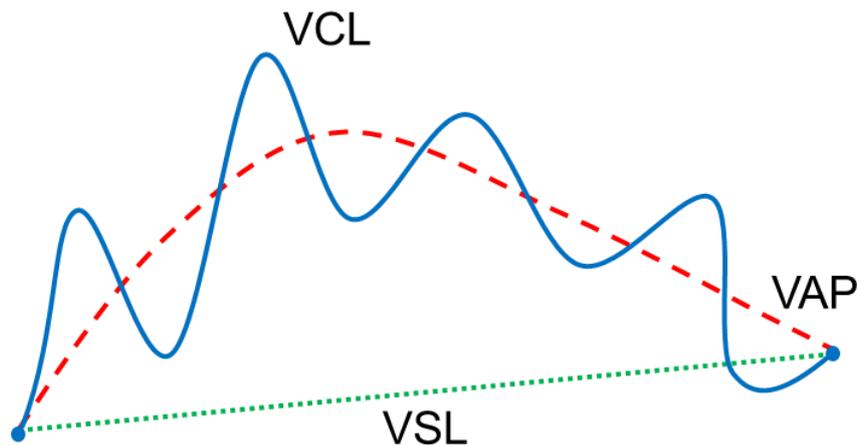


Abbildung 32: Schematisches Diagramm der Spermatozoenkinetik

Mittels CASA kann die kurvenlineare Geschwindigkeit (VCL), die mittlere Geschwindigkeit entlang der ermittelten Bahn (VAP) und der Weg pro Zeiteinheit entlang einer geraden Linie (VSL) ermittelt werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Davis und Siemers, 1995).

In dieser Arbeit wurden digital holografische Aufnahmen verwendet, um die Geschwindigkeitsanalyse hinsichtlich der dritten und vierten Dimension zu erweitern, mit dem Ziel potentielle Datenverluste bei der 2D Betrachtung zu identifizieren, die eine Bedeutung für die Beurteilung der Fertilität des Spenders haben könnten. Für die Validierung der Digital Holografischen Mikroskopie als zuverlässige Methode für Geschwindigkeitsanalysen wurden vergleichende Geschwindigkeitsmessungen mittels CASA (2D) und DHM (2D und 3D) durchgeführt. Dafür wurden humane Spermatozoen wie in Kapitel 7.1.1.2 beschrieben aus dem Ejakulat gewonnen. Zur Validierung der Analyse wurden sowohl unkapazitierte, als auch kapazitierte Spermatozoen gemessen. Hierfür wurden zunächst die Hälfte der Spermatozoensuspension, wie in Kapitel 7.1.2 beschrieben, kapazitiert. Für die Analyse wurden 30 μl der jeweiligen Spermatozoensuspension in eine Messkammer mit einer Kammertiefe von 100 μm (Leja Products B.V.) überführt und mittels CASA und DHM gemessen. In Abbildung 33 ist die mittels beider Analysemethoden ermittelte VCL dargestellt. Der erste Boxplot zeigt die mittels CASA gemessene VCL in 2D von unkapazitierten Spermatozoen ($60 \pm 5,9 \mu\text{m/s}$). Nach Kapazitation kann eine 1,3-fache Steigerung der VCL identifiziert werden ($80 \pm 16,5 \mu\text{m/s}$) (Boxplot 2). Für die 2D Analyse mittels DHM wurden nur die XY-Daten der digital holografischen Aufnahmen verwendet. Die 2D Analyse von unkapazitierten Spermatozoen ergab im Mittel eine VCL von $70 \pm 22,2 \mu\text{m/s}$ (Boxplot 3). Nach Kapazitation konnte eine VCL von $98,4 \pm 23 \mu\text{m/s}$ mittels DHM ermittelt werden (Boxplot 4). Sowohl mittels CASA als auch mittels DHM kann nach Kapazitation im Vergleich zu den unkapazitierten

Spermatozoen ein Anstieg der VCL um den Faktor 1,3 nachgewiesen werden. Die VCL-Werte unterschieden sich sowohl bei unkapazitierten (Boxplot 1 und 3), als auch bei kapazitierten Spermatozoen (Boxplot 2 und 4) zwischen den beiden Analysemethoden (CASA und DHM) um den Faktor 1,2. Die erhöhten Standardfehler erlauben trotz eines Unterschieds um den Faktor 1,2 die Validierung der DHM für Geschwindigkeitsanalysen.

Für die 3D Analyse mittels DHM wurden neben den XY-Daten zusätzlich die Z-Daten der digital holografischen Aufnahmen verwendet. Nach Einbezug der dritten Dimension in die Geschwindigkeitsanalyse konnte für unkapazitierte Spermatozoen eine VCL von $112 \pm 29 \mu\text{m/s}$ (Boxplot 5) und für kapazitierte Spermatozoen eine VCL von $207 \pm 34,5 \mu\text{m/s}$ detektiert werden (Boxplot 6). Dies entspricht einer Steigerung der VCL um den Faktor 1,9. Im Vergleich zu den mittels DHM gemessenen 2D Daten (Boxplot 3 und 4) zeigt sich eine 1,6-fach gesteigerte VCL für unkapazitierte (Boxplot 5) und eine 2,1-fach gesteigerte VCL für kapazitierte Spermatozoen (Boxplot 6).

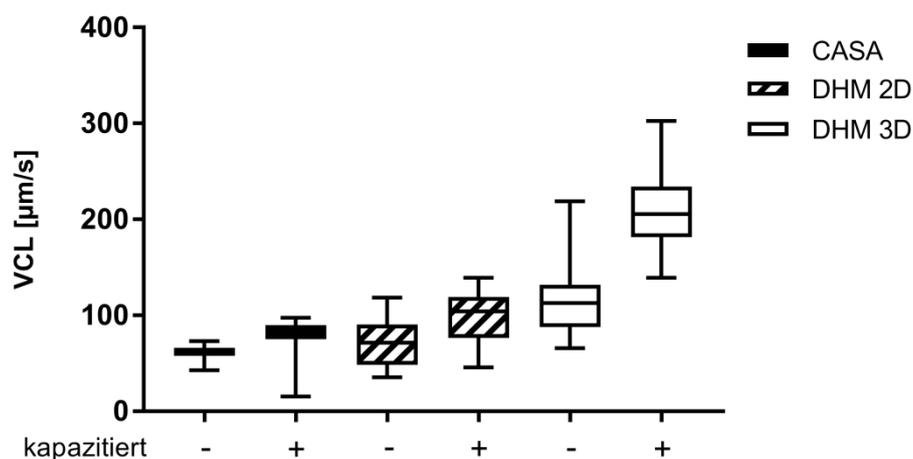


Abbildung 33: Geschwindigkeitsanalysen von unkapazitierten und kapazitierten humanen Spermatozoen

Dargestellt ist die kurvenlineare Geschwindigkeit VCL von unkapazitierten und kapazitierten humanen Spermatozoen, welche mittels CASA oder DHM bestimmt wurde. Die Messungen erfolgten in $100 \mu\text{m}$ tiefen Messkammern (Leja Products B.V.) und im physiologischen HS-Puffer (pH 7,4). Die X-Achse gibt den Kapazitationsstatus der analysierten Spermatozoen wieder. Die schwarz gefärbten Boxplots zeigen die 2D Ergebnisse mittels CASA ($n=51$), die schwarz-weiß schraffierten Boxplots die 2D Analyse ($n=35$) und die weiß gefärbten Boxplots das Ergebnis der 3D Messung ($n=35$) mittels DHM. Die Analyse zeigt, dass die 2D VCL-Werte mittels DHM mit den 2D Werten mittels CASA vergleichbar sind. Die mittels DHM gemessene VCL erhöht sich nach Einbezug der dritten Dimension um den Faktor 1,6 bei unkapazitierten und um 2,1 bei kapazitierten Spermatozoen im Vergleich zu den entsprechenden 2D-Werten.

8.3 *In-vitro* Kapazitation

Die Kapazitation beschreibt den Reifungsprozess von Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt und ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Penetration der Oozyte (Visconti et al., 1998). Bekannt ist, dass Serumalbumin, Ca^{2+} , HCO_3^- und der pH-Wert essentielle Faktoren für die Induktion der Kapazitation sind (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 2002). Diese Faktoren sind ebenfalls entscheidend für die frühe Aktivierung von Spermatozoen. Während der frühen Aktivierung bewirken diese Faktoren eine Induktion der Spermatozoenmotilität, gekennzeichnet durch eine Zunahme der Schlagfrequenz (Wennemuth, 2004). Bei der späten Aktivierung, der Kapazitation, führen diese Faktoren, durch eine gesteigerte Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen an der fibrösen Hülle des Flagellums, die einen Anstieg der Schlagfrequenz hervorrufen (Visconti et al., 1995b) und durch den Efflux von Cholesterol aus der Zellmembran zur Induktion der Hypermotilität (Jones et al., 2007; Shadan et al., 2004). Die Hypermotilität ist charakterisiert durch eine Frequenzzunahme des Flagellenschlags, durch eine Verminderung der Amplitude, einer Steigerung der lateralen Auslenkungen des Spermatozoenkopfs sowie durch eine nicht lineare Schwimmtrajektorie (Baldi et al., 2000; de Lamirande et al., 1997). Unter bestimmten Bedingungen kann die Kapazitation auch *in vitro* induziert werden (Yanagimachi, 1994a). In dieser Arbeit wurde die Kapazitation induziert, indem die murinen Spermatozoen in Kapazitationspuffer für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert wurden. Die Induktion der Kapazitation wurde zunächst auf Proteinebene mittels Western Blot und anschließend anhand vierdimensionaler Bewegungsanalysen überprüft.

Nach Präparation der Spermatozoen aus dem Ductus epididymidis und dem Ductus deferens, wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (Kapitel 7.1.1.3) und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Hälfte der Spermatozoensuspension wurde für 1 h in HS-Puffer (pH 7,4) und die andere Hälfte für 1 h in Kapazitationspuffer (pH 7,4) bei 37°C und 5% CO_2 in einem Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das Gesamt-Protein isoliert und Western Blot Analysen durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mittels eines monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (Merck). Es zeigt sich ein Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierungen bei kapazitierten im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen (Abbildung 34). Dieses Ergebnis weist auf eine erfolgreiche Induktion der Kapazitation hin.

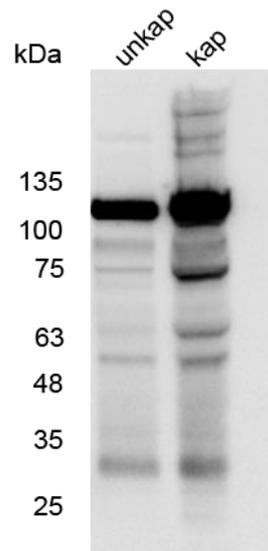


Abbildung 34: Phosphotyrosin-Immunoblot als Kapazitationsnachweis

Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen wurde mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10) der Firma Merck detektiert (drei biologische Replikate). Die Induktion der Kapazitation kann durch einen Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierungen nachgewiesen werden. unkap= unkapazitiert; kap= kapazitiert; kDa= Kilodalton

Zur zusätzlichen Überprüfung einer erfolgreichen Induktion der Kapazitation wurde die kurvenlineare Geschwindigkeit (VCL) bestimmt. In dieser Arbeit wurden die dreidimensionalen Daten des Kopf-Trackings aus den holografischen Aufnahmen verwendet. Für die Messung wurden 30 μl der unkapazitierten murinen Spermatozoensuspension in eine Messkammer mit einer Tiefe von 100 μm (Leja Products B.V.) überführt und mittels DHM gemessen. Analog erfolgte die VCL-Messung der kapazitierten Spermatozoen. Im Mittel kann für unkapazitierte Spermatozoen eine VCL von $283 \pm 63,4 \mu\text{m/s}$ und für kapazitierte Spermatozoen eine VCL von $455 \pm 68,4 \mu\text{m/s}$ detektiert werden. Somit steigt die VCL nach Kapazitation um den Faktor 1,6 (Abbildung 35).

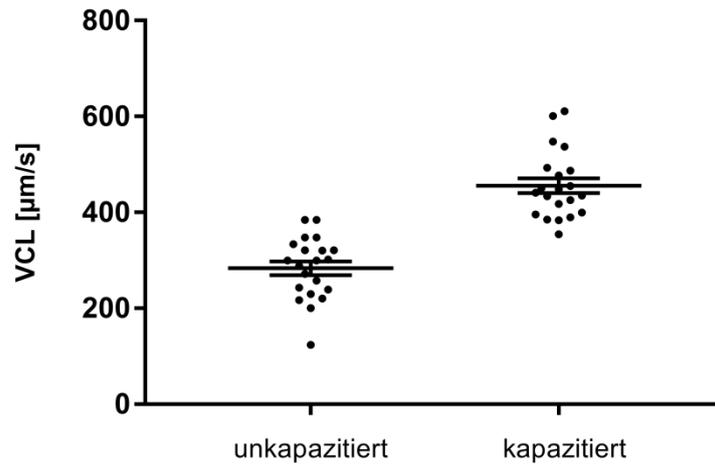


Abbildung 35: Gesteigerte VCL nach Induktion der Kapazitation

Dargestellt ist die mittels DHM gemessene kurvenlineare Geschwindigkeit VCL von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen ($n=20$, drei biologische Replikate). Nach Induktion der Kapazitation kann eine um den Faktor 1,6 höhere VCL detektiert werden. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

Der Einfluss der Kapazitation auf die Schlagfrequenz von murinen Spermatozoen wurde mit Hilfe der Schlagfrequenzanalyse (Kapitel 7.1.4) auf Einzelzellniveau untersucht. Die Messung der Schlagfrequenz von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen erfolgte nach einer dreiminütigen Inkubation in HS-Puffer ($n=20$). Im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen ($3 \pm 0,5$ Hz) zeigen kapazitierte Spermatozoen ($9 \pm 1,2$ Hz) eine um 6 Hz höhere Schlagfrequenz (Abbildung 36).

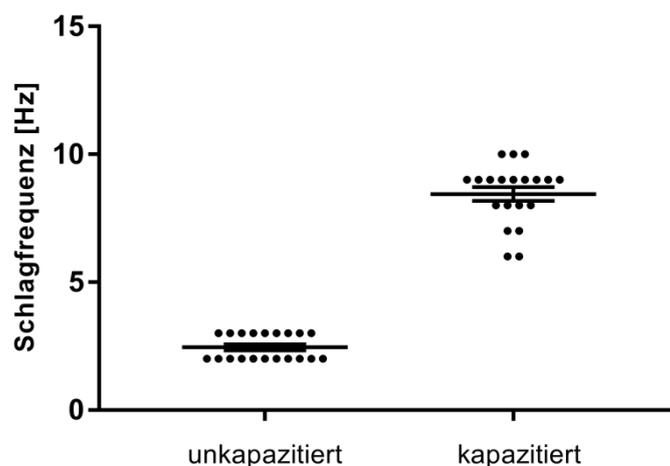


Abbildung 36: Zunahme der Schlagfrequenz nach Induktion der Kapazitation

Abgebildet ist die Schlagfrequenz von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen ($n=20$, drei biologische Replikate). Nach Induktion der Kapazitation erhöht sich die Schlagfrequenz im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen um den Faktor 3. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

Ein weiterer Parameter für die Überprüfung einer erfolgreichen Induktion der Kapazitation ist eine größere laterale XY-Auslenkung des murinen Spermatozonenkopfs. Für diese Analyse wurden die XY-Daten des Kopf-Trackings verwendet. Kapazitierte Spermatozoen zeigen eine um den Faktor 1,8 höhere laterale XY-Auslenkung des Kopfs ($11 \pm 1,6 \mu\text{m}$) als unkapazitierte Spermatozoen ($6 \pm 10,3 \mu\text{m}$) (Abbildung 37).

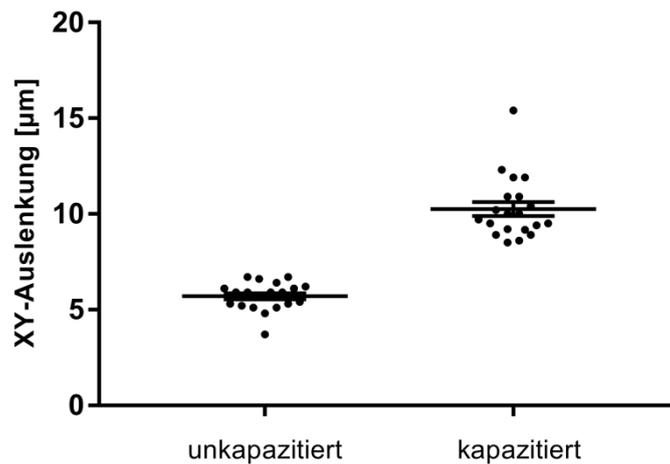


Abbildung 37: Gesteigerte XY-Auslenkung des Kopfs nach Induktion der Kapazitation

Dargestellt ist die laterale XY-Auslenkung des Kopfs von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen (n=20, drei biologische Replikate). Kapazitierte Spermatozoen zeigen eine um den Faktor 1,8 höhere laterale XY-Auslenkung des Kopfes. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

Anhand der zugenommenen Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen, der gesteigerten VCL und Schlagfrequenz sowie der gesteigerten XY-Auslenkungen des Kopfs von kapazitierten murinen Spermatozoen konnte eine erfolgreiche Induktion der Kapazitation nachgewiesen werden.

Anschließend wurde untersucht, ob der Kontakt zum murinen Zona pellucida Glykoprotein 2 (ZP2) eine Änderung des vierdimensionalen Schwimmmusters kapazitierter muriner Spermatozoen bewirkt. Parallel wurde der Einfluss der Kapazitation auf die vierdimensionale Spermatozonenbewegung durch den Vergleich mit unkapazitierten Spermatozoen analysiert.

8.4 Einfluss des N-terminalen muZP2 Proteins auf das Schwimmverhalten kapazitierter muriner Spermatozoen in 4D

Die Zona pellucida (ZP) nimmt eine entscheidende Rolle bei der Fertilisation der Oozyte ein. Sie gewährleistet eine spezie-spezifische Gametenerkennung, vermittelt die initiale Bindung der Spermatozoen an die Oozyte und bildet einen sogenannten „Zona Block“ zur Verhinderung der Polyspermie aus (Bleil et al., 1981; Dean, 1992; Gahlay et al., 2010; Wassarman, 1988). In der Maus besteht die ZP aus drei funktionellen Glykoproteinen (ZP1, ZP2 und ZP3), wobei eine konservierte Domäne am N-Terminus des ZP2 Glykoproteins identifiziert werden konnte, die die Bindung der Spermatozoen an die ZP ermöglicht (Avella et al., 2014; Bhakta et al., 2019). Um den Einfluss des N-terminalen murinen ZP2 Glykoproteins (muZP2) auf das vierdimensionale Schwimmverhalten muriner Spermatozoen zu untersuchen, wurde das Protein zunächst rekombinant hergestellt.

8.4.1 Herstellung des muZP2 Glykoproteins

Für die rekombinante Herstellung des muZP2 Glykoproteins wurde ein Expressionsplasmid kloniert. Dazu wurde die kodierende Sequenz des N-terminalen muZP2 Glykoproteins, wie in Kapitel 6.8.2 in Tabelle 5 angegeben, in das pFUSE Plasmid eingefügt. Anschließend wurden HEK293T Zellen mit dem pFUSE-muZP2 Plasmid stabil transfiziert und mit Hilfe von 400 µg/ml Zeocin™ selektioniert (Kapitel 7.6.6). Zum Schluss wurde die Expression des muZP2 Glykoproteins auf RNA- und Proteinebene verifiziert.

8.4.1.1 Validierung der Expressionsklone auf RNA-Ebene

Die Expression des N-terminalen muZP2 Glykoproteins wurde mittels qRT-PCR untersucht. Als Referenz dienten Klone, die zuvor mit einem Leervektor transfiziert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt. Bis auf Klon vier und fünf wiesen alle Klone eine erhöhte Expression der N-terminalen muZP2 mRNA auf. Der Klon sieben zeigte die stärkste Expression der muZP2 mRNA ($526 \pm 162,3$) im Vergleich zu einem Mockklon. Für die anschließende Herstellung des muZP2 Glykoproteins wurde Klon sieben verwendet.

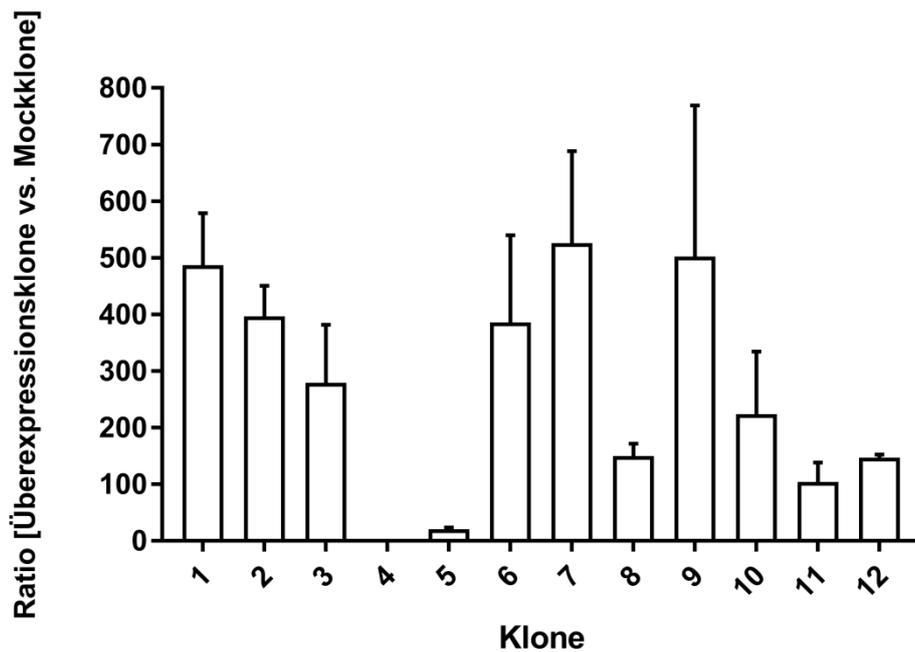


Abbildung 38: Expression der ZP2 mRNA in stabil transfizierten HEK293T Zellen

Die Abbildung zeigt die Expressionsunterschiede (Ratio) der murinen ZP2 mRNA des jeweiligen Zellklons gegenüber einem Mockklon, gemessen in Duplikaten. Zur relativen Quantifizierung der veränderten Expression wurde 18S rRNA als Referenz verwendet. Die induzierte Expression von muriner ZP2 mRNA der einzelnen Klone konnte mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Klon sieben zeigt die stärkste Expression der muZP2 mRNA.

8.4.1.2 Etablierung des murinen ZP2 Glykoprotein spezifischen Antikörpers IE-3

Nachdem die Expression des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf RNA-Ebene verifiziert werden konnte, erfolgte der Nachweis des Proteins auf Proteinebene. Die Hybridomazelllinie CRL-2463TM (ATCC[®]) (Kapitel 6.9.1) wurde für die Produktion des gegen das murine ZP2 Protein (Aminosäure 114-129) spezifischen Antikörpers (IE-3) verwendet. Zum Nachweis des B-Zellrezeptors auf der Hybridomazelllinienoberfläche wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt (Abbildung 39). In Abbildung 39 sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die gemessene Zellzahl aufgetragen. Zellen, welche mit einem spezifischen Fab-Antikörper inkubiert wurden (dicke Linie), zeigten eine mittlere Fluoreszenzintensität von 29, wohingegen die mit einer Isotypkontrolle gefärbten Zellen (dünne Linie) eine entsprechende Intensität von 5 aufwiesen. Anhand der durchflusszytometrischen Analyse konnte der B-Zellrezeptor auf der Oberfläche der Hybridomazellen nachgewiesen werden (Abbildung 39).

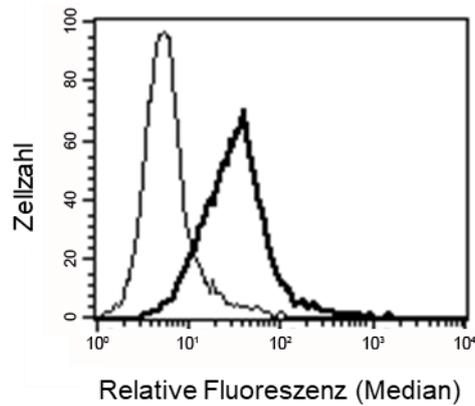


Abbildung 39: B-Zell-Rezeptor Nachweis unter Verwendung des Ziege-anti-Ratte Antikörpers

Die Hybridomazellen (CRL-2463™, ATTC) wurden geerntet, mit FITC-gekoppelter Isotypkontrolle F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) bzw. mit F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) inkubiert und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (X-Achse) aufgetragen gegen die gemessene Zellzahl (Y-Achse). Zellen, welche mit einem spezifischen Fab-Antikörper inkubiert wurden (schwarz) zeigten eine mittlere Fluoreszenzintensität von 29 und die mit einer Isotypkontrolle gefärbten Zellen (grau) wiesen eine mittlere Fluoreszenzintensität von 5 auf. Der B-Zellrezeptor konnte auf der Oberfläche der Hybridomazellen nachgewiesen werden.

Um eine spezifische Bindung des IE-3 Antikörpers an den N-Terminus des murinen ZP2 Glykoproteins nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit ein qualitativer Festphasen-ELISA durchgeführt (Abbildung 40). Der Nachweis der erfolgreichen Gewinnung des muZP2 Glykoproteins erfolgte auf Proteinebene (Kapitel 8.4.1.3). Gemessen wurde die optische Dichte (OD) bei 450 nm. Als Isotypkontrolle wurde der MEC14.7 Antikörper (ImmunoTools) verwendet, ein Ratte-anti-Maus IgG2a-Antikörper, der murines CD34 erkennt. Zur Untersuchung, ob der sekundäre Antikörper bereits das muZP2 Glykoprotein bindet, wurde nur der sekundäre Antikörper in 0,5% BSA/PBS in das mit muZP2 Glykoprotein beschichtete Well aufgetragen (sek AK-Kontrolle). Zusätzlich wurde eine mögliche unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die 96-Well Platte untersucht (HRP-Kontrolle). Für den monoklonalen IE-3 Antikörper konnte eine OD von 1,8 detektiert werden, während die OD der eingesetzten Kontrollen unter 0,1 lag (Abbildung 40). Die Auswertung des ELISAs wies eine spezifische Bindung des IE-3 Antikörpers an das N-terminale muZP2 Glykoprotein nach.

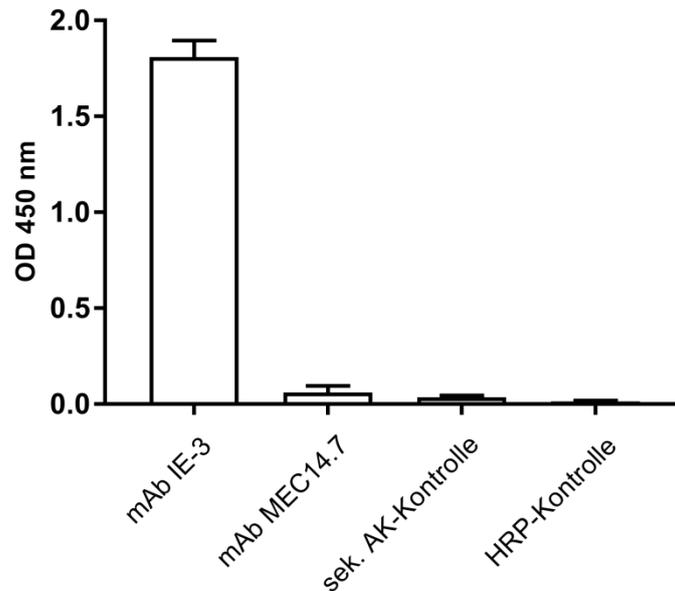


Abbildung 40: Nachweis der spezifischen Bindung des IE-3 Antikörpers an das N-terminale muZP2 Glykoprotein

In der Abbildung ist das Ergebnis eines qualitativen Festphasen-ELISAs zum Nachweis der spezifischen Bindung des monoklonalen Antikörpers IE-3 (mAB IE-3) an das N-terminale muZP2 Glykoprotein dargestellt. Es konnte für den mAb IE-3 eine OD von 1,8 detektiert werden, während die Negativkontrollen (mAB MEC14.7, HRP-Kontrolle-muZP2 und HRP-Kontrolle) eine OD von unter 0,1 zeigten. Somit konnte eine spezifische Bindung des IE-3 Antikörpers an das N-terminale muZP2 Glykoprotein nachgewiesen werden. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Dreifach-Ansatz (n=1).

8.4.1.3 Gewinnung, Aufreinigung und Umpufferung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins

Zur Gewinnung des muZP2³⁵⁻¹⁴⁹ Glykoproteins wurde der muZP2 exprimierende Klon sieben verwendet (siehe Kapitel 8.4.1.1). Die Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und über zwei Wochen in ZeocinTM-haltigem Medium (400 µg/ml) kultiviert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand steril abgenommen, zentrifugiert und steril filtriert. Das muZP2 Glykoprotein wurde mittels einer Ni-NTA-Affinitätschromatografie aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Aufreinigung basiert dabei auf der Ausbildung eines Chelatkomplexes zwischen den auf den Beads gebundenen Nickel-Atomen und dem am C-Terminus des muZP2 Glykoproteins befindlichem His-Tag. Nach Aufreinigung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand lag das muZP2 Glykoprotein in einem imidazolhaltigen Puffer vor. Um das muZP2 Glykoprotein in Zellversuchen einsetzen zu können, wurde das Protein abschließend in PBS umpufferert.

In Abbildung 41 ist die Proteinmenge des muZP2 Glykoproteins vor und nach

Aufreinigung, sowie nach Umpufferung dargestellt. Für den Western Blot wurde der in dieser Arbeit etablierte muZP2 Glykoprotein spezifische Antikörper IE-3 verwendet. N-terminales muZP2 Glykoprotein konnte im Zellkulturüberstand vor und in geringerer Konzentration nach Aufreinigung detektiert werden (Abbildung 41). Der überwiegende Anteil des Proteins war an die Beads gebunden. Um unspezifische Bindungen zu eliminieren, wurden die Beads gewaschen, wobei die spezifische Bindung des muZP2 Glykoproteins an die Beads nicht inhibiert wurde. Nach anschließender Elution lag das muZP2 Glykoprotein in dem imidazolhaltigen Elutionspuffer vor und war vollständig von den Beads gelöst (Abbildung 41). Durch die Ultrafiltration des proteinhaltigen Eluats wurde das muZP2 Glykoprotein in PBS umpuffert und zudem durch eine Volumenverkleinerung aufkonzentriert. Im Durchfluss der Umpufferung konnte kein muZP2 Glykoprotein nachgewiesen werden. Das N-terminale muZP2 Protein konnte erfolgreich aus dem Hybridomazellkulturüberstand gewonnen, umpuffert und aufkonzentriert werden (Abbildung 41).

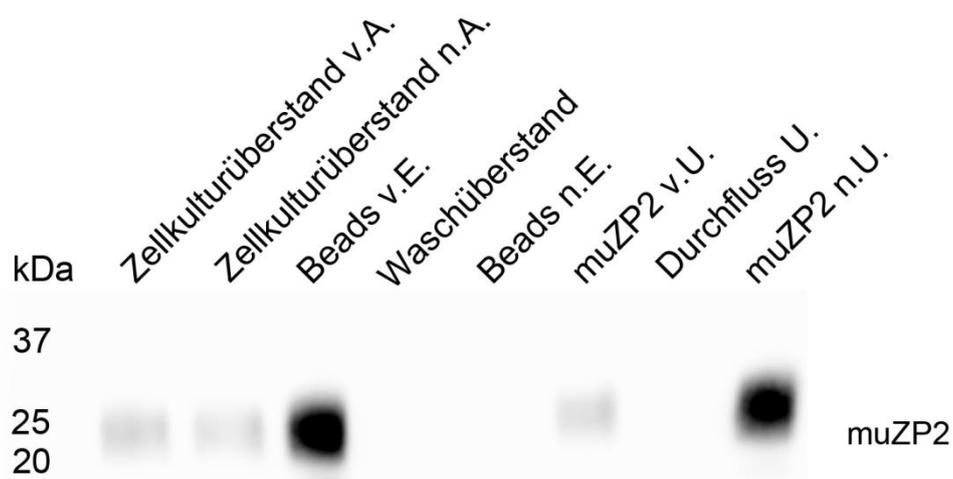


Abbildung 41: Aufreinigung und Umpufferung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins aus dem Zellkulturüberstand

Dargestellt ist eine Western Blot Analyse der muZP2 Extrakte aus dem Zellkulturüberstand vor bzw. nach Aufreinigung sowie nach Umpufferung in PBS. Die Banden bei 22 kDa weisen das muZP2 Glykoprotein nach. In dem Waschüberstand und dem Durchfluss nach Umpufferung konnte kein muZP2 Glykoprotein detektiert werden. Die Detektion erfolgte mittels des monoklonalen anti-N-terminalen ZP2 Antikörper (IE-3). Von jeder Probe wurden 20 µl und nach Proteinbestimmung des umpufferten muZP2 Glykoproteins, 1 µg rekombinant hergestelltes Protein aufgetragen, v.A.= vor Aufreinigung, n.A.= nach Aufreinigung, v.E.= vor Elution, n.E.= nach Elution, v.U.= vor Umpufferung, U= Umpufferung, n.U.= nach Umpufferung

8.4.1.4 Rekopplung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins an Sepharosebeads

Um im Folgenden den Einfluss von N-terminalem muZP2 Glykoprotein auf die Bewegung kapazitierter Spermatozoen zu untersuchen, wurde eine Rekopplung des Proteins an die magnetischen „His Mag Sepharose™ Ni-Beads“ (GE Healthcare) durchgeführt. Die Rekopplung erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Rotor und wurde mittels Western Blot Analysen überprüft (Abbildung 42). Die Abbildung 42 zeigt eine vollständige Bindung des muZP2 Glykoproteins an die Sepharosebeads. Es konnte kein muZP2 Glykoprotein mehr im Überstand nachgewiesen werden.

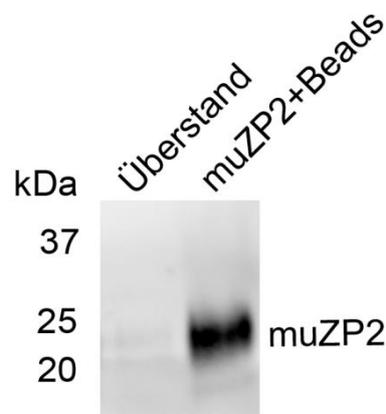


Abbildung 42: Rekopplung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins an Sepharosebeads

Dargestellt ist ein Western Blot zum Nachweis der Rekopplung von muZP2 Glykoprotein an die magnetischen His Mag Sepharose™ Ni-Beads. Die Rekopplung erfolgte durch eine über Nacht Inkubation der Sepharosebeads in einem 200 µg/ml muZP2 proteinhaltigen Puffer und wurde mittels des monoklonalen anti-N-terminalen ZP2 Antikörper nachgewiesen. Es wurden 25% der Sepharosebeads 1:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 Min aufgekocht. Die bei 25 kDa liegende Bande zeigt das an Beads gebundene muZP2 Glykoprotein an. Im Überstand konnte kein muZP2 Glykoprotein nachgewiesen werden.

8.4.2 Kapazitierte murine Spermatozoen binden an muZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads

Nach Rekopplung des muZP2 Glykoproteins an die magnetischen Sepharosebeads, wurden diese Beads verwendet, um eine spezifische Bindung kapazitierter Spermatozoen an das N-terminale muZP2 Glykoprotein nachzuweisen. Dazu wurden 1×10^6 Spermatozoen mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads bei 37°C und 5% CO₂ für 1 h inkubiert. Als Kontrolle wurde der Versuch analog mit unbeladenen Beads durchgeführt. Um unspezifische Bindungen an die Beads zu lösen, wurde die Bead-Spermatozoen-Suspension jeweils dreimal auf- und ab-pipettiert. Der Nachweis einer spezifischen Bindung der Spermatozoen an die muZP2 Glykoprotein

beladenen Beads erfolgte mikroskopisch (Abbildung 43). Abbildung 43A zeigt exemplarisch unbeladene Sepharosebeads ohne Spermatozoenbindung und in Abbildung 43B ist die spezifische Bindung kapazitierter Spermatozoen an ein mit muZP2 Glykoprotein beladenes Bead dargestellt.

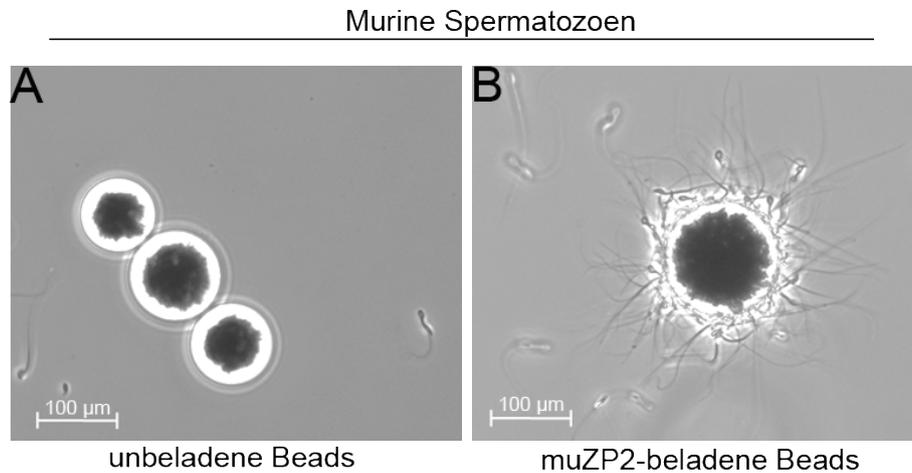


Abbildung 43: Spezifische Bindung von murinen kapazitierten Spermatozoen an ZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads

A-B. Abgebildet sind Aufnahmen von unbeladenen Sepharosebeads (A) sowie von einem mit muZP2 Glykoprotein beladenem Sepharosebead (B) nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C mit 1×10^6 Spermatozoen und nach einem anschließenden Auf- und Ab-Pipettiervorgang. Die spezifische Bindung der kapazitierten Spermatozoen an die mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads ist in B sichtbar.

8.4.3 Einfluss des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf das Schwimmverhalten kapazitierter muriner Spermatozoen in 4D

Der Effekt des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf das vierdimensionale Schwimmverhalten kapazitierter muriner Spermatozoen wurde anhand von digital holografischen Aufnahmen untersucht. Dafür wurden murine Spermatozoen zunächst präpariert (Kapitel 7.1.1.1) und kapazitiert (Kapitel 7.1.2). Um den Einfluss des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf das Schwimmverhalten muriner Spermatozoen zu analysieren, wurden muZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads verwendet. Die Analyse mittels DHM erfolgte in Messkammern mit einer Kammertiefe von 100 µm (Leja Products B.V.) und einem 20x Objektiv (Kapitel 7.7.3.). Parallel wurde der Einfluss der Kapazitation auf das vierdimensionale Schwimmverhalten muriner Spermatozoen untersucht.

8.4.3.1 Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein von kapazitierten Spermatozoen

Um zunächst einen Einfluss der Kapazitation auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie muriner Spermatozoen zu untersuchen, wurden Procrustesanalysen, wie in Kapitel 8.1.4 beschrieben, von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen durchgeführt. Im Anschluss wurde ebenfalls die Chiralität der Schwimmtrajektorie mittels Procrustesanalysen von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads und nach Kontakt mit dem muZP2 Glykoprotein analysiert. Diese Analyse soll Aufschluss darüber geben, ob die Kapazitation oder der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein eine Änderung der Chiralität, als Voraussetzung für die Durchdringung der Zona pellucida, bewirkt.

In Abbildung 44 sind in beiden Koordinatensystemen jeweils fünf repräsentative gemittelte Schwimmtrajektorien aus den Procrustesanalysen von unkapazitierten (Abbildung 44A) und kapazitierten (Abbildung 44B) Spermatozoen dargestellt. Insgesamt wurde die Chiralität von 20 Spermatozoen pro Bedingung untersucht. Die ersten X- und Y-Koordinaten der Trajektorie wurden in den Ursprung gelegt. Alle untersuchten Spermatozoen zeigen eine Chiralität der Schwimmtrajektorie im Uhrzeigersinn unabhängig von ihrem Kapazitationsstatus.

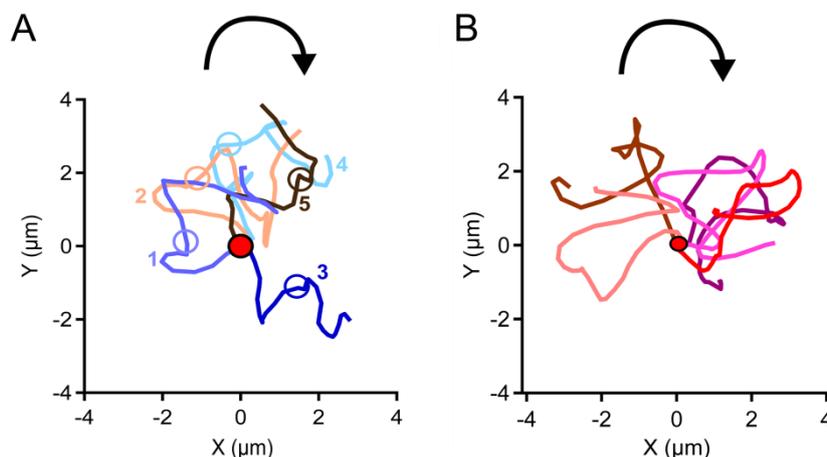


Abbildung 44: Kein Einfluss der Kapazitation auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie muriner Spermatozoen

A-B. Die Abbildungen zeigen jeweils die gemittelten Procrustesausrichtungen der Schwimmtrajektorien von fünf repräsentativen murinen Spermatozoen ($n=20$, vier biologische Replikate). Alle Trajektorien wurden mit ihrem Startpunkt in den Ursprung gelegt (roter Punkt). Gezeigt sind Procrustesanalysen von freischwimmenden unkapazitierten (A) und kapazitierten (B) Spermatozoen. Der Pfeil gibt die Chiralität der einzelnen Schwimmtrajektorien wieder. Auf den Koordinatenachsen sind jeweils die X- und Y-Werte des Kopf-Trackings in μm aufgetragen. Alle untersuchten Spermatozoen zeigen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie unabhängig vom Kapazitationsstatus.

Anschließend wurde der Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie von kapazitierten Spermatozoen zu untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 45 dargestellt. Jedes Koordinatensystem enthält jeweils fünf repräsentative gemittelte Schwimmtrajektorien aus den Procrustesanalysen. Insgesamt wurde die Chiralität von 20 Spermatozoen pro Bedingung untersucht. Die Chiralität der Schwimmtrajektorie wurde anhand der in Abbildung 45 dargestellten Trajektorien zunächst visuell bestimmt. Kapazitierte Spermatozoen, sowie kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen Sepharosebeads zeigten eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie (Abbildung 45A/B). Nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads kann jeweils für 50% der analysierten Spermatozoen eine CW Chiralität (10/20) bzw. eine CCW Chiralität identifiziert werden (10/20) (Abbildung 45C). Das gleiche Ergebnis zeigt sich bei Spermatozoen, die in Kapazitationspuffer mit 100 µg/ml muZP2 Glykoprotein gemessen werden (Abbildung 45D).

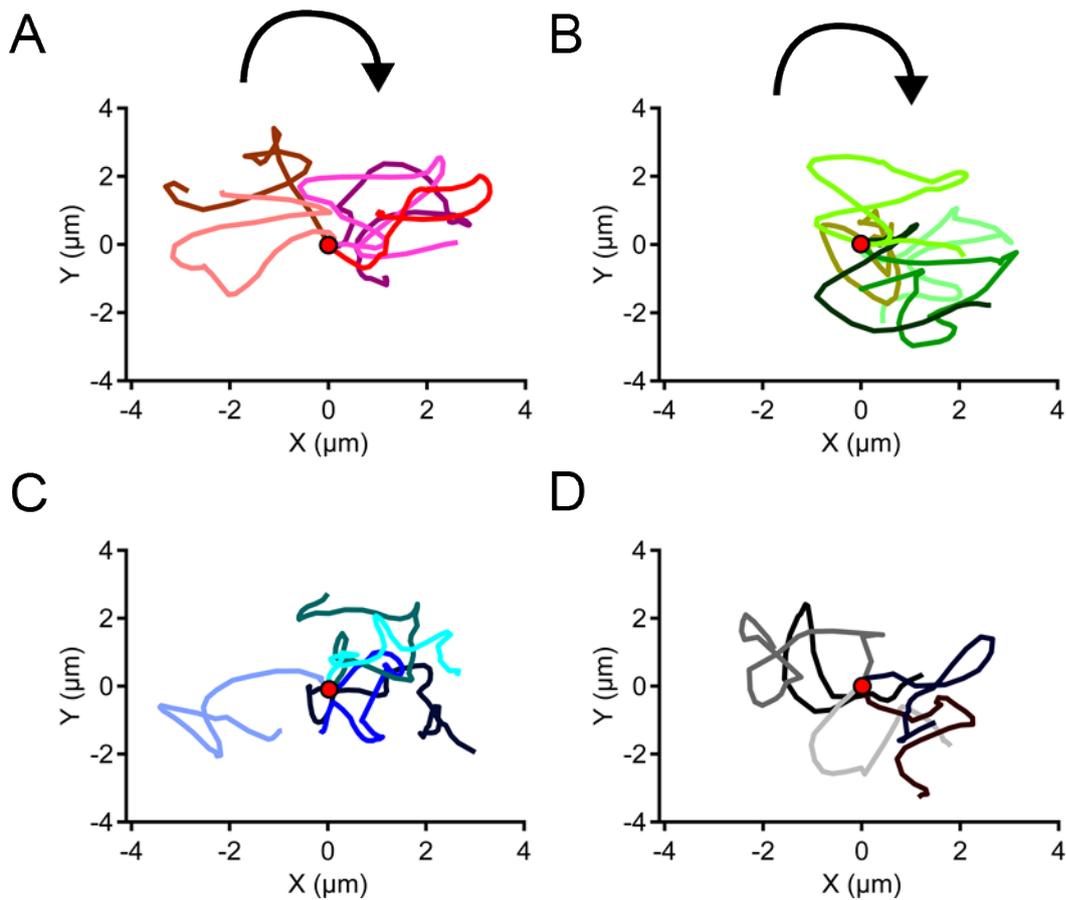


Abbildung 45: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie von kapazitierten Spermatozoen

A-D. Die Abbildungen zeigen jeweils die gemittelten Procrustesausrichtungen der Schwimmtrajektorien von fünf repräsentativen murinen Spermatozoen ($n=20$, vier biologische Replikate), wobei alle Trajektorien mit ihrem Startpunkt in den Ursprung gelegt wurden (roter Punkt). Dargestellt sind die Procrustesanalysen kapazitierter Spermatozoen (A), kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt zu unbeladenen magnetischen Sepharosebeads (B) und kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt zu muZP2 beladenen Sepharosebeads (C) sowie gemittelte Procrustesausrichtungen von kapazitierten Spermatozoen, die in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein gemessen wurden (D). In A und B gibt der Pfeil die Chiralität der Schwimmtrajektorie wieder. Alle untersuchten kapazitierten Kontrollspermatozoen und Spermatozoen nach Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads zeigen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie. Nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein weisen 50% der analysierten kapazitierten Spermatozoen eine CW und 50% eine CCW Chiralität der Schwimmtrajektorie auf.

Im Anschluss wurden die Koordinaten der gemittelten Procrustesstrajektorien in Polarkoordinaten umgerechnet, die Zeitpunkte der Änderungen gegen dessen Winkel (θ) ermittelt und die zeitliche Ableitung des Winkels ($d\theta/dt$) bestimmt. Ein positiver mittlerer ($d\theta/dt$)-Wert zeigt eine CW Chiralität an, während ein negativer mittlerer ($d\theta/dt$)-Wert mit einer CCW Chiralität korreliert. Die Abbildung 46 zeigt das Ergebnis der Berechnung des mittleren ($d\theta/dt$)-Wert der Schwimmtrajektorie der aus Abbildung 44 analysierten unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen. Das Ergebnis der visuellen Auswertung aus Abbildung 44 kann nach Berechnung des mittleren ($d\theta/dt$)-Wert bestätigt werden (Abbildung 46). Insgesamt weisen alle

analysierten Spermatozoen unabhängig von ihrem Kapazitationsstatus eine CW Chiralität ihrer Schwimmtrajektorie auf.

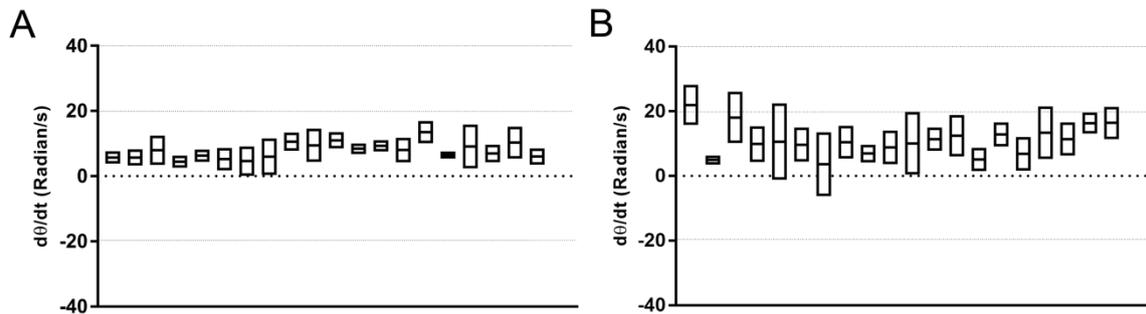


Abbildung 46: Auswertung der Procrustesanalysen von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen

A-B. Die Abbildung zeigt die gemittelten ($d\theta/dt$)-Werte für den zeitlichen Verlauf der gemittelten Procrustes Analyse ($n=20$, vier biologische Replikate) unkapazitierten (A) und kapazitierten (B) Spermatozoen. Für die Analyse wurden die X- und Y-Koordinaten der holografischen Aufnahmen verwendet. Es konnte für alle untersuchten Spermatozoen unabhängig vom Kapazitationsstatus ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert berechnet werden. Ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert zeigt eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie an.

In Abbildung 47 sind die mittleren ($d\theta/dt$)-Werte der Schwimmtrajektorien aus Abbildung 45 dargestellt. Die Analyse ergab für alle untersuchten kapazitierten Kontrollspermatozoen (Abbildung 47A) und für alle kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen Sepharosebeads (Abbildung 47B) einen positiven mittleren ($d\theta/dt$)-Wert, der einer CW Chiralität entspricht. Die Hälfte der analysierten kapazitierten Spermatozoen (10/20) weist nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads eine CCW Chiralität auf, gekennzeichnet durch einen negativen mittleren ($d\theta/dt$)-Wert (Abbildung 47C). Das gleiche Ergebnis kann für Spermatozoen, die in Kapazitationspuffer mit 100 $\mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein (10/20) gemessen wurden, beobachtet werden (Abbildung 47D). Die Procrustesanalysen zeigen, dass ohne ZP2 100% der kapazitierten Spermatozoen eine Chiralität der Schwimmtrajektorie im Uhrzeigersinn besitzen und dass 50% der Spermatozoen nach ZP2 Kontakt in eine Chiralität der Schwimmtrajektorie gegen den Uhrzeigersinn wechseln. Die kapazitierten Spermatozoen nach N-terminalen muZP2 Glykoprotein Kontakt zeigen keine bevorzugte Chiralität der Schwimmtrajektorie.

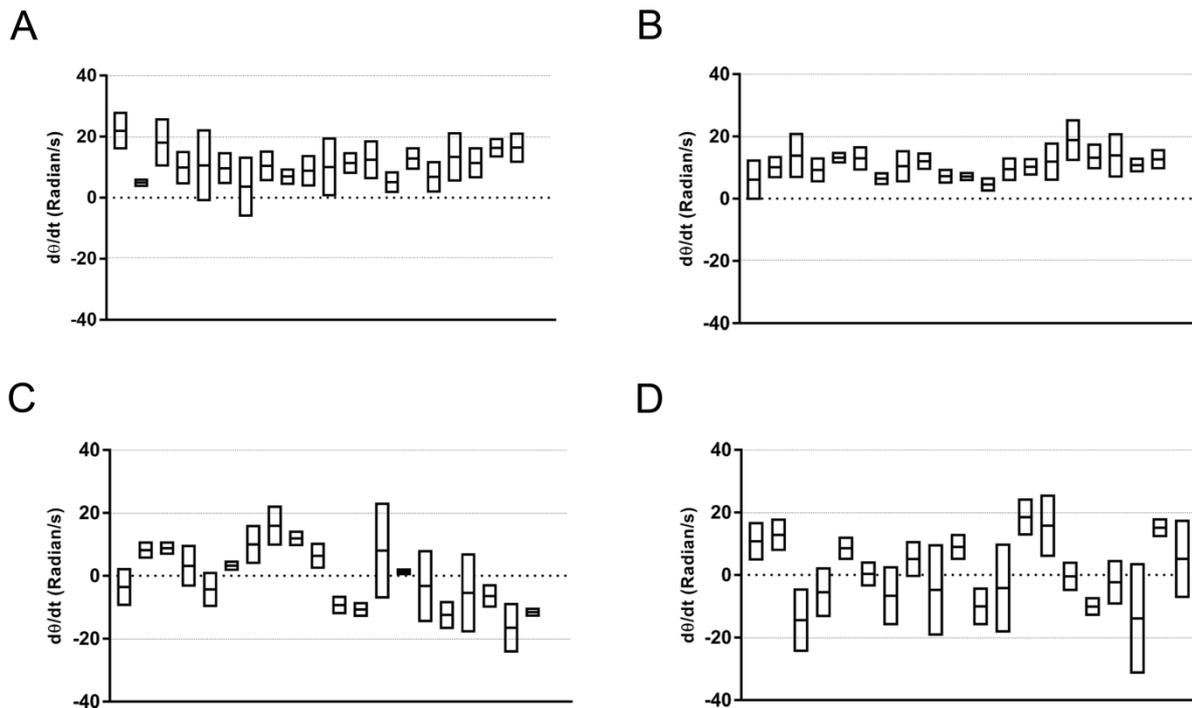


Abbildung 47: Quantitative Procrustesauswertung der kapazitierten murinen Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein

A-D. Abgebildet sind die gemittelten ($d\theta/dt$)-Werte für den zeitlichen Verlauf der gemittelten Procrustesanalyse für kapazitierte Kontroll-spermatozoen (A), kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen magnetischen Sepharosebeads (B), kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads sowie für kapazitierte Spermatozoen, die in Kapazitationspuffer mit 100 $\mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein inkubiert wurden (D). Pro Bedingung wurden 20 Spermatozoen aus insgesamt vier Mäusen analysiert. Alle untersuchten kapazitierten Kontroll-spermatozoen und Spermatozoen nach Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads zeigten einen positiven gemittelten ($d\theta/dt$)-Wert. Nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein wiesen 50% der analysierten kapazitierten Spermatozoen einen positiven und 50% einen negativen gemittelten ($d\theta/dt$)-Wert auf. Ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert korreliert mit einer CW Chiralität und ein negativer gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert mit einer CCW Chiralität.

8.4.3.2 Anstieg der VCL von kapazitierten murinen Spermatozoen nach Kontakt mit N-terminalem muZP2 Glykoprotein

Für die Analyse des Einflusses des muZP2 Glykoproteins auf die Geschwindigkeit muriner kapazitierter Spermatozoen wurde die VCL und VSL in 3D anhand der X-, Y- und Z-Koordinaten aus dem Kopf-Tracking berechnet. In Abbildung 48 ist das Ergebnis der VCL-Analyse als Streudiagramm dargestellt. Um die erfolgreiche Induktion der Kapazitation nachzuweisen, wurden als Kontrollen ebenfalls unkapazitierte und kapazitierte Spermatozoen in HS-Puffer gemessen. Die Kapazitation führt im Vergleich zu den unkapazitierten Kontroll-spermatozoen ($254 \pm 38 \mu\text{m/s}$) zu einer 1,8-fachen Steigerung der VCL ($449 \pm 70 \mu\text{m/s}$). Der Kontakt mit unbeladenen Sepharose-Beads ($417 \pm 54 \mu\text{m/s}$) bewirkt keine Änderung

der VCL im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($449 \pm 70 \mu\text{m/s}$). Nach Kontakt der kapazitierten Spermatozoen mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads steigt die VCL ($524 \pm 88 \mu\text{m/s}$) um den Faktor 1,2 im Vergleich zu den entsprechenden kapazitierten Kontrollspermatozoen. Kapazitierte Spermatozoen, gemessen in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ gelöstem muZP2 Glykoprotein, zeigen ebenfalls eine um den Faktor 1,2 höhere VCL ($546 \pm 67 \mu\text{m/s}$). Abbildung 48 zeigt, dass der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein zu einer Steigerung der VCL von kapazitierten Spermatozoen führt.

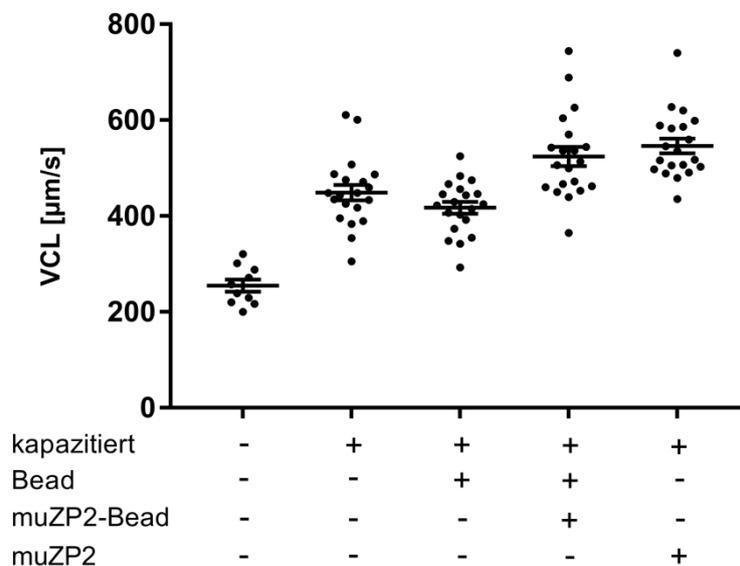


Abbildung 48: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die VCL von kapazitierten murinen Spermatozoen

Die Abbildung zeigt die anhand der X-, Y- und Z-Koordinaten der holografischen Aufnahmen berechnete VCL von unkapazitierten, kapazitierten und kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen oder mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads. Zusätzlich wurde die VCL von kapazitierten Spermatozoen bestimmt, die in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein gemessen wurden. Es wurden insgesamt zehn unkapazitierte und 20 kapazitierte Kontrollspermatozoen analysiert. Pro Bedingung wurden dann jeweils 20 kapazitierte Spermatozoen aus insgesamt vier Mäusen analysiert. Kapazitierte Spermatozoen zeigen eine höhere VCL als unkapazitierte Spermatozoen. Der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein führt zu einer Steigerung der VCL von kapazitierten Spermatozoen. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

Anschließend wurde der Einfluss des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf die VSL von kapazitierten Spermatozoen untersucht. Die VSL gibt den Weg pro Zeiteinheit ($\mu\text{m/s}$) entlang einer geraden Linie an, die an der ersten Position des Kopfs beginnt und an der letzten Position endet. Mittels DHM wurde die VSL im dreidimensionalen Raum bestimmt. Im Mittel zeigen die kapazitierten Spermatozoen eine um den Faktor 1,4 gesteigerte VSL ($64 \pm 28,7 \mu\text{m/s}$) als die unkapazitierten

Spermatozoen ($47 \pm 7,8 \mu\text{m/s}$), wobei generell eine starke Streuung bei den gemessenen VSL-Werten von kapazitierten Spermatozoen vorlag (Abbildung 49). Eine Steigerung der VSL kann nach Kapazitation beobachtet werden. Eine Reduktion der VSL kapazitierter Spermatozoen zeigt sich nach Kontakt mit unbeladenen Beads ($56 \pm 26 \mu\text{m/s}$), mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads ($56 \pm 18,4 \mu\text{m/s}$) und mit gelöstem muZP2 Glykoprotein ($61 \pm 24,5 \mu\text{m/s}$) (Abbildung 49). Der Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads sowie zum muZP2 Glykoprotein führt zu einer minimalen Reduktion der VSL von kapazitierten Spermatozoen.

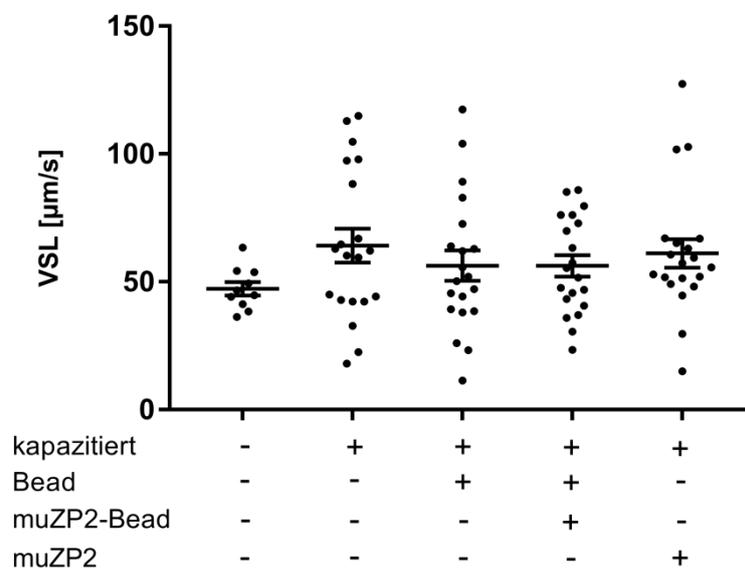


Abbildung 49: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die VSL von kapazitierten murinen Spermatozoen

In der Abbildung ist die anhand der X-, Y- und Z-Koordinaten der holografischen Aufnahmen berechnete VSL in $\mu\text{m/s}$ von unkapazitierten, kapazitierten und kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen oder mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads dargestellt. Zusätzlich wurde die VSL von kapazitierten Spermatozoen bestimmt, die in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein gemessen wurden. Insgesamt wurden zehn unkapazitierte und 20 kapazitierte Kontrollspermatozoen analysiert. Pro Bedingung wurden dann jeweils 20 kapazitierte Spermatozoen aus insgesamt vier Mäusen analysiert. Kapazitierte Spermatozoen zeigten eine höhere VSL als unkapazitierte Spermatozoen. Es kann eine geringe Reduktion der VSL nach Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads und zum muZP2 Glykoprotein detektiert werden. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

8.4.3.3 N-terminales muZP2 Glykoprotein beeinflusst die innerhalb eines Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von kapazitierten murinen Spermatozoen

Das Ergebnis der Untersuchung zum Einfluss des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf die innerhalb eines Schlagzyklus zurückgelegte Strecke ist in Abbildung 50 dargestellt. Nach Kapazitation erhöht sich die zurückgelegte Strecke von $169 \pm 49,0 \mu\text{m}$ auf $193 \pm 63,0 \mu\text{m}$. Dies entspricht einem Anstieg um den Faktor 1,14. Der Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads bewirkt keine Veränderung der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke ($200 \pm 37,7 \mu\text{m}$) von kapazitierten Spermatozoen. Für kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads kann im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($193 \pm 63,0 \mu\text{m}$) eine um den Faktor 1,2 höhere pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke detektiert werden ($237 \pm 46 \mu\text{m}$). Kapazitierte Spermatozoen gemessen in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein legen mit $185 \pm 39,6 \mu\text{m}$ eine vergleichbare Strecke pro Schlagzyklus wie die kapazitierten Kontrollspermatozoen ($193 \pm 63,0 \mu\text{m}$) zurück. Die durchgeführte Analyse weist einen Einfluss von muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads auf die pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von kapazitierten Spermatozoen nach.

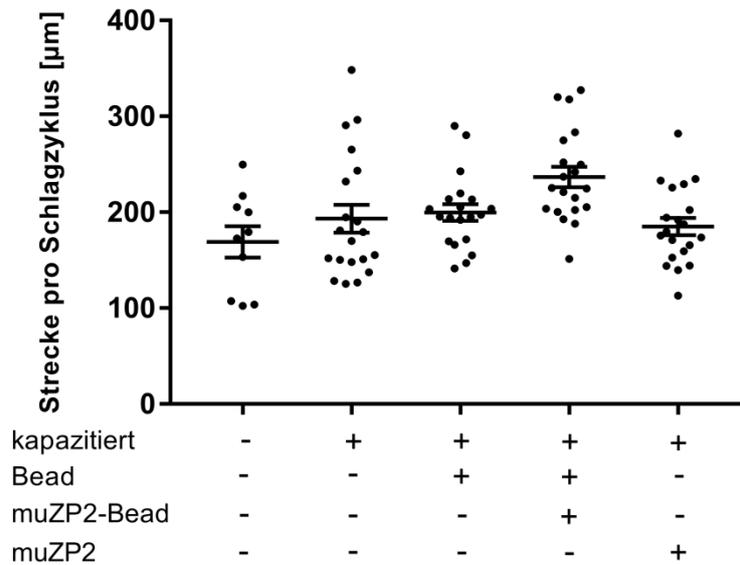


Abbildung 50: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die zurückgelegte Strecke innerhalb eines Schlagzyklus von kapazitierten murinen Spermatozoen

Die Abbildung zeigt die innerhalb eines Schlagzyklus zurückgelegte Strecke (μm) von unkapazitierten, kapazitierten und kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen oder mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads. Zusätzlich wurde die Strecke von kapazitierten Spermatozoen bestimmt, die in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein gemessen wurden. Es wurden insgesamt zehn unkapazitierte, 20 kapazitierte Kontrollspermatozoen und jeweils 20 kapazitierte Spermatozoen pro Bedingung gemessen (vier biologische Replikate). Kapazitierte Spermatozoen legen eine minimal höhere Strecke pro Schlagzyklus als unkapazitierte Spermatozoen zurück. Es kann ein Anstieg der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke für kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads detektiert werden. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

8.4.3.4 Minimale Änderung der XY-Auslenkung des Kopfs muriner kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein

Anschließend wurde anhand der X- und Y-Koordinaten aus dem Kopf-Tracking die Wirkung des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf die laterale XY-Auslenkung des Spermatozokopfs analysiert. Für unkapazitierte Spermatozoen kann im Mittel eine XY-Auslenkung des Kopfs von $6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ detektiert werden, während kapazitierte Spermatozoen eine 1,6-fach gesteigerte XY-Auslenkung des Kopfs ($9,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$) zeigen (Abbildung 51). Nach Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads steigt die laterale XY-Auslenkung von $9,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$ auf $10,7 \pm 1,8 \mu\text{m}$. Eine um den Faktor 1,2 höhere laterale Auslenkung des Spermatozokopfs zeigt sich im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($9,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$) nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads ($11,6 \pm 2,1 \mu\text{m}$). Die laterale XY-Auslenkung des Kopfs von kapazitierten Spermatozoen, gemessen in

Kapazitationspuffer mit 100 µg/ml muZP2 Glykoprotein, ($10,7 \pm 1,4$ µm) ist mit der von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen Sepharosebeads vergleichbar ($10,7 \pm 1,8$ µm). Die Analyse der lateralen XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs weist einen Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die Auslenkung bei kapazitierten Spermatozoen nach.

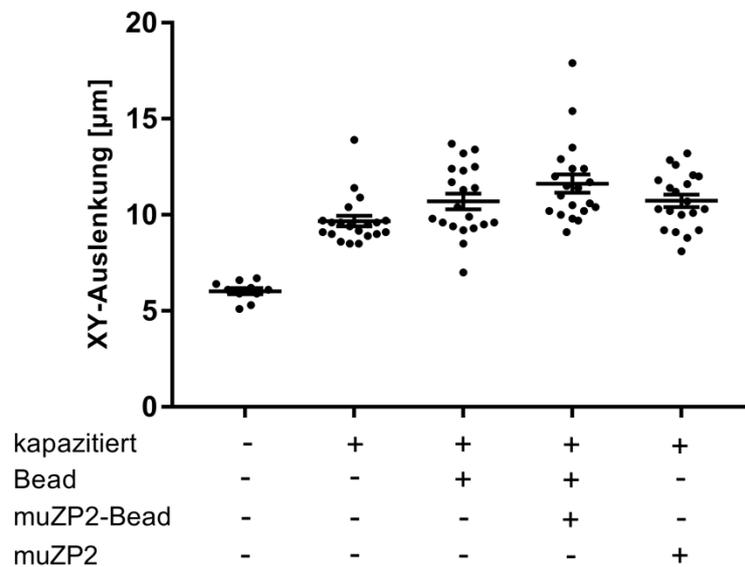


Abbildung 51: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs von kapazitierten Spermatozoen

Die Abbildung zeigt ein Streudiagramm der XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen und mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads. Zusätzlich wurde die XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs von kapazitierten Spermatozoen berechnet, die in Kapazitationspuffer mit 100 µg/ml muZP2 Glykoprotein gemessen wurden. Es wurden insgesamt zehn unkapazitierte, 20 kapazitierte Kontrollspermatozoen und jeweils 20 kapazitierte Spermatozoen pro Bedingung gemessen (vier biologische Replikate). Kapazitierte Spermatozoen zeigten eine höhere laterale XY-Auslenkung des Kopfs als unkapazitierte Spermatozoen. Es konnte eine Steigerung der lateralen XY-Auslenkung für kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharose-Beads detektiert werden. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

8.4.3.5 MuZP2 Glykoprotein beeinflusst die Flagellenauslenkung kapazitierter muriner Spermatozoen

Anschließend wurde die XY-Auslenkung des Flagellenschlags anhand der rekonstruierten XY Projektionen untersucht. Abbildung 52 zeigt repräsentativ die XY-Auslenkungen des Flagellums innerhalb eines Schlagzyklus eines unkapazitierten (Abbildung 52A) und eines kapazitierten Spermatozoons (Abbildung 52B). Für unkapazitierte Spermatozoen konnte eine laterale XY-Auslenkung von 22 µm und für kapazitierte Spermatozoen von 35 µm bestimmt werden. Somit kann eine Erhöhung

der lateralen XY-Auslenkung des Flagellenschlags nach Kapazitation beobachtet werden.

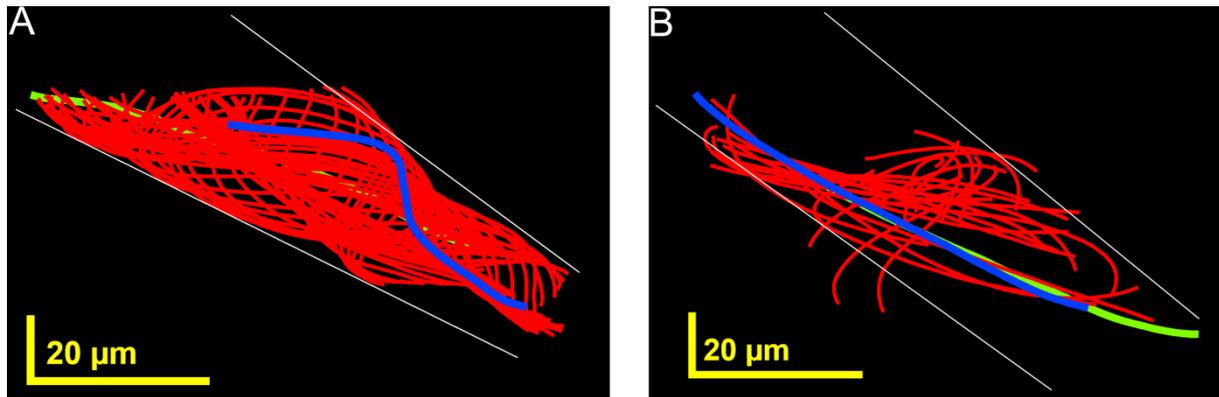


Abbildung 52: Einfluss der Kapazitation auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags

A-D. Die Abbildungen zeigen repräsentativ die Flagellenauslenkungen innerhalb eines Schlagzyklus in der XY-Ebene unkapazitierter (A) und kapazitierter Spermatozoen (B). Die grüne Linie gibt die erste und die blaue Linie die letzte Flagellenauslenkung innerhalb des Schlagzyklus wieder. Die weißen Linien begrenzen die maximalen Flagellenauslenkungen. Kapazitierte Spermatozoen zeigen eine höhere Flagellenamplitude als unkapazitierte Spermatozoen. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

Nachdem eine Steigerung der Flagellenauslenkung in der XY-Ebene nach Kapazitation gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die Flagellenbewegung untersucht. Eine Änderung des Flagellenschlags könnte dazu beitragen, dass der Spermatozoenkopf durch die ZP dringen und an die Zellmembran der Oozyte binden kann. Somit würde die Bindung an das muZP2 Glykoprotein eine entscheidende Rolle bei der Fertilisation der Oozyte einnehmen. Zunächst wurde der Einfluss des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags anhand der rekonstruierten XY Projektionen untersucht. Abbildung 53 zeigt repräsentativ die XY-Auslenkungen des Flagellums innerhalb eines Schlagzyklus eines kapazitierten Spermatozoons (Abbildung 53A), eines kapazitierten Spermatozoons nach Kontakt zu unbeladenen Beads (Abbildung 53B), nach Kontakt zu muZP2 Glykoprotein beladenen Beads (Abbildung 53C) sowie nach Kontakt zu in Kapazitationspuffer gelöstem muZP2 Glykoprotein (Abbildung 53D). Durch den visuellen Vergleich der einzelnen lateralen Auslenkungen des Flagellums scheint der Kontakt mit murinem ZP2 Glykoprotein zu einer Zunahme der XY-Auslenkung des Flagellums zu führen (Abbildung 53).

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde der Abstand zwischen den Maxima der Flagellenauslenkungen berechnet. Das Streudiagramm (Abbildung 53E) zeigt diese quantitative Auswertung von zehn unkapazitierten Spermatozoen und jeweils von 20

pro Bedingung gemessenen kapazitierten Spermatozoen. Unkapazitierte Spermatozoen weisen im Mittel eine XY-Auslenkung des Flagellums von $24 \pm 2,5 \mu\text{m}$ auf. Nach Kapazitation kann eine 1,4-fach gesteigerte XY-Auslenkung detektiert werden ($34 \pm 8,2 \mu\text{m}$). Der Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads führt im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($35 \pm 8,2 \mu\text{m}$) zu keiner Änderung der Flagellenauslenkung ($32 \pm 7,0 \mu\text{m}$). Es kann eine um den Faktor 1,2 höhere XY-Auslenkung des Flagellums nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads ($39 \pm 7,7 \mu\text{m}$) und eine 1,3-fache Steigerung nach Kontakt mit in Kapazitationspuffer gelöstem ZP2 Glykoprotein ($44 \pm 7,0 \mu\text{m}$) detektiert werden. Der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein führt bei kapazitierten Spermatozoen tendenziell zu einer Zunahme der XY-Auslenkung des Flagellums.

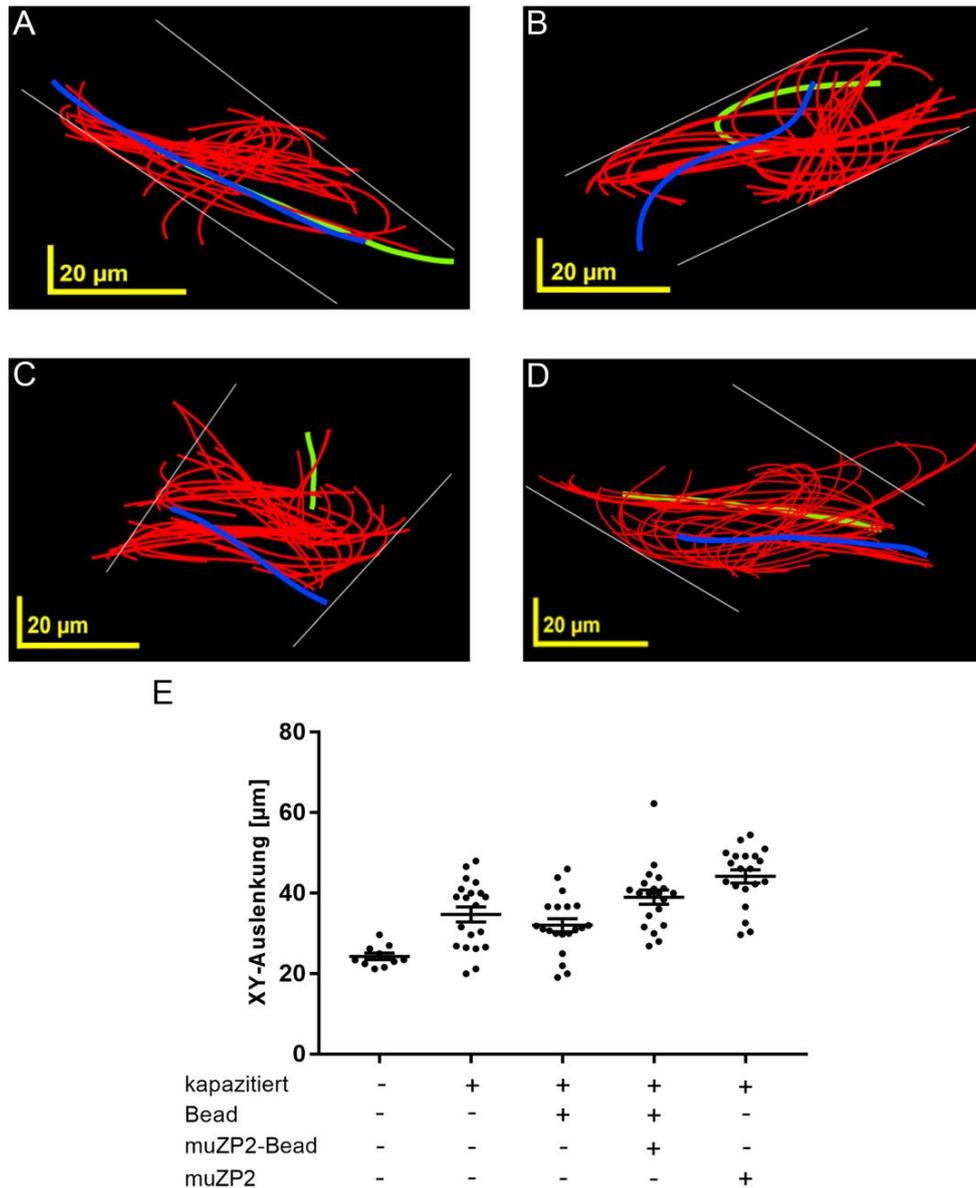


Abbildung 53: Einfluss des muZP2 Glykoproteins auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags kapazitierter Spermatozoen

A-D. Die Abbildungen zeigen repräsentativ die Flagellenauslenkungen innerhalb eines Schlagzyklus in der XY-Ebene kapazitierter Spermatozoen (A), kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt zu unbeladenen Beads (B), kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt zu mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads (C) und von kapazitierten Spermatozoen, die in Kapazitationspuffer mit 100 µg/ml muZP2 Glykoprotein gemessen wurden (D). Die grüne Linie gibt die erste und die blaue Linie die letzte Flagellenauslenkung innerhalb des Schlagzyklus wieder. Die weißen Linien begrenzen die maximalen Flagellenauslenkungen. E. Dargestellt ist die laterale XY-Auslenkung des Flagellenschlags aller untersuchten Spermatozoen unter den in A-D verwendeten Bedingungen. Als Kontrolle für die erfolgreiche Induktion der Kapazitation, wurde die XY-Auslenkung des Flagellenschlags von unkapazitierten Spermatozoen hinzugefügt. Kapazitierte Spermatozoen zeigen eine höhere Flagellenamplitude als unkapazitierte Spermatozoen. Es kann eine Steigerung der Auslenkung des Flagellenschlags in der XY-Ebene für kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein detektiert werden. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

Anschließend wurde ein potentieller Effekt des N-terminalen muZP2 Glykoproteins auf den Flagellenschlag muriner Spermatozoen in der Z-Ebene untersucht. Dafür wurde zunächst die Auslenkung des Flagellums von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen miteinander verglichen. Die Ermittlung der Z-Werte erfolgte mittels eines Skripts in Spyder anhand der X- und Y-Daten aus dem manuellen Flagellen-Tracking (Kapitel 8.1.1). Abbildung 54 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Z-Auslenkung des Flagellenschlags eines unkapazitierten (Abbildung 54A) und eines kapazitierten Spermatozoons (Abbildung 54B). Sowohl für unkapazitierte, als auch für kapazitierte Spermatozoen kann eine wellenförmige Flagellenbewegung in der Z-Ebene gemessen werden. Die Amplitude des Flagellenschlags in der Z-Ebene steigt in diesem Beispiel nach Kapazitation der murinen Spermatozoen um ca. 5 μm . Somit bewirkt die Kapazitation eine Steigerung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene.

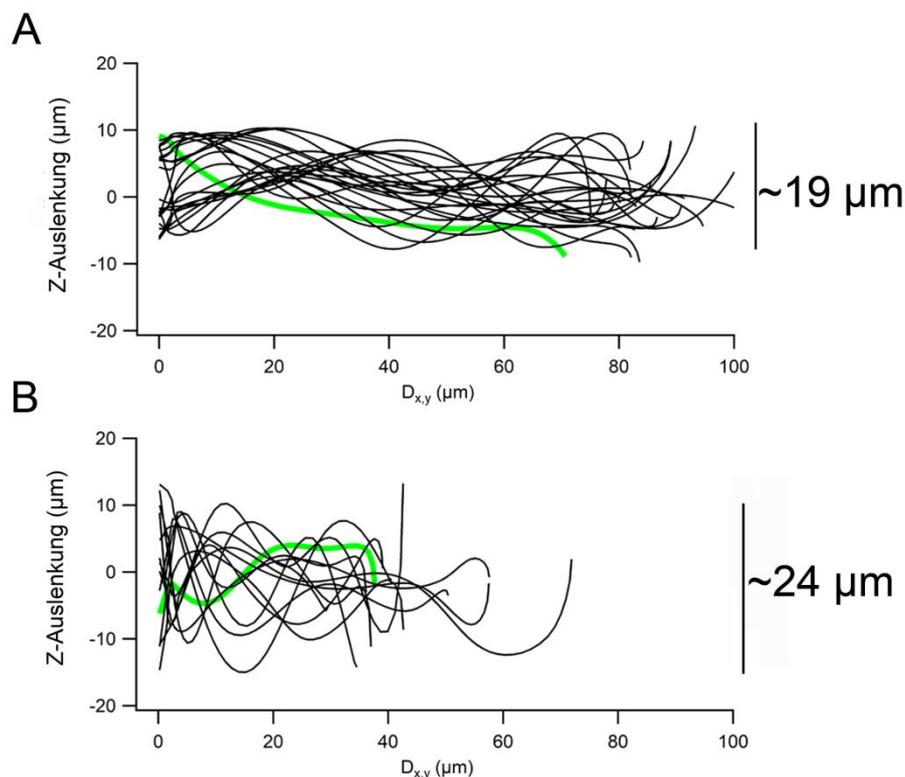


Abbildung 54: Erhöhte Flagellenauslenkung muriner Spermatozoen in der Z-Ebene nach Induktion der Kapazitation

A-B. Abgebildet ist die Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene eines unkapazitierten (A) und kapazitierten (B) Spermatozoons. Die Z-Werte wurden mittels der XY Koordination aus dem Flagellen-Tracking und der holografischen Aufnahmen rekonstruiert. Die Z-Werte wurden durch die Verwendung eines Polyfits des 7. Polynoms geglättet und gegen die kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$) aufgetragen. Die Z-Auslenkung des ersten Frames ist grün und die der weiteren Frames (A: 2–38, B: 3, 6–48) sind schwarz. In diesem repräsentativen Beispiel kann nach Kapazitation eine um den Faktor 1,3 höhere Flagellenauslenkung in der Z-Ebene detektiert werden.

Abbildung 55 zeigt repräsentative Ergebnisse der Flagellenanalyse der Z-Auslenkung eines kapazitierten Spermatozoons (A), eines kapazitierten Spermatozoons nach Kontakt zu unbeladenen Beads (B), nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein beladenen Beads (C) sowie nach Kontakt zu in Kapazitationspuffer gelöstem muZP2 Glykoprotein (D). Eine wellenförmige Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene kann für alle untersuchten Spermatozoen nachgewiesen werden (Abbildung 55A-D). Das kapazitierte Kontrollpermatozoon zeigt eine vergleichbare Z-Auslenkung des Flagellums ($23\ \mu\text{m}$) wie das kapazitierte Spermatozoon nach Kontakt zu einem unbeladenen Sepharosebead ($24\ \mu\text{m}$). Die maximale Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene ist bei Spermatozoen mit Kontakt zu einem mit muZP2 Glykoprotein beladenem Bead ($27\ \mu\text{m}$) oder zu dem in Kapazitationspuffer gelöstem muZP2 Glykoprotein ($29\ \mu\text{m}$) im Vergleich zu der Auslenkung von kapazitierten Kontrollpermatozoen ($23\ \mu\text{m}$) um den Faktor 1,2 bzw. 1,3 erhöht. Die Flagellenanalyse ergibt eine Steigerung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene nach ZP2 Kontakt.

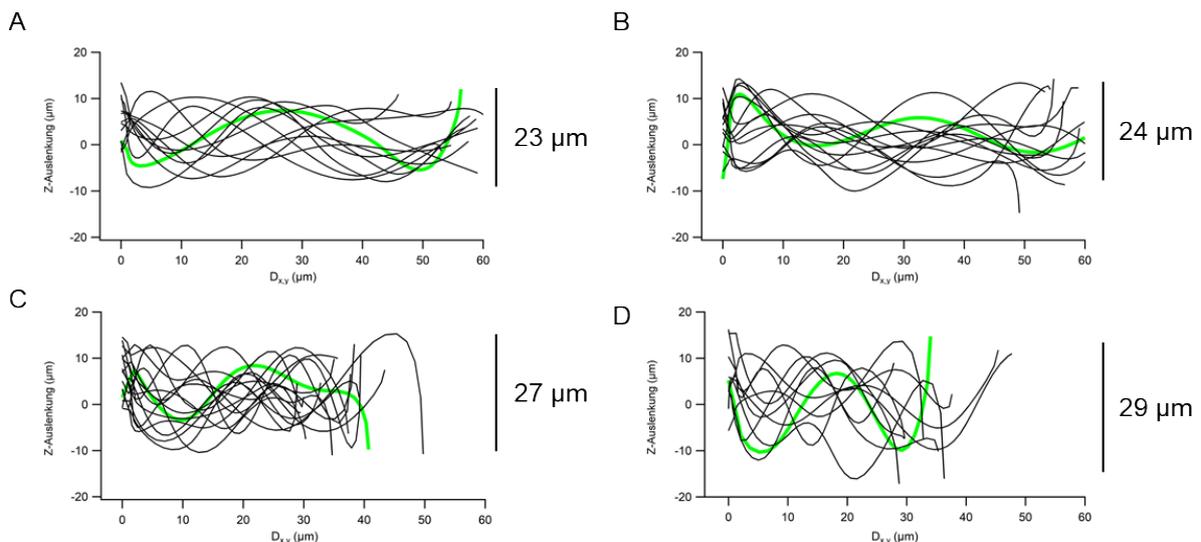


Abbildung 55: Darstellung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von kapazitierten Spermatozoen

A-D. Abgebildet ist die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene eines kapazitierten Kontrollpermatozoons (A), eines kapazitierten Spermatozoons nach Kontakt mit einem unbeladenen Sepharosebead (B), eines kapazitierten Spermatozoons nach Kontakt mit einem muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebead (C) sowie eines kapazitierten Spermatozoons nach Kontakt mit in Kapazitationspuffer gelöstem muZP2 Glykoprotein (D). Die Z-Werte wurden mittels der XY Koordination aus dem Flagellen-Tracking und der holografischen Aufnahmen rekonstruiert, durch die Verwendung eines Polyfits des 7. Polynoms geglättet und gegen die kalkulierte Distanz des Flagellums entlang der XY-Projektionen ($D_{x,y}$) aufgetragen. Die Z-Auslenkung des ersten Frames ist grün und die der weiteren Frames sind schwarz. In diesen repräsentativen Beispielen kann nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein eine höhere Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene detektiert werden. Alle Messungen erfolgten im Kapazitationspuffer.

Das Streudiagramm (Abbildung 56) zeigt die quantitative Auswertung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von zehn unkapazitierten und jeweils 20 pro Bedingung gemessenen kapazitierten Spermatozoen. Unkapazitierte Spermatozoen zeigen im Mittel eine Z-Auslenkung des Flagellenschlags von $20 \pm 1,8 \mu\text{m}$. Nach Kapazitation kann im Mittel eine leichte Steigerung (Faktor 1,1) detektiert werden ($22 \pm 5,4 \mu\text{m}$). Der Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads führt zu keiner Änderung der Flagellenauslenkung ($23 \pm 5,4 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen. Die Z-Auslenkung des Flagellums hingegen steigt jeweils um den Faktor 1,2 nach Kontakt mit dem N-terminalen muZP2 Glykoprotein beladenem Bead ($27 \pm 4,4 \mu\text{m}$) und mit dem in Kapazitationspuffer gelöstem muZP2 Glykoprotein ($26,7 \pm 4,2 \mu\text{m}$). Die Analyse ergibt eine tendenzielle Zunahme der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein.

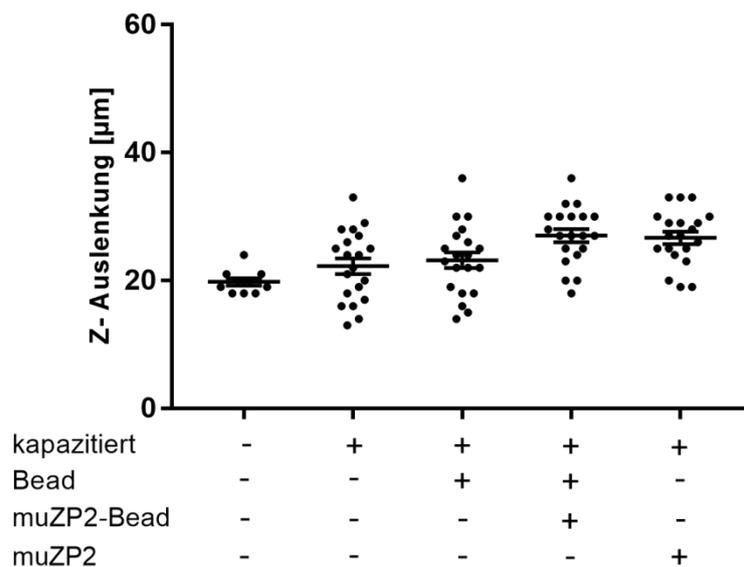


Abbildung 56: Wirkung des muZP2 Glykoproteins auf die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von kapazitierten Spermatozoen

Dargestellt ist die Z-Auslenkung des Flagellenschlags von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit unbeladenen bzw. mit muZP2 Protein beladenen Sepharosebeads. Zusätzlich wurde die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von Spermatozoen, die in Kapazitationspuffer mit $100 \mu\text{g/ml}$ muZP2 Glykoprotein gemessen wurden, bestimmt. Als Kontrolle für die erfolgreiche Induktion der Kapazitation wurde ebenfalls die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen gemessen. Nach Kapazitation steigt die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene um den Faktor 1,1. Der Kontakt zu unbeladenen Sepharosebeads bewirkt keine Änderung der Flagellenauslenkung. Nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein kann eine Steigerung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene gemessen werden. Unkapazitierte Spermatozoen wurden in HS-Puffer gemessen, während alle anderen Messungen im Kapazitationspuffer erfolgten.

In dieser Arbeit konnte mittels DHM eine Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie kapazitierter Spermatozoen nach ZP2 Kontakt nachgewiesen werden. Die vierdimensionalen Analysen ergaben zusätzlich eine Steigerung der VCL, der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke, der lateralen XY-Auslenkung des Spermatozokopfs sowie eine Steigerung der Flagellenauslenkung in der X-, Y- und Z-Ebene nach ZP2 Kontakt. Parallel wurde der Einfluss der Kapazitation auf die vierdimensionale Bewegung untersucht. Es konnte eine Steigerung von verschiedenen Geschwindigkeitsparametern (VCL, VSL), von der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke sowie von der Flagellenauslenkung in der X-, Y- und Z-Ebene nach Kapazitation detektiert werden. Die Kapazitation bewirkt keine Änderung der Chiralität der Schwimmtrajektorie.

Anschließend soll untersucht werden, ob bereits die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht eine Änderung des vierdimensionalen Bewegungsmusters von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen bewirkt.

8.5 Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf das Schwimmverhalten muriner Spermatozoen in 4D

Durch die im Ovidukt stattfindenden Prozesse erreichen nur 10-20 Spermatozoen die Oozyte (Miki und Clapham, 2013). Es ist naheliegend, dass Änderungen der Spermatozobewegung Voraussetzungen für ein gerichtetes Schwimmen zur Oozyte sind. Um die vorherigen Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Kapazitation auf das vierdimensionale Schwimmverhalten muriner Spermatozoen zu validieren, wurden in diesem Abschnitt der Arbeit erneut sowohl unkapazitierte als auch kapazitierte Kontrollspermatozoen untersucht. Gleichzeitig wurde erstmals das Schwimmverhalten muriner unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht mittels DHM analysiert, um potentielle Veränderungen des Schwimmverhaltens, die kurz vor dem Befruchtungsprozess stattfinden müssen, zu identifizieren. Im Menschen konnte bereits gezeigt werden, dass die Freisetzung von Progesteron durch die humane Kumuluszellschicht (Schuetz und Dubin, 1981) zu einer Stimulation des CatSper-Kanals und einer damit verbundenen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Lishko et al., 2011; Smith et al., 2013; Strunker et al., 2011) führt. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration ist essentiell für die Induktion der hyperaktivierten Motilität humaner Spermatozoen (Gakamsky et al., 2009; Suarez, 2008; Uhler et al., 1992). Bei

Mäusen ist der CatSper-Kanal jedoch insensitiv für Progesteron. Anhand von vierdimensionalen Bewegungsanalysen soll untersucht werden, ob es in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht zu einer Veränderung der Schwimmbewegung kommt, die auf eine Sekretion von Faktoren hinweisen ausgehend von der Oozyte oder der Kumuluszellschicht. Diese Ergebnisse würden zu einem besseren Verständnis der im Ovidukt ablaufenden Selektionsprozesse beitragen und Parameter identifizieren, die essentiell für eine erfolgreiche Befruchtung der Oozyte sind.

Für die Analyse wurden zunächst murine Oozyten mit oder ohne Kumuluszellen präpariert (Kapitel 7.1.1.4). Nach Isolierung muriner Spermatozoen aus dem Ductus deferens und dem Ductus epididymidis (Kapitel 7.1.1.1) wurde bei der Hälfte der Spermatozoensuspension die Kapazitation induziert (Kapitel 7.1.2). Anschließend wurde jeweils eine Oozyte mit oder ohne Kumuluszellschicht in eine Messkammer mit einer Tiefe von 100 μm (Leja Products B.V.) übertragen und 1×10^7 Zellen/ml unkapazitierter oder kapazitierter Spermatozoen hinzugefügt.

8.5.1 Weder die räumliche Nähe zur Oozyte noch zur Kumuluszellschicht verändert die Chiralität der Schwimmtrajektorie

Zur Untersuchung eines Einflusses von Oozyten oder Kumuluszellen auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen, wurden Procrustesanalysen (Kapitel 8.1.4) durchgeführt. In Abbildung 57 sind in jedem Koordinatensystem (A-F) jeweils fünf repräsentative gemittelte Schwimmtrajektorien aus den Procrustesanalysen dargestellt. Insgesamt wurde die Chiralität von 12 Spermatozoen pro Bedingung untersucht. Alle untersuchten Spermatozoen zeigen eine Chiralität der Schwimmtrajektorie im Uhrzeigersinn (CW) unabhängig von ihrem Kapazitationsstatus oder der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht (Abbildung 57).

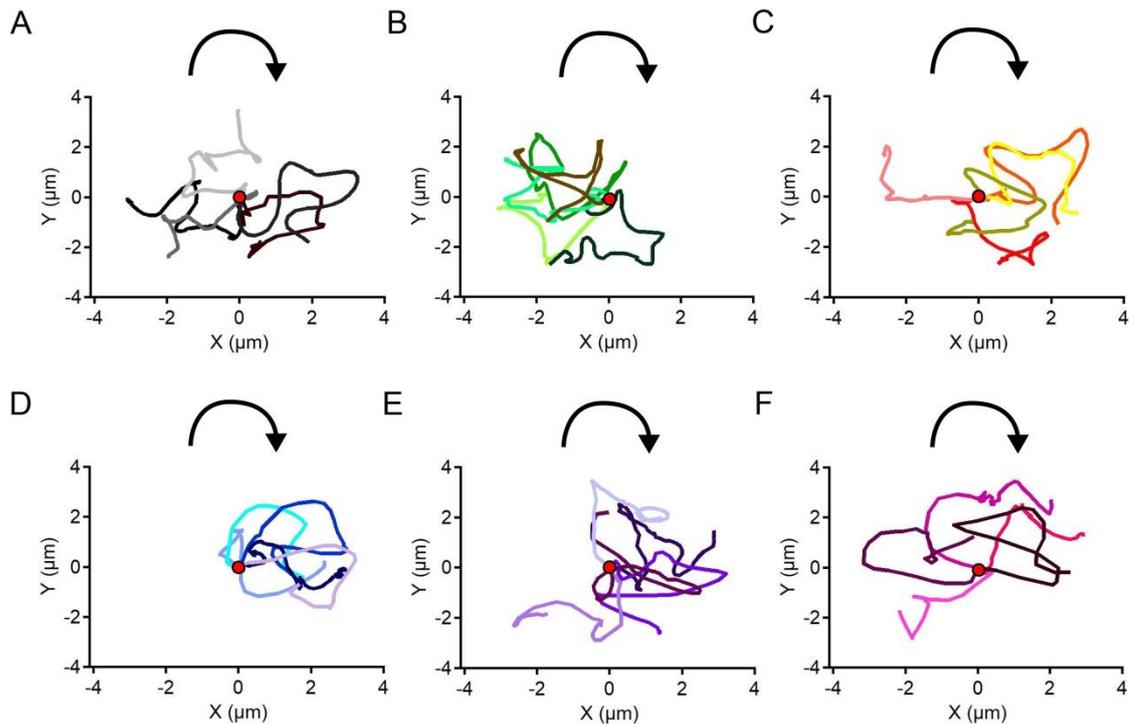


Abbildung 57: Kein Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen

A-F. Die Abbildungen zeigen jeweils die gemittelten Procrustesausrichtungen der Schwimmtrajektorien von fünf repräsentativen murinen Spermatozoen. Alle Trajektorien wurden mit ihrem Startpunkt in den Ursprung gelegt (roter Punkt). Gezeigt sind Procrustesanalysen unkapazitierten Spermatozoen (A), unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte (B) und unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluskomplex (C) sowie Procrustesausrichtungen von kapazitierten Spermatozoen (D), von kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte (E) und von kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluskomplex (F). Der Pfeil gibt die Chiralität der einzelnen Schwimmtrajektorien wieder. Auf den Koordinatenachsen sind jeweils die X- und Y-Werte des Kopf-Trackings in μm aufgetragen. Alle untersuchten Spermatozoen zeigen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie unabhängig vom Kapazitationsstatus oder der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht.

Um eine objektive Analyse der Chiralität zu ermöglichen, wurden die Koordinaten der gemittelten Procrustesstrajektorien zunächst in Polarkoordinaten umgerechnet. Anschließend wurden die Zeitpunkte der Änderungen gegen dessen Winkel (θ) ermittelt und die zeitliche Ableitung des Winkels ($d\theta/dt$) bestimmt. Abschließend wurde der Mittelwert der zeitlichen Ableitung des Winkels ($d\theta/dt$) berechnet. In Abbildung 58 sind die mittleren ($d\theta/dt$)-Werte gemessen in Radian/s von jeweils zwölf analysierten Spermatozoen pro Bedingung dargestellt. Abbildung 58A zeigt die Chiralitätsanalyse von unkapazitierten Spermatozoen ohne bzw. mit räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht, während die Abbildung 58B die analoge Chiralitätsanalyse von kapazitierten Spermatozoen wiedergibt. Ein positiver mittlerer ($d\theta/dt$)-Wert zeigt dabei eine CW Chiralität an, während ein negativer mittlerer ($d\theta/dt$)-Wert mit einer CCW Chiralität korreliert. Das Ergebnis der visuellen

Auswertung (Abbildung 57) konnte nach Berechnung des mittleren ($d\theta/dt$)-Wert bestätigt werden (Abbildung 58). Es wurde für alle untersuchten Spermatozoen, unabhängig vom Kapazitationsstatus und der räumlichen Nähe zur Oozyte oder Kumuluszellschicht, ein positiver mittlerer ($d\theta/dt$)-Wert ermittelt und somit eine CW Chiralität der entsprechenden Schwimmtrajektorie nachgewiesen.

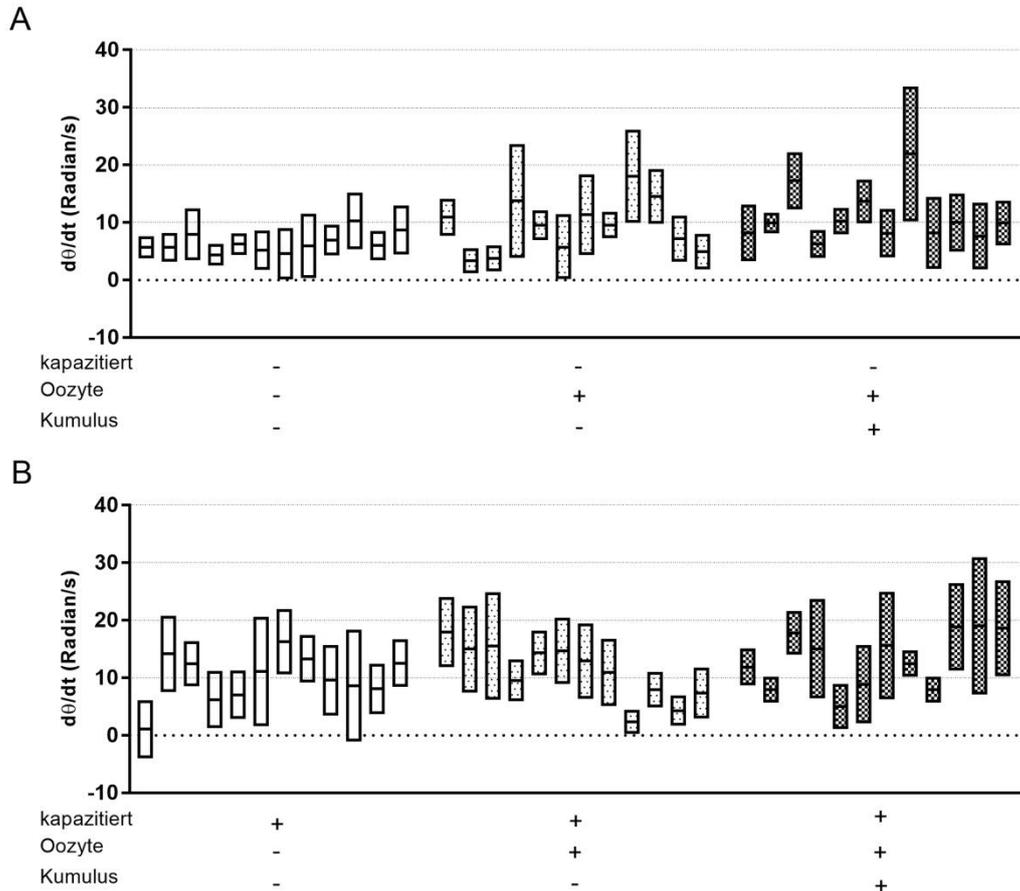


Abbildung 58: Auswertung der Procrustesanalysen von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht

A-B. Die Abbildung zeigt die gemittelten ($d\theta/dt$)-Werte für den zeitlichen Verlauf der gemittelten Procrustes Analyse ($n=12$, sechs biologische Replikate) unkapazitierten (A) und kapazitierten (B) Spermatozoen. Die X-Achse zeigt den jeweiligen Kapazitationsstatus, sowie die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht an. Für die Analyse wurden die X- und Y-Koordinaten der holografischen Aufnahmen verwendet. Es kann für alle untersuchten Spermatozoen unabhängig vom Kapazitationsstatus oder der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert berechnet werden. Ein positiver gemittelter ($d\theta/dt$)-Wert zeigt eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie an. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

8.5.2 Die räumliche Nähe zur Oozyte oder zur Oozyte mit Kumuluszellschicht führt zu einer geringen Änderung der Geschwindigkeit bei kapazitierten Spermatozoen

Um einen Effekt der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht auf die Schwimmgeschwindigkeit muriner unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen zu untersuchen, wurde die VCL pro Schlagzyklus anhand der dreidimensionalen Daten des Kopf-Trackings berechnet. In Abbildung 59 ist das Ergebnis der VCL-Analyse als Streudiagramm dargestellt. Unkapazitierte Spermatozoen zeigen im Mittel eine VCL von $249 \pm 54 \mu\text{m/s}$, kapazitierte Spermatozoen eine VCL von $466 \pm 66 \mu\text{m/s}$. Somit steigt nach Kapazitation die VCL um den Faktor 1,9. Im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen ($249 \pm 54 \mu\text{m/s}$) kann keine Änderung der VCL von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte ($272 \pm 54 \mu\text{m/s}$) oder zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($256 \pm 47 \mu\text{m/s}$) detektiert werden. Die VCL der kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte ($397 \pm 52 \mu\text{m/s}$) ist im Vergleich zu der VCL kapazitierter Kontrollspermatozoen ($466 \pm 66 \mu\text{m/s}$) um 14% reduziert. In räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht erhöht sich die durchschnittliche VCL von kapazitierten Spermatozoen ($524 \pm 117 \mu\text{m/s}$) im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($466 \pm 66 \mu\text{m/s}$) um den Faktor 1,12.

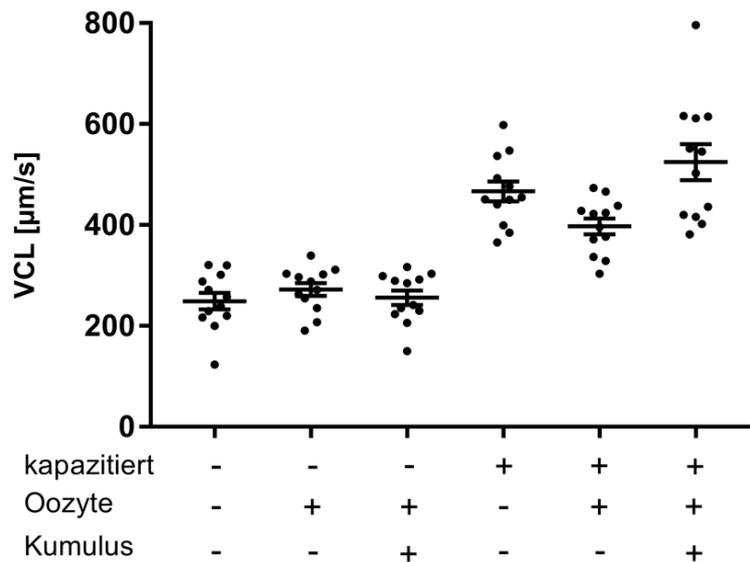


Abbildung 59: Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die VCL unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen

Dargestellt ist die VCL von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen ($n=12$, sechs biologische Replikate). Nach Kapazitation erhöht sich die VCL im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen um den Faktor 1,9. Es kann keine Änderung der VCL von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht detektiert werden. Die räumliche Nähe zur Oozyte führt zu einer geringen Reduktion und die räumliche Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht zu einer geringen Zunahme der VCL von kapazitierten Spermatozoen. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

Anschließend wurde ein potentieller Effekt der Oozyte bzw. der Oozyte mit Kumuluszellschicht auf die pro Schlagzyklus gemessene VSL von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen untersucht. Die VSL gibt den Weg pro Zeiteinheit ($\mu\text{m/s}$) entlang einer geraden Linie an, die an der ersten Position des Kopfs beginnt und an der letzten Position endet. Abbildung 60 zeigt das Ergebnis der VSL-Analyse anhand eines Streudiagramms. Für unkapazitierte Spermatozoen kann eine durchschnittliche VSL von $48 \pm 12 \mu\text{m/s}$ und für kapazitierte Spermatozoen von $56 \pm 28 \mu\text{m/s}$ detektiert werden. Dies entspricht einer Zunahme um den Faktor 1,2. Während im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen ($48 \pm 12 \mu\text{m/s}$) keine Änderung der VSL von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte ($51 \pm 17 \mu\text{m/s}$) gemessen werden kann, erhöht sich im Mittel die VSL von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht um den Faktor 1,2 ($59 \pm 20 \mu\text{m/s}$). Es kann jeweils im Vergleich zur VSL von kapazitierten Spermatozoen ($56 \pm 26 \mu\text{m/s}$) eine Zunahme der VSL um das 1,2-fache für kapazitierte Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte ($67,5 \pm 29 \mu\text{m/s}$) und um das 1,6-fache für kapazitierte Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($88 \pm 34 \mu\text{m/s}$) detektiert werden. Tendenziell zeigt sich ein

Einfluss der Oozyte mit Kumuluszellschicht auf die VSL von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen. Zusätzlich scheint die Oozyte mit Kumuluszellschicht die VSL von kapazitierten Spermatozoen zu erhöhen.

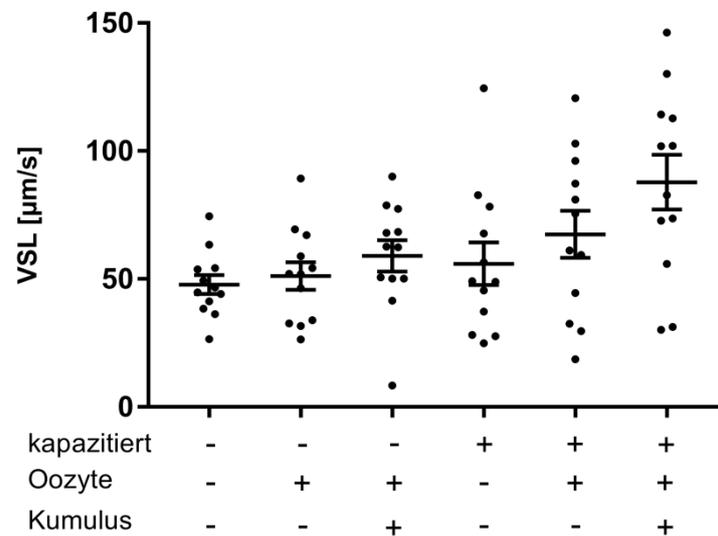


Abbildung 60: Einfluss der Oozyte und der Kumuluszellschicht auf die VSL unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen

Dargestellt ist die VSL von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen ($n=12$, sechs biologische Replikate). Nach Kapazitation erhöht sich die VSL im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen um den Faktor 1,2. Es kann keine Änderung der VSL von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte detektiert werden. Die räumliche Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht führt zu einer 1,2-fachen Steigerung der VSL von unkapazitierten Spermatozoen. Die VSL von kapazitierten Spermatozoen erhöht sich in räumlicher Nähe zur Oozyte um den Faktor 1,2 und in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht um den Faktor 1,6. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Oozyte bzw. der Oozyte mit Kumuluszellschicht auf die pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen untersucht (Abbildung 61). Unkapazitierte Spermatozoen zeigen im Mittel eine pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von $165 \pm 45 \mu\text{m}$. Die Kapazitation führt im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen zu keiner Veränderung der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke ($163 \pm 40 \mu\text{m}$). Während sich die Strecke von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen um 20% reduziert ($131 \pm 33 \mu\text{m}$), kann eine Reduktion von 32% für unkapazitierte Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($112 \pm 27 \mu\text{m}$) detektiert werden. Kapazitierte Spermatozoen zeigen im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($163 \pm 40 \mu\text{m}$) eine 1,1-fache Steigerung der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke in räumlicher Nähe zur Oozyte ($177 \pm 43 \mu\text{m}$) bzw. eine

Reduktion um 8% in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($150 \pm 35 \mu\text{m}$).

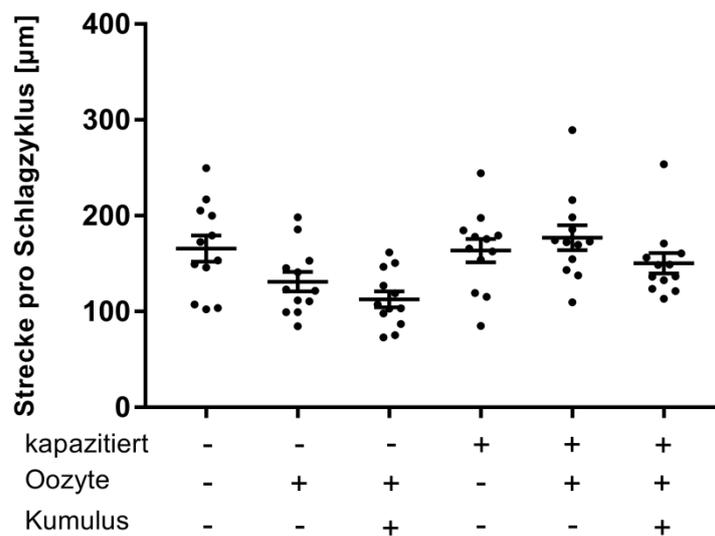


Abbildung 61: Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die zurückgelegte Strecke pro Schlagzyklus unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen

Gezeigt ist die innerhalb eines Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($n=12$, sechs biologische Replikate). Keine Änderung der zurückgelegten Strecke pro Schlagzyklus kann nach Kapazitation im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen detektiert werden. Für unkapazitierte Spermatozoen kann eine 20%-ige Reduktion der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke in räumlicher Nähe zur Oozyte, sowie eine 32%-ige Reduktion in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht detektiert werden. Die räumliche Nähe zur Oozyte bewirkt bei kapazitierten Spermatozoen eine um den Faktor 1,1 gesteigerte und die räumliche Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht eine um 8% erniedrigte pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

8.5.3 Keine Änderungen der lateralen XY-Auslenkung des Spermatozonenkopfs in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht

Nach Analyse des Einflusses von Oozyten und der Kumuluszellschicht auf die Geschwindigkeit von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen, wurde deren Einfluss auf die laterale XY-Auslenkung des Spermatozonenkopfs untersucht. Für die Analyse wurden nur die X- und Y-Koordinaten der holografischen Aufnahme verwendet. Während unkapazitierte Spermatozoen eine durchschnittliche laterale XY-Auslenkung des Kopfs von $6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ aufweisen, führt die Kapazitation zu einer 1,8-fachen Zunahme ($11 \pm 1,8 \mu\text{m}$) (Abbildung 62). Es kann keine Änderung der lateralen XY-Auslenkung des Kopfs von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte ($5 \pm 1,0 \mu\text{m}$) bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($5 \pm 1,2 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen ($6 \pm 0,6 \mu\text{m}$)

detektiert werden. Weder die Oozyte ($11 \pm 1,4 \mu\text{m}$), noch die Oozyte mit Kumuluszellschicht ($11 \pm 1,0 \mu\text{m}$) bewirken eine Änderung der lateralen XY-Auslenkung des Kopfs von kapazitierten Spermatozoen im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($11 \pm 1,8 \mu\text{m}$). Unter den gemessenen Bedingungen kann kein Einfluss der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht auf die XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs detektiert werden.

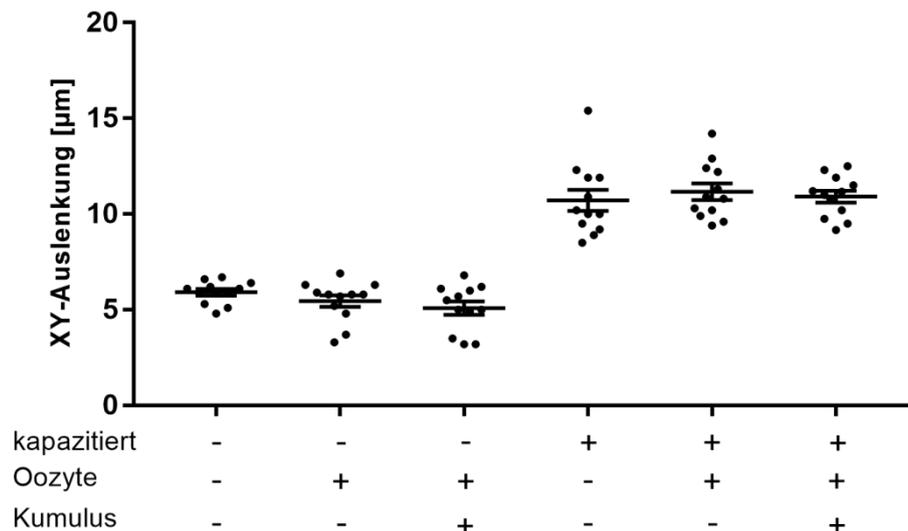


Abbildung 62: Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen

Abgebildet ist die XY-Auslenkung von Spermatozoenköpfe unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($n=12$, sechs biologische Replikate). Als Kontrolle wurden ebenfalls unkapazitierte und kapazitierte Spermatozoen ohne Kontakt zur Oozyte oder Kumuluszellschicht analysiert. Die Kapazitation führt zu einer 1,8-fachen Steigerung der lateralen XY-Auslenkung des Kopfs. Es kann keine Änderung der lateralen XY-Auslenkung des Kopfs von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollspermatozoen detektiert werden. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

8.5.4 Die räumliche Nähe zur Oozyte oder zur Oozyte mit Kumuluszellschicht führt zu keiner Änderung des Flagellenschlags von kapazitierten murinen Spermatozoen

Anhand der digital holografischen Aufnahmen und der daraus rekonstruierten XY-Projektionen, wurde der Einfluss von Oozyten und Kumuluszellen auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags analysiert. Um die X- und Y-Positionen des Flagellums zu erhalten, wurde eine „frame-by-frame“ Analyse des Flagellenschlags unter Verwendung eines programmierten Algorithmus in IgorPro™ (Version 6.36, Wavemetrics) durchgeführt. Das Streudiagramm (Abbildung 63) zeigt die quantitative

Auswertung der XY-Auslenkung des Flagellenschlags von jeweils 12 murinen Spermatozoen. Für unkapazitierte Spermatozoen kann im Mittel eine Auslenkung von $24 \pm 2,5 \mu\text{m}$ detektiert werden, während nach Kapazitation die durchschnittliche XY-Auslenkung des Flagellenschlags auf $37 \pm 5,9 \mu\text{m}$ ansteigt. Dies entspricht einer Zunahme der XY-Auslenkung des Flagellums um den Faktor 1,5. Die räumliche Nähe zur Oozyte bewirkt keine Änderung der XY-Auslenkung von unkapazitierten ($25,8 \pm 5,6 \mu\text{m}$) oder kapazitierten Spermatozoen ($38,3 \pm 9,1 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll spermatozoen (unkapazitiert: $24,2 \pm 2,5 \mu\text{m}$, kapazitiert: $37,3 \pm 5,9 \mu\text{m}$). Eine 1,2-fache Steigerung der XY-Auslenkung des Flagellums zeigt sich beim Vergleich mit den unkapazitierten Kontroll spermatozoen für unkapazitierte Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($30 \pm 2,3 \mu\text{m}$) (Abbildung 63). Die räumliche Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht führt bei kapazitierten Spermatozoen zu einer 1,1-fachen Zunahme der lateralen XY-Auslenkung des Flagellums ($41 \pm 9,2 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den kapazitierten Kontroll spermatozoen ($38,3 \pm 9,1 \mu\text{m}$). Die Ergebnisse deuten einen leichten Einfluss der Kumuluszellschicht auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen an.

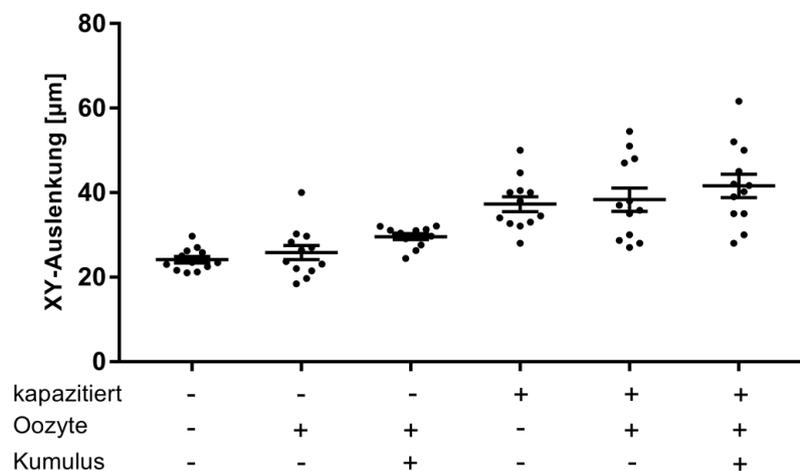


Abbildung 63: Effekt von Oozyten und Kumuluszellen auf die XY-Auslenkung des Flagellenschlags unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen

Dargestellt ist die XY-Auslenkung des Flagellenschlags von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($n=12$, sechs biologische Replikate). Als Kontrolle wurden ebenfalls unkapazitierte und kapazitierte Spermatozoen ohne Kontakt zur Oozyte oder Kumuluszellschicht analysiert. Für die Untersuchung wurden die X- und Y-Koordinaten aus der „frame-by-frame“-Analyse des Flagellenschlags verwendet. Die Kapazitation führt zu einer 1,5-fachen Zunahme der XY-Auslenkung des Flagellums. Die räumliche Nähe zur Oozyte bewirkt keine Änderung der Auslenkung von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen. In räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht kann für unkapazitierte Spermatozoen eine 1,2-fache und für kapazitierte Spermatozoen eine 1,1-fache Zunahme der XY-Auslenkung des Flagellenschlags detektiert werden. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

Anschließend wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht und der Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene von freischwimmenden Spermatozoen untersucht. Das Streudiagramm (Abbildung 64) zeigt die quantitative Auswertung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von jeweils zwölf unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht. Für kapazitierte Spermatozoen ($27 \pm 6,2 \mu\text{m}$) kann im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen ($19 \pm 1,1 \mu\text{m}$) eine um den Faktor 1,4 höhere Z-Auslenkung des Flagellums beobachtet werden. Unkapazitierte Spermatozoen zeigen in räumlicher Nähe zur Oozyte ($17 \pm 2,0 \mu\text{m}$) bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($16 \pm 1,8 \mu\text{m}$) jeweils eine um den Faktor 1,2 geringere Flagellenauslenkung als die unkapazitierten Kontrollspermatozoen ($19 \pm 1,1 \mu\text{m}$). Die räumliche Nähe kapazitierter Spermatozoen zur Oozyte ($27 \pm 8,0 \mu\text{m}$) bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht ($26 \pm 3,8 \mu\text{m}$) bewirkt im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen ($27 \pm 6,2 \mu\text{m}$) keine Änderung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene. Unter den gemessen Bedingungen scheint die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht zu keiner Änderung der Flagellenamplitude bei unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen zu führen.

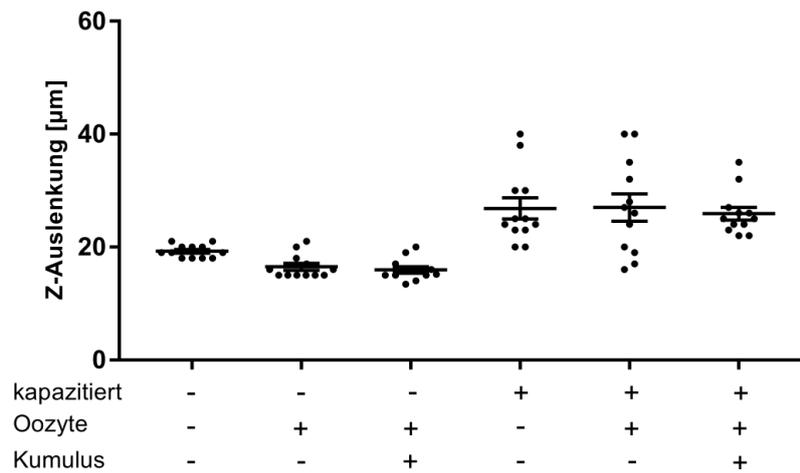


Abbildung 64: Effekt von Oozyten und Kumuluszellen auf die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen

Dargestellt ist die Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht (n=12, sechs biologische Replikate). Nach Kapazitation erhöht sich die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene um den Faktor 1,4. Die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht bewirkt bei unkapazitierten Spermatozoen im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen eine um den Faktor 1,2 niedrigere Auslenkung des Flagellenschlags in der Z-Ebene. Es kann keine Änderung der Auslenkung in der Z-Ebene in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht für kapazitierte Spermatozoen im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen detektiert werden. Alle Messungen erfolgten im HS-Puffer.

In dieser Arbeit konnte mittels DHM keine Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie unkapazitierter bzw. kapazitierter Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht nachgewiesen werden. Die vierdimensionalen Analysen ergaben geringe Änderungen der Geschwindigkeiten, der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke sowie der lateralen XY-Auslenkung des Flagellums in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht. Die laterale XY-Auslenkung des Spermatozokopfs und die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene änderten sich nicht.

9 Diskussion

Während die Spermatozoen den weiblichen Genitaltrakt passieren, durchlaufen sie verschiedene Selektionsprozesse, sodass nur 10–20 kapazitierte Spermatozoen die Oozyte erreichen (Miki und Clapham, 2013). Eine Voraussetzung für das Erreichen der Oozyte ist eine geregelte und responsive Motilität (Hino et al., 2016; Ishikawa et al., 2016; Miki und Clapham, 2013). Ziel dieser Arbeit war es daher, die vierdimensionale murine Spermatozoenbewegung in definierten Fertilisationszuständen (nicht kapazitiert, kapazitiert) und nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein sowie in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht zu untersuchen, um Hinweise auf unterschiedliche Schlagmuster der Flagellen zu erhalten. Für diese Analyse wurde erstmals die DHM verwendet. Zunächst wurde die vierdimensionale Flagellenbewegung, die Schwimmtrajektorie und das Rollverhalten unkapazitierter muriner Spermatozoen mittels DHM untersucht und die Chiralität der Schwimmtrajektorie analysiert. Im Anschluss wurde die DHM als Methode für Geschwindigkeitsanalysen validiert und mit Ergebnissen der bisherigen Methode zur Geschwindigkeitsanalyse, CASA, verglichen. Des Weiteren konnte die Induktion der Kapazitation *in vitro* durch biochemische, wie eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung, als auch durch biophysikalische Veränderungen, wie einer Steigerung der Motilität und einer lateralen XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Kapazitation einen Anstieg der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene bewirkt, die Chiralität der Schwimmtrajektorie jedoch nicht beeinflusst. Anschließend wurde das N-terminale muZP2 Glykoprotein rekombinant hergestellt, auf RNA- und Proteinebene validiert und die spezifische Bindung kapazitierter Spermatozoen an die mit N-terminalem muZP2 Glykoprotein beladenen Beads erfolgreich mikroskopisch überprüft. Es konnte erstmals eine Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie nach Kontakt mit muZP2 Protein nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich eine Zunahme der VCL, ein Einfluss auf die pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke sowie auf die XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs und eine gesteigerte Auslenkung des Flagellenschlags in der X-, Y- und Z-Ebene nach ZP2 Kontakt. Abschließend konnte kein Einfluss der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht auf die laterale XY-Auslenkung des Spermatozoenkopfs sowie auf die vierdimensionale Flagellenbewegung muriner unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen und die Chiralität der Schwimmtrajektorie mittels DHM nachgewiesen werden.

9.1 Die DHM ermöglicht vierdimensionale Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der vierdimensionale Flagellenschlag von murinen Spermatozoen analysiert und quantitative Untersuchungen der Wellenform des Flagellenschlags durchgeführt. Dies erfolgte anhand von Einzelzellanalysen mittels DHM. Bereits in Vorarbeiten konnte eine nicht planare Flagellenbewegung gemessen werden (Phillips, 1972; Rikmenspoel, 1965). Dabei wurde die Auslenkung aus der XY-Ebene lediglich am Fokusverlust bestimmt, welcher durch die Verwendung von hoch numerischen Aperturobjektiven identifiziert werden konnte (Ishijima et al., 1992; Woolley und Osborn, 1984; Yeung und Woolley, 1984). Eine andere Analysemöglichkeit ist die Abstandsbestimmung der Intensitätsmaxima anhand von Linienanalysen durch das Flagellum (Bukatin et al., 2015). In dieser Arbeit konnte mittels DHM bei freischwimmenden, unkapazitierten murinen Spermatozoen eine wellenförmige, entlang des Flagellums propagierende, Flagellenauslenkung in der Z-Ebene gemessen werden (Abbildung 23A), die eine vergleichbare Amplitude ($\sim 19 \mu\text{m}$) wie die Wellen in der XY-Ebene besitzen (Abbildung 22B). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Initiierung der wellenförmigen Bewegung in der Z-Ebene mit der Einleitung der hauptsächlich („principle flagellar bends“) und der reversen („reverse flagellar bends“) Flagellenschlägen in der XY-Ebene übereinstimmt. Die Initiation einer neuen, zweiten wellenförmigen Flagellenauslenkung in der Z-Ebene erfolgt ca. auf dem halben Weg der ersten Welle (Abbildung 23A), vermutlich beim Übergang vom hauptsächlich zum reversen Flagellenschlag (Wennemuth et al., 2003b) wie es in der XY-Ebene beobachtet wird. Die wellenförmige Flagellenauslenkung in der Z-Ebene propagiert mit einer konstanten Geschwindigkeit entlang des Flagellums (Muschol et al., 2018). Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis des Prinzips für die Ausbildung des Flagellenschlags bei und konnten ebenfalls für bovine und humane Spermatozoen nachgewiesen werden (Muschol et al., 2018). Bullenspermatozoen zeigen in dieser Studie jedoch eine geringere laterale Auslenkung des Flagellenschlags als murine Spermatozoen (Muschol et al., 2018), welche möglicherweise durch ihre kürzeren Flagellen und ihren symmetrischeren Flagellenschlag verursacht werden. An der Ausbildung einer wellenförmigen Flagellenbewegung scheinen die akzessorischen Axonemstrukturen nicht beteiligt zu sein, da dieses Bewegungsmuster ebenfalls bei Eukaryoten ohne akzessorische

Strukturen identifiziert werden konnte (Wilson et al., 2013).

Neben der Analyse freischwimmender, unkapazitierter muriner Spermatozoen, wurde in dieser Arbeit auch der vierdimensionale Flagellenschlag von adhärenenten murinen Spermatozoen untersucht. Adhärenente Spermatozoen binden mit ihrem Kopf an die Oberfläche der Messkammer, sodass einerseits eine Fortbewegung und andererseits ein Rollen entlang ihrer Längsachse ausbleibt (Babcock et al., 2014). In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass dennoch eine Bewegung des Flagellums stattfindet (Carlson et al., 2003; Wennemuth et al., 2003b). Anhand der digital holografischen Aufnahmen konnte auch für adhärenente, nicht rollende murine Spermatozoen eine Flagellenauslenkung in der Z-Ebene gezeigt werden (Abbildung 24B). Diese Auslenkung ist vergleichbar mit der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene von freischwimmenden Spermatozoen. Schlussfolgernd zeigen diese Ergebnisse, dass die wellenförmige Flagellenauslenkung in der Z-Ebene unabhängig von dem Rollvorgang entlang der Längsachse sowie einer damit verbundenen progressiven Motilität ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die Flagellenbewegung unabhängig von der Rotationsbewegung entlang der Längsachse ist. Die Arbeit von Miller und Kollegen unterstützt dieses Ergebnis, indem sie ebenfalls einen Rollvorgang entlang der Längsachse bei kopflosen („decapitated“) Spermatozoen nachweisen konnten (Miller et al., 2018).

Während freischwimmende, nicht rollende murine Spermatozoen (Kreisschwimmer) eine niedrigere Z-Auslenkung des Flagellenschlags aufweisen (Abbildung 28B), zeigen adhärenente, ebenfalls nicht rollende murine Spermatozoen eine mit freischwimmenden Spermatozoen vergleichbare Z-Auslenkung des Flagellums (Abbildung 24B, Abbildung 23A). Diese Beobachtung stimmt mit der beobachteten Bewegung bei niedriger Reynolds-Zahl überein, bei der die Trägheitskraft vernachlässigt werden kann (Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der Flagellenschlag die Quelle jeder Bewegung, auch die der Rotation des Kopfs ist (Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013). Zusätzlich lassen sich diese Ergebnisse dahingehend deuten, dass die Ausbildung der Flagellenauslenkung in der Z-Ebene unabhängig vom Rollvorgang ist. Durch die Verwendung von Atomkraftmikroskopie, wie von Allen und Kollegen beschrieben (Allen et al., 2010), könnten Kraftmessungen am Kopf adhärenenter Spermatozoen durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die Entstehung der für den Rollvorgang benötigten Kraft von der wellenförmigen Flagellenbewegung abhängt.

In dieser Arbeit wurde für freischwimmende, rollende Spermatozoen am proximalen Teil des Flagellums, in Bezug zum Spermatozoenkopf, sowohl positive als auch negative Flagellenauslenkungen in der Z-Ebene detektiert (Abbildung 23A), während adhärente Spermatozoen ausschließlich eine negative Auslenkung am proximalen Teil des Flagellums aufweisen (Abbildung 24B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die untersuchten adhärenen Spermatozoen mit ihrem Kopf an die Oberfläche der oberen Kammerbegrenzung binden, wodurch am proximalen Teil des Flagellums nur ein negativer Flagellenausschlag möglich ist.

Um die vierdimensionale Spermatozoenbewegung weiter zu charakterisieren, wurde der Rollvorgang muriner freischwimmender, unkapazitierter Spermatozoen mittels Intensitätsmessungen untersucht. Dabei konnte eine transiente Zunahme der Intensität des vom Spermatozoenkopf reflektierten Lichts bei jedem Rollvorgang beobachtet werden (Abbildung 27A). Dieses optische Signal, das sowohl in den rekonstruierten Projektionen als auch in früheren Arbeiten mittels konventioneller Mikroskopieanalysen detektiert wurde, kann als Marker für die zeitliche Bestimmung des Rollvorgangs verwendet werden (Babcock et al., 2014; Miki und Clapham, 2013). Anhand dieses Signals kann auch für bovine und humane Spermatozoen ein Rollvorgang identifiziert werden (Muschol et al., 2018). Die Chiralitätsbestimmung des Rollvorgangs in dieser Arbeit basierte auf der spezifischen Form des murinen Spermatozoenkopfs (Breed, 2004; Breed und Yong, 1986), die es ermöglicht, den Kopf in eine konkave bzw. in eine konvexe sowie in eine rechte bzw. in eine linke Seite einzuteilen (Abbildung 20A). Die visuelle Analyse des Rollvorgangs entlang der Längsachse ergab für murine freischwimmende, unkapazitierte Spermatozoen eine alternierende Rollbewegung im (CW) und gegen den Uhrzeigersinn (CCW) (Abbildung 27A). Dabei rollt das Spermatozoon immer über die konvexe Seite des Spermatozoonkopfs. Dies entspricht einer alternierenden 180°-Rollbewegung. Das alternierende Muster von CW und CCW Rollzyklen über die konvexe Seite des murinen Spermatozoonkopfs deutet auf ein chirales Gedächtnis hin, wodurch ein Teil der Kraft, die für das Rollen benötigt wird, gespeichert und für den nächsten darauffolgenden Gegenzyklus wiederverwendet wird. Ein chirales Gedächtnis konnte bereits für Seeigel-Spermatozoen nachgewiesen werden, indem die Spermatozoonköpfe mit einer vibrierenden Mikropipette festgehalten und eine Anpassung des ursprünglichen Flagellenschlags an die Vibrationsebene beobachtet werden konnte (Gibbons et al., 1987). Nach Abschalten der durch die Mikropipette verursachten Vibration, stellte sich spontan ein ähnlicher Flagellenschlag wie vor der

Vibrationsbehandlung ein (Eshel et al., 1990; Nosrati et al., 2016). Anhand dieses Ergebnisses lässt sich die Präsenz einer elastischen Rückhaltekraft vermuten. Sollte eine solche Kraft in Seeigel- und Mäuse-Spermatozoen existieren, kann diese Kraft nicht in den äußeren Fasern oder der fibrösen Hülle des Flagellums gespeichert werden, da diese bei Stachelhäutern fehlen (Toshimori und Eddy, 2015).

Im Gegensatz zu murinen Spermatozoen besitzen bovine (Ounjai et al., 2012; Sleight und Kerkut, 2016) und humane (WHO, 1999) Spermatozoen eine symmetrische Kopfmorphologie, sodass aktuell eine Chiralitätsbestimmung des Rollvorgangs entlang der Längsachse mittels DHM nicht möglich ist (Muschol et al., 2018). Des Weiteren konnte eine hohe morphologische Variabilität bei humanen Spermatozoköpfen nachgewiesen werden (Mai et al., 2002), wodurch sie eine hohe Anzahl an lichtbrechenden Oberflächen besitzen und das durch das Rollen hervorgerufene optische Signal variabler und die Chiralitätsanalyse mittels DHM schwieriger ist (Muschol et al., 2018). Für humane Spermatozoen wird in der Literatur eine 360°-Rollbewegung entlang der Längsachse beschrieben (Ishijima et al., 1992; Phillips, 1972). Miller und Kollegen postulieren, dass in humanen Spermatozoen die asymmetrische Verteilung der Ionenkanäle CatSper und Hv1 in Nanodomänen für die 360°-Rotationen von Spermatozoen entlang der Längsachse wichtig sein könnten (Miller et al., 2018). Sie erklären diese Annahme damit, dass die asymmetrische Verteilung des Hv1-Kanals eine einseitige, selektive Alkalisierung des Axonems bewirken könnte, wodurch wiederum nur ein Teil der CatSper-Kanäle aktiviert werden würde. Eine solche asymmetrische Aktivierung der Kanäle könnte zu einem selektiven Ca^{2+} -Anstieg im Flagellum führen, die Dyneinbewegung einseitig hemmen und eine asymmetrische Steifheit des Axonems bewirken. Dieser Vorgang könnte die Bewegungsrotation des Flagellums verstärken (Miller et al., 2018). Miller und Kollegen postulieren weiterhin, dass die spezifische Position der Ionenkanäle Hv1 und CatSper eine schnelle Signaltransduktion gewährleistet und schließlich die komplexen Zellbewegungen, wie die Hypermotilität und die Rotation, beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnten Miller und Kollegen ebenfalls zeigen, dass die Inhibition des Hv1 Kanals in humanen Spermatozoen zu einer ähnlichen 180°-Rollbewegung entlang der Längsachse (Miller et al., 2018), wie die in dieser Arbeit für murine Spermatozoen identifizierte alternierende Rollbewegung, führt. Da der Hv1 Kanal in Mäusen nicht funktionell aktiv ist (Lishko et al., 2010), kann dieser für die, in dieser Arbeit beobachtete, murine 180°-Rollbewegung nicht verantwortlich sein. Andere Studien wiesen ebenfalls eine Beteiligung des CatSper-Kanals, und

dem damit verbundenen Ca^{2+} -Influx (Carlson et al., 2003; Ho et al., 2009), für die asymmetrische Rollbewegung nach (Ishijima et al., 1992; Ishijima und Hamaguchi, 1992).

In der Studie von Miller und Kollegen wurden die Rotationsanalysen durch subjektive visuelle Betrachtung der Aufnahmen ohne Berücksichtigung einer vierdimensionalen Analyse durchgeführt (Miller et al., 2018). Die in dieser Arbeit verwendete Rotationsbestimmung mittels DHM ermöglicht eine vierdimensionale Analyse und garantiert zusätzlich, durch die Verwendung von hoch numerischen Aperturlinsen, eine zuverlässigere Messung des Rotationsvorgangs sowie der Chiralität des Rollvorgangs im Vergleich zu den in Vorarbeiten verwendeten konventionellen Mikroskopieanalysen (Babcock et al., 2014; Miki und Clapham, 2013) und der subjektiven Beurteilung von Miller und Kollegen (Miller et al., 2018).

In der Studie von Ishijima und Kollegen wurde die Bewegung von Hamsterspermatozoen untersucht, die vertikal gegen ein Deckglas schwammen (Ishijima et al., 1992). Die Analyse erfolgte anhand der anterioren Region des Flagellenschlags und wies eine CCW Rollbewegung des Kopfs bei 76% der analysierten Hamsterspermatozoen nach (Ishijima et al., 1992). Während ein ähnliches Ergebnis für Bullenspermatozoen beobachtet werden konnte, war die Verteilung der Chiralität der Rollbewegungen bei humanen Spermatozoen ausgeglichen (Ishijima et al., 1992). In einer anderen Studie von Ishijima und Hamaguchi erfolgte die Betrachtung der Schwimmtrajektorien aus der Vogelperspektive, wodurch eine CW Rollbewegung für die Mehrheit der analysierten Hamsterspermatozoen beobachtet wurde (Ishijima und Hamaguchi, 1992). Woolley und Kollegen untersuchten die Chiralität des Rollvorgangs von murinen Spermatozoen, die ebenfalls vertikal gegen ein Deckglas schwammen, und konnten für alle analysierten Spermatozoen eine CW Rollbewegung entlang der gesamten Trajektorie zeigen (Woolley, 2003). Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass bei allen untersuchten freischwimmenden murinen Spermatozoen eine CCW Rollbewegung auf eine CW Rollbewegung folgt und umgekehrt (Abbildung 27A), widerspricht der Beobachtung von Wolley. Diese verschiedenen Beobachtungen fundieren auf den unterschiedlichen Analyseverfahren. Während Wolley Spermatozoen analysierte, die vertikal gegen ein Deckglas schwammen (Woolley, 2003), erfolgten die Analysen in dieser Arbeit mittels DHM an freischwimmenden murinen Spermatozoen. Um zusätzlich einen Einfluss der Messkammerbegrenzung auf die Bewegung der Spermatozoen auszuschließen, erfolgte die Messung in $20\ \mu\text{m}$

tieferen Messkammern (100 μm) als bei Woolley (80 μm) (Woolley, 2003). Da in dieser Arbeit freischwimmende murine Spermatozoen, ohne Bewegungseinschränkungen, analysiert wurden, scheint die von Wolley beobachtete Rollbewegung darauf zu beruhen, dass die frontale Begegnung des Spermatozookopfs mit dem Deckglas den CW oder den CCW Rollvorgang selektiv unterdrückt. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit analysierte alternierende Rollbewegung der tatsächlichen, physiologisch durchgeführten Bewegung muriner Spermatozoen entspricht.

Des Weiteren konnte ein asymmetrischer Flagellenschlag und die Rotationsbewegung entlang der Längsachse des Spermatozoons als entscheidende Faktoren für die Rheotaxis identifiziert werden, wodurch Spermatozoen in der Lage sind, gegen einen Flüssigkeitsstrom zu schwimmen (Ishijima et al., 1992; Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Quill et al., 2003). Es ist bereits bekannt, dass die Rheotaxis ein wichtiger Faktor für die Spermatozoenorientierung im weiblichen Genitaltrakt ist (Miki und Clapham, 2013). Miki und Clapham konnten zeigen, dass eine positive Rheotaxis von der Rotationsbewegung des Flagellums abhängt, die durch Ca^{2+} -Influx über den CatSper-Kanal verstärkt wird und eine stromaufwärtsgerichtete Bewegung ermöglicht. Sie postulieren, dass die Spermatozoenrotation eine zusätzliche Kraft generiert, um das Spermatozoon in der Strömung zu positionieren (Miki und Clapham, 2013). Aufgrund der drei folgenden Argumente schlussfolgern Miki und Clapham, dass die Rheotaxis ein wichtiger Selektions- und Navigationsmechanismus im weiblichen Genitaltrakt ist. Erstens fördert der Koitus die Flüssigkeitssekretion im Ovidukt, wodurch die luminale Strömung, durch die Zilienbewegung und die Muskelkontraktion im Isthmus, von der Ampulle zum Uterus erhöht wird. Zweitens konnte bereits eine positive Rheotaxis von murinen und humanen Spermatozoen *in situ* und *in vitro* nachgewiesen werden und drittens konnte gezeigt werden, dass mittels Kapazitation, einhergehend mit einer hyperaktivierten Motilität, und physiologischer Strömung Spermatozoenadhäsion überwunden werden kann. Diese Faktoren fördern zusätzlich die Spermatozoenrotationsbewegung, welche eine Änderung des planaren, zirkulären Schwimmusters zu einer direkten Schwimmbewegung bewirkt und entscheidend für die Navigation im Ovidukt ist (Miki und Clapham, 2013). Da nur 10-20 Spermatozoen die Ampulle erreichen (Ishijima et al., 1986; Miki und Clapham, 2013), postulieren Miki und Clapham zusätzlich, dass die Strömung im Ovidukt neben der Navigation der Spermatozoen zur Oozyte, kapazitierte Spermatozoen selektiert, die

in der Lage sind den Cumulus oophorus und die Zona pellucida zu durchdringen und die Oozyte erfolgreich zu fertilisieren. Mittels 3D Analysen des Spermatozoenschwimmverhaltens im murinen Ovidukt, konnten Wang und Larina ebenfalls *in vivo* nachweisen, dass die Rheotaxis eine entscheidende Rolle bei der Lenkung der Spermatozoen zur Ampulle einnimmt (Wang und Larina, 2018).

In dieser Arbeit wurden digital holografische Aufnahmen für die 4D Analyse der Schwimmtrajektorie von murinen unkapazitierten Spermatozoen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die asymmetrisch geformten Köpfe muriner Spermatozoen durch alternierendes Rollen eine lineare Bewegungsrichtung gewährleisten (Abbildung 29A). Zusätzlich konnte mittels Procrustesanalysen für alle untersuchten freischwimmenden murinen Spermatozoen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie beobachtet werden (Abbildung 30). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie ein konserviertes Bewegungsmuster muriner Spermatozoen ist. Auch für Schwimmtrajektorien boviner Spermatozoen konnte eine CW Chiralität nachgewiesen werden (Muschol et al., 2018). Diese Ergebnisse suggerieren zusätzlich eine fehlende Korrelation zwischen der Morphologie des Spermatozokopfs und der Chiralität der Schwimmtrajektorie. Bovine Spermatozoen besitzen keinen sichelförmigen Kopf wie murine Spermatozoen (Flaherty und Breed, 1982), sondern einen planaren, abgerundeten Kopf (Masuda, 1995; Ounjai et al., 2012; Sleight und Kerkut, 2016).

Holografische Aufnahmen wurden bereits in früheren Studien verwendet, um den Weg von humanen (Su et al., 2012) sowie von equinen Spermatozoen (Su et al., 2013; Su et al., 2012) zu untersuchen. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine planare Trajektorie meist bei Spermatozoen (ca. 40% der Spermatozoenpopulation) gefunden wurde, die nahe der Messkammerbegrenzung schwammen. Su und Kollegen postulierten daher, dass die Kammerbegrenzung (Probenvolumen 9 μl) ein einflussreicher Faktor für den Übergang von Schwimmmustern sein könnte (Su et al., 2013). In dieser Arbeit konnten ebenfalls planare, zirkuläre Schwimmtrajektorien bei murinen nicht rollenden Spermatozoen in größeren Messkammern (100 μm Tiefe mit einem Probenvolumen von 65 μl) beobachtet werden (Abbildung 28B). Diese Beobachtung schließt daher einen Einfluss der Messkammerbegrenzung für die Ausbildung planarer zirkulärer Trajektorien aus, sodass es sich bei diesem Bewegungsmuster nicht um ein Artefakt des Versuchsaufbaus handelt. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Spermatozoen, die keine alternierenden 180°-Drehungen des Kopfs ausüben,

nicht in linearen Mustern, sondern sich in kreisförmigen Trajektorien fortbewegen (Kreisläufer) (Babcock et al., 2014). Dabei liegt der Kopf des nicht rollenden Spermatozoons entweder auf der rechten oder der linken Seite (Babcock et al., 2014). Durch die asymmetrische Form des murinen Spermatozoenkopfs werden diese Spermatozoen zu Kreisschwimmern, deren Trajektorie entweder eine CW Orientierung, wenn der Kopf auf der linken Seite liegt oder eine CCW Orientierung besitzt, wenn der Kopf auf der rechten Seite liegt (Babcock et al., 2014). Zirkulär schwimmende murine Spermatozoen zeigen keine periodischen Oszillationen und somit keine Rollvorgänge des Spermatozoenkopfs (Abbildung 27B). Diese Beobachtung konnte ebenfalls für bovine Spermatozoen gemacht werden (Muschol et al., 2018). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beim Ausbleiben des Rollvorgangs die asymmetrischen Flagellenschläge Ursache für die Produktion zirkulärer Trajektorien sind. In den Arbeiten von Su und Kollegen zeigten 25% der analysierten Spermatozoenpopulation eine Trajektorie, die mit einem verdrehten Band vergleichbar war, welche von den Autoren als schraubenförmige (helikale) Trajektorie beschrieben wurde (Su et al., 2013; Su et al., 2012). Die in dieser Arbeit für die meisten freischwimmenden Spermatozoen identifizierten irregulären helikalen Trajektorien könnten möglicherweise ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt werden. Modellierungen schraubenförmiger Trajektorien gilt es weiter zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte das vierdimensionale Schwimmverhalten, die Schwimmtrajektorie und der Flagellenschlag muriner Spermatozoen mittels DHM analysiert werden. Zusätzlich konnten erstmals Chiralitätsanalysen der Rollbewegung entlang der Längsachse und der Schwimmtrajektorie durchgeführt werden, die ein konserviertes Bewegungsmuster für unkapazitierte Spermatozoen nachwies.

9.2 Die DHM ermöglicht 4D Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen

Für die Untersuchung von humanen Ejakulatproben wird in der Klinik CASA als routinemäßig standardisierte Methode eingesetzt. Sie ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung, sowie eine Geschwindigkeitsanalyse der gesamten Spermatozoenpopulation in 2D (Talarczyk-Desole et al., 2017; Vantman et al., 1988). Das Potential von CASA für die Beurteilung männlicher Fertilität konnte bereits 1985 von Holt und Kollegen durch die Korrelation der Schwimmgeschwindigkeit von

Spermatozoen im Seminalplasma mit der Befruchtung Zona-freier Hamsteroozyten und humaner Oozyten *in vitro* gezeigt werden (Holt et al., 1985). Aktuell wird die CASA-Methode für die Beurteilung männlicher Fertilität kontrovers diskutiert (Amann und Waberski, 2014; Gallagher et al., 2018). Faktoren, wie die strikte Einhaltung der vom Hersteller angegebenen CASA-Einstellungen, der Einsatz von geschultem Personal sowie die Benutzung von Leja-Messkammern (Leja Products B.V.) für die humane Spermatozoenanalyse sind essentiell für die Gewinnung zuverlässiger Daten (Bailey et al., 2007; Mortimer et al., 2015). Trotz Einhaltung dieser Parameter wiesen Talarczyk-Desole und Kollegen Unterschiede in den Motilitätsanalysen mittels CASA und einer durch geschultes Personal durchgeführten manuellen Spermatozoenanalyse nach (Talarczyk-Desole et al., 2017). Ein weiterer Nachteil der Spermatozoenanalyse mittels CASA ist die ausbleibende Differenzierung der ermittelten Geschwindigkeitsparameter von sich kreuzenden Spermatozoen (Talarczyk-Desole et al., 2017). Zusätzlich kann der Flagellenschlag der Spermatozoen nicht beurteilt werden (Mortimer et al., 2015). Eine vielversprechende Erweiterung für das Verständnis der Spermatozoenschwimbewegung ist die Analyse in 3D mittels holografischer Aufnahmen (Di Caprio et al., 2010; Gallagher et al., 2018; Mico et al., 2008). Die DHM ermöglicht die Rekonstruktion der Spermatozoenschwimmtrajektorie in 4D und wurde in dieser Arbeit für die Analyse des Spermatozoenschwimmverhaltens sowie für die Berechnung der Spermatozoenschwimmgeschwindigkeit verwendet. Andere Studien verwendeten ebenfalls die DHM für vierdimensionale Geschwindigkeitsberechnungen (Daloglu et al., 2018; Su et al., 2012).

In dieser Arbeit wurden die dreidimensionalen Daten des Kopf-Trackings mit Hilfe der Koala-Software (Version 6) von Lyncée Tec., durch die numerische Kalkulation der Projektionen in der XY-Ebene in verschiedenen Fokalebene, und der anschließenden Verwendung der Spyder-Software (Python 2.7) generiert (Colomb et al., 2010; Rappaz et al., 2005) und für die Berechnung der Spermatozoengeschwindigkeit in 2D und 3D verwendet. Für die Validierung der DHM als Methode für Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen wurde die kurvenlineare Geschwindigkeit (VCL) humaner Spermatozoen mittels CASA (2D) und DHM (2D, 3D) bestimmt und miteinander verglichen (Abbildung 33). Die VCL wird in der Literatur als der charakteristischste Bewegungsparameter für die Spermatozoenfunktion beschrieben (De Geyter et al., 1998), bei der die Geschwindigkeit des Spermatozoons entlang der gesamten Distanz gemessen wird

(Mortimer, 2000). Es konnte ein geringer Unterschied zwischen den 2D VCL-Daten vom Digital Holografischen Mikroskop und den von CASA beobachtet werden (Abbildung 33). Dieser Unterschied lässt sich damit erklären, dass bei der DHM die VCL-Bestimmung auf Einzelzellanalysen basiert, wodurch die VCL der gesamten Trajektorie bestimmt werden kann, während bei CASA die Möglichkeit besteht, dass die Software mehrere VCL-Werte für ein Spermatozoon berechnet, wenn seine Trajektorie während der Aufnahme von einem anderen Spermatozoon gekreuzt wird (Talarczyk-Desole et al., 2017). Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mittels DHM ebenfalls Geschwindigkeitsanalysen durchgeführt werden können. Mittels DHM sind im Gegensatz zu CASA dreidimensionale Bewegungsanalysen möglich (Di Caprio et al., 2010; Gallagher et al., 2018; Mico et al., 2008). Dieser Vorteil wurde in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt, um dreidimensionale Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen durchzuführen. Bei Einbezug der dritten Dimension in die Geschwindigkeitsanalyse konnte eine höhere VCL im Vergleich zu den 2D Analysen detektiert werden (Abbildung 33). Eine Änderung der Geschwindigkeit nach Einbezug der dritten Dimension konnte bereits von Hiramoto und Kollegen beobachtet werden (Hiramoto et al., 1981). In dieser Studie wiesen Spermatozoen von Stachelhäutern, die nahe der Oberfläche schwammen, eine signifikant geringere Geschwindigkeit als freischwimmende Spermatozoen auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei der Verwendung unvollständiger Datensätze, in diesem Fall die Verwendung von 2D VCL-Daten, nicht die gesamte Geschwindigkeit bestimmt werden kann, da eine Ebene nicht berücksichtigt wird. Des Weiteren können die 3D-Daten durch die zusätzlich enthaltenen Informationen zu einem besseren Verständnis des Spermatozoenschwimmverhaltens und dessen Relation zur männlichen Infertilität beitragen (Guerrero et al., 2011). Das Potential der 3D-Analyse liegt darin, Spermatozoen als motil identifizieren zu können, die sich hauptsächlich in der dritten Dimension bewegen und deshalb von CASA als immotil detektiert werden. Damit stellt die 3D Analyse eine Methode dar, mit der die Ejakulatparameter des Mannes genauer bestimmt und die Erfolgchancen, z.B. durch die Selektion von hoch motilen Spermatozoen bei einer IVF erhöht werden könnten.

9.3 Die Induktion der Kapazitation führt zu biochemischen und biophysikalischen Veränderungen

In dieser Arbeit konnte bereits die vierdimensionale Schwimmbewegung unkapazitierter Spermatozoen mittels DHM untersucht und die DHM als Methode für Geschwindigkeitsanalysen bestätigt werden. Im Folgenden wurde die Induktion der Kapazitation *in vitro* auf Proteinebene und anhand vierdimensionaler Bewegungsanalysen überprüft. Dazu wurden murine Spermatozoen für 1 h in Kapazitationspuffer inkubiert. Als Kontrolle dienten Spermatozoen, die 1 h in einem physiologischen HS-Puffer inkubiert wurden. Die im Kapazitationspuffer enthaltenen Bestandteile, wie HCO_3^- , BSA und Ca^{2+} , konnten bereits in verschiedenen Säugetieren als essentielle Faktoren für die Induktion der Kapazitation nachgewiesen werden (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 2002; Yanagimachi, 1994a). Diese Faktoren sind ebenfalls entscheidend für die frühe Aktivierung von Spermatozoen. Während der frühen Aktivierung bewirken diese Faktoren eine Induktion der Spermatozoenmotilität, gekennzeichnet durch eine Zunahme der Schlagfrequenz (Wennemuth, 2004). Bei der späten Aktivierung, der Kapazitation, führt HCO_3^- zu einer intrazellulären pH-Erhöhung (Parrish et al., 1989; Zeng et al., 1996), einer Aktivierung der löslichen Adenylatzyklase (engl.: *soluble adenylyl cyclase*, sAC) einhergehend mit einem Anstieg der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration (Chen et al., 2000; Litvin et al., 2003) und einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). HCO_3^- fördert zusätzlich die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Carlson et al., 2007; Wennemuth et al., 2003b), wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt und den sAC-Signalweg zusätzlich aktiviert. Die Aktivierung der PKA führt zu erhöhten Tyrosin-Phosphorylierungen von Proteinen an der fibrösen Hülle des Flagellums (Visconti et al., 1995b) und zur Zunahme der Schlagfrequenz durch die Phosphorylierung von Dyneinketten innerhalb des Axonems (Harrison, 2004; Hess et al., 2005; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Salathe, 2007; Wennemuth, 2004). Zusätzlich bewirkt der Efflux von Cholesterol aus der Zellmembran die Induktion der Hypermotilität (Jones et al., 2007; Shadan et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte nach Kapazitation muriner Spermatozoen ebenfalls eine gesteigerte Tyrosin-Phosphorylierung mittels Western Blot Analysen (Abbildung 34) und eine Zunahme der Schlagfrequenz nachgewiesen werden (Abbildung 36). Des Weiteren führt die Kapazitation zu einer erhöhten VCL (Goodson et al., 2011;

Mortimer und Mortimer, 1990) und einer größeren lateralen Auslenkung des Spermatozoenkopfs (Mortimer und Mortimer, 1990). Eine Steigerung der VCL (Abbildung 35) und der lateralen Auslenkungen des Kopfs (Abbildung 37) konnte mittels DHM ebenfalls nach Kapazitation gezeigt werden. Während Goodson und Kollegen mittels CASA eine um den Faktor 1,3 gesteigerte VCL und laterale Auslenkung des Kopfs für murine Spermatozoen nach Kapazitation nachweisen konnten (Goodson et al., 2011), zeigte die 3D Analyse mittels DHM in dieser Arbeit eine Zunahme der VCL um den Faktor 1,6 (Abbildung 35) und um den Faktor 1,8 für die laterale Auslenkung des Kopfs (Abbildung 37). Dieser Unterschied basiert vermutlich auf der Verwendung von 3D- statt, wie Goodson und Kollegen, von 2D-Daten (Goodson et al., 2011).

Folglich konnte die Induktion der Kapazitation aufgrund der gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierungen, der Zunahme der Schlagfrequenz und der VCL sowie der lateralen Auslenkungen des Spermatozoenkopfs erfolgreich etabliert werden. Anschließend wurde der Einfluss der Kapazitation sowie des Kontakts zum muZP2 Glykoproteins auf die vierdimensionale Schwimmbewegung muriner Spermatozoen mittels DHM untersucht.

9.4 Der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein verändert die Schwimmbewegung kapazitierter Spermatozoen

Die Literatur beschreibt in Mensch und Maus eine konservierte, am N-Terminus gelegene Domäne des ZP2 Glykoproteins als essentiellen Spermatozoenligand der ZP (Avella et al., 2014; Bhakta et al., 2019; Jimenez-Movilla und Dean, 2011). Aufgrund dessen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob es durch die Bindung an das N-terminale muZP2 Glykoprotein zu einer Veränderung der vierdimensionalen Schwimmbewegung muriner kapazitierter Spermatozoen kommt. Dazu wurde zunächst der N-Terminus des muZP2 Glykoproteins rekombinant hergestellt, aus dem Zellkulturüberstand mittels Sepharosebeads aufgereinigt und in PBS umgepuffert. Die anschließende Rekopplung des muZP2 Proteins an die Sepharosebeads wurde auf Proteinebene mittels Western Blot Analysen validiert (Abbildung 41) und die spezifische Bindung kapazitierter muriner Spermatozoen an die mit muZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads mikroskopisch bestätigt (Abbildung 43). Avella und Kollegen wiesen zusätzlich nach, dass es sich bei der, auch in dieser Arbeit beobachteten Bindung muriner Spermatozoen an das muZP2

Glykoprotein um eine spezie-spezifische Bindung handelt (Avella et al., 2014). Um zu untersuchen, ob die Bindung kapazitierter muriner Spermatozoen an den N-Terminus des muZP2 Glykoproteins zu einer geänderten vierdimensionalen Schwimmbewegung führt, wurden die Spermatozoen zunächst kapazitiert. Anschließend wurde erstmals deren vierdimensionale Bewegung nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein anhand von digital holografischen Aufnahmen analysiert.

9.4.1 Veränderung der Chiralität der Schwimmtrajektorie nach Kontakt zum N-terminalen muZP2 Glykoprotein

Mit Hilfe von Procrustesanalysen konnte der Einfluss der Kapazitation bzw. des murinen N-terminalen ZP2 Glykoproteins auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie muriner Spermatozoen untersucht werden. Die Chiralitätsanalysen zeigen, dass sich das Bewegungsmuster muriner Spermatozoen nach Kapazitation im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen nicht verändert (Abbildung 44). Alle analysierten unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen zeigen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie. Dieses Ergebnis impliziert, dass der Kapazitationsprozess die Chiralität der Schwimmtrajektorie nicht beeinflusst, dass die CW Chiralität weiterhin ein konserviertes Bewegungsmuster muriner Spermatozoen ist und dass dieses Bewegungsmuster möglicherweise entscheidend für das Erreichen der Oozyte ist. Eine Änderung der Chiralität zeigt sich für kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt zum murinen ZP2 Glykoprotein (Abbildung 45). Während alle untersuchten kapazitierten Kontrollspermatozoen ohne Kontakt zum ZP2 Glykoprotein sowie nach Bindung an unbeladene Sepharosebeads eine CW Chiralität ihrer Schwimmtrajektorie zeigen, ist bei den analysierten Spermatozoen nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein keine bevorzugte Chiralität mehr nachweisbar (Abbildung 45; Abbildung 47). Diese Bewegungsänderung kann ein entscheidender Faktor für die Penetration der ZP sein. Die ZP wird als extrazelluläre Matrix, die die Oozyte umgibt und als visköse Grenze zwischen dem Oolemma und der Corona radiata beschrieben (Bauskin et al., 1999; Sinowatz et al., 2001; Yanagimachi, 1994a). Mehrere Studien konnten bereits eine Korrelation zwischen der Viskosität der Spermatozoenumgebung und einer Änderung der Schwimmbewegung identifizieren. Während Brokaw eine Abnahme der Flagellenbewegung, der Flagellenamplitude und des dafür benötigten Energieaufwands in visköser Flüssigkeit detektierte (Brokaw, 1966), wiesen Suarez und Kollegen eine Steigerung der

Schwimm- und Flagellenbewegung hyperaktivierter Spermatozoen in viskösem Medium nach und korrelierten dieses Ergebnis mit einem mechanischen Vorteil beim Passieren der viskösen Oviduktsflüssigkeit und der Kumulusmatrix (Suarez et al., 1991). Es konnte ebenfalls eine Abnahme der Rotationsbewegung um die Längsachse und eine damit verbundene planare Bewegung in Korrelation mit einer Viskositätszunahme der Umgebung identifiziert werden (Woolley, 2003). Zusätzlich wies Caballero-Campo eine Änderung der progressiven Motilität von humanen Spermatozoen nach Exposition von rekombinantem ZP2 nach (Caballero-Campo et al., 2006). Die Ergebnisse dieser Studien und dieser Arbeit implizieren, dass für die Penetration der ZP eine Änderung des Spermatozoenbewegungsmusters und damit auch eine Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie von Bedeutung sein könnten.

Eine weitere Erklärung für die bei 50% der analysierten Spermatozoen identifizierte Chiralitätsänderung nach ZP2 Glykoprotein Kontakt (Abbildung 45) könnte sein, dass eine Änderung des intrazellulären Ionenmilieus nach Bindung an ZP2 stattfindet, wodurch Vorgänge die für die Penetration entscheidend sind aktiviert und die Mechanismen zur Aufrechterhaltung der konservierten Chiralität der Schwimmtrajektorie vernachlässigt werden. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die Zugabe von ZP zu kapazitierten Spermatozoen zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung führt, während die Zugabe eines ZP-Inhibitors die ZP-induzierte Akrosomreaktion (AR) unterdrückt und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in murinen Spermatozoen reduziert (Bailey und Storey, 1994; Florman, 1994; Florman et al., 2008). Ein essentieller Ca^{2+} -Ionenkanal für die Spermatozoenbewegung ist der CatSper-Kanal (Navarro et al., 2008; Ren et al., 2001). Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den CatSper-Kanal führt zur Hypermotilität, zur Induktion der Kapazitation und ist essentiell für die Fertilisation (Carlson et al., 2003; Ren et al., 2001). In den letzten Jahren konnten Versuche mittels Patch-Clamp Techniken zeigen, dass der CatSper-Kanal wichtig für die ZP induzierte Ca^{2+} -Erhöhung bei murinen Spermatozoen ist (Miwa, 2015; Xia und Ren, 2009b). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Zunahme führt zur Induktion der AR und einer Änderung der Spermatozoenmotilität (Bjorkgren et al., 2016). Anhand dieser Ergebnisse könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den CatSper-Kanal bei kapazitierten Spermatozoen möglicherweise zu einer Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie führt. Jedoch zeigen alle in dieser Arbeit untersuchten kapazitierten

Kontrollpermatozoen ebenfalls eine konservierte CW Chiralität der Schwimmtrajektorie, sodass kein Einfluss der Kapazitation auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie beobachtet werden konnte.

Eine weitere Änderung des intrazellulären Ionenmilieus findet bei der Induktion der AR statt, die über einen G-Protein induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und eine erneute intrazelluläre pH-Erhöhung erfolgt (Florman et al., 1989; Ren und Xia, 2010; Xia und Ren, 2009b). Die pH-Erhöhung führt neben der Induktion der AR zur Hyperaktivierung (Jeon et al., 2001). Die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration findet in der akrosomalen Region des Spermatozoonkopfs und im Flagellum statt (Florman, 1994). Sie führt einerseits zur Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der Spermatozoonplasmamembran und zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen wie Akrosin und Hyaluronidase (Bleil und Wassarman, 1983; Chiu et al., 2010; Florman et al., 1992) als Voraussetzung für die Penetration der ZP und andererseits zur Erhöhung von Protein-Phosphorylierungen, die zur Initiation der Hypermotilität und der AR führen (Jha und Shivaji, 2002; Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2002). Diese Prozesse, hervorgerufen durch eine Änderung des intrazellulären Ionenmilieus nach Bindung an die ZP, sind essentiell für die Fertilisation der Oozyte (Ho et al., 2002; Jeon et al., 2001; Luconi et al., 2006; Revelli et al., 2002; Tasken und Aandahl, 2004). Die Aufrechterhaltung einer konservierten Chiralität der Schwimmtrajektorie scheint daher nicht zwangsläufig für die Fertilisation der Oozyte von Nöten zu sein, sodass die Hälfte der in dieser Arbeit analysierten Spermatozoen eine geänderte Chiralität aufwies.

9.4.2 Veränderung der vierdimensionalen Schwimmbewegung muriner kapazitierter Spermatozoen nach Kontakt zum N-terminalen muZP2 Glykoprotein

Die weitere Analyse des Einflusses der Kapazitation auf die vierdimensionale Bewegung muriner Spermatozoen ergibt, wie in der Literatur beschrieben (Goodson et al., 2011; Mortimer und Mortimer, 1990), eine Steigerung der VCL nach Kapazitation (Abbildung 48). Des Weiteren zeigen kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit dem ZP2 Glykoprotein eine erneute Steigerung der VCL, die allerdings nicht signifikant ist (Abbildung 48). Diese Zunahme konnte sowohl für kapazitierte Spermatozoen nach Bindung an ein mit muZP2 Glykoprotein beladenem Sepharosebead, als auch nach Kontakt mit in Kapazitationspuffer gelöstem muZP2

Glykoprotein beobachtet werden (Abbildung 48). Die Zunahme der VCL kann mit einer erhöhten Schlagfrequenz und Flagellenschlagsamplitude, wie sie bereits nach ZP Bindung identifiziert werden konnte (Katz und Yanagimachi, 1981), erklärt werden. In dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls eine leichte Steigerung der Flagellenschlagsamplitude nach μ ZP2 Glykoprotein Kontakt (Abbildung 53). Caballero-Campo und Kollegen wiesen eine Steigerung der VCL nach Exposition von rekombinantem ZP2 Glykoprotein nach (Caballero-Campo et al., 2006). Die Zunahme der Amplitude verstärkt die Kraft des Flagellenschlags (Katz et al., 1987; Katz et al., 1989), wodurch wiederum die Kraft gesteigert wird, mit der der Spermatozoonkopf gegen die ZP schwimmt (Drobnis und Katz, 1990; Ishimoto und Gaffney, 2016; Katz und Blake, 1975; Lighthill, 1976). Die Penetration der ZP erfolgt nicht allein durch Kraftereinwirkungen (Green, 1987). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Änderungen des Bewegungsmusters während der Kapazitation essentiell für die Penetration der ZP und das Erreichen der Oozyte sind (Yanagimachi, 1994a). Drobnis und Kollegen beschrieben eine bimodale Bewegung des Flagellums während der Penetration der ZP, die einerseits durch eine hohe Amplitude und eine niedrige Schlagfrequenz, und andererseits durch eine niedrige Amplitude und eine hohe Schlagfrequenz charakterisiert ist (Drobnis et al., 1988). In dieser Arbeit wurde die Schlagfrequenz nicht bestimmt, sodass eine Zuordnung zu einem dieser Bewegungsmuster nicht möglich ist. Drobnis und Kollegen postulierten, dass der asymmetrische Flagellenschlag und die oszillierende Bewegung des Spermatozoonkopfs innerhalb der ZP mechanische Vorteile erzeugen, die für die Penetration der ZP essentiell sind (Drobnis et al., 1988). Kirichok und Lishko konnten zusätzlich zeigen, dass eine asymmetrische Flagellenbewegung zu einem kraftvolleren Flagellenschlag führt, der für die Penetration der Kumuluszellschicht wichtig ist (Kirichok und Lishko, 2011). Im gleichen Jahr wies Ishijima die Bedeutung von Transversalkräften, die durch langsam oszillierende hyperaktivierte Spermatozoen generiert werden, für die Penetration der ZP nach (Ishijima, 2011). Die in dieser Arbeit leicht gesteigerte VCL und Flagellenschlagsamplitude kapazitierter Spermatozoen nach ZP2 Glykoprotein Kontakt deuten ebenfalls darauf hin, dass der Flagellenschlag entscheidend für eine erfolgreiche Penetration der ZP ist.

In dieser Arbeit konnte nach Kapazitation eine höhere pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke muriner Spermatozoen im Vergleich zu unkapazitierten Kontrollspermatozoen beobachtet werden (Abbildung 50). Zusätzlich konnte eine

höhere pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit einem muZP2 Glykoprotein beladenem Bead beobachtet werden (Abbildung 50). Die Zunahme der Strecke geht einher mit einer größeren Amplitude des Flagellenschlags (Abbildung 53) und einer gesteigerten VCL (Abbildung 48). Die Zunahme der Amplitude verstärkt die Kraft des Flagellenschlags (Katz et al., 1987; Katz et al., 1989), bewirkt eine Steigerung der Schwimgeschwindigkeit und resultiert damit in einer pro Schlagzyklus längeren zurückgelegten Strecke. Um dieses Ergebnis weiter zu validieren, soll in Folgearbeiten ebenfalls die Schlagfrequenz von kapazitierten Spermatozoen bei Bindung an ein mit muZP2 Glykoprotein beladenes Bead mittels DHM bestimmt werden. Während Drobnis und Kollegen bei Hamsterspermatozoen sowohl eine Ab- als auch Zunahme der Schlagfrequenz nach Bindung an die ZP nachwiesen (Drobnis et al., 1988), konnten Tollner und Kollegen eine Abnahme der Schlagfrequenz nach Bindung an die ZP bei Spermatozoen von Makaken beobachten (Tollner et al., 2003). Ravaux und Kollegen hingegen konnten zeigen, dass bei humanen Spermatozoen ein oszillierender Flagellenschlag mit einer hohen Schlagfrequenz für die Bindung an ZP-freien Oozyten wichtig ist (Ravaux et al., 2016). Zwei Minuten nach Bindung an die Oozyte stoppte die Flagellenbewegung und die Fertilisation der Oozyte wurde initiiert (Ravaux et al., 2016). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Abnahme der Schlagfrequenz wichtig für die Penetration der ZP und eine Zunahme der Schlagfrequenz wichtig für die Bindung an die Oozyte und die Einleitung der Gametenfusion ist.

Nach Kontakt mit in Kapazitationspuffer gelöstem ZP2 Glykoprotein zeigt sich im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen eine leichte Reduktion der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke (Abbildung 50). Dieser Unterschied zur pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke von kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt zu einem ZP2 Glykoprotein beladenem Bead könnte auf den von Su und Kollegen beschriebenen unterschiedlichen Bewegungsmustern von kapazitierten Spermatozoen basieren (Su et al., 2012). Sie unterteilen das hyperaktivierte Schwimmmuster humaner Spermatozoen in zwei Gruppen. Die erste Gruppe beschreibt eine sogenannte vorübergehende Hyperaktivierung, bei der die Spermatozoen sich schlängelnd vorwärtsbewegen. Zu der zweiten Gruppe werden Spermatozoen mit einer sternförmigen Trajektorie gezählt, bei der die Spermatozoen sich wenig vorwärtsgerichtet bewegen. Letzteres korreliert mit einer Abnahme der VSL (Su et al., 2012), sodass eine weitere Erklärung eine durch ZP2 ausgelöste

Abnahme der Linearität korreliert mit einer Abnahme der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke wäre. Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Linearität und einer Abnahme der VSL sowie einer damit verbundenen Reduktion der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke konnte bereits nachgewiesen werden (Burkman, 1991; Mortimer und Mortimer, 1990). Zusätzlich konnten Caballero-Campo und Kollegen zeigen, dass nach ZP2 Glykoprotein Kontakt die Linearität der Schwimmtrajektorie humaner Spermatozoen, sowie dessen progressive Motilität abnahm, einhergehend mit der Förderung eines hyperaktivierten Bewegungsmusters (Caballero-Campo et al., 2006). Aufgrund der in dieser Arbeit beobachteten hohen Streuung der VSL Werte, kann keine Aussage über den Einfluss des ZP2 Glykoproteins auf die VSL getroffen werden (Abbildung 49). Daher kann die in dieser Arbeit identifizierte Abnahme der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke bei kapazitierten Spermatozoen nach Kontakt mit in Kapazitationspuffer gelöstem ZP2 Glykoprotein nicht in Zusammenhang mit einer Abnahme der Linearität bzw. der VSL gebracht werden. Eine Erhöhung der Anzahl analysierter Spermatozoen soll in Folgearbeiten genauere Ergebnisse zum Einfluss des ZP2 Glykoproteins auf die pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke und die VSL liefern.

Die Kapazitation führt neben der Zunahme der VCL zu einer Linearitätsabnahme der Schwimmtrajektorie (Olds-Clarke, 1985; Suarez und Osman, 1987), wodurch die VSL muriner (Goodson et al., 2011) und humaner Spermatozoen (Burkman, 1991; de Lamirande und Gagnon, 1993; Mortimer und Mortimer, 1990) abnimmt. In dieser Arbeit konnte keine Reduktion der VSL von kapazitierten im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen detektiert werden (Abbildung 49). Dies könnte an der geringen Anzahl ausgewerteter Spermatozoen und der hohen Streuung der VSL Daten von kapazitierten Spermatozoen liegen. Die hohe Streuung der VSL Daten könnte mit der bereits erwähnten Unterteilung des hyperaktivierten Schwimmmusters in zwei Gruppen, die Su und Kollegen für humane Spermatozoen identifizierten, erklärt werden (Su et al., 2012). In dieser Arbeit wurden vermutlich sowohl Spermatozoen der ersten, als auch der zweiten Gruppe analysiert, womit die hohe Varianz der VSL-Werte erklärbar wäre. Aufgrund der hohen Varianz der VSL Werte der kapazitierten Kontrollspermatozoen, kann keine zuverlässige Aussage über den Einfluss der Kapazitation auf die VSL von murinen Spermatozoen getroffen werden (Abbildung 49).

Weitere Charakteristika der Kapazitation sind eine Zunahme der lateralen Auslenkung sowohl des Spermatozokopfs (Cooper, 1984; de Lamirande und

Gagnon, 1993) als auch des Flagellenschlags (Cooper, 1984; Suarez und Osman, 1987), dessen vierdimensionale Analyse durch die Verwendung der DHM ermöglicht wird. In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Steigerung der lateralen Kopfauslenkung (Abbildung 51) sowie der Amplitude des Flagellenschlags (Abbildung 53) für kapazitierte im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen beobachtet werden. Die Zunahme der Flagellenschlagsamplitude bewirkt eine Zunahme der tangentialen Kräfte im Flagellum, wodurch die Spermatozoen in der Lage sind hoch visköse Strukturen, wie die ZP, zu durchdringen (Suarez, 2006). Ravaux und Kollegen postulieren eine essentielle Bedeutung der oszillierenden Bewegung des Spermatozokopfs, einhergehend mit einem spezifischen Flagellenschlag, für die Penetration der Oozyte (Ravaux et al., 2016). Die Bindung an muZP2 Glykoprotein beladene Sepharosebeads führt zu einer geringen Steigerung der lateralen Auslenkung des Spermatozokopfs, die nach Kontakt zu löslichem ZP2 Glykoprotein nicht beobachtet werden kann (Abbildung 51). Da eine gesteigerte laterale Auslenkung des Kopfs ein Charakteristikum des hyperaktivierten Bewegungsmusters ist (Mortimer und Mortimer, 1990; Yanagimachi, 1994b) und dieses nachweislich durch ZP2 stimuliert wird (Caballero-Campo et al., 2006), wäre eine deutliche Zunahme der lateralen Auslenkung des Spermatozokopfs nach ZP2 Kontakt zu erwarten gewesen. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 51). Möglicherweise liegt dies daran, dass es sich in dieser Arbeit um Einzelzellanalysen handelt und die zufällig untersuchten Spermatozoen diese Bewegungsänderung nicht zeigten. Daher soll in Zukunft einerseits die Anzahl der analysierten Spermatozoen mittels DHM erhöht und andererseits kumulative Analysen mittels CASA durchgeführt werden. CASA ermöglicht ebenfalls die Untersuchung der lateralen Auslenkung des Spermatozokopfs (WHO, 2010).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein erneut zu einem Anstieg der Flagellenamplitude bei murinen kapazitierten Spermatozoen führt (Abbildung 53). Wie bereits erwähnt, nehmen durch die Zunahme der Flagellenschlagsamplitude ebenfalls die tangentialen Kräfte im Flagellum zu, wodurch die Spermatozoen in der Lage sind hoch visköse Strukturen, wie die ZP, zu durchdringen (Suarez, 2006). Tollner und Kollegen wiesen für Makaken-Spermatozoen ebenfalls eine Zunahme der lateralen Flagellenauslenkung nach Bindung an die ZP nach (Tollner et al., 2003). Die DHM erlaubt zusätzlich eine vierdimensionale Analyse des Flagellenschlags, sodass erstmals die Flagellenbewegung in 4D untersucht werden konnte. Zusätzlich zu der

Steigerung der Flagellenauslenkung in der XY-Ebene, steigt ebenfalls die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene nach Kapazitation (Abbildung 55). Außerdem zeigt sich tendenziell eine höhere Auslenkung des Flagellums in der Z-Ebene nach Kontakt mit muZP2 Glykoprotein (Abbildung 55). Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen der Flagellenamplitude in der XY-Ebene (Abbildung 53) als Charakteristikum der hyperaktivierten Motilität (Katz und Yanagimachi, 1981). Stauss und Kollegen konnten zeigen, dass eine hyperaktivierte Motilität die Fähigkeit die ZP zu penetrieren von kapazitierten Spermatozoen steigert (Stauss et al., 1995). Der in dieser Arbeit bereits identifizierte Zusammenhang zwischen der Flagellenauslenkung in der XY- und Z-Ebene für unkapazitierte Spermatozoen (siehe Kapitel 8.1.1) deutet darauf hin, dass neben der Flagellenauslenkung in der XY-Ebene auch die Auslenkung in der Z-Ebene ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Penetration der ZP und damit für die Fertilisation ist.

Neben der Bewegung des Spermatozoons ist die Induktion der Akrosomreaktion (AR), die erstmals 1952 beschrieben wurde (Dan, 1952), durch die Freisetzung hydrolytischer Enzyme entscheidend für die Penetration der Oozyte (Puga Molina et al., 2018; Wennemuth, 2017; Yanagimachi, 1994a). Nur akrosomal reagierte Spermatozoen konnten im Perivitellinenraum von Oozyten gefunden werden (Fleming und Yanagimachi, 1982; Inoue et al., 2011; Kuzan et al., 1984). Dieses Ergebnis suggeriert eine Induktion der AR vor der Fusion des Spermatozoons mit der Oozyte. Verschiedene Moleküle werden in der Literatur als Initiatoren für die AR diskutiert (Beebe et al., 1992; Bleil und Wassarman, 1980a; Chakravarty et al., 2005). Bleil und Wassarman konnten mittels funktionellen Assays eine, durch murines ZP3 bzw. gelöste murine ZP induzierte Akrosomexozytose *in vitro* nachweisen (Bleil und Wassarman, 1990), sodass eine Induktion der AR an der ZP postuliert wurde (Saling et al., 1979). Weitere Studien postulierten ebenfalls eine durch die ZP induzierte bzw. geförderte AR (Bleil und Wassarman, 1983; Crozet und Dumont, 1984; Uto et al., 1988). Welches ZP Glykoprotein essentiell für die Induktion der AR ist, wird kritisch diskutiert. Erste Fluoreszenzanalysen deuteten darauf hin, dass bei Mäusen die AR erst nach Bindung an die ZP initiiert wird (Storey et al., 1984). Durch die Verwendung von rekombinanten Proteinen konnten Gupta und Kollegen nachweisen, dass humanes ZP1, ZP3 und ZP4 die AR auslösen, nicht aber ZP2 (Gupta, 2015). Andere Studien wiesen ebenfalls ZP3 als AR-Initiator in Mäusen (Bleil und Wassarman, 1980a) und Menschen (Vanduin et al., 1994) nach. Im Gegensatz dazu konnten Baibakov und Kollegen mittels transgener Mäuse

nachweisen, dass nur bei intaktem humanen ZP2 Glykoprotein die Bindung und Penetration der ZP möglich ist (Baibakov et al., 2012). Dieses Ergebnis konnte auch für das muZP2 Glykoprotein gezeigt werden (Avella et al., 2014), sodass ebenfalls das ZP2 Glykoprotein als Auslöser für die AR fungieren könnte. Baibakov und Kollegen wiesen jedoch nach, dass die Bindung an die ZP keine Induktion der AR auslöst (Baibakov et al., 2007). Zusätzlich wiesen akrosomreagierte im Vergleich zu akrosomintakten Spermatozoen eine höhere Effizienz, die ZP zu durchdringen auf (Jin et al., 2011). Avella und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass murine und humane Spermatozoen am N-Terminus des ZP2 Glykoproteins auch nach der akrosomalen Exozytose gebunden bleiben (Avella et al., 2016). Weitere Studien ergaben, dass die Mehrheit der Spermatozoen vor Penetration der Kumuluszellschicht bereits akrosomal reagiert ist (Hino et al., 2016; Muro et al., 2016) und nur 5% der Spermatozoen, die die Ampulle passieren ein intaktes Akrosom besitzen (La Spina et al., 2016). Diese Untersuchungen suggerieren eine Initiation der AR bei der Migration der Spermatozoen durch den weiblichen Genitaltrakt (Bhakta et al., 2019).

Zusammengefasst konnte erstmals mit dem N-terminalen muZP2 Glykoprotein ein Faktor gefunden werden, der eine Änderung der Chiralität der Schwimmtrajektorie hervorruft. Zusätzlich bewirkt der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein eine Veränderung der vierdimensionalen Schwimmbewegung muriner kapazitierter Spermatozoen. Diese vierdimensionalen Bewegungsänderungen sind möglicherweise essentiell, um die ZP, als Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation der Oozyte, zu penetrieren.

9.5 Bedeutung der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht für das Schwimmverhalten muriner Spermatozoen

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits eine Änderung des vierdimensionalen Bewegungsmusters muriner kapazitierter Spermatozoen nach ZP2 Glykoprotein Kontakt mittels DHM gefunden werden, sodass im Folgenden untersucht wurde, ob sich die vierdimensionale Bewegung muriner Spermatozoen bereits in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht verändert. Diese Analyse soll Bewegungsmuster identifizieren, die notwendig für eine erfolgreiche Befruchtung sind. Bisherige Untersuchungen erfolgten kumulativ mittels CASA, sodass in dieser

Arbeit der Vorteil der DHM, vierdimensionale Analysen auf Einzelzellniveau durchführen zu können verwendet wurde, um potentiell spezifische Änderungen des Schwimmverhaltens in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht zu identifizieren. Eine Änderung der Spermatozoenbewegung als Antwort auf einen durch den Kumuluskomplex hervorgerufenen chemischen Gradienten (Chemotaxis) wird in der Literatur als ein Parameter für die Spermatozoenselektion im weiblichen Genitaltrakt beschrieben (Eisenbach, 1999; Giojalas und Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999; Ralt et al., 1994). Speziesabhängig sind bereits Moleküle wie Progesteron beim Menschen (Blackmore et al., 1990; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011) und Resact bei Seeigeln (*Arbacia punctulata*) (Seifert et al., 2015) identifiziert worden, die direkt bzw. über Signalkaskaden zur Aktivierung von CatSper-Kanälen führen. Progesteron, das von der humanen Kumuluszellschicht freigesetzt wird (Schuetz und Dubin, 1981), konnte als ein Chemoattraktant für die Navigation humaner Spermatozoen zur Oozyte identifiziert werden (Villanuevadias et al., 1995). Die Freisetzung des Progesterons führt zu einer Stimulation des CatSper-Kanals und einer damit verbundenen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Lishko et al., 2011; Smith et al., 2013; Strunker et al., 2011). Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration nimmt eine essentielle Rolle für die Induktion der hyperaktivierten Motilität humaner Spermatozoen ein (Gakamsky et al., 2009; Suarez, 2008; Uhler et al., 1992).

In dieser Arbeit wurde erstmals ein potentieller Einfluss der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen mittels Procrustesanalysen untersucht. Dabei zeigten alle analysierten unkapazitierten und kapazitierten Spermatozoen eine CW Chiralität ihrer Schwimmtrajektorie (Abbildung 57). Dieses Ergebnis impliziert erneut, dass der Kapazitationsprozess die Chiralität der Schwimmtrajektorie nicht beeinflusst, dass die CW Chiralität weiterhin ein konserviertes Bewegungsmuster muriner Spermatozoen ist und dass dieses Bewegungsmuster möglicherweise entscheidend für das Erreichen der Oozyte ist. Unabhängig vom Kapazitationsstatus ändert sich die Chiralität der Schwimmtrajektorie muriner Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht nicht (Abbildung 57). Alle untersuchten murinen Spermatozoen zeigen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie. Dieses Ergebnis könnte implizieren, dass eine CW Chiralität für die Penetration der Kumuluszellschicht sowie für das Erreichen der Oozyte essentiell ist. Dieses Ergebnis soll anhand eines neuen Versuchsaufbaus validiert werden. Dafür soll ein

Mikrokanal, wie von Xie und Kollegen beschrieben, bei der die Oozyte bzw. die Oozyte mit Kumuluszellschicht so platziert wird, dass die Spermatozoen nur von einer Richtung auf die Oozyte zu schwimmen können, verwendet werden (Xie et al., 2010). Somit soll ausgeschlossen werden, dass die fehlende Änderung der Chiralität darauf beruht, dass die Konzentration der von der Oozyte bzw. vom Kumuluskomplex sezernierten Signale, die das Spermatozoon erreichen, zu gering ist. Die in dieser Arbeit ausbleibende Änderung der Chiralität der Schwimmtrajektorie muriner Spermatozoen könnte ebenfalls darauf beruhen, dass die sezernierten Signale der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht durch die Wahl der 100 µm großen Messkammer zu stark verdünnt wurden, sodass die Konzentration, die für eine Bewegungsänderung essentiell wäre, zu gering ist. Andere Studien, die ebenfalls den Einfluss des Kumulus-Oozyten-Komplex auf die Schwimmbewegung muriner Spermatozoen untersuchten, verwendeten eine Kammer mit einer Höhe von 20 µm (Li et al., 2015). Der Einfluss der Messkammerhöhe soll in Folgearbeiten ebenfalls durch die Verwendung einer Messkammer mit einer 20 µm Höhe, bzw. mittels eines Mikrokanals, wie von Xie und Kollegen beschrieben, verhindert werden (Xie et al., 2010). Somit könnte eine gerichtete Bewegung entgegen eines Konzentrationsgradienten (Rheotaxis) untersucht und potentielle Änderungen des vierdimensionalen Schwimmmusters identifiziert werden. Die Rheotaxis wird bereits als ein wichtiger Faktor für die Spermatozoenorientierung im weiblichen Genitaltrakt beschrieben (Miki und Clapham, 2013).

Anschließend wurde der Einfluss der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht anhand der X-, Y- und Z-Koordinaten der holografischen Aufnahmen auf die dreidimensionale Geschwindigkeit unkapazitierter und kapazitierter muriner Spermatozoen untersucht. Nach *in vitro* Kapazitation konnte, wie in der Literatur beschrieben (Goodson et al., 2011; Mortimer und Mortimer, 1990), eine höhere VCL muriner Spermatozoen im Vergleich zu den unkapazitierten Spermatozoen identifiziert werden (Abbildung 59). Die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht bewirkt bei unkapazitierten Spermatozoen im Vergleich zu den unkapazitierten Kontrollspermatozoen keine Änderung der VCL (Abbildung 59). Eine Änderung der VCL von unkapazitierten Spermatozoen ist nicht zu erwarten, da lediglich kapazitierte Spermatozoen in die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht *in vivo* gelangen und fähig sind, auf Signale ausgehend von der Oozyte zu reagieren (Suarez und Dai, 1992; Topfer-Petersen et al., 2000). Die in dieser Arbeit identifizierte leichte Reduktion der VCL von kapazitierten Spermatozoen

in räumlicher Nähe zur Oozyte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollspermatozoen (Abbildung 59) beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die Geschwindigkeiten in einer Spermatozoenpopulation variieren können, sodass zufällig vermehrt Spermatozoen analysiert wurden, die eine geringere Geschwindigkeit als die Gesamtpopulation aufwiesen. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Spermatozoen nicht kapazitiert waren, da bereits im Menschen gezeigt werden konnte, dass lediglich 10% der Spermatozoenpopulation kapazitieren (Cohen-Dayag et al., 1995; Giojalas et al., 2004; Jaiswal und Eisenbach, 2002). Aufgrund der in dieser Arbeit vorherigen Überprüfung der Induktion der Kapazitation, auf Proteinebene und anhand vierdimensionaler Bewegungsanalysen (Kapitel 8.3), können die beobachteten Unterschiede in der Geschwindigkeit nicht mit einer fehlenden Induktion der Kapazitation erklärt werden.

In dieser Arbeit konnte eine geringe Steigerung der VCL in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht für kapazitierte Spermatozoen im Vergleich zu den kapazitierten Kontrollspermatozoen identifiziert werden (Abbildung 59). Sun und Kollegen konnten bereits nachweisen, dass sowohl die Kumuluszellschicht als auch die Oozyte Chemoattraktanten sezernieren, wobei diese sezernierten Faktoren die Motilität humaner kapazitierter Spermatozoen nicht veränderten (Sun et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnten Fetterolf und Kollegen durch die Verwendung von konditioniertem Medium von humanen Kumuluszellen eine Zunahme der humanen Spermatozoengeschwindigkeit beobachten (Fetterolf et al., 1994). Die Bedeutung dieser Beobachtung muss noch validiert werden, da die Kultivierung von Kumuluszellen nachweislich zu einer Morphologieänderung führt, die möglicherweise die Physiologie dieser Zellen beeinflusst (Hong et al., 2004). Eine Änderung der Spermatozoenbewegung als Antwort auf einen durch den Kumuluskomplex hervorgerufenen chemischen Gradienten (Chemotaxis) wird in der Literatur als ein Parameter für die Spermatozoenselektion im weiblichen Genitaltrakt beschrieben (Eisenbach, 1999; Giojalas und Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999; Ralt et al., 1994). Speziesabhängig sind bereits Moleküle wie Progesteron beim Menschen (Blackmore et al., 1990; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011) und Resact bei Seeigeln (*Arbacia punctulata*) (Seifert et al., 2015) identifiziert worden, die direkt bzw. über Signalkaskaden zur Aktivierung von CatSper-Kanälen führen. Progesteron, das von der humanen Kumuluszellschicht freigesetzt wird (Schuetz und Dubin, 1981), konnte als ein Chemoattraktant für die Navigation humaner Spermatozoen zur Oozyte identifiziert werden (Villanuevadiaz et al., 1995). Die Freisetzung des

Progesterons führt zu einer Stimulation des CatSper-Kanals und einer damit verbundenen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Lishko et al., 2011; Smith et al., 2013; Strunker et al., 2011). Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration nimmt eine essentielle Rolle für die Induktion der hyperaktivierten Motilität humaner Spermatozoen ein (Gakamsky et al., 2009; Suarez, 2008; Uhler et al., 1992) und führt zu einer Progesteron-induzierten Steigerung der VCL (Sumigama et al., 2015). Diese Zunahme der VCL konnten Giojalas und Rovasio ebenfalls nach Kontakt mit einem Extrakt aus superovulierten Oozyten und dessen Kumuluszellen detektieren (Giojalas und Rovasio, 1998). Bei Mäusen ist der CatSper-Kanal jedoch insensitive für Progesteron (Lishko et al., 2011), sodass ein anderer von den Kumuluszellen sezernierter Faktor für die in dieser Arbeit identifizierte leichte Steigerung der VCL kapazitiertes Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte mit Kumuluszellschicht verantwortlich sein muss (Abbildung 59). Kirichok und Kollegen konnten zeigen, dass die intrazelluläre Alkalisierung den murinen CatSper-Kanal aktiviert (Kirichok et al., 2006). Pérez-Cereales und Kollegen konnten jedoch für murine Spermatozoen, gemessen in einem niedrig viskösem Medium, eine durch Progesteron induzierte hyperaktivierte Motilität nachweisen, wobei dieser Effekt in einem höheren viskösem Medium nicht mehr detektierbar war (Perez-Cereales et al., 2016). Die Frage, ob Progesteron die Motilität muriner Spermatozoen beeinflusst und falls dies zutrifft, welcher Signalweg darin involviert ist, bleibt aktuell noch unbeantwortet.

Die Kapazitation führt neben der Zunahme der VCL zu einer Linearitätsabnahme der Schwimmtrajektorie (Olds-Clarke, 1985; Suarez und Osman, 1987), wodurch die VSL muriner (Goodson et al., 2011) und humaner Spermatozoen (Burkman, 1991; de Lamirande und Gagnon, 1993; Mortimer und Mortimer, 1990) abnimmt. Es konnte keine Reduktion der VSL von kapazitierten im Vergleich zu unkapazitierten Spermatozoen beobachtet werden (Abbildung 60). Dies könnte erneut an der geringen Anzahl ausgewerteter Spermatozoen und der hohen Streuung der VSL Daten von kapazitierten Spermatozoen liegen. Eine weitere Erklärung wäre, wie bereits erwähnt, die Unterteilung des hyperaktivierten Schwimmmusters in zwei Gruppen, die Su und Kollegen bereits für humane Spermatozoen identifizierten (Su et al., 2012). In dieser Arbeit wurden vermutlich sowohl Spermatozoen der ersten, als auch der zweiten Gruppe analysiert, womit die hohe Varianz der VSL-Werte erklärbar wäre. Aufgrund der hohen Varianz der VSL Werte sowohl von kapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte, als auch zur Oozyte mit Kumuluszellschicht, kann keine zuverlässige Aussage über deren Einfluss auf die

VSL getroffen werden (Abbildung 60). Wie bereits erwähnt korreliert das von Su und Kollegen zur zweiten Gruppe zugeordnete Schwimmmuster mit einer Abnahme der VSL (Su et al., 2012) und somit mit einem Linearitätsverlust der Schwimmtrajektorie (Burkman, 1991; Goodson et al., 2011; Suarez und Osman, 1987). Würden diese Charakteristika auch auf die in dieser Arbeit analysierten Spermatozoen zutreffen, wäre zusätzlich eine Abnahme der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke zu erwarten gewesen. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 60). Nachdem die VSL kapazitierter Spermatozoen bereits im Vergleich zu der VSL von unkapazitierten Kontrollspermatozoen, unabhängig von der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht, nicht reduziert ist, zeigt sich ebenfalls keine Abnahme der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke beim Vergleich von unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen (Abbildung 60). Dies könnte daran liegen, dass ein Großteil der in dieser Arbeit zufällig analysierten Spermatozoen zu der von Su und Kollegen beschriebenen ersten Gruppe, mit einer schlängelnden Vorwärtsbewegung, gezählt würden (Su et al., 2012). In Folgearbeiten soll die Anzahl der untersuchten Spermatozoen erhöht werden, um Spermatozoen aus beiden Kategorien zu analysieren. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit weder ein Einfluss der Oozyte, noch der Kumuluszellschicht auf die pro Schlagzyklus zurückgelegte Strecke muriner kapazitierter Spermatozoen detektiert werden (Abbildung 60). Die Abnahme der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke von unkapazitierten Spermatozoen in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht lässt sich physiologisch nicht erklären, da nur kapazitierte Spermatozoen fähig sind, auf Signale ausgehend von der Oozyte oder der Kumuluszellschicht zu reagieren (Suarez und Dai, 1992; Topfer-Petersen et al., 2000).

Die Analyse des Einflusses der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht zeigt weder eine Änderung der lateralen Auslenkung des Spermatozokopfs (Abbildung 62), noch der Flagellenamplitude (Abbildung 63), sowohl für unkapazitierte als auch für kapazitierte Spermatozoen. Dasselbe Ergebnis zeigt die Analyse des Flagellenschlags in der Z-Ebene (Abbildung 64). In dieser Arbeit konnte anhand des verwendeten Versuchsaufbaus kein Einfluss der räumlichen Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht auf das vierdimensionale Schwimmmuster muriner unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen festgestellt werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass weder die Oozyte, noch die Kumuluszellschicht die Schwimmbewegung muriner Spermatozoen

durch sezernierte Signale direkt beeinflusst. Ein durch die Oozyte bzw. durch den Kumuluskomplex hervorgerufener chemischer Gradient konnte in dieser Arbeit, aufgrund fehlender Bewegungsänderungen, nicht identifiziert werden. Dies widerspricht der Beobachtung von Giojalas und Rovasio, die bereits 1998 sowohl eine Änderung von dynamischen Parametern, als auch eine gerichtete Bewegung zu einem Oozyten-Kumulus-Gemisch beobachteten (Giojalas und Rovasio, 1998). Oliveira und Kollegen wiesen ebenfalls ein geändertes Bewegungsmuster muriner Spermatozoen als Antwort auf Faktoren der Oozytenmikroumgebung nach und postulierten eine Bedeutung dieser Faktoren *in vivo* für eine gerichtete Bewegung der Spermatozoen zur Oozyte (Oliveira et al., 1999). Eine Änderung der Flagellenbewegung, charakterisiert durch ein erhöhtes, einseitiges Schlagen des Flagellums, konnte nach Kontakt zum Kumulus-Oozyten-Komplex für murine ejakulierte Spermatozoen beobachtet werden (Li et al., 2015). Ein Grund für die in dieser Arbeit ausbleibenden Änderungen des Spermatozoenschwimmverhaltens in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht könnte die Zeit sein. Die holografischen Aufnahmen in dieser Arbeit erfolgten sofort nach Zugabe der Oozyten und Kumuluszellen sowie der Spermatozoen in die Messkammer. Möglicherweise war die Zeit zu kurz, um einen von der Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht ausgehenden Gradienten aufzubauen, sodass in Folgearbeiten eine Vorinkubation der Oozyte bzw. der Oozyte mit Kumuluszellschicht in der Messkammer bei 37°C durchgeführt werden soll. Ein Einfluss der Oozyte auf die Schwimmbewegung humaner Spermatozoen konnte nach Bindung des Spermatozoons an die Oozyte bereits beobachtet werden (Ravaux et al., 2016). Ravaux und Kollegen wiesen ein spezifisches Bewegungsmuster humaner Spermatozoen nach, das charakterisiert ist durch eine oszillierende Kopf-Bewegung auf der Oozyten-Plasmamembran, hervorgerufen durch einen spezifischen Flagellenschlag (Ravaux et al., 2016). Dieser Flagellenschlag ist charakterisiert durch eine hohe Frequenz und eine oszillierende Bewegung. Ravaux und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass zwei Minuten nach Bindung an die Oozyte die Flagellenbewegung stoppte und die Fertilisation der Oozyte initiiert wurde (Ravaux et al., 2016). Daher postulieren sie eine essentielle Bedeutung dieses Bewegungsmusters für die Penetration der Oozyte.

Zusammengefasst konnten mit dem verwendeten Versuchsaufbau keine physiologisch relevanten Änderungen des Spermatozoenschwimmverhaltens in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Oozyte mit Kumuluszellschicht beobachtet werden.

9.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit mittels DHM die vierdimensionale Flagellenbewegung sowie das Rollverhalten und die Chiralität der Schwimmtrajektorie unkapazitierter Spermatozoen analysiert werden. Außerdem wurde die DHM für Geschwindigkeitsanalysen von Spermatozoen etabliert. Eine Änderung der Schwimmbewegung muriner kapazitierter Spermatozoen, insbesondere eine Chiralitätsänderung der Schwimmtrajektorie, konnte nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein beobachtet werden. Es zeigte sich kein für physiologische Prozesse relevanter Einfluss der murinen Oozyte bzw. der Kumuluszellschicht unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen auf das vierdimensionale Schwimmverhalten muriner unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen.

Spermatozoen durchlaufen bei der Passage des weiblichen Genitaltrakts einen Reifungsprozess (Kapazitation), der Voraussetzung für die Induktion der Hypermotilität ist und eine erfolgreiche Befruchtung der Oozyte ermöglicht (Marquez und Suarez, 2007; Yanagimachi, 1994b). Es konnte gezeigt werden, dass lediglich kapazitierte Spermatozoen in die räumliche Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht *in vivo* gelangen und fähig sind, auf Signale ausgehend von der Oozyte zu reagieren (Suarez und Dai, 1992; Topfer-Petersen et al., 2000). Die Kapazitation bewirkt eine Membran Hyperpolarisation, einen Anstieg des intrazellulären pH-Werts und der cAMP-Konzentration sowie eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme und eine gesteigerte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung, vermutlich durch die PKA-Aktivität (Abbildung 65) (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b). Die intrazellulären Veränderungen ermöglichen die Bindung von Spermatozoen an die ZP und die Induktion der AR sowie die Hyperaktivierung als Voraussetzung für die Penetration und Fusion mit der Oozyte (Bleil und Wassarman, 1983; Chiu et al., 2010; Florman et al., 1992). Diese Änderungen des intrazellulären Ionenmilieus erfolgen über spezies-spezifische Ionenkanäle (Abbildung 65). Einige spezies-spezifische Faktoren, die eine Änderung des intrazellulären Ionenmilieus hervorrufen, konnten bereits identifiziert werden. In humanen Spermatozoen aktiviert das von der Kumuluszellschicht sezernierte Progesteron den humanen CatSper Kanal und bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom (Brenker et al., 2012; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), der über die Aktivierung einer Spermatozoen spezifischen AC zur Erhöhung der cAMP Konzentration und zur Aktivierung der PKA und somit zur Induktion der Hypermotilität führt (Gakamsky et al., 2009; Suarez, 2008; Uhler et al.,

1992). Neben dem Progesteron konnten weitere Faktoren gefunden werden, die einen CatSper-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom stimulieren. Dazu zählen die zyklischen Nukleotide (cAMP und cGMP) (Chen et al., 2000; Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005), die sAC (Chen et al., 2000; Esposito et al., 2004), ein Zona pellucida Glykoprotein (Bailey und Storey, 1994; Florman, 1994; Florman et al., 1989), das Serum Albumin (Bailey und Storey, 1994; Xia und Ren, 2009a), die intrazelluläre Alkalisierung (Chavez et al., 2014; Mannowetz et al., 2013) und der pH-Wert (Lishko et al., 2011; Lishko und Kirichok, 2010). Durch die Alkalisierung des intrazellulären Milieus über sNHE (Garcia und Meizel, 1999; Lee, 1984; Lee und Garbers, 1986; Lee et al., 1983; Zeng et al., 1996) oder zusätzlich über Hv1-Kanäle bei humanen Spermatozoen ändert sich der intrazelluläre pH-Wert (Lishko et al., 2010; Lishko und Kirichok, 2010) und bewirkt einerseits einen CatSper-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom bei Seeigel-Spermatozoen (Seifert et al., 2015) und andererseits eine Aktivierung der K^+ -Kanäle, Slo3 bei murinen und Slo1 bei humanen Spermatozoen (Brenker et al., 2014; Navarro et al., 2007; Zeng et al., 2011).

Neben Ca^{2+} spielt für die Kapazitation und Induktion der Hyperaktivität HCO_3^- eine entscheidende Rolle. Durch die Vermischung des Vaginalsekrets mit der HCO_3^- -reichen Samenflüssigkeit, erhöht sich die extrazelluläre HCO_3^- -Konzentration (Setchell et al., 1994), wobei der HCO_3^- -Transport in die Spermatozoenzelle noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Sowohl $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (NBC) (Demarco et al., 2003; Romero und Boron, 1999), als auch Carboanhydrasen (Carlson et al., 2007; Ekstedt et al., 2004; Parkkila et al., 1991; Wandernoth et al., 2010), die durch ihre reversible Enzymreaktion den HCO_3^- -Haushalt der Spermatozoen beeinflussen (Wandernoth et al., 2015; Wandernoth et al., 2010) werden als Modelle für die HCO_3^- -Aufnahme diskutiert. Die Beteiligung des NBCs in murinen, humanen und Seeigel-Spermatozoen konnte für die initiale HCO_3^- -Aufnahme nachgewiesen werden (Demarco et al., 2003; Gunaratne et al., 2006; Puga Molina et al., 2018). HCO_3^- führt durch die Aktivierung der sAC über den cAMP- und Ca^{2+} -vermittelten Signalweg zur Phosphorylierung der Dyneinketten innerhalb des Axonems, die die Zunahme der Schlagfrequenz des Flagellums bewirken (Harrison, 2004; Hess et al., 2005; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Salathe, 2007; Wennemuth, 2004) und durch die anschließenden Tyrosin-Phosphorylierungen die Hypermotilität bzw. die akrosomale Exozytose initiieren (Jones et al., 2007; Shadan et al., 2004; Visconti et al., 1995b). Diese Änderung des Bewegungsmusters ist entscheidend für die Penetration der Kumuluszellschicht (Quill et al., 2003), wodurch das Spermatozoon

an die um die Oozyte liegende ZP binden kann. Die ZP nimmt eine entscheidende Rolle bei der Fertilisation der Oozyte ein. Sie gewährleistet eine spezie-spezifische Gametenerkennung, vermittelt die initiale Bindung der Spermatozoen an die Oozyte und bildet einen sogenannten „Zona Block“ zur Verhinderung der Polyspermie aus (Bleil et al., 1981; Dean, 1992; Gahlay et al., 2010; Wassarman, 1988). Aktuell werden in der Literatur mehrere Modelle diskutiert, die entweder das Glykoprotein ZP3 oder das Glykoprotein ZP2 als Zona Spermatozoenliganden beschreiben (Bhakta et al., 2019). Verschiedene Arbeiten liefern Hinweise dafür, dass ZP2 für die primäre Keimzellerkennung verantwortlich ist (Avella et al., 2014; Avella et al., 2016; Baibakov et al., 2012; Tian et al., 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung von ZP-Glykoproteinen an den ZP-Rezeptor zu einem G-Protein gekoppelten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und einer erneuten intrazellulären pH-Erhöhung führt (Florman, 1994; Florman et al., 1989; Ren und Xia, 2010; Xia und Ren, 2009b). Diese intrazellulären Änderungen bewirken eine Induktion der AR (Florman et al., 2008; Florman und Storey, 1982; Florman und Wassarman, 1985). Die pH-Erhöhung führt neben der Induktion der AR zur Hyperaktivierung (Jeon et al., 2001). Florman wies die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowohl in der akrosomalen Region des Spermatozoenkopfs als auch im Flagellum nach (Florman, 1994). Die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zusätzlich zur Induktion der akrosomalen Exozytose (Bleil und Wassarman, 1983; Chiu et al., 2010; Florman et al., 1992) zur Erhöhung von Protein-Phosphorylierungen, die zur Initiation der Hypermotilität und der AR führen (Jha und Shivaji, 2002; Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2002). Dieser intrazelluläre Ca^{2+} - und pH-Anstieg könnte die Änderung der progressiven Motilität von humanen Spermatozoen nach Exposition von rekombinantem ZP2 erklären (Caballero-Campo et al., 2006). In dieser Arbeit konnten ebenfalls Motilitätsänderungen muriner kapazitierter Spermatozoen nach ZP2 Kontakt nachgewiesen werden. Die beobachtete Erhöhung der kurvenlinearen Geschwindigkeit (VCL) (Abbildung 48) sowie der pro Schlagzyklus zurückgelegten Strecke (Abbildung 50) resultieren vermutlich aus der ZP2 induzierten intrazellulären Ca^{2+} - und pH-Änderung. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den CatSper-Kanal führt ebenfalls zur Hypermotilität (Carlson et al., 2003), charakterisiert durch die Zunahme der Schlagfrequenzamplitude des Flagellums und einer asymmetrischen Bewegungsform (Brokaw, 1979; Ho et al., 2002; Lindemann et al., 1987; Suarez, 2008). Kirichok und Lishko konnten 2011 zeigen, dass diese asymmetrische Bewegungsform zu einem kraftvolleren Flagellenschlag führt, der

notwendig für die Penetration der Kumuluszellschicht ist (Kirichok und Lishko, 2011). Nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein stieg ebenfalls die Flagellenschlagsamplitude bei murinen kapazitierten Spermatozoen (Abbildung 53), sowie die Flagellenauslenkung in der Z-Ebene (Abbildung 54). Die Zunahme der Flagellenschlagsamplitude bewirkt eine Zunahme der tangentialen Kräfte im Flagellum, wodurch die Spermatozoen in der Lage sind hoch visköse Strukturen, wie die ZP, zu durchdringen (Suarez, 2006). Ravaux und Kollegen postulieren ebenfalls eine essentielle Bedeutung der oszillierenden Bewegung des Spermatozookopfs, einhergehend mit einem spezifischen Flagellenschlag, für die Penetration der Oozyte (Ravaux et al., 2016). Aufgrund dessen scheinen die in dieser Arbeit beobachteten Änderungen der Spermatozoenmotilität ebenfalls entscheidend für die Penetration der ZP und Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation der Oozyte zu sein.

Anhand von Bewegungsanalysen konnte für murine Spermatozoen eine alternierende Rollbewegung (180°-Drehung) (Abbildung 27) (Babcock et al., 2014) und für humane Spermatozoen eine 360°-Rollbewegung entlang der Längsachse beobachtet werden (Ishijima et al., 1992; Phillips, 1972). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Rollvorgang entlang der Längsachse bei murinen Spermatozoen mit der Amplitude des Flagellenschlags koordiniert ist. Dabei korreliert eine lineare Schwimmtrajektorie mit einer höheren Flagellenschlagsamplitude im Vergleich zu zirkulär schwimmenden Spermatozoen (Abbildung 28). Die Hypermotilität kapazitierter Spermatozoen ist ebenfalls durch eine Zunahme der Schlagamplitude charakterisiert (Yanagimachi, 1970). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Änderungen des Bewegungsmusters während der Kapazitation essentiell für die Penetration der ZP und das Erreichen der Oozyte sind (Yanagimachi, 1994a). Die in dieser Arbeit identifizierte transiente Rollbewegung entlang der Längsachse im Zusammenhang mit den beobachteten Chiralitätsänderungen (Abbildung 27) können ebenfalls entscheidende Faktoren für den Selektionsprozess im weiblichen Genitaltrakt sein. Sie erlauben eine schnelle Änderung der Schwimmtrajektorie, welche eine Möglichkeit suggeriert, um auf externe Reize zu reagieren. Miller und Kollegen wiesen zusätzlich einen Einfluss der asymmetrischen Verteilung der Ionenkanäle CatSper und Hv1 bei humanen Spermatozoen für die Ausübung der 360°-Rotationen entlang der Längsachse nach (Miller et al., 2018). Sie postulieren, dass die asymmetrische Verteilung des Hv1-Kanals eine einseitige, selektive Alkalisierung des Axonems bewirken könnte,

wodurch wiederum nur ein Teil der CatSper-Kanäle aktiviert werden würde. Eine solche asymmetrische Aktivierung der Kanäle könnte zu einem selektiven Ca^{2+} -Anstieg im Flagellum führen, die Dyneinbewegung einseitig hemmen und eine asymmetrische Steifheit des Axonems verursachen (Miller et al., 2018). Dieser Vorgang könnte die Bewegungsrotation des Flagellums verstärken (Miller et al., 2018). Miller und Kollegen postulieren weiterhin, dass die spezifische Position der Ionenkanäle Hv1 und CatSper eine schnelle Signaltransduktion gewährleistet und schließlich die komplexen Zellbewegungen, wie die Hypermotilität und die Rotation, beeinflusst. Diese asymmetrische Verteilung der Ionenkanäle könnte somit ebenfalls einen Einfluss auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie haben. In den letzten Jahren, konnten Versuche mittels Patch-Clamp Techniken zeigen, dass der CatSper-Kanal wichtig für die ZP induzierte Ca^{2+} -Erhöhung bei murinen Spermatozoen ist (Miwa, 2015; Xia und Ren, 2009b). Obwohl der Hv1 Kanal bei Mäusen nicht aktiv ist, könnte eine solche asymmetrische Kanalverteilung die in dieser Arbeit beobachtete konservierte CW Chiralität der Schwimmtrajektorie für unkapazitierte und kapazitierte Spermatozoen (Abbildung 46) erklären. Aufgrund dieser konservierten Chiralität der Schwimmtrajektorie scheint der Kapazitationsprozess und die damit verbundenen intrazellulären Ionenkonzentrationen keinen Einfluss auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie zu haben. Daraus schlussfolgernd scheint dieses konservierte Bewegungsmuster entscheidend für das Erreichen der Oozyte zu sein. Diese Annahme wird unterlegt durch die ausbleibende Änderung der Chiralität in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht (Abbildung 57, Abbildung 58).

Nach Bindung an das murine ZP2 Glykoprotein scheint das für unkapazitierte und kapazitierte Spermatozoen ohne Kontakt zum ZP2 Glykoprotein beobachtete konservierte Bewegungsmuster keine wichtige Rolle mehr zu spielen, da für die analysierten kapazitierten Spermatozoen nach ZP2 Kontakt ein ausgeglichenes Verhältnis von Schwimmtrajektorien mit einer CW und einer CCW Chiralität zu detektieren ist (Abbildung 45, Abbildung 47). Eine Erklärung für die Aufhebung der konservierten Chiralität wäre, dass die Vorgänge, die für die Penetration entscheidend sind aktiviert und die Mechanismen zur Aufrechterhaltung der konservierten Chiralität der Schwimmtrajektorie vernachlässigt werden. Andererseits wäre es denkbar, dass die Änderung der Chiralität essentiell für die Penetration der ZP und der Oozyte ist. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste die Chiralität von den Spermatozoen untersucht werden, die zu einer erfolgreichen Befruchtung der Oozyte führen. Die beobachtete Änderung der Chiralität nach ZP2 Kontakt könnte

durch Änderungen des intrazellulären Ionenmilieus nach Bindung an ZP2 erklärt werden. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die Zugabe von ZP zu kapazitierten Spermatozoen zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung führt, während die Zugabe eines ZP-Inhibitors die ZP-induzierte AR unterdrückt und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in murinen Spermatozoen reduziert (Bailey und Storey, 1994; Florman, 1994; Florman et al., 2008). Bleil und Wassarman konnten bereits mittels funktionellen Assays eine durch murines ZP3 bzw. gelöste murine ZP induzierte Akrosomexozytose *in vitro* nachweisen (Bleil und Wassarman, 1990), sodass eine Induktion der AR an der ZP postuliert wurde (Saling et al., 1979). Weitere Studien postulierten ebenfalls eine durch die ZP induzierte bzw. geförderte AR (Bleil und Wassarman, 1983; Crozet und Dumont, 1984; Uto et al., 1988). Welches ZP Glykoprotein essentiell für die Induktion der AR ist, wird aktuell kritisch diskutiert. Durch die Verwendung von rekombinanten Proteinen konnten Gupta und Kollegen nachweisen, dass humanes ZP1, ZP3 und ZP4 die AR auslösen, nicht aber ZP2 (Gupta, 2015). Andere Studien wiesen ebenfalls ZP3 als AR-Initiator in Mäusen (Bleil und Wassarman, 1980a) und Menschen (Vanduin et al., 1994) nach. Sollte der Kontakt zum muZP2 Glykoprotein trotz aktueller Erkenntnisse die AR auslösen, wäre zu erwarten, dass es durch die akrosomale Exozytose zu einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt und sich auch das Bewegungsmuster des Flagellums, sowie die Chiralität der Schwimmtrajektorie ändert, mit dem Ziel, die ZP zu penetrieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit Änderungen des vierdimensionalen Bewegungsmusters muriner Spermatozoen nach Kontakt zum muZP2 Glykoprotein identifiziert werden, die für eine erfolgreiche Befruchtung der Oozyte essentiell sein könnten. Die Kenntnis über die biochemischen Grundlagen, die zur Motilität führen und die sich kurz vor der Befruchtung verändern, ist essentiell für das Verständnis männlicher Fertilität und Infertilität. Das Modell zeigt die Ergebnisse dieser Arbeit im logischen Kontext zu dem in der Literatur beschriebenen aktuellen Forschungsstand.

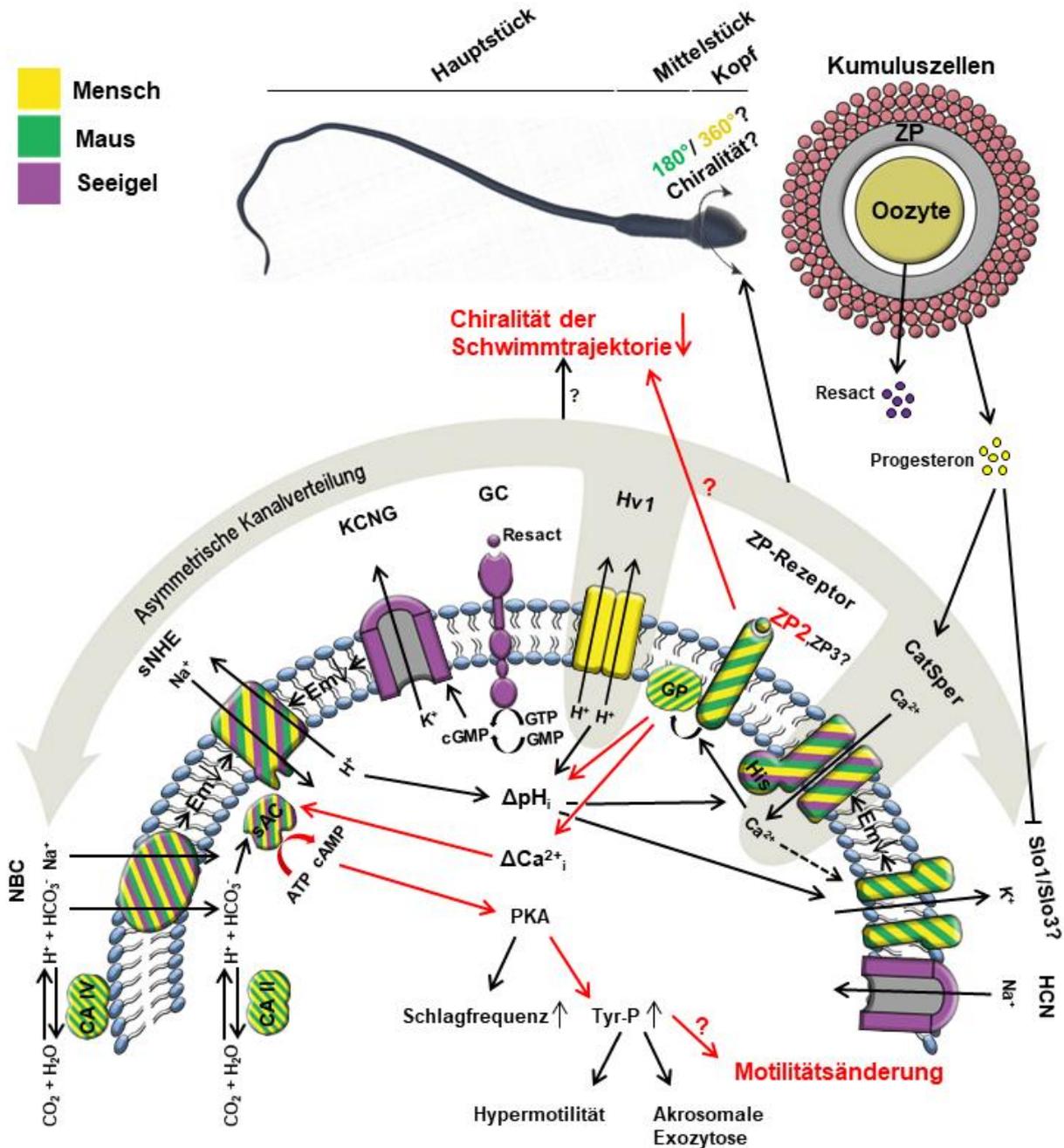


Abbildung 65: Hypothetisches Modell zum Einfluss des ZP2 Glykoproteins auf die Signaltransduktion muriner Spermatozoen

Das Modell zeigt den möglichen Einfluss des ZP2 Glykoproteins auf die grundlegenden Mechanismen der Signaltransduktion von murinen Spermatozoen. Dargestellt ist ebenfalls die Signaltransduktion von humanen und Seeigel-Spermatozoen. Die spezies-spezifische Farbkodierung ist in der Legende dargestellt. Die Aktivierung des ZP-Rezeptors, ausgelöst durch die Bindung von murinem ZP2, könnte ein assoziiertes G-Protein (GP) aktivieren, das eine Erhöhung des intrazellulären pH-Werts und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration findet in der akrosomalen Region des Spermatozoenkopfs und im Flagellum statt. Die G-Protein vermittelte Signaltransduktion aktiviert die lösliche Adenylatzyklase (AC) und initiiert letztendlich Tyrosin-Phosphorylierungen, welche verantwortlich für die beobachteten Motilitätsänderungen sein könnten. Die Bindung an ZP2 führt zu einer Änderung bzw. Aufhebung der zuvor beobachteten Chiralität der Schwimmtrajektorie von kapazitierten Spermatozoen. Der Mechanismus, der die Änderung der Chiralität und die der Motilität bewirkt ist bisher noch unbekannt (?). Die Beschreibung der kompletten Abbildung ist in Abbildung 8 im Kapitel 3.5.2 dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Kaupp und Strunker, 2017; Nishigaki et al., 2014).

10 Ausblick

Obwohl in der Klinik bereits Verfahren für die Behandlung von männlicher Infertilität existieren (Insemination, ICSI und IVF) (Krause et al., 2011), steigt in den westlichen Ländern der Bedarf an ART-Verfahren (Centola et al., 2016; Jensen et al., 2008; Jorgensen et al., 2012; Kupka et al., 2014; Romero-Otero et al., 2015; Swan et al., 2000). Zur Diagnostik der ART wird meist CASA verwendet, wodurch die Bestimmung der Zellkonzentration, Motilität und Bewegungsmuster von Spermatozoen möglich ist (Mortimer, 2000). Da CASA jedoch für den klinischen Einsatz weiterhin kontrovers diskutiert wird, muss eine ergänzende Methode zur Analyse der Spermatozoenbewegung und der damit verbundenen Beurteilung der Erfolgchancen von ART-Verfahren etabliert werden. Eine vielversprechende Erweiterung ist die 3D Analyse der Spermatozoenbewegung mittels holografischer Aufnahmen (Di Caprio et al., 2010; Gallagher et al., 2018; Mico et al., 2008). Ein Informationsgewinn durch die 3D Bewegungsanalyse konnte bereits von einigen Arbeitsgruppen belegt werden und die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Vergleichs von CASA und DHM verifizieren diese Annahme. In dieser Arbeit, sowie in Vorarbeiten (Muschol et al., 2018), konnte die DHM als Methode etabliert werden, um die Flagellenbewegung und die Schwimmtrajektorie von Spermatozoen in allen drei Ebenen (X, Y und Z) abhängig von der Zeit zu analysieren. Somit könnte die DHM durch die 4D Analyse der Flagellenbewegung und der Schwimmtrajektorie in Zukunft dazu beitragen, Spermatozoen mit dem Potential die ZP erfolgreich zu penetrieren, zu identifizieren.

Verschiedene Studien wiesen eine Beteiligung des CatSper-Kanals und dem damit verbundenen Ca^{2+} -Influx (Carlson 2003, Ho 2009) für die asymmetrische Rollbewegung nach (Ishijima 1992, Ishijima und Hamaguchi 1992). Aufgrund dessen soll in Zukunft der Einfluss des CatSper-Kanals auf die alternierende Rollbewegung entlang der Längsachse von murinen Spermatozoen mittels DHM anhand von *CatSper*-Knockout Mäusen untersucht werden. Zusätzlich soll zukünftig die Bewegung von Seeigel-Spermatozoen mittels DHM untersucht werden, um zu analysieren, ob die stabilisierenden Strukturen der Ultrastruktur des Flagellums im Zusammenhang mit den, in dieser Arbeit beobachteten, alternierenden Rollbewegungen des Kopfes mit vorgegebener Chiralität besitzen. Invertebratenspermatozoen wie die Seeigel-Spermatozoen besitzen im Gegensatz zu Vertebratenspermatozoen keine stabilisierenden Strukturen innerhalb des

Flagellums, also weder die Axonem umgebenden Außenfibrillen noch eine Ringfaserscheide (Toshimori und Eddy, 2015), wodurch sie als ein Modellorganismus für die oben beschriebenen Untersuchungen verwendet werden können. Sollte ebenfalls eine alternierende Rollbewegung bei Seeigel-Spermatozoen identifiziert werden, könnte belegt werden, dass die Rollbewegung unabhängig von diesen Strukturen des Flagellums stattfindet. Zusätzlich soll der Einfluss der Zellmembran auf das Rollverhalten mittels demembranierter Spermatozoen untersucht werden, da einige Studien einen Zusammenhang zwischen der Plasmamembran und der Rotation entlang der Längsachse vermuten (Miki und Clapham, 2013; Miller et al., 2018). Dabei soll die Demembration von murinen Spermatozoen anhand veröffentlichter Protokolle erfolgen (Lesich et al., 2014; Lesich et al., 2008; Okuno et al., 1976). Ein weiterer Vorteil von demembranierten Spermatozoen ist, dass extrazelluläre Veränderungen von Ionen und Nukleotiden die intrazelluläre Konzentration simulieren. Dies bietet die Möglichkeit die Bedeutung von Faktoren, die für einen geordneten Ablauf des Schlagzyklus verantwortlich sind (Mg^{2+} , Ca^{2+} , ATP) (Brokaw, 1975; Garbers et al., 1973), für die Chiralität der Spermatozoenbewegung zu untersuchen. Um auszuschließen, dass die beobachteten Chiralitäten der Schwimmtrajektorie sowie der Rollbewegung um die Längsachse im Modellorganismus Maus auf den morphologischen Eigenschaften des Spermatozoenkopfs beruht, sollen spezies-spezifische Vergleiche von Bewegungsmustern durchgeführt werden. Ein möglicher Lösungsansatz, um in Zukunft repräsentative 4D Chiralitätsanalysen humaner oder boviner Spermatozoenköpfe mittels DHM durchführen zu können, wäre die Verwendung von Glasbeads, da Spermatozoen nachweislich unspezifisch an Glas binden (Bessen et al., 1980; Chapeau und Gagnon, 1987; Gibbons et al., 1976). Wenn das Spermatozoon rollt, könnte anhand des am Spermatozoenkopf gebundenen Beads untersucht werden, ob es sich um eine 360°-Rotation oder wie bei murinen Spermatozoen um eine alternierende 180°-Drehung entlang der Rotationsachse des Kopfs handelt. Diese Versuche sollen aufklären, ob die Rollbewegungen entlang der Längsachse ein spezies-spezifisches Bewegungsmuster ist und zu einem besseren Verständnis der Spermatozoenbewegung und damit zur Aufklärung des im weiblichen Genitaltrakt stattfindenden Selektionsprozesse beitragen.

Um den Einfluss der Chiralität muriner Spermatozoen auf die Penetration der ZP zu untersuchen, sollen in Folgearbeiten Migrationsversuche durchgeführt werden. Sollte eine Korrelation zwischen der Chiralitätsänderung nach ZP2 Kontakt und der

Migration bestehen, so müsste sich ebenfalls eine Änderung der Chiralität bei der Durchquerung visköser Flüssigkeit, also bei einer Bewegung gegen einen Widerstand, zeigen. Sowohl für Seeigel-Spermatozoen (Gibbons et al., 1987), als auch für die in dieser Arbeit untersuchten unkapazitierten und kapazitierten murinen Spermatozoen ohne Kontakt zum N-terminalen ZP2 Glykoprotein konnte ein chirales Gedächtnis identifiziert werden, wodurch ein Teil der Kraft, die für das Rollen benötigt wird, gespeichert und für den nächsten darauffolgenden Gegenzyklus wiederverwendet wird.

Zusätzlich soll in Folgearbeiten untersucht werden, ob die Chiralitätsänderung nach ZP2 Kontakt nur ein vorübergehendes Ereignis ist. Sollte sich nach ZP2 Kontakt erneut ein konserviertes CW Bewegungsmuster einstellen, würde dieses Ergebnis dafürsprechen, dass die Änderung der Chiralität lediglich für die Penetration der ZP essentiell ist und das chirale Gedächtnis weiterhin besteht. Eine solche vorübergehende Änderung des Bewegungsmusters, mit anschließender Rückführung auf das ursprüngliche Bewegungsmuster nach Ausschalten des Stimulus, konnte bereits detektiert werden (Eshel et al., 1990; Nosrati et al., 2016). Des Weiteren soll der Einfluss des CatSper-Kanals und die darüber induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Zunahme auf die Chiralität der Schwimmtrajektorie untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass die Spermatozoen von *CatSper*-Knockout-Mäusen eine CW Chiralität der Schwimmtrajektorie, wie die unkapazitierten Kontrollspermatozoen, besitzen, da der CatSper-Kanal durch einen intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zur Hypermotilität und zur Induktion der Kapazitation führt (Carlson et al., 2003; Ren et al., 2001). Im Anschluss sollen kapazitierte Spermatozoen nach Kontakt mit ZP2 und einem CatSper-Inhibitor mittels DHM analysiert werden. Sollten alle untersuchten Spermatozoen trotz ZP2 Kontakt wieder eine konservierte CW Chiralität der Schwimmtrajektorie aufweisen, könnte eine essentielle Rolle des CatSper-Kanals für die Chiralität der Schwimmtrajektorie nachgewiesen werden. Zusätzlich soll eine mögliche Induktion der AR durch ZP2 mittels Spermatozoen transgener Mäuse, deren Akrosom durch GFP-Expression grün fluoresziert, nach Kontakt zu ZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads mittels des Digital Holografischen Mikroskops mit integriertem Fluoreszenzmodul analysiert werden. Durch den Nachweis der Induktion der AR nach ZP2 Kontakt, könnten die in dieser Arbeit identifizierten Änderungen der vierdimensionalen Spermatozoenbewegung mit einem für die Induktion der AR essentiellen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erklärt werden (Arnoult et al., 1999). Dabei würde

der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Änderung der Symmetrie und der Schlagfrequenz des Flagellenschlags führen (Carlson et al., 2007; Carlson et al., 2003; Nolan et al., 2004; Okamura et al., 1985; Wennemuth, 2004; Wennemuth et al., 2003b; Wennemuth et al., 2000). Diese Änderung des Flagellenschlags könnte im Zusammenhang mit einer erfolgreichen Penetration der ZP und mit einer damit einhergehenden Fertilisation der Oozyte stehen. Um diese Hypothese zu bestätigen, soll der Ca^{2+} -Einstrom, wie in Vorarbeiten bereits durchgeführt (Wennemuth et al., 2003a), bei Bindung an das ZP2 Protein beladene Bead gemessen werden. Neben der Tatsache, dass ZP2 möglicherweise die AR generell nicht induzieren kann (Gupta, 2015), könnte ein Ausbleiben der AR nach Bindung an die ZP2 beladenen Beads darauf hindeuten, dass das rekombinante Protein möglicherweise nicht aktiv ist. Chakravarty und Kollegen wiesen bereits durch die Verwendung von rekombinanten ZP Glykoproteinen nach, dass die Glykosylierung der ZP Proteine entscheidend für die Induktion der AR ist (Chakravarty et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ZP2 einen Kofaktor wie z.B. ZP3 benötigt, um die AR zu induzieren. Diese Voraussetzung ist durch die Verwendung der nur mit ZP2 Glykoprotein beladenen Sepharosebeads nicht gegeben.

Ein Faktor des extrazellulären Milieus, der die Spermioselektion beeinflusst und die Spermatozoen zur Oozyte navigieren kann ist die Modifikation als Antwort auf Flüssigkeitsstrom (Rheotaxis) (Fair et al., 2019; Kantsler et al., 2014; Miki und Clapham, 2013; Omori und Ishikawa, 2016), sodass in Zukunft der Einfluss der Rotationsbewegung auf die Rheotaxis mittels DHM durch den Vergleich von murinen und humanen Spermatozoen untersucht werden soll. Dafür sollen geschlossene Perfusionskammer verwendet werden. Gleichzeitig soll der Einfluss der Rheotaxis auf die vierdimensionale Bewegung unkapazitierter und kapazitierter Spermatozoen mittels DHM untersucht werden, um Änderungen des Bewegungsmusters zu identifizieren, die entscheidend für das Erreichen der Oozyte sind bzw. um den Vorgang der Spermatozoenselektion im weiblichen Genitaltrakt aufzuklären.

In unterschiedlichen Spezies konnte eine Änderung der Spermatozoenbewegung nach Bindung an die ZP detektiert werden (Katz und Yanagimachi, 1981). Aufgrund dessen soll in Zukunft der Flagellenschlag muriner Spermatozoen während der Bindung an die Oozyte und nicht, wie in dieser Arbeit durchgeführt, in räumlicher Nähe zur Oozyte bzw. zur Kumuluszellschicht mittels DHM untersucht werden. Diese Untersuchung soll neue, grundlegende Erkenntnisse über den Flagellenschlag während des Fertilisationsprozesses liefern.

Literaturverzeichnis

Afzelius, B. (1959). Electron Microscopy of the Sperm Tail - Results Obtained with a New Fixative. *J Biophys Biochem Cy* 5, 269-278.

Allen, M. J., Rudd, R. E., McElfresh, M. W., and Balhorn, R. (2010). Time-dependent measure of a nanoscale force-pulse driven by the axonemal dynein motors in individual live sperm cells. *Nanomedicine* 6, 510-515.

Allison, A. C. und Hartree, E. F. (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil* 21, 501-515.

Alvarez, L., Dai, L., Friedrich, B. M., Kashikar, N. D., Gregor, I., Pascal, R., and Kaupp, U. B. (2012). The rate of change in Ca^{2+} concentration controls sperm chemotaxis. *J Cell Biol* 196, 653-663.

Alvarez, L., Friedrich, B. M., Gompper, G., and Kaupp, U. B. (2014). The computational sperm cell. *Trends Cell Biol* 24, 198-207.

Amanai, M., Brahmajosyula, M., and Perry, A. C. (2006). A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol Reprod* 75, 877-884.

Amann, R. P. und Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5-17.

Arcelay, E., Salicioni, A. M., Wertheimer, E., and Visconti, P. E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *International Journal of Developmental Biology* 52, 463-472.

Armon, L., Ben-Ami, I., Ron-El, R., and Eisenbach, M. (2014). Human oocyte-derived sperm chemoattractant is a hydrophobic molecule associated with a carrier protein. *Fertil Steril* 102, 885-890.

Armon, L. und Eisenbach, M. (2011). Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. *PLoS One* 6, e28359.

Arndt, L., Castonguay, J., Arlt, E., Meyer, D., Hassan, S., Borth, H., Zierler, S., Wennemuth, G., Breit, A., Biel, M., *et al.* (2014). NAADP and the two-pore channel protein 1 participate in the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Mol Biol Cell* 25, 948-964.

Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M., and Florman, H. M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *P Natl Acad Sci USA* 96, 6757-6762.

Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., *et al.* (2017a). Embryologie- Grundlagen. In *Duale Reihe Anatomie* (Thieme).

Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., *et al.* (2017b). Männliches Genital. In *Duale Reihe Anatomie* (Thieme).

Austin, C. R. (1951). Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. *Aust J Sci Res Ser B* 4, 581-596.

Avella, M. A., Baibakov, B., and Dean, J. (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *Journal of Cell Biology* 205, 801-809.

Avella, M. A., Baibakov, B. A., Jimenez-Movilla, M., Sadusky, A. B., and Dean, J. (2016). ZP2 peptide beads select human sperm in vitro, decoy mouse sperm in vivo, and provide reversible contraception. *Science Translational Medicine* 8.

Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Sinith, L. L. H., Kahrizi, K., Najmabadi, H., and Smith, R. J. H. (2009). Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *American Journal of Human Genetics* 84, 505-510.

Awata, J., Song, K., Lin, J., King, S. M., Sanderson, M. J., Nicastro, D., and Witman, G. B. (2015). DRC3 connects the N-DRC to dynein g to regulate flagellar waveform. *Mol Biol Cell* 26, 2788-2800.

Babcock, D. F., Rufo, G. A., and Lardy, H. A. (1983). Potassium-Dependent Increases in Cytosolic Ph Stimulate Metabolism and Motility of Mammalian Sperm. *P Natl Acad Sci-Biol* 80, 1327-1331.

Babcock, D. F., Wandernoth, P. M., and Wennemuth, G. (2014). Episodic rolling and transient attachments create diversity in sperm swimming behavior. *BMC Biol* 12, 67.

Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L. C., Breitbart, H., and Eisenbach, M. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med* 9, 149-150.

Baibakov, B., Boggs, N. A., Yauger, B., Baibakov, G., and Dean, J. (2012). Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J Cell Biol* 197, 897-905.

Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T. L., and Dean, J. (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 134, 933-943.

Bailey, E., Fenning, N., Chamberlain, S., Devlin, L., Hopkisson, J., and Tomlinson, M. (2007). Validation of sperm counting methods using limits of agreement. *J Androl* 28, 364-373.

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

- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M., and Forti, G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* 5, E110-123.
- Bauskin, A. R., Franken, D. R., Eberspaecher, U., and Donner, P. (1999). Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Molecular Human Reproduction* 5, 534-540.
- Bedford, J. M. (1977). Sperm-Egg Interaction - Specificity of Human Spermatozoa. *Anat Record* 188, 477-483.
- Beebe, S. J., Leyton, L., Burks, D., Ishikawa, M., Fuerst, T., Dean, J., and Saling, P. (1992). Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Dev Biol* 151, 48-54.
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Schultheis, P. J., Miller, M. L., Evans, R. L., Vorhees, C. V., Shull, G. E., and Scott, W. J. (1999). Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol-Cell Ph* 276, C788-C795.
- Bertrand, E., Vandenberg, M., and Englert, Y. (1995). Does Zona-Pellucida Thickness Influence the Fertilization Rate. *Human Reproduction* 10, 1189-1193.
- Bessen, M., Fay, R. B., and Witman, G. B. (1980). Calcium control of waveform in isolated flagellar axonemes of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 86, 446-455.
- Bhakta, H. H., Refai, F. H., and Avella, M. A. (2019). The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development* 146.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., and Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483-487.
- Bianchi, E. und Wright, G. J. (2014). Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle* 13, 2019-2020.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bjorkgren, I., Alvarez, L., Blank, N., Balbach, M., Turunen, H., Laajala, T. D., Toivanen, J., Krutskikh, A., Wahlberg, N., Huhtaniemi, I., *et al.* (2016). Targeted inactivation of the mouse epididymal beta-defensin 41 alters sperm flagellar beat pattern and zona pellucida binding. *Molecular and Cellular Endocrinology* 427, 143-154.
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R., and Alexander, N. (1990). Progesterone and 17-Alpha-Hydroxyprogesterone - Novel Stimulators of Calcium Influx in Human-Sperm. *Journal of Biological Chemistry* 265, 1376-1380.
- Bleil, J. D., Beall, C. F., and Wassarman, P. M. (1981). Mammalian Sperm-Egg Interaction - Fertilization of Mouse Eggs Triggers Modification of the Major Zona Pellucida Glycoprotein, Zp2. *Developmental Biology* 86, 189-197.

Bleil, J. D., Greve, J. M., and Wassarman, P. M. (1988). Identification of a Secondary Sperm Receptor in the Mouse Egg Zona Pellucida - Role in Maintenance of Binding of Acrosome-Reacted Sperm to Eggs. *Developmental Biology* 128, 376-385.

Bleil, J. D. und Wassarman, P. M. (1980a). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20, 873-882.

Bleil, J. D. und Wassarman, P. M. (1980b). Structure and Function of the Zona Pellucida - Identification and Characterization of the Proteins of the Mouse Oocytes Zona Pellucida. *Developmental Biology* 76, 185-202.

Bleil, J. D. und Wassarman, P. M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 95, 317-324.

Bleil, J. D. und Wassarman, P. M. (1990). Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5563-5567.

Bohmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., and Kaupp, U. B. (2005). Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *EMBO J* 24, 2741-2752.

Boja, E. S., Hoodbhoy, T., Fales, H. M., and Dean, J. (2003). Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 278, 34189-34202.

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.

Borg, C. L., Wolski, K. M., Gibbs, G. M., and O'Bryan, M. K. (2010). Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum Reprod Update* 16, 205-224.

Boryshpolets, S., Perez-Cerezales, S., and Eisenbach, M. (2015). Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Hum Reprod* 30, 884-892.

Breed, W. G. (2004). The spermatozoon of Eurasian murine rodents: Its morphological diversity and evolution. *J Morphol* 261, 52-69.

Breed, W. G. und Yong, H. S. (1986). Sperm morphology of murid rodents from Malaysia and its possible phylogenetic significance. In *American Museum Novitates*.

Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krahling, M., Muller, A., Kaupp, U. B., and Strunker, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J* 31, 1654-1665.

Brenker, C., Zhou, Y., Muller, A., Echeverry, F. A., Trotschel, C., Poetsch, A., Xia, X. M., Bonigk, W., Lingle, C. J., Kaupp, U. B., *et al.* (2014). The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* 3, e01438.

Brokaw, C. J. (1966). Effects of increased viscosity on the movements of some invertebrate spermatozoa. *J Exp Biol* 45, 113-139.

Brokaw, C. J. (1967). Adenosine Triphosphate Usage by Flagella. *Science* 156, 76-78.

Brokaw, C. J. (1975). Effects of viscosity and ATP concentration on the movement of reactivated sea-urchin sperm flagella. *J Exp Biol* 62, 701-719.

Brokaw, C. J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol* 82, 401-411.

Brokaw, C. J. (1987). Regulation of Sperm Flagellar Motility by Calcium and Camp-Dependent Phosphorylation. *J Cell Biochem* 35, 175-184.

Brokaw, C. J. (2009). Thinking about flagellar oscillation. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 425-436.

Brokaw, C. J. (2014). Computer simulation of flagellar movement X: doublet pair splitting and bend propagation modeled using stochastic dynein kinetics. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71, 273-284.

Brokaw, C. J. und Kamiya, R. (1987). Bending Patterns of Chlamydomonas Flagella .4. Mutants with Defects in Inner and Outer Dynein Arms Indicate Differences in Dynein Arm Function. *Cell Motil Cytoskel* 8, 68-75.

Bruckert, E. (1991). How Frequent Is Unintentional Childlessness in Germany. *Andrologia* 23, 245-250.

Bukatin, A., Kukhtevich, I., Stoop, N., Dunkel, J., and Kantsler, V. (2015). Bimodal rheotactic behavior reflects flagellar beat asymmetry in human sperm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 15904-15909.

Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jimenez-Movilla, M., and Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Journal of Cell Biology* 197, 37-44.

Burkman, L. J. (1991). Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril* 55, 363-371.

Caballero-Campo, P., Chirinos, M., Fan, X. J., Gonzalez-Gonzalez, M. E., Galicia-Chavarria, M., Larrea, F., and Gerton, G. L. (2006). Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod* 74, 760-768.

Carlson, A. E., Burnett, L. A., del Camino, D., Quill, T. A., Hille, B., Chong, J. A., Moran, M. M., and Babcock, D. F. (2009). Pharmacological targeting of native

CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One* 4, e6844.

Carlson, A. E., Hille, B., and Babcock, D. F. (2007). External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Developmental Biology* 312, 183-192.

Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L., and Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14864-14868.

Carr, D. W. und Acott, T. S. (1989). Intracellular Ph Regulates Bovine Sperm Motility and Protein-Phosphorylation. *Biology of Reproduction* 41, 907-920.

Centola, G. M., Blanchard, A., Demick, J., Li, S., and Eisenberg, M. L. (2016). Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. sperm bank. *Andrology* 4, 270-276.

Chaconas, G. und van de Sande, J. H. (1980). 5'-³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* 65, 75-85.

Chakravarty, S., Kadunganattil, S., Bansal, P., Sharma, R. K., and Gupta, S. K. (2008). Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Molecular Reproduction and Development* 75, 75-88.

Chakravarty, S., Suraj, K., and Gupta, S. K. (2005). Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Molecular Human Reproduction* 11, 365-372.

Chan, P. J., Corselli, J. U., Patton, W. C., Jacobson, J. D., and King, A. (1998). Heat-induced hyperactivation. *J Assist Reprod Gen* 15, 32-38.

Chang, H., Kim, B. J., Kim, Y. S., Suarez, S. S., and Wu, M. (2013). Different migration patterns of sea urchin and mouse sperm revealed by a microfluidic chemotaxis device. *PLoS One* 8, e60587.

Chang, H. und Suarez, S. S. (2012). Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 86, 140, 141-148.

Chang, M. C. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* 168, 697-698.

Chapeau, C. und Gagnon, C. (1987). Nitrocellulose and polyvinyl coatings prevent sperm adhesion to glass without affecting the motility of intact and demembrated human spermatozoa. *J Androl* 8, 34-40.

Chavez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega Beltran, J. L., Trevino, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., and Santi, C. M. (2014). SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem* 289, 32266-32275.

Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625-628.

Chiu, P. C., Wong, B. S., Lee, C. L., Lam, K. K., Chung, M. K., Lee, K. F., Koistinen, R., Koistinen, H., Gupta, S. K., Seppala, M., *et al.* (2010). Zona pellucida-induced acrosome reaction in human spermatozoa is potentiated by glycodelin-A via down-regulation of extracellular signal-regulated kinases and up-regulation of zona pellucida-induced calcium influx. *Hum Reprod* 25, 2721-2733.

Chung, J. J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2, 153.

Chung, J. J., Shim, S. H., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X., and Clapham, D. E. (2014). Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell* 157, 808-822.

Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., and Eisenbach, M. (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11039-11043.

Colomb, T., Jourdain, P., Marquet, P., Magistretti, P., and Depeursinge, C. (2007). Enhancing the performance of digital holographic microscopy.

Colomb, T., Pavillon, N., Kuhn, J., Cuche, E., Depeursinge, C., and Emery, Y. (2010). Extended depth-of-focus by digital holographic microscopy. *Opt Lett* 35, 1840-1842.

Cooper, T. G. (1984). The Onset and Maintenance of Hyperactivated Motility of Spermatozoa from the Mouse. *Gamete Res* 9, 55-74.

Coppola, G., Di Caprio, G., Wilding, M., Ferraro, P., Esposito, G., Di Matteo, L., Dale, R., Coppola, G., and Dale, B. (2014). Digital holographic microscopy for the evaluation of human sperm structure. *Zygote* 22, 446-454.

Cosson, J. und Prokopchuk, G. (2014). Wave propagation in flagella. In *Wave propagation*, pp. 514-583.

Crha, I., Zakova, J., Huser, M., Ventruba, P., Lousova, E., and Pohanka, M. (2011). Digital holographic microscopy in human sperm imaging. *J Assist Reprod Genet* 28, 725-729.

Crozet, N. und Dumont, M. (1984). The Site of the Acrosome Reaction during In vivo Penetration of the Sheep Oocyte. *Gamete Res* 10, 97-105.

Cuche, E., Bevilacqua, F., and Depeursinge, C. (1999a). Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Opt Lett* 24, 291-293.

- Cuche, E., Marquet, P., and Depeursinge, C. (1999b). Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl Opt* 38, 6994-7001.
- Dai, C., Hu, L., Gong, F., Tan, Y. Q., Cai, S. F., Zhang, S. P., Dai, J., Lu, C. F., Chen, J., Chen, Y. Z., *et al.* (2019). ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility. *Genet Med* 21, 431-440.
- Daloglu, M. U., Luo, W., Shabbir, F., Lin, F., Kim, K., Lee, I., Jiang, J. Q., Cai, W. J., Ramesh, V., Yu, M. Y., *et al.* (2018). Label-free 3D computational imaging of spermatozoon locomotion, head spin and flagellum beating over a large volume. *Light Sci Appl* 7, 17121.
- Dan, J. C. (1952). Studies on the Acrosome .1. Reaction to Egg Water and Other Stimuli. *Biol Bull-U.S.* 103, 54-66.
- Davis, R. und Siemers, R. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 857-869.
- De Geyter, C., De Geyter, M., Koppers, B., and Nieschlag, E. (1998). Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod* 13, 2512-2520.
- de Lamirande, E. und Gagnon, C. (1993). Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 59, 1291-1295.
- de Lamirande, E., Leclerc, P., and Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-194.
- Dean, J. (1992). Biology of Mammalian Fertilization - Role of the Zona-Pellucida. *Journal of Clinical Investigation* 89, 1055-1059.
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., de la Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A., and Visconti, P. E. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7001-7009.
- Di Caprio, G., Ferrara, M. A., Miccio, L., Merola, F., Memmolo, P., Ferraro, P., and Coppola, G. (2015). Holographic imaging of unlabelled sperm cells for semen analysis: a review. *J Biophotonics* 8, 779-789.
- Di Caprio, G., Gioffre, M. A., Saffioti, N., Grilli, S., Ferraro, P., Puglisi, R., Balduzzi, D., Galli, A., and Coppola, G. (2010). Quantitative Label-Free Animal Sperm Imaging by Means of Digital Holographic Microscopy. *Ieee J Sel Top Quant* 16, 833-840.
- Dott, H. M. und Foster, G. C. (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *J Reprod Fertil* 55, 161-166.

- Drobnis, E. Z. und Katz, D. F. (1990). videomicroscopy of mammalian fertilization. In *The Biology and Chemistry of mammalian fertilization*, Wassarman, P. M., ed. (CRC Press, New York), pp. 269-300.
- Drobnis, E. Z., Yudin, A. I., Cherr, G. N., and Katz, D. F. (1988). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Dev Biol* 130, 311-323.
- Dubey, V., Popova, D., Ahmad, A., Acharya, G., Basnet, P., Mehta, D. S., and Ahluwalia, B. S. (2019). Partially spatially coherent digital holographic microscopy and machine learning for quantitative analysis of human spermatozoa under oxidative stress condition. *Sci Rep* 9, 3564.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., and Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of molecular biology* 96, 171-184.
- Dun, M. D., Mitchell, L. A., Aitken, R. J., and Nixon, B. (2010). Sperm-zona pellucida interaction: molecular mechanisms and the potential for contraceptive intervention. *Handb Exp Pharmacol*, 139-178.
- Ehrenwald, E., Foote, R. H., and Parks, J. E. (1990). Bovine Oviductal Fluid Components and Their Potential Role in Sperm Cholesterol Efflux. *Molecular Reproduction and Development* 25, 195-204.
- Eisenbach, M. (1999). Sperm chemotaxis. *Rev Reprod* 4, 56-66.
- Eisenbach, M. und Giojalas, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 276-285.
- Ekstedt, E., Holm, L., and Ridderstrale, Y. (2004). Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage. *J Mol Histol* 35, 167-173.
- Emery, Y., Aspert, N., and Marquet, F. (2012). Dynamical topography measurements of MEMS up to 25 MHz, through transparent window, and in liquid by digital holographic microscope (DHM). In *AIP Conference Proceedings* 1457, pp. 71-77.
- Emery, Y., Cuhe, E., Marquet, F., Aspert, N., Marquet, P., Kühn, J., Botkine, M., Colomb, T., Montfort, F., and Charrière, F. (2006). Digital holographic microscopy (DHM) for metrology and dynamic characterization of MEMS and MOEMS. Paper presented at: *Mems, Moems, and Micromachining II* (International Society for Optics and Photonics).
- Eshel, D., Shingyoji, C., Yoshimura, K., Gibbons, B. H., Gibbons, I. R., and Takahashi, K. (1990). Transient behavior of sea urchin sperm flagella following an abrupt change in beat frequency. *J Exp Biol* 152, 441-451.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A., Robben, T. J., Strik, A. M., Kuil, C., Philipsen, R. L., van Duin, M., Conti, M., *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, 2993-2998.

European, I. V. F. m. p. f. t. E. S. o. H. R., Embryology, Andersen, A. N., Gianaroli, L., Felberbaum, R., de Mouzon, J., and Nygren, K. G. (2006). Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 21, 1680-1697.

Fair, S., Meade, K., Reynaud, K., Druart, X., and de Graaf, S. P. (2019). The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix. *Reproduction*.

Ferrara, M. A., Di Caprio, G., Manago, S., De Angelis, A., Sirleto, L., Coppola, G., and De Luca, A. C. (2015). Label-Free Imaging and Biochemical Characterization of Bovine Sperm Cells. *Biosensors-Basel* 5, 141-157.

Fetterolf, P. M., Jurisicova, A., Tyson, J. E., and Casper, R. F. (1994). Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biol Reprod* 51, 184-192.

Flaherty, S. und Breed, W. (1982). The structure of the hooks on the sperm head of the plains mouse *Pseudomys australis*. *Micron* (1969) 13, 343-344.

Fleming, A. D. und Yanagimachi, R. (1982). Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 220, 109-115.

Flesch, F. M., Brouwers, J. F. H. M., Nievelstein, P. F. E. M., Verkleij, A. J., van Golde, L. M. G., Colenbrander, B., and Gadella, B. M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science* 114, 3543-3555.

Florman, H. M. (1994). Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 165, 152-164.

Florman, H. M., Corron, M. E., Kim, T. D., and Babcock, D. F. (1992). Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 152, 304-314.

Florman, H. M., Jungnickel, M. K., and Sutton, K. A. (2008). Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 52, 503-510.

Florman, H. M. und Storey, B. T. (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev Biol* 91, 121-130.

Florman, H. M., Tombes, R. M., First, N. L., and Babcock, D. F. (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, 133-146.

Florman, H. M. und Wassarman, P. M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41, 313-324.

Friedrich, B. M., Riedel-Kruse, I. H., Howard, J., and Julicher, F. (2010). High-precision tracking of sperm swimming fine structure provides strong test of resistive force theory. *J Exp Biol* 213, 1226-1234.

Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol* 161, 79-88.

Gabor, D. (1948a). Diffraction Microscopy. *Anal Chem* 20, 992-992.

Gabor, D. (1948b). A new microscopic principle. *Nature* 161, 777.

Gadella, B. M. und Harrison, R. A. P. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407-2420.

Gahlay, G., Gauthier, L., Baibakov, B., Epifano, O., and Dean, J. (2010). Gamete Recognition in Mice Depends on the Cleavage Status of an Egg's Zona Pellucida Protein. *Science* 329, 216-219.

Gakamsky, A., Armon, L., and Eisenbach, M. (2009). Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides. *Hum Reprod* 24, 1152-1163.

Galindo, B. E., Neill, A. T., and Vacquier, V. D. (2005). A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 96-101.

Gallagher, M. T., Smith, D. J., and Kirkman-Brown, J. C. (2018). CASA: tracking the past and plotting the future. *Reprod Fertil Dev* 30, 867-874.

Garbers, D., First, N. L., and Lardy, H. A. (1973). The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Biol Reprod* 8, 589-598.

Garcia-Sucerquia, J., Xu, W., Jericho, S. K., Klages, P., Jericho, M. H., and Kreuzer, H. J. (2006). Digital in-line holographic microscopy. *Appl Opt* 45, 836-850.

Garcia, M. A. und Meizel, S. (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Molecular Reproduction and Development* 52, 189-195.

Garrido, N., Martinez-Conejero, J. A., Jauregui, J., Horcajadas, J. A., Simon, C., Remohi, J., and Meseguer, M. (2009). Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril* 91, 1307-1310.

Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393, 583-587.

- Geyer, V. F., Sartori, P., Friedrich, B. M., Julicher, F., and Howard, J. (2016). Independent Control of the Static and Dynamic Components of the Chlamydomonas Flagellar Beat. *Curr Biol* 26, 1098-1103.
- Gibbons, B. H., Ogawa, K., and Gibbons, I. R. (1976). The effect of antidynein 1 serum on the movement of reactivated sea urchin sperm. *J Cell Biol* 71, 823-831.
- Gibbons, I. R. und Rowe, A. J. (1965). Dynein - a Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 149, 424-426.
- Gibbons, I. R., Shingyoji, C., Murakami, A., and Takahashi, K. (1987). Spontaneous recovery after experimental manipulation of the plane of beat in sperm flagella. *Nature* 325, 351-352.
- Giojalas, L. C. und Rovasio, R. A. (1998). Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int J Androl* 21, 201-206.
- Giojalas, L. C., Rovasio, R. A., Fabro, G., Gakamsky, A., and Eisenbach, M. (2004). Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril* 82, 247-249.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Kim, J. W., Machesky, L. M., Rhee, S. G., and Pollard, T. D. (1991). Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231-1233.
- Goodman, J. W. und Lawrence, R. W. (1967). Digital Image Formation from Electronically Detected Holograms. *Appl Phys Lett* 11, 77-79.
- Goodson, S. G., Zhang, Z., Tsuruta, J. K., Wang, W., and O'Brien, D. A. (2011). Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biol Reprod* 84, 1207-1215.
- Gordon, A. H., Keil, B., and Sebesta, K. (1949). Electrophoresis of proteins in agar jelly. *Nature* 164, 498.
- Gottardo, F. und Prof. Dr. Kliesch, S. (2011). Ejakulatdiagnostik- Spermogramm nach WHO-Kriterien 2010. In *Der Urologe* (Springer Verlag).
- Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I., and Monget, P. (2008). Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biology of Reproduction* 78, 796-806.
- Gower, J. C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40, 33-51.
- Green, D. P. (1987). Mammalian sperm cannot penetrate the zona pellucida solely by force. *Exp Cell Res* 169, 31-38.
- Green, D. P. (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod* 2, 147-156.

- Greenhouse, S., Castle, P. E., and Dean, J. (1999). Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucidae. *Human Reproduction* 14, 593-600.
- Guerrero, A., Carneiro, J., Pimentel, A., Wood, C. D., Corkidi, G., and Darszon, A. (2011). Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *Mol Hum Reprod* 17, 511-523.
- Gunaratne, H. J., Nomura, M., Moy, G. W., and Vacquier, V. D. (2006). A sodium bicarbonate transporter from sea urchin spermatozoa. *Gene* 375, 37-43.
- Gupta, S. K. (2015). Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol* 108, 90-97.
- Gupta, S. K. und Bhandari, B. (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology* 13, 97-105.
- Haifler, M., Girshovitz, P., Band, G., Dardikman, G., Madjar, I., and Shaked, N. T. (2015). Interferometric phase microscopy for label-free morphological evaluation of sperm cells. *Fertil Steril* 104, 43-47 e42.
- Halliday, D., Resneck, R., and Walker, J. (2009a). Interferenz. In Halliday Physik, Auflage, ed. (WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA), pp. 1068-1089.
- Halliday, D., Resneck, R., and Walker, J. (2009b). Wellen. In Halliday Physik, Auflage, ed. (WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA), pp. 486-509.
- Hamano, K., Kawanishi, T., Mizuno, A., Suzuki, M., and Takagi, Y. (2016). Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 4 in mouse sperm thermotaxis. *J Reprod Dev* 62, 415-422.
- Harrison, R. A. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 67, 337-352.
- Harrison, R. A. und Miller, N. G. (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55, 220-228.
- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., *et al.* (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9, 249-259.
- Heuser, T., Barber, C. F., Lin, J., Krell, J., Rebesco, M., Porter, M. E., and Nicastro, D. (2012a). Cryoelectron tomography reveals doublet-specific structures and unique interactions in the I1 dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2067-2076.
- Heuser, T., Dymek, E. E., Lin, J., Smith, E. F., and Nicastro, D. (2012b). The CSC connects three major axonemal complexes involved in dynein regulation. *Mol Biol Cell* 23, 3143-3155.

Hildebrand, M. S., Avenarius, M. R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N. C., Auer, J., Serres, C., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Beckmann, J. S., *et al.* (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 18, 1178-1184.

Hino, T., Muro, Y., Tamura-Nakano, M., Okabe, M., Tateno, H., and Yanagimachi, R. (2016). The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating. *Biol Reprod* 95, 50.

Hiramoto, Y. und Baba, S. A. (1978). A Quantitative Analysis of Flagellar Movement in Echinoderm Spermatozoa. *The Journal of Experimental Biology* 76, 85-104.

Hiramoto, Y., Hamaguchi, Y., Shoji, Y., Schroeder, T. E., Shimoda, S., and Nakamura, S. (1981). Quantitative studies on the polarization optical properties of living cells II. The role of microtubules in birefringence of the spindle of the sea urchin egg. *J Cell Biol* 89, 121-130.

Ho, H. C., Granish, K. A., and Suarez, S. S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental Biology* 250, 208-217.

Ho, K., Wolff, C. A., and Suarez, S. S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev* 21, 345-350.

Holstein, A. F. und Roosen-Runge, E. C. (1981). Atlas of Human Spermatogenesis. In (Grosse Verlag), p. 224.

Holt, W. V., Moore, H. D., and Hillier, S. G. (1985). Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil Steril* 44, 112-119.

Hong, S. J., Chiu, P. C., Lee, K. F., Tse, J. M., Ho, P. C., and Yeung, W. S. (2004). Establishment of a capillary-cumulus model to study the selection of sperm for fertilization by the cumulus oophorus. *Hum Reprod* 19, 1562-1569.

Hoodbhoy, T., Aviles, M., Baibakov, B., Epifano, O., Jimenez-Movilla, M., Gauthier, L., and Dean, J. (2006). ZP2 and ZP3 traffic independently within oocytes prior to assembly into the extracellular zona pellucida. *Molecular and Cellular Biology* 26, 7991-7998.

Huang, H. L., Lv, C., Zhao, Y. C., Li, W., He, X. M., Li, P., Sha, A. G., Tian, X., Papasian, C. J., Deng, H. W., *et al.* (2014). Mutant ZP1 in Familial Infertility. *New Engl J Med* 370, 1220-1226.

Inaba, K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod* 17, 524-538.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.

Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20008-20011.

Ishijima, S. (2011). Dynamics of flagellar force generated by a hyperactivated spermatozoon. *Reproduction* *142*, 409-415.

Ishijima, S. (2016). Self-Sustained Oscillatory Sliding Movement of Doublet Microtubules and Flagellar Bend Formation. *PLoS One* *11*, e0148880.

Ishijima, S., Hamaguchi, M. S., Naruse, M., Ishijima, S. A., and Hamaguchi, Y. (1992). Rotational movement of a spermatozoon around its long axis. *J Exp Biol* *163*, 15-31.

Ishijima, S. und Hamaguchi, Y. (1992). Relationship between direction of rolling and yawing of golden hamster and sea urchin spermatozoa. *Cell Struct Funct* *17*, 319-323.

Ishijima, S., Oshio, S., and Mohri, H. (1986). Flagellar movement of human spermatozoa. *Gamete Res* *13*, 185-197.

Ishikawa, Y., Usui, T., Yamashita, M., Kanemori, Y., and Baba, T. (2016). Surfing and Swimming of Ejaculated Sperm in the Mouse Oviduct. *Biol Reprod* *94*, 89.

Ishimoto, K. und Gaffney, E. A. (2016). Mechanical tuning of mammalian sperm behaviour by hyperactivation, rheology and substrate adhesion: a numerical exploration. *J R Soc Interface* *13*.

Jaiswal, B. S. und Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10676-10681.

Jaiswal, B. S. und Eisenbach, M. (2002). Capacitation. In *Fertilization*, Hardy, D. M., ed. (Academic Press, San Diego), pp. 57-117.

Jennings, H. S. (1901). On the significance of the spiral swimming of organisms. *American Naturalist* *35*, 369-378.

Jensen, T. K., Sobotka, T., Hansen, M. A., Pedersen, A. T., Lutz, W., and Skakkebaek, N. E. (2008). Declining trends in conception rates in recent birth cohorts of native Danish women: a possible role of deteriorating male reproductive health. *Int J Androl* *31*, 81-92.

Jeon, B.-G., Moon, J.-S., Kim, K.-C., Lee, H.-J., Choe, S.-Y., and Rho, G.-J. (2001). Andrology: Follicular fluid enhances sperm attraction and its motility in human. *J Assist Reprod Gen* *18*, 407-412.

Jha, K. N. und Shivaji, S. (2002). Protein serine and threonine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in in vitro capacitated hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* *63*, 119-130.

Jikeli, J. F., Alvarez, L., Friedrich, B. M., Wilson, L. G., Pascal, R., Colin, R., Pichlo, M., Rennhack, A., Brenker, C., and Kaupp, U. B. (2015). Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes. *Nat Commun* 6, 7985.

Jimenez-Movilla, M. und Dean, J. (2011). ZP2 and ZP3 cytoplasmic tails prevent premature interactions and ensure incorporation into the zona pellucida. *Journal of Cell Science* 124, 940-950.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4892-4896.

Jones, R., James, P. S., Howes, L., Bruckbauer, A., and Klenerman, D. (2007). Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian Journal of Andrology* 9, 438-444.

Jorgensen, N., Joensen, U. N., Jensen, T. K., Jensen, M. B., Almstrup, K., Olesen, I. A., Juul, A., Andersson, A. M., Carlsen, E., Petersen, J. H., *et al.* (2012). Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* 2.

Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S., and Wassarman, P. M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* 74, 83-114.

Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., and Kudo, A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet* 24, 279-282.

Kantsler, V., Dunkel, J., Blayney, M., and Goldstein, R. E. (2014). Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife* 3, e02403.

Katz, D. F. und Blake, J. R. (1975). Flagellar motions near walls. In *Swimming and Flying in Nature I*, Wu, T. Y., Brokaw, C. J., and Brennen, C., eds. (Plenum Press, New York), pp. 173-184.

Katz, D. F., Drobnis, E. Z., Baltz, J., Cherr, G. N., Yudin, A. I., Cone, R. A., and Cheng, L. Y. (1987). The biophysics of sperm penetration of the cumulus and zona pellucida. In *New Horizons in Sperm Cell Research*, Mohri, H., ed. (Japan Scientific Societies Press, Tokyo), pp. 275-285.

Katz, D. F., Drobnis, E. Z., and Overstreet, J. W. (1989). Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res* 22, 443-469.

Katz, D. F. und Yanagimachi, R. (1981). Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod* 25, 785-791.

Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J. E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., and Weyand, I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol* 5, 109-117.

Kaupp, U. B. und Strunker, T. (2017). Signaling in Sperm: More Different than Similar. *Trends Cell Biol* 27, 101-109.

Kiefer, S. M. und Saling, P. (2002). Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biology of Reproduction* 66, 407-414.

Kirichok, Y. und Lishko, P. V. (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Molecular Human Reproduction* 17, 478-499.

Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 439, 737-740.

Klingenberg, C. P. (2016). Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Dev Genes Evol* 226, 113-137.

Köhler, G. und Mielstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Vol 256 (*Nature*), 495-497.

Kopelman, H., Corey, M., Gaskin, K., Durie, P., Weizman, Z., and Forstner, G. (1988). Impaired Chloride Secretion, as Well as Bicarbonate Secretion, Underlies the Fluid Secretory Defect in the Cystic-Fibrosis Pancreas. *Gastroenterology* 95, 349-355.

Krause, W., Weidner, W., and et al. (2011). Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane In *Andrologie* (Thieme).

Krisp, A. und Krause, W. (2002). Das Sertoli-cell-only-Syndrom (Germinalzellaplasie) als Ursache männlicher Infertilität. *Reproduktionsmedizin* 18, 101-104.

Kronrod, M. A., Merzlyakov, N. S., and Yaroslavskii, L. P. (1972). Reconstruction of a hologram with a computer. *Sov Phys Tech* 17, 333-334.

Kupka, M. S., Ferraretti, A. P., de Mouzon, J., Erb, K., D'Hooghe, T., Castilla, J. A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Goossens, V., European Ivf-Monitoring Consortium, f. t. E. S. o. H. R., et al. (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 29, 2099-2113.

Kushner, S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids in Genetic Engineering. In *Genetic Engineering*, Boyer, H. B., and Nicosia, S., ed. (Elsevier), pp. 17-23.

Kuzan, F. B., Fleming, A. D., and Seidel, G. E., Jr. (1984). Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil Steril* 41, 766-770.

La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N., and Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol* 411, 172-182.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319-321.
- Leach, R. (2011). *Optical Measurement of Surface Topography* (Springer, Berlin, Heidelberg).
- Lee, H. C. (1984). A membrane potential-sensitive Na⁺-H⁺ exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *J Biol Chem* 259, 15315-15319.
- Lee, H. C. und Garbers, D. L. (1986). Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J Biol Chem* 261, 16026-16032.
- Lee, H. C., Johnson, C., and Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev Biol* 95, 31-45.
- Lefievre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., *et al.* (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* 19, 1580-1586.
- Lesich, K. A., de Pinho, T. G., Dang, L., and Lindemann, C. B. (2014). Ultrastructural evidence that motility changes caused by variations in ATP, Mg²⁺, and ADP correlate to conformational changes in reactivated bull sperm axonemes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71, 649-661.
- Lesich, K. A., Pelle, D. W., and Lindemann, C. B. (2008). Insights into the mechanism of ADP action on flagellar motility derived from studies on bull sperm. *Biophys J* 95, 472-482.
- Li, H., Hung, P. H., and Suarez, S. S. (2015). Ejaculated mouse sperm enter cumulus-oocyte complexes more efficiently in vitro than epididymal sperm. *PLoS One* 10, e0127753.
- Liang, L. F., Chamow, S. M., and Dean, J. (1990). Oocyte-Specific Expression of Mouse Zp-2 - Developmental Regulation of the Zona-Pellucida Genes. *Molecular and Cellular Biology* 10, 1507-1515.
- Lighthill, J. (1976). *Flagellar Hydrodynamics - Neumann, Jv Lecture, 1975. Siam Rev* 18, 161-230.
- Lindemann, C. B. (1996). Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton* 34, 258-270.
- Lindemann, C. B. und Goltz, J. S. (1988). Calcium Regulation of Flagellar Curvature and Swimming Pattern in Triton X-100 Extracted Rat Sperm. *Cell Motil Cytoskel* 10, 420-431.

Lindemann, C. B., Goltz, J. S., and Kanous, K. S. (1987). Regulation of Activation State and Flagellar Wave Form in Epididymal Rat Sperm - Evidence for the Involvement of Both Ca²⁺ and Camp. *Cell Motil Cytoskel* 8, 324-332.

Lindemann, C. B. und Lesich, K. A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* 123, 519-528.

Lindemann, C. B. und Lesich, K. A. (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 652-669.

Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A., and Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140, 327-337.

Lishko, P. V., Botchkina, I. L., and Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471, 387-91.

Lishko, P. V. und Kirichok, Y. (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 588, 4667-4672.

Litvin, T. N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., and Levin, L. R. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 278, 15922-15926.

Liu, C. Y., Litscher, E. S., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R. A., Stewart, C. L., and Wassarman, P. M. (1996). Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *P Natl Acad Sci USA* 93, 5431-5436.

Liu, W. Q., Li, K. M., Bai, D. D., Yin, J. Q., Tang, Y. Y., Chi, F. L., Zhang, L. F., Wang, Y., Pan, J. P., Liang, S. S., *et al.* (2017). Dosage effects of ZP2 and ZP3 heterozygous mutations cause human infertility. *Hum Genet* 136, 975-985.

Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.

Luconi, M., Forti, G., and Baldi, E. (2006). Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci* 11, 1433.

Luk, A. S., Kaler, E. W., and Lee, S. P. (1993). Phospholipase C-induced aggregation and fusion of cholesterol-lecithin small unilamellar vesicles. *Biochemistry* 32, 6965-6973.

Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2 edn (Cold Spring Harbor).

Mannowetz, N., Naidoo, N. M., Choo, S. A., Smith, J. F., and Lishko, P. V. (2013). Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife* 2, e01009.

Mannowetz, N., Wandernoth, P., Hornung, J., Ruffing, U., Raubuch, M., and Wennemuth, G. (2011). Early activation of sperm by HCO₃⁻ is regulated hormonally in the murine uterus. *Int J Androl* *34*, 153-164.

Marquet, P., Rappaz, B., Magistretti, P. J., Cuche, E., Emery, Y., Colomb, T., and Depeursinge, C. (2005). Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Opt Lett* *30*, 468-470.

Marquez, B. und Suarez, S. S. (2007). Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biology of Reproduction* *76*, 660-665.

Masuda, H. (1995). Reproductive physiology in male. In *Textbook of Theriogenology*, Mori, J., Kanagawa, H., and Hamana, K., eds. (Bunido, Tokyo), pp. 119-130.

McLernon, D. J., Steyerberg, E. W., Te Velde, E. R., Lee, A. J., and Bhattacharya, S. (2016). Predicting the chances of a live birth after one or more complete cycles of in vitro fertilisation: population based study of linked cycle data from 113 873 women. *BMJ* *355*, i5735.

Meistrich, M. L. (2013). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril* *100*, 1180-1186.

Merola, F., Miccio, L., Memmolo, P., Di Caprio, G., Galli, A., Puglisi, R., Balduzzi, D., Coppola, G., Netti, P., and Ferraro, P. (2013). Digital holography as a method for 3D imaging and estimating the biovolume of motile cells. *Lab Chip* *13*, 4512-4516.

Mico, V., Zalevsky, Z., Ferreira, C., and Garcia, J. (2008). Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples. *Opt Express* *16*, 19260-19270.

Miki, K. und Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol* *23*, 443-452.

Miller, M. R., Kenny, S. J., Mannowetz, N., Mansell, S. A., Wojcik, M., Mendoza, S., Zucker, R. S., Xu, K., and Lishko, P. V. (2018). Asymmetrically Positioned Flagellar Control Units Regulate Human Sperm Rotation. *Cell Rep* *24*, 2606-2613.

Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., and Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* *352*, 555-559.

Mirsky, S., Barnea, I., and Shaked, N. (2016). Label-Free quantitative imaging of sperm for in vitro fertilization using interferometric phase microscopy. *J Fertil In Vitro-IVF-Worldwide Reprod Med Genet Stem Cell Biol* *190*.

Mitteroecker, P., Gunz, P., Windhager, S., and Schaefer, K. (2013). A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix* *24*, 59-66.

Miwa, N. (2015). Protein-Carbohydrate Interaction between Sperm and the Egg-Coating Envelope and Its Regulation by Dicalcin, a *Xenopus laevis* Zona Pellucida Protein-Associated Protein. *Molecules* 20, 9468-9486.

Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., *et al.* (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287, 321-324.

Molina, L. C. P., Pinto, N. A., Torres, N. I., Gonzalez-Cota, A. L., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Romarowski, A., Krapf, D., Santi, C. M., Trevino, C. L., *et al.* (2018). CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *Journal of Biological Chemistry* 293, 9924-9936.

Moller, C. C. und Wassarman, P. M. (1989). Characterization of a Proteinase That Cleaves Zona Pellucida Glycoprotein-Zp2 Following Activation of Mouse Eggs. *Developmental Biology* 132, 103-112.

Mondal, M. A., Takagi, Y., Baba, S. A., and Hamano, K. I. (2017). Involvement of calcium channels and intracellular calcium in bull sperm thermotaxis. *J Reprod Dev* 63, 143-148.

Monne, M. und Jovine, L. (2011). A Structural View of Egg Coat Architecture and Function in Fertilization. *Biology of Reproduction* 85, 661-669.

Mortimer, D. und Mortimer, S. T. (1988). Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. *Hum Reprod* 3, 621-625.

Mortimer, S. T. (2000). CASA-practical aspects. *J Androl* 21, 515-524.

Mortimer, S. T. und Mortimer, D. (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 11, 195-203.

Mortimer, S. T., van der Horst, G., and Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl* 17, 545-553.

Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R., and Okabe, M. (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biology of Reproduction* 94.

Muschol, M., Wenders, C., and Wennemuth, G. (2018). Four-dimensional analysis by high-speed holographic imaging reveals a chiral memory of sperm flagella. *PLoS One* 13, e0199678.

Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J. J., and Clapham, D. E. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology* 52, 607-613.

Navarro, B., Kirichok, Y., and Clapham, D. E. (2007). KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7688-7692.

Nieschlag, E., Behre, H., and Nieschlag, S. (2010). Male Reproductive Health and Dysfunction. In *Andrology* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

Nishigaki, T., Jose, O., Gonzalez-Cota, A. L., Romero, F., Trevino, C. L., and Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 1149-1158.

Nishigaki, T., Zamudio, F. Z., Possani, L. D., and Darszon, A. (2001). Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 531-535.

Nolan, M. A., Babcock, D. F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K. A., and McKnight, G. S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13483-13488.

Nomura, M. und Vacquier, V. D. (2006). Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 582-590.

Nosrati, R., Driouchi, A., Yip, C. M., and Sinton, D. (2015). Two-dimensional slither swimming of sperm within a micrometre of a surface. *Nat Commun* 6, 8703.

Nosrati, R., Graham, P. J., Liu, Q., and Sinton, D. (2016). Predominance of sperm motion in corners. *Sci Rep* 6, 26669.

Nudell, D. M., Monoski, M. M., and Lipshultz, L. I. (2002). Common medications and drugs: how they affect male fertility. *Urol Clin N Am* 29, 965-+ 973.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 260, 9699-9705.

Okuno, M., Ogawa, K., and Mohri, H. (1976). Inhibition of Movement and Atpase Activity of Demembrated Sea-Urchin Spermatozoa by Anti-Dynein Antiserum. *Biochem Biophys Res Commun* 68, 901-906.

Olds-Clarke, P. (1985). Motility characteristics of hyperactivated mouse sperm. *J Androl* 6, 130.

Oliveira, R. G., Tomasi, L., Rovasio, R. A., and Giojalas, L. C. (1999). Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil* 115, 23-27.

Omori, T. und Ishikawa, T. (2016). Upward swimming of a sperm cell in shear flow. *Phys Rev E* 93, 032402.

Ounjai, P., Kim, K. D., Lishko, P. V., and Downing, K. H. (2012). Three-dimensional structure of the bovine sperm connecting piece revealed by electron cryotomography. *Biol Reprod* 87, 73.

Pan, F., Liu, S., Wang, Z., Shang, P., and Xiao, W. (2012). Digital holographic microscopy long-term and real-time monitoring of cell division and changes under simulated zero gravity. *Opt Express* 20, 11496-11505.

Parkkila, S., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., and Rajaniemi, H. (1991). A High-Activity Carbonic-Anhydrase Isoenzyme (Ca-li) Is Present in Mammalian Spermatozoa. *Histochemistry* 95, 477-482.

Parrish, J. J., Suskoparrish, J. L., and First, N. L. (1989). Capacitation of Bovine Sperm by Heparin - Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular Ph. *Biology of Reproduction* 41, 683-699.

Perez-Cerezales, S., Lopez-Cardona, A. P., and Gutierrez-Adan, A. (2016). Progesterone effects on mouse sperm kinetics in conditions of viscosity. *Reproduction* 151, 501-507.

Phillips, D. M. (1972). Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J Cell Biol* 53, 561-573.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.

Pouly, J. L. (2014). [In vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection]. *Rev Prat* 64, 92-96.

Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marin-Briggiler, C. I., Romarowski, A., and Buffone, M. G. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front Cell Dev Biol* 6, 72.

Quesada, C., Sanchez, L. M., Alvarez, J., and Lopez-Otin, C. (2004). Identification and characterization of human and mouse ovastacin - A novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish. *Journal of Biological Chemistry* 279, 26627-26634.

Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., and Garbers, D. L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14869-14874.

Ralt, D., Manor, M., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Ben-Shlomo, I., Makler, A., Yuli, I., Dor, J., Blumberg, S., Mashiach, S., *et al.* (1994). Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol Reprod* 50, 774-785.

Rankin, T., Familiar, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., BlanchetteMackie, J., Drago, J., Westphal, H., and Dean, J. (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 122, 2903-2910.

Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., and Dean, J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126, 3847-3855.

Rankin, T. L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J., and Dean, J. (2001). Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128, 1119-1126.

Rappaz, B., Marquet, P., Cuche, E., Emery, Y., Depeursinge, C., and Magistretti, P. (2005). Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Opt Express* 13, 9361-9373.

Ravaux, B., Garroum, N., Perez, E., Willaime, H., and Gourier, C. (2016). A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization. *Sci Rep-Uk* 6.

Reddy, M. M. und Quinton, P. M. (2001). Selective activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ and HCO₃⁻ conductances. *JOP* 2, 212-218.

Ren, D. und Xia, J. (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 25, 165-175.

Ren, D. J., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S. F., Shi, Q., Tilly, J. L., and Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.

Revelli, A., Ghigo, D., Moffa, F., Massobrio, M., and Tur-Kaspa, I. (2002). Guanylate cyclase activity and sperm function. *Endocrine Reviews* 23, 484-494.

Rikmenspoel, R. (1965). The tail movement of bull spermatozoa. Observations and model calculations. *Biophys J* 5, 365-392.

Rohlf, F. J. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification* 16, 197-223.

Romero-Otero, J., Medina-Polo, J., Garcia-Gomez, B., Lora-Pablos, D., Duarte-Ojeda, J. M., Garcia-Gonzalez, L., Garcia-Cruz, E., and Rodriguez-Antolin, A. (2015). Semen Quality Assessment in Fertile Men in Madrid During the Last 3 Decades. *Urology* 85, 1333-1338.

Romero, M. F. und Boron, W. F. (1999). Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 699-723.

Rossato, M., Nogara, A., Merico, M., Ferlin, A., Garolla, A., and Foresta, C. (2001). Store-operated calcium influx and stimulation of steroidogenesis in rat Leydig cells: role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Endocrinology* 142, 3865-3872.

Rüsse, I. und Sinowatz, F. (1991). *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere* (Paul Parey).

Salathe, M. (2007). Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol* 69, 401-422.

Saling, P. M., Sowinski, J., and Storey, B. T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool* 209, 229-238.

Sandras, F., Hermerel, C., Choux, A., Mérillot, P., Pin, G., and Jeannot, L. (2009). Characterization of the Microshell Surface Using Holographic Measurements. *Fusion Science and Technology* 55, 389-398.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.

Santi, C. M., Martinez-Lopez, P., de la Vega-Beltran, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., and Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 584, 1041-1046.

Satir, P., Heuser, T., and Sale, W. S. (2014). A Structural Basis for How Motile Cilia Beat. *Bioscience* 64, 1073-1083.

Sauerbrun-Cutler, M. T., Vega, M., Breborowicz, A., Gonzales, E., Stein, D., Lederman, M., and Keltz, M. (2015). Oocyte zona pellucida dysmorphology is associated with diminished in-vitro fertilization success. *J Ovarian Res* 8, 5.

Schiebler, T. H. und Korf, H. W. (2007). Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. In *Anatomie* (Steinkopff-Verlag Heidelberg).

Schnars, U. und Jueptner, W. (2005). Hologram Recording, Numerical Reconstruction, and Related Techniques (Springer, Berlin).

Schnars, U. und Juptner, W. (1994). Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. *Appl Opt* 33, 179-181.

Schuetz, A. W. und Dubin, N. H. (1981). Progesterone and Prostaglandin Secretion by Ovulated Rat Cumulus Cell-Oocyte Complexes. *Endocrinology* 108, 457-463.

Seifert, R., Flick, M., Bonigk, W., Alvarez, L., Trotschel, C., Poetsch, A., Muller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N. D., *et al.* (2015). The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *EMBO J* 34, 379-392.

Serres, C., Escalier, D., and David, G. (1983). Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol Cell* 49, 153-161.

Servin-Vences, M. R., Tatsu, Y., Ando, H., Guerrero, A., Yumoto, N., Darszon, A., and Nishigaki, T. (2012). A caged progesterone analog alters intracellular Ca²⁺ and flagellar bending in human sperm. *Reproduction* 144, 101-109.

Setchell, B., Maddocks, S., and Brooks, D. E. (1994). Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In *The Physiology of reproduction*, Raven Press, L. N. Y., ed. (Kno il, E. u. J. Neill).

Sgaramella, V., Van de Sande, J. H., and Khorana, H. G. (1970). Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1468-1475.

Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A., and Jones, R. (2004). Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 253-265.

Sharlip, I. D., Jarow, J. P., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J., Schlegel, P. N., Howards, S. S., Nehra, A., Damewood, M. D., *et al.* (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility* 77, 873-882.

Siegel, D. P., Banschbach, J., Alford, D., Ellens, H., Lis, L. J., Quinn, P. J., Yeagle, P. L., and Bentz, J. (1989). Physiological levels of diacylglycerols in phospholipid membranes induce membrane fusion and stabilize inverted phases. *Biochemistry* 28, 3703-3709.

Sinowatz, F., Kollé, S., and Topfer-Petersen, E. (2001). Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 168, 24-35.

Sleigh, M. A. und Kerkut, G. A. (2016). *The Biology of Cilia and Flagella: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology* (Elsevier Science).

Smith, J. F., Syritsyna, O., Fellous, M., Serres, C., Mannowetz, N., Kirichok, Y., and Lishko, P. V. (2013). Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6823-6828.

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

Stauss, C. R., Votta, T. J., and Suarez, S. S. (1995). Sperm Motility Hyperactivation Facilitates Penetration of the Hamster Zona-Pellucida. *Biology of Reproduction* 53, 1280-1285.

Storey, B. T., Lee, M. A., Muller, C., Ward, C. R., and Wirtshafter, D. G. (1984). Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol Reprod* 31, 1119-1128.

Strunker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 471, 382-6.

Su, T. W., Choi, I., Feng, J., Huang, K., McLeod, E., and Ozcan, A. (2013). Sperm trajectories form chiral ribbons. *Sci Rep* 3, 1664.

Su, T. W., Choi, I., Feng, J., Huang, K., and Ozcan, A. (2016). High-throughput analysis of horse sperms' 3D swimming patterns using computational on-chip imaging. *Anim Reprod Sci* 169, 45-55.

Su, T. W., Xue, L., and Ozcan, A. (2012). High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 16018-16022.

Suarez, S. S. (2006). Gamete and zygote transport. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Elsevier, S. L., ed. (St. Louis Elsevier), pp. 113-145.

Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* *14*, 647-657.

Suarez, S. S. und Dai, X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* *46*, 686-691.

Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., and Powell, R. L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* *44*, 375-381.

Suarez, S. S. und Osman, R. A. (1987). Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod* *36*, 1191-1198.

Suarez, S. S. und Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* *12*, 23-37.

Sumigama, S., Mansell, S., Miller, M., Lishko, P. V., Cherr, G. N., Meyers, S. A., and Tollner, T. (2015). Progesterone Accelerates the Completion of Sperm Capacitation and Activates CatSper Channel in Spermatozoa from the Rhesus Macaque. *Biol Reprod* *93*, 130.

Summers, K. E. und Gibbons, I. R. (1971). Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 3092-3096.

Sun, F., Bahat, A., Gakamsky, A., Girsh, E., Katz, N., Giojalas, L. C., Tur-Kaspa, I., and Eisenbach, M. (2005). Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod* *20*, 761-767.

Sütterlin, S. und Hoßmann, I. (2007). Ungewollt kinderlos. Was kann die moderne Medizin gegen den Kindermangel in Deutschland tun. (Berlin Institut für Bevölkerung und Entwicklung).

Swan, S. H., Elkin, E. P., and Fenster, L. (2000). The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* *108*, 961-966.

Talarczyk-Desole, J., Berger, A., Taszarek-Hauke, G., Hauke, J., Pawelczyk, L., and Jedrzejczak, P. (2017). Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekol Pol* *88*, 56-60.

Tasken, K. und Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiological reviews* *84*, 137-167.

Tian, J. D., Gong, H., Thomsen, G. H., and Lennarz, W. J. (1997). Gamete interactions in *Xenopus laevis*: Identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *Journal of Cell Biology* 136, 1099-1108.

Tokuhiro, K. und Dean, J. (2018). Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Dev Cell* 46, 627-640 e625.

Tollner, T. L., Yudin, A. I., Cherr, G. N., and Overstreet, J. W. (2003). Real-time observations of individual macaque sperm undergoing tight binding and the acrosome reaction on the zona pellucida. *Biol Reprod* 68, 664-672.

Topfer-Petersen, E., Petrounkina, A. M., and Ekhlesi-Hundrieser, M. (2000). Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60, 653-662.

Toshimori, K. und Eddy, E. M. (2015). The Spermatozoon. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Plant, T. M., and Zeleznik, A. J., eds., p. 118.

Tsubamoto, H., Hasegawa, A., Nakata, Y., Naito, S., Yamasaki, N., and Koyama, K. (1999). Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biology of Reproduction* 61, 1649-1654.

Uhler, M. L., Leung, A., Chan, S. Y., and Wang, C. (1992). Direct effects of progesterone and antiprogestosterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril* 58, 1191-1198.

Uto, N., Yoshimatsu, N., Lopata, A., and Yanagimachi, R. (1988). Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J Exp Zool* 248, 113-120.

Vanduin, M., Polman, J. E. M., Debreet, I. T. M., Vanginneken, K., Bunschoten, H., Grootenhuis, A., Brindle, J., and Aitken, R. J. (1994). Recombinant Human Zona-Pellucida Protein Zp3 Produced by Chinese-Hamster Ovary Cells Induces the Human Sperm Acrosome Reaction and Promotes Sperm-Egg Fusion. *Biology of Reproduction* 51, 607-617.

Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M., and Sherins, R. J. (1988). Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil Steril* 49, 510-515.

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., and Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.

Villanuevadias, C., Ariasmartinez, J., Bermejomartinez, L., and Vadilloortega, F. (1995). Progesterone Induces Human Sperm Chemotaxis. *Fertility and Sterility* 64, 1183-1188.

Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G. S. (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.

- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M., and Kopf, G. S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* *19*, 242-248.
- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G. D., Valenzuela, J. P., Jorgez, C. J., Alvarez, J. G., and Kopf, G. S. (1999a). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* *274*, 3235-3242.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G. S. (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* *121*, 1139-1150.
- Visconti, P. E., Ning, X., Fornes, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A., and Kopf, G. S. (1999b). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* *214*, 429-443.
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., and Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* *53*, 133-150.
- Walensky, L. D. und Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* *130*, 857-869.
- Wandernoth, P. M., Mannowetz, N., Szczyrba, J., Grannemann, L., Wolf, A., Becker, H. M., Sly, W. S., and Wennemuth, G. (2015). Normal Fertility Requires the Expression of Carbonic Anhydrases II and IV in Sperm. *J Biol Chem* *290*, 29202-29216.
- Wandernoth, P. M., Raubuch, M., Mannowetz, N., Becker, H. M., Deitmer, J. W., Sly, W. S., and Wennemuth, G. (2010). Role of Carbonic Anhydrase IV in the Bicarbonate-Mediated Activation of Murine and Human Sperm. *Plos One* *5*.
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. A., McLeroy, P., Moe, O. W., and Garbers, D. L. (2007). A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *P Natl Acad Sci USA* *104*, 9325-9330.
- Wang, D., King, S. M., Quill, T. A., Doolittle, L. K., and Garbers, D. L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ Exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* *5*, 1117-1122.
- Wang, S. und Larina, I. V. (2018). In vivo three-dimensional tracking of sperm behaviors in the mouse oviduct. *Development* *145*.
- Wassarman, P. M. (1988). Zona Pellucida Glycoproteins. *Annu Rev Biochem* *57*, 415-442.

Wassarman, P. M., Jovine, L., and Litscher, E. S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 3, E59-64.

Wassarman, P. M., Liu, C., Chen, J., Qi, H., and Litscher, E. S. (1998). Ovarian development in mice bearing homozygous or heterozygous null mutations in zona pellucida glycoprotein gene mZP3. *Histol Histopathol* 13, 293-300.

Wassarman, P. M. und Mortillo, S. (1991). Structure of the Mouse Egg Extracellular Coat, the Zona-Pellucida. *Int Rev Cytol* 130, 85-110.

Wedel, B. und Garbers, D. (2001). The guanylyl cyclase family at Y2K. *Annu Rev Physiol* 63, 215-233.

Wennemuth, G. (2004). Bicarbonate action on early events in sperm activation. *Ann Anat* 186, 293-294.

Wennemuth, G. (2017). Taschenbuch Histologie, 2. Auflage edn (Elsevier).

Wennemuth, G., Babcock, D. F., and Hille, B. (2003a). Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J Gen Physiol* 122, 115-128.

Wennemuth, G., Carlson, A. E., Harper, A. J., and Babcock, D. F. (2003b). Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130, 1317-1326.

Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B., and Babcock, D. F. (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *J Biol Chem* 275, 21210-21217.

Westenbroek, R. E. und Babcock, D. F. (1999). Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev Biol* 207, 457-469.

WHO (1987). Task force on the diagnosis and treatment of infertility: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility (*Int J Androl.*).

WHO (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction., 4 edn (Cambridge University Press).

WHO (2000). WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. 2000,

Cambridge University Press: Cambridge. (Cambridge University Press).

WHO (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5 edn.

Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B., and Weyand, I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol* 142, 473-484.

- Wilson, L. G., Carter, L. M., and Reece, S. E. (2013). High-speed holographic microscopy of malaria parasites reveals ambidextrous flagellar waveforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18769-18774.
- Wolf, D. P. und Hamada, M. (1977). Induction of Zonal and Egg Plasma-Membrane Blocks to Sperm Penetration in Mouse Eggs with Cortical Granule Exudate. *Biology of Reproduction* 17, 350-354.
- Woolley, D. M. (2003). Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction* 126, 259-270.
- Woolley, D. M. (2010). Flagellar oscillation: a commentary on proposed mechanisms. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85, 453-470.
- Woolley, D. M. und Osborn, I. W. (1984). Three-dimensional geometry of motile hamster spermatozoa. *J Cell Sci* 67, 159-170.
- Xia, J. und Ren, D. (2009a). The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 119.
- Xia, J. und Ren, D. (2009b). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod* 80, 1092-1098.
- Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., Gossen, J. A., Esposito, G., van Duin, M., and Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 296, 353-362.
- Xie, L., Ma, R., Han, C., Su, K., Zhang, Q., Qiu, T., Wang, L., Huang, G., Qiao, J., Wang, J., *et al.* (2010). Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. *Clin Chem* 56, 1270-1278.
- Yanagimachi, R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid In *J Reprod Fertil*, pp. 275–286.
- Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 23, 193-196.
- Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of Fertilization in Mammals. In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, Mastroianni, L., and Biggers, J. D., eds. (Springer).
- Yanagimachi, R. (1994a). Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E., and Neill, J. D., eds. (Raven Press, New York), pp. 189-317.
- Yanagimachi, R. (1994b). *The Physiology of Reproduction Vol. 1*, Knobil E and Neill JD (Raven Press: New York).
- Yanagimachi, R., Cherr, G., Matsubara, T., Andoh, T., Harumi, T., Vines, C., Pillai, M., Griffin, F., Matsubara, H., Weatherby, T., *et al.* (2013). Sperm attractant in the micropyle region of fish and insect eggs. *Biol Reprod* 88, 47.

Yeung, C. H. und Woolley, D. M. (1984). Three-dimensional bend propagation in hamster sperm models and the direction of roll in free-swimming cells. *Cell Motil* 4, 215-226.

Yu, X., Hong, J. S., Liu, C. G., and Kim, M. K. (2014). Review of digital holographic microscopy for three-dimensional profiling and tracking. *Opt Eng* 53.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., Icmart, and Who (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility* 92, 1520-1524.

Zeng, X. H., Navarro, B., Xia, X. M., Clapham, D. E., and Lingle, C. J. (2013). Simultaneous knockout of *Slo3* and *CatSper1* abolishes all alkalization- and voltage-activated current in mouse spermatozoa. *J Gen Physiol* 142, 305-313.

Zeng, X. H., Yang, C., Kim, S. T., Lingle, C. J., and Xia, X. M. (2011). Deletion of the *Slo3* gene abolishes alkalization-activated K^+ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5879-5884.

Zeng, Y., Oberdorf, J. A., and Florman, H. M. (1996). pH regulation in mouse sperm: Identification of Na^+ -, Cl^- -, and HCO_3^- -dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental Biology* 173, 510-520.

Zernike, F. (1942a). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica* 9, 686-698.

Zernike, F. (1942b). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica* 9, 974-986.

Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H. J., Hong, Z. W., Xie, M., Chen, S. R., and Yao, B. (2015). The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *Plos One* 10.

Anhang

Publikationen

Muschol, M., **Wenders, C.**, and Wennemuth, G. (2018). Four-dimensional analysis by high-speed holographic imaging reveals a chiral memory of sperm flagella. *PLoS One* 13, e0199678.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen und Symposien in Form von wissenschaftlichen Postern vorgestellt:

- | | |
|---------|--|
| 11/2019 | Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Essen |
| 11/2019 | 19. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der DGGEF und der DGRM, Düsseldorf |
| 07/2019 | 2019 Fertilization and Activation of Development, Gordon Research Conference, Holderness (USA) |
| 12/2018 | 18. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der DGGEF und der DGRM, Essen |
| 12/2018 | Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Essen |
| 07/2018 | Mammalian Reproduction, Gordon Research Conference, Lucca (Italien) |
| 11/2017 | Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Essen |
| 10/2017 | 17. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der DGGEF und der DGRM, Münster |
| 09/2017 | 112th Annual Meeting/ 32. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg |
| 07/2017 | 33 rd Annual Meeting of ESHRE, Genf (Schweiz) |
| 11/2016 | Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Essen |

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Gunther Wennemuth für die Möglichkeit meine Dissertation in dem hoch interessanten Forschungsgebiet der Spermatozoenbewegung verfassen zu dürfen. Außerdem danke ich für den umfangreichen wissenschaftlichen Austausch und für das Vertrauen unsere Forschung in zahlreichen wissenschaftlichen und weiterbildenden Kongressen weltweit repräsentieren zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Bernhard Singer und seiner Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung des, in dieser Arbeit verwendeten, IE-3 Antikörpers bedanken.

Außerdem möchte ich mich noch ganz herzlich bei Herrn Dr. Michael Muschol bedanken, der mich hervorragend in das Feld der Digital Holografischen Mikroskopie eingearbeitet hat und mir stets mit Rat und Tat beiseite stand.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Dr. Matteo Avella, der mich durch stetigen Informationsaustausch bei der Herstellung des ZP2 Glykoproteins unterstützt hat.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Wennemuth für die Unterstützung und das lockere Arbeitsklima bedanken, welches mir bei der Verfassung meiner Arbeit sehr geholfen hat. Vor Allem möchte ich mich bei Frau Dr. Linda Frintrop bedanken, für den Zusammenhalt während des Projekts, für das gegenseitige Vertrauen sowie für die Freundschaft auch außerhalb des Labors.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums und der Promotion unterstützt haben. Herzlichster Dank gilt meiner Mutter, die mir während dieser Zeit durch zahlreiche Gespräche viel Kraft gegeben hat.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Herrn Dr. Marc Wiesehöfer für die tatkräftige Unterstützung, für sein Fachwissen, für seine Geduld auch außerhalb des Labors und sein Vertrauen in meine Arbeit bedanken. Dein Vertrauen hat mir in dieser Zeit immer wieder neue Kraft gegeben!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen von vierdimensionalen Bewegungsmustern muriner Spermatozoenflagellen mittels Digital Holografischer Mikroskopie“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Caroline Wiesehöfer befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Univ.-Prof. Dr. med. Gunther Wennemuth

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen