

**Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. T. Gudermann

Identifizierung und funktionelle
Charakterisierung von
Geschmacksrezeptoren in Spermien

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dorke Meyer

aus Oldenburg (Oldb)

München, 2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Wolfgang Neuhofer Prof. Dr. Artur Mayerhofer Prof. Dr. Hans Wolff
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Ingrid Boekhoff
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	23.05.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion von Säugerspermien	1
1.1.1	Aufbau einer Spermienzelle.....	1
1.1.2	Aufgaben eines Spermiums im weiblichen Genitaltrakt	2
1.1.2.1	Motilität.....	3
1.1.2.2	Kapazitierug	3
1.1.2.3	Wegfindung zur Eizelle.....	6
1.1.2.4	Akrosomreaktion und Fusion mit der Eizelle	8
1.1.3	Zusammensetzung des luminalen Milieus im weiblichen Genitaltrakt	11
1.2	Chemische Sinnesorgane	14
1.2.1	Funktion des Geschmackssinns	15
1.2.2	Geschmacksstoffe	15
1.2.3	Anatomischer Aufbau des Geschmackssystems	17
1.2.4	Geschmacksrezeptormoleküle	18
1.2.4.1	Salzig.....	18
1.2.4.2	Sauer.....	18
1.2.4.3	Geschmacksrezeptoren für „süß“, „umami“ und „bitter“	19
1.2.4.4	Signaltransduktion von Tas1- und Tas2-Rezeptoren	21
1.2.4.5	Extra-orale Expression von Geschmacksrezeptoren und assoziierten Signaltransduktionskomponenten	23
1.3	Zielsetzung.....	25
2	Material	27
2.1	Chemikalien.....	27
2.2	Enzyme, Kits und Größenstandards	29
2.3	Primer	30
2.3.1	Primer für die RT-PCR	30
2.3.2	Genotypisierungsprimer.....	33
2.4	Antikörper.....	33
2.4.1	Primärantikörper	33
2.4.2	Sekundärantikörper	35
2.5	Bakterienstämme, Plasmide, Zelllinien	35
2.6	Zellkultur	36
2.7	Puffer	36
2.8	Gebrauchswaren	39
2.9	Geräte.....	39
2.10	Versuchstiere	42
3	Methoden.....	43
3.1	Molekularbiologische Methoden	43

3.1.1	Isolierung von RNA aus Geweben.....	43
3.1.2	Synthese von cDNA (<i>complementary</i> DNA).....	43
3.1.3	Methoden der Polymerasekettenreaktion.....	44
3.1.3.1	Standard-PCR an cDNA.....	44
3.1.3.2	<i>Touchdown</i> PCR.....	44
3.1.4	Sequenzanalyse von Tas2-Rezeptoren.....	45
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
3.1.6	Aufreinigen von DNA aus einem Agarosegel.....	46
3.1.7	Ligation eines DNA-Fragments in einen Klonierungsvektor.....	46
3.1.8	Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden.....	46
3.1.8.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	46
3.1.8.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	47
3.1.8.3	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	47
3.1.8.4	Isolierung großer Mengen von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	48
3.1.9	Sequenzierungen.....	48
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.2.1	Aufbereitung der Gewebeprobe.....	48
3.2.1.1	Herstellung von Membranfraktionen isolierter Organe und Zellen.....	48
3.2.1.2	Herstellung eines Spermienhomogenisats.....	49
3.2.1.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	49
3.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.2.3	Immunoblotting.....	51
3.2.4	Immuncytochemische Untersuchungen an Spermien.....	52
3.2.4.1	Herstellung von Spermienpräparaten für die Mikroskopie.....	52
3.2.4.2	Immuncytochemische Färbungen.....	53
3.2.4.3	Peptidblockierung immuncytochemischer Färbungen.....	54
3.2.4.4	Co-Färbungen mit dem Akrosomenmarker <i>Peanut agglutinin</i>	54
3.2.5	Immunhistochemische Untersuchungen an Formalin-fixierten Geweben.....	54
3.2.5.1	Entnahme, Fixierung und Einbetten der Gewebe.....	55
3.2.5.2	Anfertigen von Paraffinschnitten.....	55
3.2.5.3	Immunhistochemische Färbungen.....	55
3.2.6	Immunhistochemische Untersuchungen an cryokonservierten Geweben.....	56
3.2.6.1	Anfertigen von Gefrierschnitten.....	56
3.2.6.2	Immunhistochemische Färbungen an Gefrierschnitten.....	56
3.2.7	Nachweis von Fluoreszenzproteinen im Mausgewebe.....	57
3.3	Zellkultur.....	57
3.3.1	Kultivierung von HEK293-Zellen.....	57
3.3.2	Cryokonservierung von HEK293-Zellen.....	58
3.3.3	Transfektion mit Hilfe von Metafectene.....	58
3.3.4	Ernten transfizierter Zellen.....	59
3.3.4.1	Probengewinnung für Western Blot Untersuchungen.....	59
3.3.4.2	Immuncytochemische Untersuchungen von Zellkulturzellen.....	59
3.4	Reproduktionsbiologische Techniken.....	59

3.4.1	Morphometrische Analyse der männlichen Reproduktionsorgane der Maus.....	59
3.4.1.1	Bestimmung des Hodengewichts und der Spermienzahl.....	59
3.4.1.2	Untersuchung der Spermienmorphologie	60
3.4.1.3	Analyse der Hodenmorphologie	60
3.4.1.4	Nachweis von apoptischen Zellen im männlichen Keimdrüsengewebe der Maus.....	61
3.4.2	Motilitätsanalysen an isolierten Spermien (<i>computer assisted semen analysis</i> [CASA]).....	62
3.4.3	Bestimmung des Serum-Testosteronspiegels	63
3.4.4	Untersuchung der Spermienkapazitierung durch Quantifizierung der Cholesterolauslagerung.....	64
3.4.5	Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion.....	65
3.4.5.1	Auslösen der Akrosomreaktion.....	65
3.4.5.2	Bestimmung des akrosomalen Status durch Coomassie-Färbung	65
3.4.6	<i>Zona pellucida</i> Präparation.....	66
3.4.6.1	Präparation von <i>Zona pellucida</i>	66
3.4.6.2	Solubilisierung von <i>Zona pellucida</i>	67
3.5	Funktionelle Untersuchungen.....	68
3.5.1	Messung von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in Spermien mit dem Ca^{2+} -Chelator Fura-2	68
3.5.1.1	Vorbereiten und Beladen von Spermien zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2	69
3.5.1.2	Einzelzellmessung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an Spermien	69
3.5.1.3	Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Zellpopulationen	71
3.5.2	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration von Spermien.....	72
3.5.2.1	Stimulation der Spermien.....	72
3.5.2.2	cAMP Extraktion	73
3.5.2.3	cAMP-Bestimmung.....	73
3.6	Arbeiten mit Tieren	74
3.6.1	Zucht der Mausstämme.....	74
3.6.2	Geschmacksrezeptor-defiziente Reportermauslinien	74
3.6.3	Genotypisierung.....	77
3.6.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	77
3.6.3.2	PCR zur Feststellung des Genotyps	77
3.6.4	Analyse des Reproduktionsverhaltens Gen-defizienter Tiere	78
3.6.4.1	Analyse des Züchterfolgs.....	78
3.6.4.2	Genotyp-Verteilung der Nachkommen	79
3.7	Statistische Methoden.....	79
4	Ergebnisse	81
4.1	Analyse der Expression des potentiellen Sauerdetektors PKD2L1 im Reproduktionssystem der männlichen Maus.....	81

4.1.1	Immunhistochemischer Nachweis des PKD2L1 Proteins im männlichen Keimdrüsengewebe der Maus	83
4.1.2	Western Blot Analyse des Sauerdetektors PKD2L1 im Keimdrüsengewebe der Maus	86
4.1.3	Subzelluläre Lokalisation des PKD2L1 in Mausspermien	88
4.2	Funktionelle Charakterisierung der G Protein α -Untereinheit Gustducin im Reproduktionssystem männlicher Mäuse	91
4.2.1	Reproduktionsbiologische Analyse einer Gustducin-defizienten Mauslinie	93
4.2.1.1	Überprüfung der Gustducin-Antikörper-Immunreaktivität an Zungengewebe von Wildtyp- und Gustducin-KO Mäusen	93
4.2.1.2	Zuchterfolg von α -Gustducin-defizienten Mäusen	95
4.2.1.3	Gustducin-Immunreaktivität im Keimdrüsengewebe der Gustducin-defizienten Mauslinie	96
4.3	Bitterrezeptoren im Keimdrüsengewebe der männlichen Maus	105
4.3.1	RT-PCR Untersuchung zum Expressionsnachweis von Tas2-Rezeptoren im Hoden der Maus	105
4.3.2	Immunhistochemischer Spezifitätstest eines Tas2r138 Antikörpers	114
4.3.3	Reproduktionsbiologische Charakterisierung einer Tas2r131 GFP Mauslinie	116
4.3.3.1	Analyse der GFP Expression in Wallpapillen der Tas2r131 GFP Maus	116
4.3.3.2	Nachweis des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP im männlichen Reproduktionssystem	118
4.3.4	Funktionelle Analyse des reproduktionsbiologischen Phänotyps männlicher Tas2r131 GFP Mäuse	123
4.3.4.1	Histologische Analyse der männlichen Reproduktionsorgane Tas2r131-defizienter Mäuse	123
4.3.4.2	Untersuchung der Fertilität von Tieren der Tas2r131 GFP Mauslinie	129
4.3.4.3	Funktionelle Charakterisierung von Spermien Tas2r131-defizienter Mäuse	134
4.4	Geschmacksrezeptoren der Tas1r-Familie im männlichen Reproduktionssystem	140
4.4.1	Nachweis von Tas1-Rezeptor-Transkripten in Reproduktionsorganen der männlichen Maus	140
4.4.2	Immunhistochemische Analyse von Tas1-Rezeptorproteinen im Keimdrüsengewebe der männlichen Maus	141
4.4.3	Expression des Tas1r3 Rezeptors im Keimdrüsengewebe der Ratte	147
4.4.4	Analyse der Expression von Geschmacksrezeptoren der Tas1r-Familie in humanen Spermien	151
4.5	Reproduktionsbiologische Charakterisierung eines Tas1r1-defizienten Mausmodells	161

4.5.1	Analyse der Tas1r1 Expression unter Verwendung einer Tas1r1 mCherry Reportermaus	161
4.5.2	Reproduktionsbiologische Charakterisierung der Tas1r1 mCherry Mauslinie	169
4.5.2.1	Analyse der Fertilität von Tas1r1-defizienten Mäusen	169
4.5.2.2	Histologische Analyse des Hodens Tas1r1-defizienter Mäuse	170
4.5.3	Analyse der Spermienfunktion von Tas1r1-defizienten Tieren	176
4.5.3.1	Vergleich der Motilität von Spermien mit unterschiedlichem Tas1r1 Genotyp	177
4.5.3.2	Analyse der Akrosomreaktion von Tas1r1-defizienten Tieren	181
4.5.3.3	Quantifizierung der Konzentrationen der <i>second messenger</i> Ca ²⁺ und cAMP in isolierten Spermien der Tas1r1 mCherry Reportermauslinie	188
5	Diskussion	197
5.1	Expression von gustatorischen Sensormolekülen im männlichen Reproduktionssystem	197
5.2	Physiologische Rolle von Rezeptormolekülen des Geschmackssystems in Spermien	198
5.2.1	Physiologische Funktion von Tas1-Rezeptoren in Spermien	199
5.2.1.1	Funktionelle Rolle des Tas1r1 für die Verhinderung einer spontanen Akrosomreaktion	199
5.2.1.2	Mögliche Liganden-Detektion durch Tas1-Rezeptoren in Spermien	203
5.2.2	Potentielle Funktion von Bitterrezeptoren im männlichen Reproduktionssystem	211
5.2.3	Physiologische Funktion des potentiellen Sauerdetektors PKD2L1 in männlichen Keimzellen	218
5.2.4	Die gustatorische G Protein Untereinheit α -Gustducin in Spermien	220
5.3	Ausblick	221
5.3.1	Mögliche physiologische Funktionen von Geschmacksrezeptoren in Sinneszellen der Zunge und in extra-oralen Systemen	222
5.3.2	Potentielle medizinische Relevanz von Geschmacksrezeptoren in Spermien	223
6	Zusammenfassung	225
7	Literaturverzeichnis	229
8	Anhang	257
8.1	Abbildungsverzeichnis	257
8.2	Tabellenverzeichnis	261
8.3	Abkürzungsverzeichnis	262
8.4	Publikationsverzeichnis	265
8.5	Danksagung	269

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion von Säugerspermien

1.1.1 Aufbau einer Spermienzelle

Die einzige Aufgabe eines Spermiums besteht darin, eine Eizelle zu befruchten, um so seine DNA an die entstehenden Nachkommen weiterzugeben [Lefievre et al., 2009]. Zur optimalen Erfüllung dieser Aufgabe sind Spermien hochgradig spezialisierte Zellen, die sich aus zwei strukturell und funktionell getrennten subzellulären Kompartimenten zusammensetzen: Dem Kopf als Träger des genetischen Materials und der Motoreinheit des Flagellums [Zitranski et al., 2010].

Der Spermienkopf besteht hauptsächlich aus dem Zellkern mit dem stark kondensierten, haploiden Chromosomensatz sowie einem großen Vesikel, dem sogenannten Akrosom [Florman et al., 2008]. Dieses akrosomale Vesikel entsteht während der Spermiogenese durch die Fusion einzelner, aus dem Golgi-Apparat abgeschnürter kleiner Vesikel [Escalier et al., 1991; Kierszenbaum et al., 2007] und beinhaltet eine Vielzahl an hydrolysierenden Enzymen [Kim et al., 2008]. Beim Kontakt des Spermiums mit der Glykoprotein-reichen Hülle der Eizelle, der *Zona pellucida* (ZP), wird der Inhalt des akrosomalen Vesikels exocytisiert, ein Prozess, der als Akrosomreaktion bezeichnet wird (siehe Abschnitt 1.1.2.4). Die dabei freigesetzten Enzyme verdauen die *Zona pellucida* partiell und erlauben es so dem Spermium, zur Plasmamembran der Eizelle vorzudringen und mit dieser zu verschmelzen.

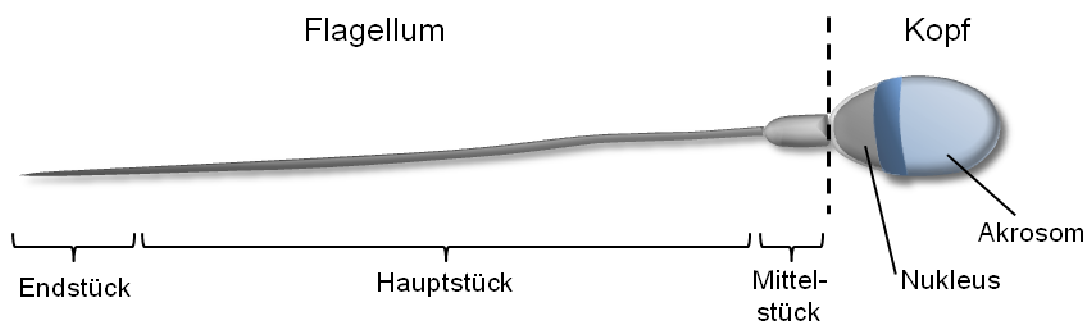


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines humanen Spermiums.

Ein Spermium ist morphologisch in zwei subzelluläre Kompartimente unterteilt (gestrichelte Linie): Den Kopf und das lange Flagellum. Der Kopf des Spermiums besteht im Wesentlichen aus dem Zellkern [Nukleus] sowie dem akrosomalen Vesikel [Akrosom]. Der Spermianschwanz unterteilt sich in drei funktionelle Abschnitte: das Mitochondrien-reiche Mittelstück, das Hauptstück und das Endstück. (Bild: Heike Borth)

Im Gegensatz zum Spermienkopf, der für die direkte Interaktion mit der Eizelle verantwortlich ist, wird der Spermischwanz hauptsächlich für die Fortbewegung der männlichen Keimzelle benötigt. Dieses Flagellum, das das Spermium nutzt, um nach der Ejakulation die lange Wegstrecke bis zur Eizelle aktiv zu überwinden, setzt sich aus drei funktionellen Abschnitten zusammen: dem Mittel-, Haupt- und Endstück (Abbildung 1.1). Strukturell zeichnet sich das Mittelstück vor allem durch eine hohe Anzahl Energie-liefernder Mitochondrien aus, die das Axonem spiralförmig umschließen. Das Axonem, welches das Mittel- und Hauptstück durchzieht, weist eine typische 9 + 2 Mikrotubuli-Struktur auf [Inaba, 2003] und ist für die geißelartige Bewegung des Flagellums verantwortlich [Summers und Gibbons, 1971].

Reife Spermien besitzen kaum Cytoplasma und kein endoplasmatisches Retikulum [Gur und Breitbart, 2008; Lefievre et al., 2009] und weisen, bis auf sehr wenige Ausnahmen [Gur und Breitbart, 2006], keine transkriptionelle oder translationelle Aktivität auf [Vogt, 2004]. Die Änderungen physiologischer Spermienfunktionen, die während der Passage durch den weiblichen Genitaltrakt notwendig sind, können deshalb nur über posttranslationale Modifikationen wie Proteinphosphorylierungen, Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentration und des pH-Wertes sowie die Generierung von *second messengern* vermittelt werden [Lefievre et al., 2009]. Zentrale Regulatoren stellen dabei vor allem die intrazellulären Ca^{2+} - und cAMP-Konzentrationen sowie der cytosolische pH-Wert der Spermienzelle dar. Besonders Calcium, das als elementares Signaltransduktionsmolekül an der Steuerung multipler Funktionen in verschiedensten Zelltypen beteiligt ist [Clapham, 1995], spielt bei der Regulation aller wichtigen Prozesse der Spermienzelle, wie z. B. Motilität, Wegfindung und Akrosomreaktion eine essentielle Rolle [Yanagimachi und Usui, 1974; Florman et al., 1989; Florman et al., 1992; Ren et al., 2001; Ho et al., 2002].

1.1.2 Aufgaben eines Spermiums im weiblichen Genitaltrakt

Bis zur erfolgreichen Befruchtung einer Eizelle muss ein Spermium in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts eine Vielzahl komplexer Aufgaben erfüllen, die u.a. aktives Schwimmen (Motilität), einen sekundären Reifungsprozess (Kapazitierung), die Wegfindung zur Eizelle und die Akrosomreaktion umfassen (Abbildung 1.2) und die im Folgenden detailliert beschrieben werden.

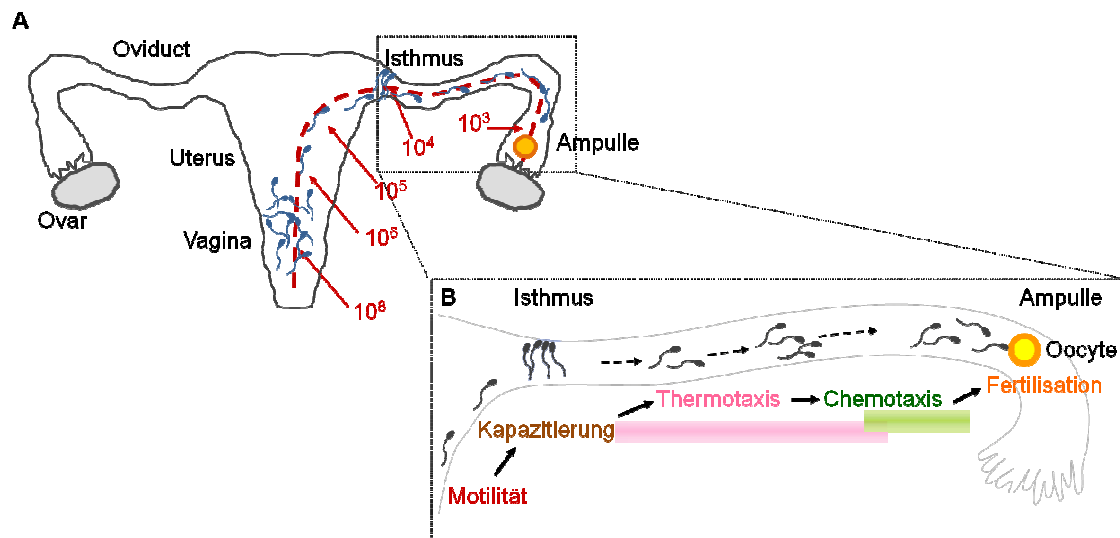


Abbildung 1.2: Übersicht über physiologische Aufgaben eines Spermiums im weiblichen Genitaltrakt bis zur Befruchtung einer Eizelle.

Während der Wanderung der Spermien zum Ort der Befruchtung in der Ampulle des Eileiters kommt es zu einer drastischen Reduzierung der Spermienzahl (rote Ziffern) [A]. Die noch verbleibenden Spermien durchlaufen im Bereich des Isthmus im proximalen Teil des Eileiters eine sekundäre Reifung (Kapazittierung), bevor ihre Wegfindung zur Eizelle (Thermotaxis und Chemotaxis) beginnt. Nach dem erfolgreichen Auffinden der Eizelle bindet das Spermium an die Glykoprotein-reiche Hülle der Eizelle (*Zona pellucida*), wodurch es zur Akrosomreaktion kommt, die es dem Spermium erlaubt bis zur Oocyte vorzudringen und mit dieser zu verschmelzen (Fertilisation).

1.1.2.1 Motilität

Nach der Ejakulation in den weiblichen Genitaltrakt findet durch den erhöhten pH-Wert des Seminalplasmas (6,7 - 7,4) [Suarez und Pacey, 2006] eine Alkalisierung der Spermien statt [Babcock und Pfeiffer, 1987; Hamamah et al., 1996], wodurch das Spermienflagellum anfängt zu schlagen und das Spermium somit aktiv zu schwimmen beginnt [Hamamah und Gatti, 1998]. Dieser Flagellumschlag ermöglicht es dem Spermium, die enorme Wegstrecke zum Eileiter, die mehr als das 1000fache der eigenen Länge ausmacht, zu überwinden [Eisenbach und Tur-Kaspa, 1999; Suarez und Pacey, 2006]. Dabei gelingt die Durchquerung des schleimgefüllten Gebärmutterhalses (Cervix) [Sobrero und Macleod, 1962] nur motilen, morphologisch intakten Spermien [Hanson und Overstreet, 1981; Barros et al., 1984; Katz et al., 1990], so dass nur ein Bruchteil der ejakulierten Spermien den Beginn des Eileiters (Isthmus) überhaupt erreicht [Williams et al., 1993] (Abbildung 1.2 [A], rote Ziffern).

1.1.2.2 Kapazittierung

Am Isthmus des Eileiters angekommen heften sich die Spermien an das Epithel des Oviductes [Pacey et al., 1995a; Baillie et al., 1997; Reeve et al., 2003], wo sie komplexe sekundäre Reifungsprozesse durchlaufen, die zusammengefasst als Kapazittierung bezeichnet werden [De Jonge, 2005; Suarez und Pacey, 2006; Visconti et al., 2011], (Abbildung 1.2 [B]) und durch die die Zellen erst die Kompetenz erlangen, eine Eizelle

befruchten zu können [Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952; Mahi und Yanagimachi, 1973].

Dem Isthmus kommt dabei eine Rolle als funktionelles Spermienreservoir zu [Yanagimachi und Chang, 1963; Suarez und Osman, 1987; Pacey et al., 1995b; De Jonge, 2005; Suarez und Pacey, 2006], in dem die Zellen während der Kapazitierung gespeichert und lebensfähig gehalten werden [Kervancioglu et al., 1994; Murray und Smith, 1997; Holt und Lloyd, 2010], bis sie sich nach und nach vom Epithel ablösen [Smith und Yanagimachi, 1991; Demott und Suarez, 1992; Lefebvre und Suarez, 1996; Suarez und Ho, 2003; Ho et al., 2009].

Spermien können jedoch nicht nur *in vivo* kapazitieren; dieser sekundäre Reifungsprozess kann auch *in vitro* durch eine Inkubation mit Puffern induziert werden, die Ca^{2+} , Bicarbonat und bovines Serum-Albumin (BSA) enthalten [Yanagimachi, 1994; de Lamirande et al., 1997]. Die Inkubation in einem solchen Kapazitierungspuffer bewirkt, wie auch *in vivo* am Isthmus des Eileiters, einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [Baldi et al., 1991; DasGupta et al., 1993] und des intrazellulären pH-Wertes der Spermien [Carr und Acott, 1989; Parrish et al., 1989; Galantino-Homer et al., 2004; Lishko et al., 2010]. Die intrazelluläre Alkalisierung resultiert in einer Erhöhung der Leitfähigkeit eines Kaliumkanals (SLO3) in der Plasmamembran [Schreiber et al., 1998; Navarro et al., 2007; Santi et al., 2010]; als Folge davon kommt es zur Hyperpolarisation der Spermienzellmembran auf -60 bis -70 mV, die charakteristisch für kapazitierte Keimzellen ist [Zeng et al., 1995; Arnoult et al., 1999; Munoz-Garay et al., 2001; Demarco et al., 2003; Zeng et al., 2011].

Eine weitere entscheidende Veränderung der Spermienzelle stellt der Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels während der Kapazitierung dar [Garbers et al., 1982; Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2002]. Dieser wird durch einen speziellen Typ von Adenylylcyclasen bewirkt, einer löslichen Adenylylcyclase (*soluble adenylate cyclase*, [sAC]), die im Gegensatz zu membranständigen Adenylylcyclasen (mAC) [Sunahara und Taussig, 2002] nicht durch G Proteine reguliert wird und auch keine Aktivierbarkeit durch Forskolin zeigt [Seamon und Daly, 1986; Dessauer und Gilman, 1996; Litvin et al., 2003]. Stattdessen wird diese sAC durch Bicarbonat aktiviert [Chen et al., 2000; Jaiswal und Conti, 2003; Litvin et al., 2003], wobei ihre Aktivität zusätzlich durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration [Jaiswal und Conti, 2003; Litvin et al., 2003; Carlson et al., 2007] und durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus über die Proteinkinase A (PKA) reguliert wird [Nolan et al., 2004; Burton und McKnight, 2007]. Das Bicarbonat zur Aktivierung dieser sAC wird während der Kapazitierung durch einen Einstrom von extrazellulärem HCO_3^- aus dem Kapazitierungspuffer bzw. dem Milieu des weiblichen Genitaltrakts [Maas et al., 1977] bereit gestellt. Dies geschieht vermutlich über einen Natrium/ HCO_3^- -Cotransporter [Demarco et al., 2003], einen Natrium/Protonen-Austauscher (NHE) [Wang et al., 2003] oder in Form von CO_2 , das in Spermien durch eine Carboanhydrase zu HCO_3^- umgesetzt werden kann [Wandernoth et al., 2010].

Die elementare Bedeutung der löslichen Adenylylcyclase für die Kapazitierung konnte in Studien an Gen-defizienten Mäusen bestätigt werden: In Spermien von sAC-*Knockout* Mäusen wurde eine stark reduzierte cytoplasmatische cAMP-Konzentration registriert [Xie et al., 2006], was zur Folge hatte, dass die Zellen keine progressive Motilität und Hyperaktivierung (siehe unten) mehr aufwiesen [Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005] und die Männchen infertil waren [Xie et al., 2006].

Für die Produktion von cAMP während der Kapazitierung wird allerdings auch eine Beteiligung von mACs diskutiert [Baxendale und Fraser, 2003]. Dabei wird angenommen, dass die Aktivierung solcher mACs durch G Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptor* [GPCR]) erfolgt, die lösliche Liganden des weiblichen Genitaltrakts binden können [Fraser et al., 2006]. Ein solcher Detektionsmechanismus könnte *in vivo* entscheidend zur Regulation der Kapazitierung durch Liganden im luminalen Milieu des weiblichen Genitaltrakts beitragen. Die physiologische Relevanz dieser mACs konnte bislang jedoch nicht eindeutig geklärt werden und wird gerade in jüngster Zeit kontrovers diskutiert [Baxendale und Fraser, 2003; Hess et al., 2005; Xie et al., 2006; Kaupp et al., 2008].

Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt schließlich die Aktivierung von PKA [Visconti et al., 1995b; Desseyn et al., 2000; Nolan et al., 2004]. Die PKA aktiviert anschließend Tyrosinkinasen [Leclerc et al., 1996], welche für die umfangreichen Proteinphosphorylierungen verantwortlich sind, die für die Kapazitierung charakteristisch sind [Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b; Naz und Rajesh, 2004; Salicioni et al., 2007].

Die Lipidkomposition der Spermienmembran erfährt im Verlauf der Kapazitierung ebenfalls elementare Veränderungen: cAMP- und PKA-abhängig kommt es zu einem *Phospholipid-Scrambling* [Gadella und Harrison, 2000; Harrison und Miller, 2000; Gadella und Harrison, 2002], wodurch die Membranfluidität erhöht und damit die für die Kapazitierung charakteristische Extraktion von Cholesterol aus der Membran ermöglicht wird [Eliasson, 1966; Cross, 1998; Gadella und Harrison, 2000; Flesch et al., 2001; De Jonge, 2005; Jones et al., 2010].

Auch das Bewegungsmuster und die Schwimmkraft der Spermienzellen verändern sich während der Kapazitierung gravierend. Diese Änderungen sind auf zellulärer Ebene durch eine Erhöhung der flagellaren Bewegungsamplitude und asymmetrische peitschenartige Bewegungen des Spermienchwanzes gekennzeichnet und werden als Hyperaktivierung bezeichnet [White und Aitken, 1989; Suarez, 2008a; Kirichok und Lishko, 2011]. Molekular wird die Hyperaktivierung vor allem durch einen Einstrom von Ca^{2+} durch den CatSper-Kanal (*Cationic Channel of Sperm*) [Ren et al., 2001] induziert, einen Spermien-spezifischen, hoch-selektiven, schwach spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2012], der im Hauptstück von Spermien exprimiert wird. Fehlt dieser Kanal wie z. B. bei Mäusen, die Gen-defizient für eine der α -Untereinheiten sind, so zeigen die Spermien der betroffenen Tiere keine Hyperaktivierung mehr und die Männchen sind infertil [Quill et al., 2001;

Ren et al., 2001; Lobley et al., 2003; Quill et al., 2003; Carlson et al., 2005; Qi et al., 2007; Carlson et al., 2009]. Interessanterweise führen Mutationen im *CatSper 1* oder *CatSper 2* Gen, die zwei der CatSper α -Untereinheiten codieren, auch beim Menschen zur männlichen Unfruchtbarkeit [Avidan et al., 2003; Zhang et al., 2007a; Avenarius et al., 2009; Hildebrand et al., 2010].

Bei der Aufklärung der Aktivierungsmechanismen dieses Ca^{2+} -Kanals mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik [Kirichok et al., 2006], stellte sich spannenderweise heraus, dass der Kanal nicht nur durch eine Erhöhung des pH-Wertes aktiviert wird [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2010], sondern in humanen Spermien auch durch nanomolare Konzentrationen von Progesteron aktiviert werden kann [Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011], das z. B. in follikulärer Flüssigkeit vorkommt (siehe Abschnitt 1.1.2.3) und beim Eisprung freigesetzt wird. Diese Aktivierung des Kanals durch Progesteron und der resultierende Ca^{2+} -Einstrom könnten somit einen Mechanismus repräsentieren, mit dem die Hyperaktivierung eines Spermiums funktionell an das Vorhandensein einer befruchtungsfähigen Eizelle gekoppelt werden könnte. Dieses Modell erscheint besonders attraktiv, da das veränderte Schwanzschlagmuster hyperaktivierter Zellen diesen nicht nur hilft, den Weg im Mucus-gefüllten Eileiter bis hin zur befruchtungsfähigen Eizelle zurückzulegen [Jansen, 1980; Suarez et al., 1983; Suarez et al., 1991; Quill et al., 2003], sondern auch für das Loslösen vom Epithel des Eileiters nach der Kapazitierung notwendig ist [Stauss et al., 1995; Quill et al., 2001; Ren et al., 2001; Carlson et al., 2003; Quill et al., 2003; Ho et al., 2009]. Die Aktivierung des CatSper durch Progesteron aus follikulärer Flüssigkeit könnte folglich dafür sorgen, dass sich die am Isthmus während der Kapazitierung arretierten Spermien gerade dann verstärkt vom Epithel ablösen, wenn auch eine befruchtungsfähige Eizelle zur Verfügung steht.

1.1.2.3 Wegfindung zur Eizelle

Die Tatsache, dass nur ein überraschend geringer Anteil der ursprünglich immensen Zahl von Spermien im Ejakulat am Isthmus des Eileiters ankommt (siehe Abschnitt 1.1.2.1 und Abbildung 1.2 [A]) [Williams et al., 1993] und von diesen immer nur ein geringer Teil zur gleichen Zeit kapazitiert und damit befruchtungskompetent ist (ca. 10 % beim Menschen) [Cohen-Dayag et al., 1995; Giojalas et al., 2004], legt die Vermutung nahe, dass es Orientierungshilfen zur Wegfindung des Spermiums durch den Eileiter gibt, die eine erfolgreiche Befruchtung sicherstellen [Eisenbach und Giojalas, 2006].

Für diese Wegfindung vom Isthmus bis hin zur trichterförmigen Erweiterung des Eileiters, der Ampulle (Abbildung 1.2), in der die Befruchtung stattfindet, wurden in den vergangenen Jahren unterschiedliche Navigationsmechanismen diskutiert. Inzwischen wird ein Modell favorisiert, das zwei der verschiedenen Hypothesen zur Wegfindung von Spermien vereinigt: Über lange Distanzen, in diesem Fall vom Isthmus bis zur Ampulle des Eileiters, orientieren sich Spermien offenbar anhand eines Temperaturgradienten (Thermotaxis) [Bahat et al., 2003]. Dabei können Spermien einen Ovulations-abhängigen Temperaturunterschied von 1 - 2 °C [Hunter und Nichol, 1986;

Bahat et al., 2005] zwischen dem kühleren Isthmusbereich und der wärmeren Ampulle wahrnehmen [Bahat et al., 2003; Bahat und Eisenbach, 2010]. Der molekulare Mechanismus dieser sehr sensitiven Temperaturwahrnehmung und Bewegungssteuerung ist bislang jedoch unklar. In jüngsten Untersuchungen konnten zwar Hinweise dafür gefunden werden, dass thermotaktische Prozesse in Spermien eine Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und des IP_3 -Rezeptors (IP_3R) bewirken und die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern induzieren; die verantwortlichen molekularen Temperatursensoren konnten bislang jedoch nicht identifiziert werden [Bahat und Eisenbach, 2010].

Befinden sich die Spermien dann in der Nähe der Eizelle in der Ampulle, so kommen chemische Lockstoffe als Navigationshilfen zum Tragen [Eisenbach, 1999; Babcock, 2003] (Abbildung 1.2 [B]), die dem Spermium ein gezieltes Auffinden der weiblichen Keimzelle ermöglichen (Chemotaxis) (zur Übersicht siehe [Eisenbach und Giojalas, 2006]). Bislang konnte die Chemotaxis von Spermien beim Menschen [Cohen-Dayag et al., 1994; Sun et al., 2005], aber auch bei Mäusen [Giojalas und Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999] und Kaninchen [Fabro et al., 2002] nachgewiesen werden.

Der Nachweis der chemoattraktiven Eigenschaft von follikulärer Flüssigkeit [Villanueva-Diaz et al., 1990; Ralt et al., 1991; Ralt et al., 1994], die beim Eisprung freigesetzt wird, ergab erste Hinweise darauf, dass die Eizelle und die sie umgebenden Cumuluszellen solche Spermienlockstoffe produzieren könnten. Später konnte bestätigt werden, dass sowohl die Oocyte als auch isolierte Cumuluszellen kontinuierlich chemoattraktive Substanzen freisetzen [Sun et al., 2005], so dass über die Ovulation hinaus ein chemischer Gradient um die Eizelle herum gebildet wird. Während Progesteron als die chemotaktisch aktive Substanz identifiziert werden konnte, die von den Cumuluszellen synthetisiert wird [Guidobaldi et al., 2008; Oren-Benaroya et al., 2008], ist derzeit nicht klar, ob und welche Lockstoffe die Eizelle selbst produziert [Sun et al., 2005].

Die wohl am besten charakterisierte chemoattraktive Substanz für Säugerspermien stellt das Hormon Progesteron dar, das bereits in picomolaren Konzentrationen eine Chemotaxis humaner Spermien verursacht [Teves et al., 2006] und dementsprechend eine sehr effektive chemotaktische Substanz repräsentiert [Oren-Benaroya et al., 2008; Publicover et al., 2008; Teves et al., 2009]. Neben Progesteron wurden aber auch verschiedene andere chemische Substanzen und Proteine bzw. Peptide mit chemoattraktiven Eigenschaften identifiziert. Für die Duftstoffe Lylal und Bourgeonal, die Leitsubstanz des synthetischen Maiglöckchendufts, wurde ein chemoattraktiver Effekt auf murine bzw. humane Spermien beschrieben [Spehr et al., 2003; Fukuda et al., 2004; Spehr et al., 2004]. Dieser Effekt wurde zunächst den in Spermien identifizierten olfaktorischen Rezeptoren [Parmentier et al., 1992; Vanderhaeghen et al., 1997; Spehr et al., 2003; Fukuda et al., 2004; Spehr et al., 2006] zugeschrieben. Kürzlich publizierte Befunde, die darauf hindeuten, dass Duftstoffe wie Bourgeonal, Helional, Undecanal und Cyclamal in der Lage sind, den CatSper-Kanal im Flagellum von Spermien direkt zu aktivieren, werfen allerdings die Frage auf, ob die chemoattraktive Wirkung von

Odorantien tatsächlich auf eine Erkennung durch olfaktorische Rezeptoren zurückzuführen ist oder durch den CatSper vermittelt wird [Brenker et al., 2012]. Da der CatSper zudem auch noch durch Prostaglandine, wie z. B. Prostaglandin E1 (PGE1) [Schaefer et al., 1998], sowie durch eine Vielzahl lipophiler Substanzen wie z. B. Menthol oder cyclische Nukleotid-Analoga aktiviert wird [Brenker et al., 2012], könnte er somit möglicherweise einen polymodalen Chemosensor repräsentieren, der im weiblichen Genitaltrakt für die Detektion verschiedener kleiner, überwiegend lipophiler Substanzen verantwortlich ist [Brenker et al., 2012] und neben der Hyperaktivierung auch an chemotaktischen Prozessen von Spermien beteiligt sein könnte [Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011].

Eine chemotaktische Wirkung wird aber auch verschiedenen deutlich hydrophileren Substanzen mit peptiderger bzw. proteinerger Struktur zugeschrieben. Dazu gehört das Chemokin RANTES (*Regulator on Activation Normally T-cell Expressed and Secreted Chemokine*) [Schall et al., 1990; Alam et al., 1993; Isobe et al., 2002], das chemoattraktiv auf humane Spermien wirkt und u. a. in follikulärer Flüssigkeit zu finden ist [Isobe et al., 2002]. Auch für das Chemokin SDF1 (*stromal cell-derived factor-1*) und das atriale natriuretische Peptid [Brenner et al., 1990], welche ebenfalls im weiblichen Genitaltrakt vorkommen [Sundsfjord et al., 1989; Zuccarello et al., 2011], sowie für Allurin, ein Protein der CRISP-Familie (*Cysteine-Rich Secretory Protein*), konnten Befunde gesammelt werden, die auf einen chemotaktischen Effekt in Spermien hindeuten [Zamir et al., 1993; al-Anzi und Chandler, 1998; Zuccarello et al., 2011]. In der Arbeitsgruppe von Michael Eisenbach (Weizmann-Institut, Israel) konnten zudem Hinweise auf verschiedene weitere kleine chemoattraktive Peptide bzw. Proteine (<1.3 und ca. 13 kDa) gefunden werden, die jedoch bislang nicht näher identifiziert wurden [Eisenbach und Giojalas, 2006].

1.1.2.4 Akrosomreaktion und Fusion mit der Eizelle

Trifft ein Spermium nach dieser langen Wegstrecke zur Ampulle des Eileiters auf ein befruchtungsfähiges Ei, muss es zunächst die Schicht der Cumuluszellen durchdringen, die die Eizelle umgeben, bevor es an die *Zona pellucida* binden kann. Diese dicke extrazelluläre Hülle der Eizelle [Clark und Dell, 2006] besteht bei Mäusen aus einem Netzwerk dreier stark polymerisierter Glykoproteine: ZP1, ZP2 und ZP3 [Bleil und Wassarman, 1980; Greve und Wassarman, 1985; Wassarman und Litscher, 2008b]; in der *Zona pellucida* des Menschen ist zusätzlich noch ein viertes Glykoprotein (ZP4) zu finden [Gupta et al., 2007; Serres et al., 2008; Gupta et al., 2009].

Durch die Bindung des Spermiums an die *Zona pellucida* wird die Akrosomreaktion ausgelöst, eine irreversible, Ca^{2+} -abhängige Exocytose des akrosomalen Vesikels [Yanagimachi und Usui, 1974; Bleil und Wassarman, 1983; Roldan et al., 1994]. Der molekulare Mechanismus der dieser Spezies-spezifischen Erkennung der Eizelhülle durch das Spermium zu Grunde liegt, ist allerdings bisher nicht eindeutig geklärt: Als Liganden auf der Oberfläche der Eizelle kommen Oligosaccharide des ZP3-Proteins in Frage, z. B. an Serin-Resten (Ser332 und Ser334) [Florman und Wassarman, 1985;

Wassarman, 1990; Tulsiani et al., 1997; Chen et al., 1998; Clark und Dell, 2006; Williams et al., 2006; Gupta und Bhandari, 2011]. Resultate neuerer Untersuchungen führten hingegen zu der These, dass nicht einzelne ZP-Proteine oder deren Kohlenhydratreste die Akrosomreaktion auslösen, sondern dass vielmehr die dreidimensionale Struktur der *Zona pellucida* für die Bindung des Spermiums von zentraler funktioneller Bedeutung sein könnte [Rankin et al., 2003; Gahlay et al., 2010]. Gegenwärtig wird außerdem diskutiert, dass die Bindung an die *Zona pellucida* allein nicht ausreicht, um die akrosomale Exocytose zu induzieren, sondern dass diese erst durch mechanosensorische Transduktionsmechanismen beim Penetrieren der *Zona pellucida* ausgelöst wird [Baibakov et al., 2007; Gahlay et al., 2010].

Trotz der elementaren funktionellen Relevanz der Akrosomreaktion für eine erfolgreiche Befruchtung konnten die molekularen Erkennungsmoleküle in der Spermienmembran, mit denen das Spermium die *Zona pellucida* detektiert, bisher nicht eindeutig identifiziert werden [Gupta et al., 2007; Florman et al., 2008; Hirohashi et al., 2008; Litscher et al., 2009]. Als solche „Zona-Rezeptoren“ des Spermiums kommen möglicherweise β -1,4-Galaktosyltransferase [Asano et al., 1997; Nixon et al., 2001], sp56 [Sinowatz et al., 1998], β -Mannosidase [Cornwall et al., 1991; Tulsiani et al., 1992] und Zonadhesin [Gao und Garbers, 1998] als Kandidaten in Betracht. Alternativ wird eine Hypothese diskutiert, nach der ein bislang nicht identifizierter GPCR im Spermium als Erkennungsmolekül der *Zona pellucida* fungiert [Florman et al., 1989; Evans und Florman, 2002]. In Studien an *Knockout*-Mäusen, die Gen-defizient für einzelne der potentiellen Zona-Rezeptoren sind, wurde bislang zumeist nur eine Einschränkung der Fertilität, aber keine vollständige Sterilität festgestellt [Okabe und Cummins, 2007], so dass an der Erkennung der *Zona pellucida in vivo* möglicherweise auch eine Kombination verschiedener Rezeptorproteine beteiligt sein könnte [van Gestel et al., 2007; Darszon et al., 2011].

Beim Kontakt des Spermiums mit der *Zona pellucida* wird die akrosomale Exocytose durch funktionell gekoppelte Signaltransduktionsprozesse und distinkte, sequentielle Ca^{2+} -Signale ausgelöst [Florman et al., 1989; Arnoult et al., 1996b; Rockwell und Storey, 2000; Florman et al., 2008; Darszon et al., 2011], deren Verlauf in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt ist.

Dabei soll die *Zona pellucida* durch einen bislang unbekannten GPCR detektiert werden, der ein *Pertussis*-Toxin sensitives G_i Protein aktiviert [Endo et al., 1988; Ward et al., 1994], welches u. a. eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes des Spermiums induziert [Florman et al., 1989; Arnoult et al., 1996a]. Zusätzlich erfolgt ein schneller, transients Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Aktuell wird kontrovers diskutiert, ob dieser erste kurze Ca^{2+} -Einstrom durch Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle (Ca_v) erfolgt [Ward et al., 1994; Arnoult et al., 1996a; Florman et al., 1998; Darszon et al., 2001; Breitbart, 2002a; Primakoff und Myles, 2002; Fukami et al., 2003; Lopez-Gonzalez et al., 2003; Escoffier et al., 2007] und/oder durch den CatSper [Xia

und Ren, 2009], der durch die intrazelluläre Alkalisierung aktiviert werden könnte [Kirichok et al., 2006], vermittelt wird [Florman et al., 2008; Darszon et al., 2011; Lishko et al., 2012].

Durch den aktivierten GPCR wird außerdem eine Phospholipase C aktiviert (PLC $\delta 4$), die durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) eine Erhöhung der cytosolischen Inositoltrisphosphat (IP_3)-Konzentration bewirkt [Roldan et al., 1994; Walensky und Snyder, 1995; Fukami et al., 2001; Fukami et al., 2003; Roldan und Shi, 2007]. Dieses IP_3 aktiviert den IP_3 -Rezeptor in der akrosomalen Membran, woraufhin Ca^{2+} aus dem Akrosom freigesetzt wird [Walensky und Snyder, 1995; De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2005] und es zu einem lang anhaltenden, langsamen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt [Florman et al., 2008]. Zum anderen kommt es, vermutlich durch einen Ca^{2+} -abhängigen Aktivierungsmechanismus von Vertretern der *transient receptor potential* (TRP) Ionenkanalfamilie (z. B. TRPC2) [Jungnickel et al., 2001], möglicherweise aber auch durch STIM/Orai-Kanäle zu einem zusätzlichen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle [O'Toole et al., 2000; Costello et al., 2009; Darszon et al., 2012].

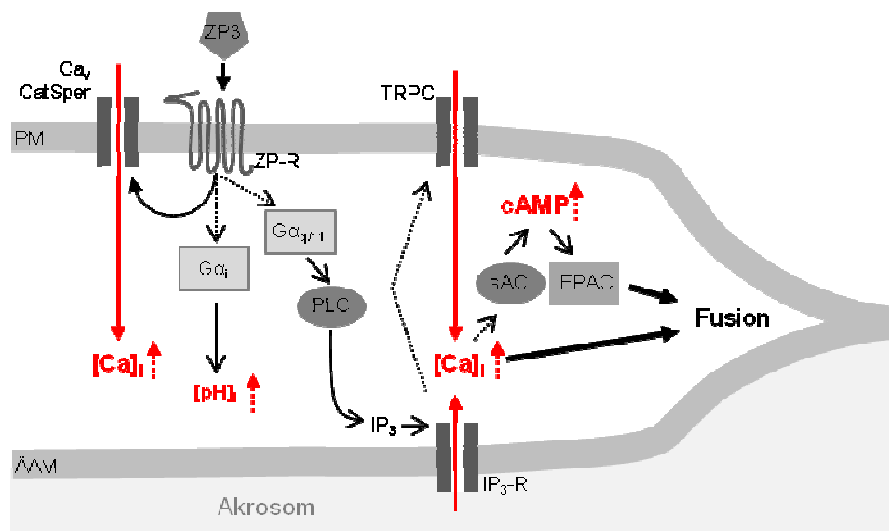


Abbildung 1.3: Molekularer Ablauf der Akrosomreaktion.

Die Bindung des ZP3-Proteins [ZP3] an einen bislang unbekannten Rezeptor [ZP-R] in der Plasmamembran [PM] des Spermiums induziert verschiedene sequentielle Signaltransduktionsprozesse, die eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes sowie der Ca^{2+} - und cAMP-Konzentration zur Folge haben (rot gekennzeichnet). Durch den Anstieg der intrazellulären cAMP- und Ca^{2+} -Spiegel wird schließlich die Fusion zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran [ÄAM] induziert. Zum genauen Ablauf der verschiedenen Ca^{2+} -Signale siehe Text.

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach der Zona-Bindung bewirkt außerdem eine Aktivierung der sAC [Litvin et al., 2003; Steegborn et al., 2005], woraus eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration der Spermienzelle resultiert. Das so generierte cAMP aktiviert anschließend das GEF-Protein (*guanine nucleotide exchange factor*) EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*), das im Zusammenspiel mit der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration die Exocytose des akrosomalen

Vesikels durch Ca^{2+} -abhängige SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Proteine vermittelt [Ramalho-Santos et al., 2002; Tomes et al., 2002; Tomes et al., 2005; Mayorga et al., 2007].

Durch die Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran kommt es zur Ausschüttung der akrosomalen, vorwiegend hydrolytischen Enzyme wie z. B. Akrosin [Adham et al., 1997; Tranter et al., 2000]. Diese freigesetzten Enzyme verdauen die *Zona pellucida* partiell und ermöglichen es dem Spermium somit, diese zu durchqueren. Durch die Exocytose kommt es außerdem zur Freilegung der inneren akrosomalen Membran, wodurch die Verschmelzung von Spermium und Eizelle ermöglicht wird [Monroy, 1985; Florman et al., 2008; Wassarman und Litscher, 2008a].

1.1.3 Zusammensetzung des luminalen Milieus im weiblichen Genitaltrakt

Die Tatsache, dass die vorangehend beschriebenen Prozesse u. a. durch Protonen, Bicarbonat und Progesteron im luminalen Milieu des weiblichen Genitaltrakts reguliert werden, macht deutlich, dass die Funktion von Spermien maßgeblich durch ihre extrazelluläre Umgebung beeinflusst wird [Suarez, 2007]. Um eine erfolgreiche Befruchtung zu ermöglichen, zeichnen sich deshalb sowohl der caudale Teil des Nebenhodens, in dem Spermien vor der Ejakulation gespeichert werden, als auch die verschiedenen Abschnitte des weiblichen Genitaltrakts durch eine charakteristische Zusammensetzung ihres luminalen Milieus aus.

So wird im caudalen Teil des Nebenhodens durch einen niedrigen pH-Wert von 5,5 - 6,8 [Acott und Carr, 1984; Carr und Acott, 1984; Shum et al., 2009], sehr niedrige Ca^{2+} - (0,2 mM) und Na^{+} -Konzentrationen (ca. 40 mM) [Levine und Marsh, 1971; Jenkins et al., 1980; Turner, 1991; Weissgerber et al., 2011] sowie eine geringe Bicarbonat-Konzentration (3 - 4 mM) [Levine und Marsh, 1971; Okamura et al., 1985] sichergestellt, dass die männlichen Keimzellen während der Speicherung in einem immotilen und inaktiven Zustand gehalten werden.

Wenn die Spermien bei der Ejakulation mit Seminalplasma vermischt werden und in den weiblichen Genitaltrakt gelangen, ändert sich die Zusammensetzung ihrer extrazellulären Umgebung deutlich (Abbildung 1.4). Durch den pH-Wert des Seminalplasmas ($\text{pH} = 6,7 - 7,4$) [Suarez und Pacey, 2006] wird der niedrige vaginale pH-Wert ($\text{pH} \approx 5$) nach der Ejakulation zunächst neutralisiert [Fox et al., 1973], wodurch der pH-Wert der Spermien ansteigt und diese motil werden. Im Cervixmucus liegt der pH-Wert dann sogar bei bis 8 - 9, während er im Oviduct ca. 7 beträgt [Maas et al., 1977; Qi et al., 2007]. Neben dem pH-Wert sind aber auch die Ca^{2+} - (ca. 2 mM) und Na^{+} -Konzentrationen (140 - 150 mM) und die Bicarbonat-Konzentration, die im Oviduct ca. 20 mM beträgt [Maas et al., 1977], im weiblichen Genitaltrakt deutlich höher [Mann, 1964; Borland et al., 1980], was sowohl für die aktive Bewegung der Spermien als auch für ihre Kapazitierung essentiell ist.

Außerdem kommen die männlichen Keimzellen im weiblichen Genitaltrakt mit verschiedenen Hormonen in Kontakt. Dazu gehört vor allem Progesteron, welches z. B. in follikulärer Flüssigkeit vorhanden ist und an chemotaktischen Prozessen beteiligt ist [Schuetz und Dubin, 1981; Westergaard et al., 1986; Osman et al., 1989; Frederick et al., 1991; Sun et al., 2005; Correia et al., 2007; Guidobaldi et al., 2008] und auch Östradiol [Westergaard et al., 1986; Frederick et al., 1991; Munuce et al., 2006], sowie verschiedene Prostaglandine (PGF2 α , PGE2 und PG-I2) [Schuetz und Dubin, 1981; Espey, 2006].

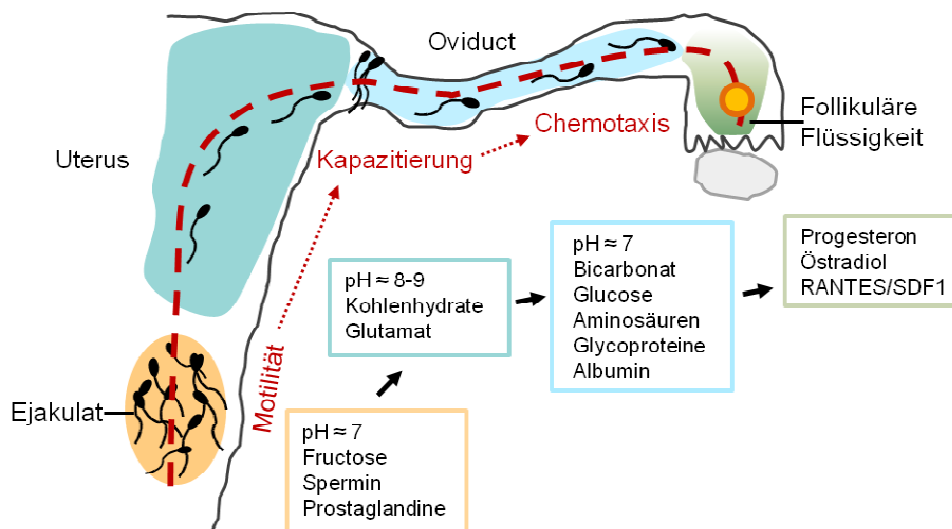


Abbildung 1.4: Übersicht über charakteristische Bestandteile des extrazellulären Milieus im weiblichen Genitaltrakt.

Gezeigt ist eine Übersicht über charakteristische Veränderungen im luminalen Milieu des weiblichen Genitaltrakts, denen Spermien auf ihrem Weg zur Eizelle begegnen (rote gestrichelte Linie) und die elementare Prozesse wie Motilität, Kapazitierung und Chemotaxis regulieren. Es sind die Bestandteile angegeben, die im jeweiligen Abschnitt des weiblichen Genitaltrakts ihre höchste Konzentration haben bzw. wichtige regulatorische Funktionen erfüllen. Zur Vereinfachung sind nur ausgewählte Komponenten des luminalen Milieus aufgeführt, zur detaillierten Erklärung siehe Text.

Im weiblichen Genitaltrakt befinden sich aber auch andere Stoffe, oftmals eher hydrophilen Charakters, die distinkte Konzentrationsgradienten ausbilden und somit ebenfalls an der Regulation einzelner Spermienfunktionen beteiligt sein könnten. So sind im Lumen des weiblichen Genitaltrakts und in follikulärer Flüssigkeit eine Vielzahl essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren gelöst [Harris et al., 2005; Jozwik et al., 2006]. Interessanterweise weist dabei Glutamat im Vergleich zu anderen nachgewiesenen Aminosäuren deutliche Unterschiede in seiner Konzentrationsverteilung auf: Während das Konzentrationsmaximum der meisten detektierten Aminosäuren im weiblichen Genitaltrakt im Bereich des Eileiter liegt, ist die Konzentration von Glutamat im Uterus am höchsten (Abbildung 1.4), nimmt dann aber im Verlauf des Eileiters bis zur Ampulle, wo sich das befruchtungsfähige Ei befindet, kontinuierlich ab [Harris et al., 2005].

Auch Kohlenhydrate und Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels, wie Glucose, Lactat und Pyruvat, konnten in follikulärer Flüssigkeit und im Eileiter in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden [Leese et al., 1981; Harris et al., 2005]. Dabei ist z. B. bei weiblichen Mäusen die Konzentration von Lactat und Pyruvat in follikulärer Flüssigkeit höher als im Oviduct und Uterus, während die Glucose-Konzentration im Oviduct doppelt so hoch ist wie in follikulärer Flüssigkeit [Harris et al., 2005].

Weitere potentielle Liganden, die einzelne Spermienfunktionen beeinflussen könnten, stellen diverse im Seminalplasma und im weiblichen Genitaltrakt nachgewiesene Moleküle dar, wie Endocannabinoide [Schuel und Burkman, 2005; Kirichok et al., 2006; El-Talatini et al., 2009], Katecholamine [Owman et al., 1986], Nucleoside [Fabiani und Ronquist, 1995; Schuh et al., 2006], sowie verschiedene Peptide und Proteine [Sundsfjord et al., 1989; Fraser et al., 2003; Suarez, 2008b; Aviles et al., 2010]. Trotz dieser erstaunlichen Vielzahl chemischer Substanzen, die in der unmittelbaren extrazellulären Umgebung von Spermien identifiziert wurden, sind die Erkennungsmoleküle auf der Spermienoberfläche, die diese verschiedenen pH-Werte, unterschiedliche Ionenkonzentrationen oder Gradienten von Hormonen, Aminosäuren und Zuckern detektieren können, bislang jedoch nur wenig verstanden. Ebenfalls unklar ist, welche Signaltransduktionsmoleküle daran beteiligt sein könnten, die Aktivierung dieser Sensorproteine in eine zelluläre Antwort umzusetzen und damit die Interaktion zwischen Spermien und dem weiblichen Genitaltrakt zu vermitteln, die für eine erfolgreiche Befruchtung essentiell ist.

1.2 Chemische Sinnesorgane

Der Detektion von chemischen Substanzen kommt vom Einzeller über Insekten, bis hin zu Säugern und schließlich dem Menschen eine zentrale Bedeutung zu. Säugetiere besitzen für diese elementare Aufgabe ganz unterschiedliche Sinnesorgane (Abbildung 1.5), die vielfältige Funktionen wie die Nahrungserkennung und -bewertung, die Orientierung in der Umwelt, die Wahrnehmung von Artgenossen und/oder Feinden, sowie die Steuerung von Partnerwahl und Sexualverhalten erfüllen.

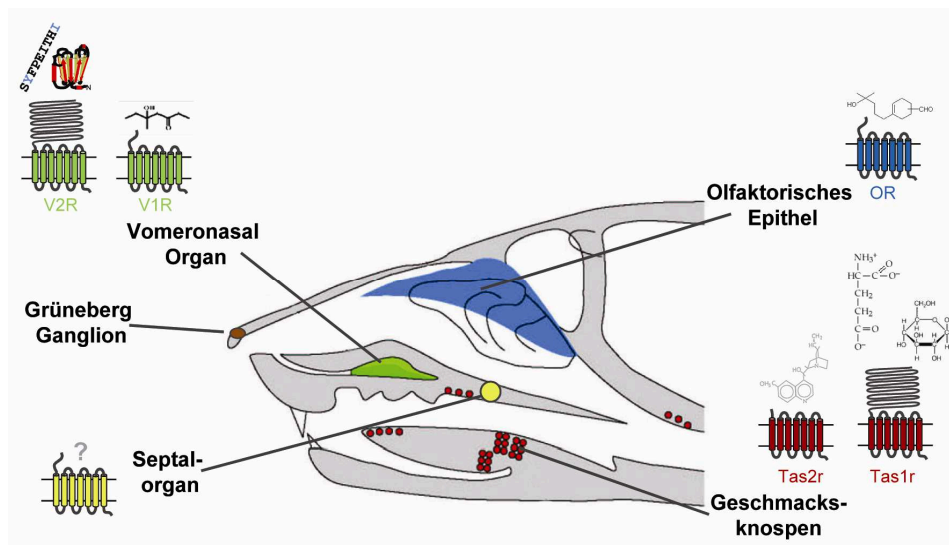


Abbildung 1.5: Übersicht über die chemosensorischen Organe einer Maus.

Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch den Kopf einer Maus. Farblich eingezeichnet sind die einzelnen chemosensorischen Organe mit den jeweils vorkommenden G Protein-gekoppelten Rezeptoren und möglichen Liganden. Modifiziert nach [Matsunami und Amrein, 2003].

Der Geschmackssinn übernimmt als ausgesprochener Nahsinn die Funktion, eine Qualitätsbeurteilung der inkorporierten Nahrung vorzunehmen. Die so genannten Geschmacksknospen, die auf der Zunge und auch im Rachenraum lokalisiert sind (Abbildung 1.5, rote Punkte), sind in der Lage, wasserlösliche Nahrungsbestandteile wie Zucker, Salze, Aminosäuren und Protonen zu erkennen; darüber hinaus werden auch bittere, meist giftige Geschmacksstoffe, die vorwiegend als lipophile Substanzen vorliegen, von Sinneszellen der Geschmacksknospen erkannt (siehe unten).

Der Geruchssinn ist hingegen ein typischer Fernsinn und dient der Wahrnehmung vornehmlich flüchtiger Substanzen in der Umgebung; diese flüchtigen Duftstoffe werden hauptsächlich durch chemosensorische Neurone im olfaktorischen Epithel der Nasenhöhle registriert (Abbildung 1.5, blaue Markierung). Bemerkenswerterweise besitzen die meisten terrestrisch lebenden Säuger darüber hinaus ein zusätzliches Geruchsorgan, das so genannte Vomeronasalorgan (VNO) (Abbildung 1.5, grüne Markierung), welches darauf spezialisiert ist, Signalmoleküle von Artgenossen (Pheromone) zu

detektieren. Deshalb wird diesem sensorischen System, ähnlich wie dem Septalorgan und dem Grüneberg Ganglion (Abbildung 1.5, gelbe bzw. braune Markierung), eine zentrale Funktion bei der intraspezies-spezifischen Kommunikation zugeschrieben (zur Übersicht siehe [Brennan, 2010] und [Ma, 2010]).

Obwohl sich die von den genannten Sinnesorganen detektierten Stoffe chemisch sehr unterscheiden, erfolgt die Erkennung in der Regel durch zwei unterschiedliche Familien von GPCRs, die sich vor allem in der Länge ihrer N-Termini unterscheiden. Die Bindung von lipophilen Substanzen, wie Duftstoffen, Bitterstoffen und manchen Pheromonen, erfolgt durch GPCRs, die sich durch eine relativ kurze N-terminale Domäne auszeichnen (Abbildung 1.5, *OR*, *Tas2r* bzw. *V1R*) [Mombaerts, 1999]. Wasserlösliche Liganden hingegen, wie beispielsweise MHC-Peptide mit Pheromoncharakter, Zucker, Aminosäuren oder auch süße Proteine, werden bevorzugt durch Vertreter der Familie C der GPCRs detektiert, wobei die Bindung der Liganden in diesen Fällen zumeist in der extrem langen N-terminalen Region stattfindet (Abbildung 1.5, *Tas1r*, *V2R*) [Pin et al., 2003].

1.2.1 Funktion des Geschmackssinns

Der Geschmackssinn dient der Detektion chemisch sehr unterschiedlicher Stoffe (siehe Abbildung 1.6) in unserer Nahrung, die die Geschmacksempfindungen süß, umami, salzig, bitter und sauer hervorrufen können [Yarmolinsky et al., 2009]. Seit kurzem wird zudem diskutiert, dass auch Fett eine eigene Geschmacksqualität darstellen könnte [Mattes, 2009]. Die Wahrnehmung dieser verschiedenen Geschmacksrichtungen dient der Identifizierung distinkter Nährstoffe, aber auch der Vermeidung der Inkorporation von toxischen bzw. unverdaulichen Substanzen in der Nahrung (zur Übersicht siehe [Chaudhari und Roper, 2010]) und stellt somit die Grundlage der qualitativen Bewertung von Nahrungsmitteln dar: So deuten der süße bzw. der umami-Geschmack von Kohlenhydrat- bzw. Protein-reicher Nahrung auf einen hohen Energiegehalt hin, während salzigen Substanzen eine Funktion zur Regulation des Elektrolythaushalts zugeschrieben wird. Ein bitterer oder saurer Geschmack wirkt hingegen überwiegend aversiv und warnt in der Regel vor toxischen Inhaltsstoffen bzw. schwer verdaulichen, unreifen oder gar verdorbenen Nahrungsmitteln [Chaudhari und Roper, 2010].

1.2.2 Geschmacksstoffe

Geschmacksstoffe, die durch die Sinneszellen der Zunge detektiert werden, repräsentieren biophysikalisch sehr diverse Substanzen, deren chemische Struktur in Abbildung 1.6 exemplarisch dargestellt ist. Zwei der Hauptgeschmacksempfindungen werden durch Ionen ausgelöst: Der Geschmacksempfindung „sauer“ liegt die Erkennung von Protonen in Säure-haltiger Nahrung zu Grunde, während der Geschmackseindruck „salzig“ durch die Detektion von Natriumsalzen, z. B. Kochsalz

(NaCl), aber auch anderer Salze wie z. B. Kaliumchlorid ausgelöst wird (Abbildung 1.6 [sauer] und [salzig]) [Lindemann, 1997; Lindemann, 2001].

Die größte, sehr diverse Gruppe von Geschmacks-aktiven Substanzen stellen die zumeist toxischen bitteren Geschmacksstoffe dar. Typische Vertreter sind dabei chemische Substanzgruppen wie Alkaloide, Amide, Glycoside, Ester, Flavone, Harnstoffverbindungen, Lactone, N-heterozyklische Verbindungen, Peptide, Phenole, Terpene aber auch einige Metallsalze wie z. B. Magnesiumsulfat, das landläufig als Bittersalz bekannt ist (Abbildung 1.6 [bitter]) [Barratt-Fornell und Drewnowski, 2002; Meyerhof, 2005]

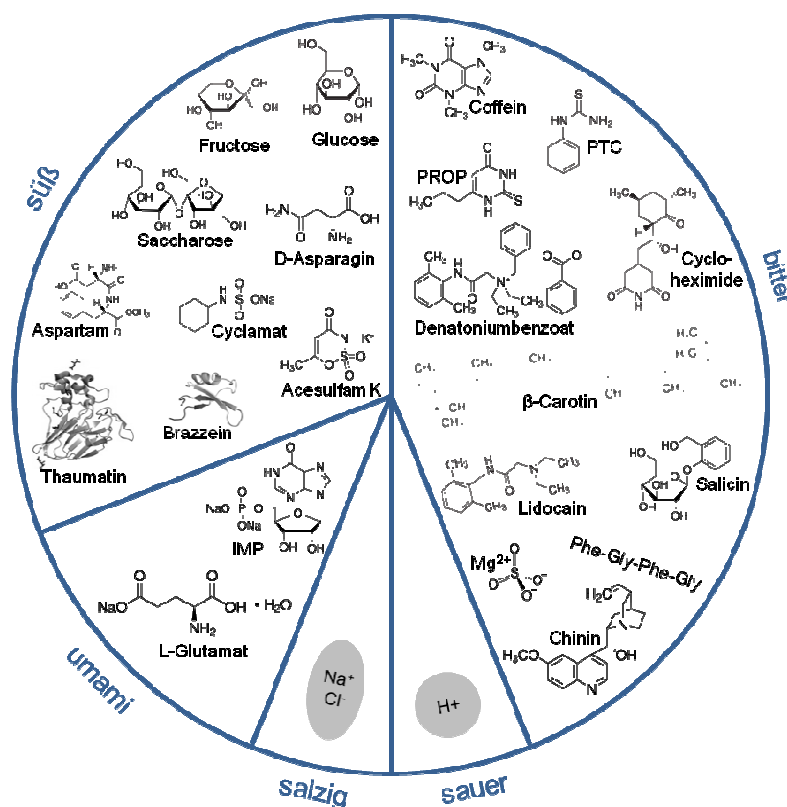


Abbildung 1.6: Typische Vertreter von Geschmacksstoffen der fünf Basisgeschmacksqualitäten süß, umami, salzig, sauer und bitter.

Dargestellt ist die chemische Struktur einer exemplarischen Auswahl typischer Geschmacksstoffe der fünf Basisgeschmacksqualitäten. Zur detaillierten Beschreibung siehe 1.2.2.

Als süß wahrgenommen werden hingegen verschiedene, meist stark hydrophile Substanzen wie Mono- und Disaccharide z. B. Glucose, Fructose, Saccharose, aber auch künstliche Süßstoffe wie Cyclamat, Saccharin, Acesulfam K und süß-schmeckende D-Aminosäuren (Abbildung 1.6, [süß]) [Li et al., 2002; Nelson et al., 2002]. Die Geschmacksempfindung „süß“ kann außerdem durch einige pflanzliche Proteine wie Thaumatin [van der Wel und Loeve, 1972], Brazzein [Ming und Hellekant, 1994], Monellin [Morris und Cagan, 1972] und Neoculin [Shimizu-Ibuka et al., 2006] ausgelöst werden (zur Übersicht über die chemische Struktur süßer Liganden siehe auch [Behrens et al., 2011]).

Der umami-Geschmack wird beim Menschen durch L-Glutamat hervorgerufen (Abbildung 1.6 [umami]) [Li et al., 2002]; Mäuse detektieren hingegen fast alle L-Aminosäuren als „umami“ [Nelson et al., 2002]. Interessanterweise wird die Wahrnehmung von L-Glutamat in Geschmackszellen der Zunge und auch in heterologen Expressionssystemen durch eine kombinatorische Gabe von 5′Ribonukleotiden wie Inosin-5′-monophosphat (IMP) oder Guanosin-5′-monophosphat (GMP), die in den verwendeten geringen Konzentrationen allein keine Geschmacksempfindung hervorrufen, stark potenziert (siehe auch 1.2.4.3) [Brand, 2000; Yamaguchi und Ninomiya, 2000; Li et al., 2002; Nelson et al., 2002; Beauchamp, 2009].

1.2.3 Anatomischer Aufbau des Geschmackssystems

Die Detektion von Geschmacksstoffen erfolgt in gustatorischen Sinneszellen, die vorwiegend auf der Zunge, aber auch am Gaumen und in der gesamten Mundhöhle zu finden sind. Die Sinneszellen der Zunge sind in Geschmackspapillen organisiert, die am Zungengrund (Wallpapille), am Zungenrand (Blätterpapille) oder über die gesamte Zungenoberfläche verteilt (Pilzpapillen) lokalisiert sind (Abbildung 1.7, [A]) [Hoon et al., 1999]. Ins Epithel dieser Geschmackspapillen eingebettet befinden sich einzelne, zwiebelartige Geschmacksknospen, die aus circa 100 Zellen zusammengesetzt sind, und in denen lang gestreckte Geschmackssinneszellen auszumachen sind (Abbildung 1.7 [B], gelbe, grüne und rote Zellen), die sich ca. alle 10 Tage aus rundlichen Basalzellen neu differenzieren (Abbildung 1.7 [B], graue Zellen) [Farbman, 1965].

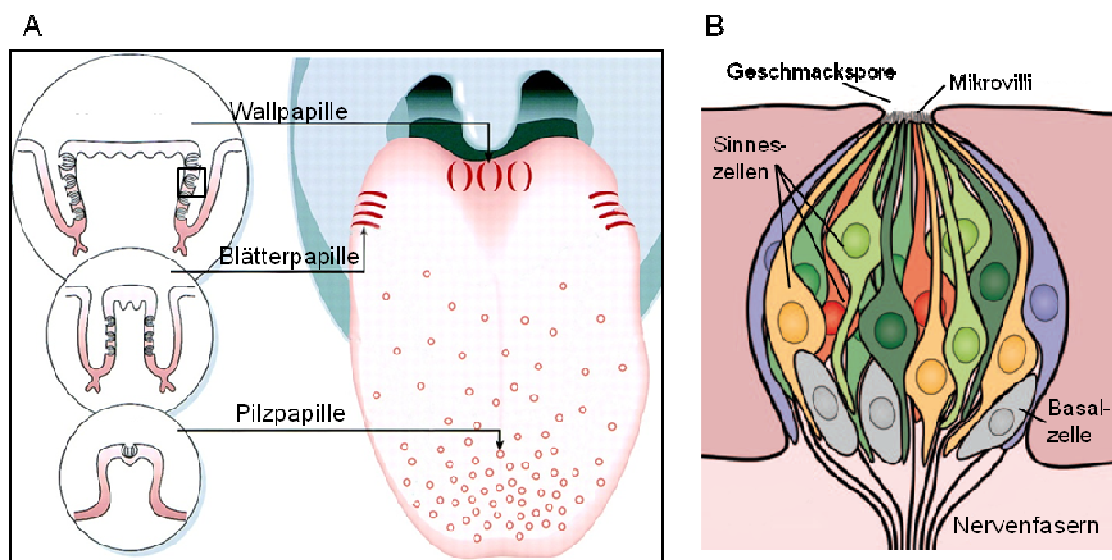


Abbildung 1.7: Übersicht über das Geschmackssystem der Zunge.

[A] zeigt eine schematische Übersicht über den Aufbau der Zunge und einzelner Geschmackspapillen.

[B] stellt eine einzelne Geschmacksknospe grafisch dar. Die Zellen innerhalb der Geschmackspore können morphologisch in verschiedene Typen unterteilt werden: Die Sinneszellen vom Typ I (gelb), Typ II (grün) und Typ III (rot), sowie Basalzellen (Typ 4, grau).

Modifiziert nach [Hoon et al., 1999] [A] bzw. [Behrens et al., 2011] [B].

Die eigentliche Wahrnehmung der Geschmacksstoffe auf der Zunge erfolgt mit Hilfe mikrovillärer Fortsätze, die am apikalen Fortsatz der gustatorischen Sinneszellen lokalisiert sind. In kleinen Büscheln konzentriert, münden diese Mikrovilli in die Geschmackspore und erreichen so die Zungenoberfläche und damit die auf der Zunge befindlichen Geschmacksstoffe.

1.2.4 Geschmacksrezeptormoleküle

1.2.4.1 Salzig

In Typ I Zellen der Geschmacksknospen (Abbildung 1.7 [B], gelbe Zellen) erfolgt die Wahrnehmung von Natriumchlorid [Vandenbeuch et al., 2008]. An der Detektion soll ein Amilorid-sensitiver Natrium-Kanal (epithelialer Natrium-Kanal [ENaC]) beteiligt sein (Abbildung 1.8 [A]), durch den Natrium-Ionen der Nahrung in die Zelle strömen und diese dann direkt depolarisieren [Heck et al., 1984; Lin et al., 1999; Lindemann, 2001]. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen an ENaC-defizienten Mäusen, die Einschränkungen in ihrer Salzwahrnehmung zeigen, unterstützt [Chandrashekar et al., 2010]. Die Beteiligung eines TRPV-Kanals (*transient receptor potential, vanilloid family*), des TRPV1, an der Salzdetektion wird zusätzlich diskutiert [Lyll et al., 2004]. Die Relevanz dieses Kanalproteins ist allerdings unklar, da eine TRPV1-Deletion bei Mäusen nur geringe Effekte auf die Salzwahrnehmung zeigt [Ruiz et al., 2006; Treesukosol et al., 2007].

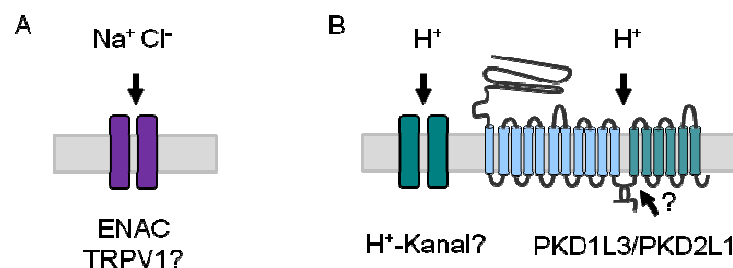


Abbildung 1.8: Potentielle Rezeptormoleküle der Geschmacksqualitäten „salzig“ und „sauer“.

[A] Der salzige Geschmack von Natriumchlorid wird wahrscheinlich durch einen ENaC vermittelt; eventuell könnte auch der TRPV1 an der Detektion von Na⁺ beteiligt sein.

[B] Säure-haltige Nahrung führt zu einem Einstrom von Protonen durch einen bislang noch nicht identifizierten Ionenkanal oder Transporter [*H⁺-Kanal*]. Außerdem könnte ein Dimer aus PKD1L3 und PKD2L1 an der Detektion saurer Substanzen beteiligt sein.

1.2.4.2 Sauer

Saure Geschmacksstoffe werden in Typ III Geschmackszellen (Abbildung 1.7 [B], rote Zellen) detektiert [Tomchik et al., 2007]. Kürzlich konnten Hinweise darauf erbracht werden, dass Mitglieder der PKD-Familie (*Polycystic kidney disease*), die in diesen Zellen exprimiert werden, an der Detektion von Protonen beteiligt sein könnten [Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; LopezJimenez et al., 2006]: In Geschmackszellen, die Heterodimere aus den Subtypen PKD1L3 und PKD2L1 exprimieren (Abbildung 1.8

[B]), führt der Kontakt mit Säuren zu einer Depolarisation der innervierenden Geschmacksnerven [Kataoka et al., 2008; Ishimaru und Matsunami, 2009; Horio et al., 2011]. Im heterologen Expressionssystem konnte ebenfalls eine Aktivierung des PKD1L3/PKD2L1 Dimers durch Protonen gezeigt werden [Ishimaru et al., 2006]. Allerdings können PKD1L3- und PKD2L1-defiziente Mäuse weiterhin saure Substanzen schmecken [Nelson et al., 2010] und zeigen nur eine leicht reduzierte Antwort auf saure Geschmacksstoffe [Horio et al., 2011]. Eine alleinige Erkennung saurer Substanzen durch das PKD-Dimer erscheint somit unwahrscheinlich.

Als Kandidaten für die Detektion von Protonen werden auch ASIC-Kanäle (*acid-sensing ion channels*) [Lindemann, 1996; Liu und Simon, 2001] und *two pore domain* Kalium-Kanäle, wie z. B. TASK-2, die durch intrazelluläre Ansäuerung moduliert werden [Lin et al., 2004; Richter et al., 2004; Shimada et al., 2006], diskutiert.

Neuere elektrophysiologische Studien konnten hingegen belegen, dass bei Stimulation mit Säuren ein Einstrom von Protonen durch die apikale Membran von Sauerdetektierenden Zellen erfolgt. Dieser depolarisierende Protonenstrom, der durch Zink-Ionen blockierbar ist, soll dann durch Aktivierung spannungsabhängiger Kationenkanäle direkt ein Aktionspotential generieren können [Chang et al., 2010]. Die Identität des Kanals oder Transporters, der diesen direkten Protonen-Einstrom in die Zelle ermöglicht und für die Wahrnehmung saurer Substanzen elementar zu sein scheint, ist bislang aber unbekannt (siehe Abbildung 1.8 [B]) [Chang et al., 2010].

1.2.4.3 Geschmacksrezeptoren für „süß“, „umami“ und „bitter“

Während die Signaltransduktion von Salz- und Sauerreizen über apikal lokalisierte Ionenkanäle vermittelt wird (siehe oben, Abschnitte 1.2.4.1 und 1.2.4.2), erfolgt die Detektion von Süß- und Bitterstoffen sowie „umami“ durch GPCRs [Chandrashekar et al., 2000; Li et al., 2002; Nelson et al., 2002]. Die Rezeptoren und ihre G Proteingekoppelten Reaktionskaskaden werden in Typ II Zellen exprimiert (Abbildung 1.7 [B], grüne Zellen), welche deshalb auch als Rezeptorzellen bezeichnet werden [Chaudhari und Roper, 2010]. Die gustatorischen GPCRs (s. Abbildung 1.9) lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Tas1-Rezeptoren, die für die Detektion der Geschmacksqualitäten süß und umami verantwortlich sind, und Tas2-Rezeptoren, die bittere Geschmacksstoffe erkennen [Li et al., 2002; Montmayeur und Matsunami, 2002] (s. auch Abbildung 1.9).

Die Familie der Tas1-Rezeptoren, die aus den drei Rezeptorproteinen Tas1r1, Tas1r2 und Tas1r3 besteht, gehört in die Superfamilie der Klasse C der GPCRs [Max et al., 2001; Pin et al., 2003], die funktionelle Dimere bilden und ihre Liganden in der Venus-Fliegenfallen-Struktur (*venus flytrap* [VFT]) ihres N-Terminus binden (Abbildung 1.9 [A] und [B]) [Pin et al., 2004; Kniazeff et al., 2011].

Für die Detektion süßer Geschmacksstoffe ist ein heteromeres Dimer aus dem Tas1r2 und dem Tas1r3 Protein verantwortlich [Morris und Cagan, 1972; Ming und Hellekant, 1994; Kitagawa et al., 2001; Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Nelson et al., 2001; Li et al., 2002; Nelson et al., 2002; Jiang et al., 2004; Xu et al., 2004; Shimizu-Ibuka et al., 2006]. Die Erkennung von Zuckern und einigen künstlichen Süßstoffen

(z. B. Aspartam) durch dieses Dimer erfolgt, wie für Klasse C Rezeptoren üblich [Kniazeff et al., 2011], durch das VFT-Modul der Rezeptoren [Nie et al., 2005; Koizumi et al., 2007]. Andere süße Geschmacksstoffe werden hingegen in der Linker-region des N-Terminus (Brazzein) oder in der Transmembranregion des Rezeptordimers gebunden [Jiang et al., 2004; Xu et al., 2004; Cui et al., 2006; Temussi, 2009]. Lactisol, das die Erkennung süßer Geschmacksstoffe am humanen Rezeptordimer inhibieren kann, interagiert ebenfalls mit den Transmembrandomänen des Tas1r3 Proteins [Xu et al., 2004].

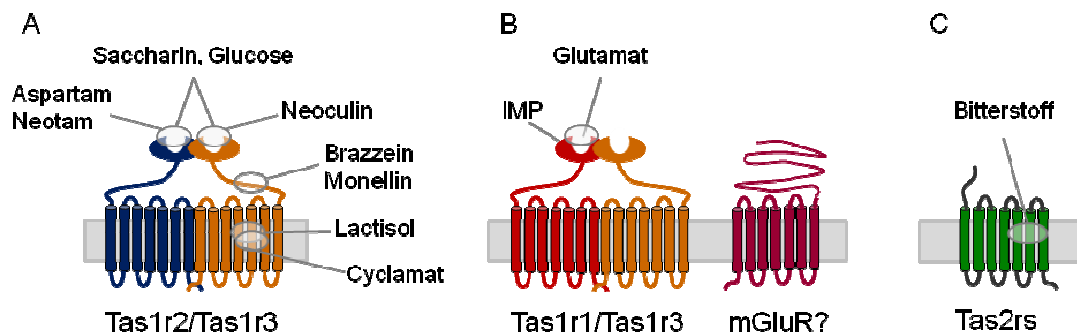


Abbildung 1.9: Schematische Übersicht über G Protein-gekoppelte Geschmacksrezeptoren und ihre möglichen Ligandenbindungsstellen.

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über Rezeptormoleküle der Zunge für süße [A], umami [B] und bittere Stimuli [C]. In diese Übersicht sind nachgewiesene und vermutete Bindungsstellen typischer Liganden eingezeichnet (modifiziert nach [Zhang et al., 2008] und [Behrens et al., 2011]).

An der Geschmacksempfindung umami ist ein Heterodimer aus dem Tas1r1 und Tas1r3 Rezeptor beteiligt, das L-Aminosäuren, wie z. B. L-Glutamat, in seiner VFT-Struktur binden kann [Li et al., 2002; Nelson et al., 2002]. Die Erkennung von Glutamat wird dabei durch IMP bzw. GMP potenziert [Nelson et al., 2002] (s. o.). Dieser positive synergistische Effekt von IMP ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass IMP an eine andere Bindestelle des VFT-Motivs bindet als Glutamat. Dabei soll IMP die geschlossene, aktive Konformation der „Venus-Fliegenfalle“, die durch die Bindung von Glutamat entsteht, stabilisieren und somit als positiver allosterischer Modulator wirken (Abbildung 1.9 [B]) [Zhang et al., 2008]. Ein solcher allosterischer Mechanismus wird auch für den Süßrezeptor [Servant et al., 2010] und andere Klasse C GPCRs diskutiert: So kann z. B. die Affinität des GABA_B Rezeptors für GABA durch Ca²⁺ erhöht werden [Galvez et al., 2000; Jensen et al., 2001] und die Sensitivität des *Calcium-sensing* Rezeptors (CaSR) gegenüber seinem Liganden Ca²⁺ wird durch aromatische Aminosäuren potenziert [Conigrave et al., 2000].

Beobachtungen, dass die Erkennung von Glutamat in Tas1r3-defizienten Mäusen nicht vollständig unterbleibt [Damak et al., 2003], führten zu der Hypothese, dass neben dem Tas1r1/Tas1r3 Dimer noch weitere Rezeptorproteine an der Wahrnehmung von Umami-Stimuli beteiligt sind [Maruyama et al., 2006; Yasumatsu et al., 2009]. Dabei könnte es sich um, möglicherweise geschmacksspezifische, metabotrope Glutamatrezeptoren

handeln (mGluRs) [Lin und Kinnamon, 1999; Chaudhari et al., 2000; Toyono et al., 2002; San Gabriel et al., 2009].

Im Gegensatz zu Tas1-Rezeptoren weisen Tas2-Rezeptoren, die die Erkennungsmoleküle für bittere Geschmacksstoffe [Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Bufe et al., 2002; Shi et al., 2003; Meyerhof, 2005] repräsentieren, nur eine kurze N-terminale Domäne auf (Abbildung 1.9 [C]), so dass die Ligandenbindung wahrscheinlich durch Wechselwirkungen mit den Transmembrandomänen erfolgt (Abbildung 1.9 [C]) [Mombaerts, 1999; Floriano et al., 2006; Biarnes et al., 2010; Brockhoff et al., 2010; Slack et al., 2010].

Für die meisten der 25 funktionellen humanen Tas2-Rezeptoren [Wu et al., 2005] konnte bereits mindestens ein aktivierender Ligand identifiziert werden. Bei diesen Untersuchungen zur Deorphanisierung wurde deutlich, dass einige der humanen Tas2-Rezeptoren nur durch sehr wenige Bitterstoffe (2 - 4) aktiviert werden, während andere Tas2-Rezeptoren ein sehr viel breiteres Ligandenspektrum aufweisen [Meyerhof et al., 2010]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein Bitterstoff auch mehrere Tas2-Rezeptoren aktivieren kann. Die Co-Expression von 4 - 11 verschiedenen Rezeptoren in einer Zelle [Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Behrens et al., 2007] und die teils größeren Ligandenspektren der Rezeptoren ermöglichen demnach die Detektion einer enormen Vielfalt potentiell toxischer Substanzen [Drayna, 2005; Chaudhari und Roper, 2010]. Zusätzliche Variabilität in der Erkennung von Bittersubstanzen ergibt sich durch, bei Tas2-Rezeptoren häufig vorkommende, Polymorphismen [Drayna, 2005], die sich beim Menschen z. B. in der sehr unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber dem Bitterstoff Phenylthiocarbamid (PTC) widerspiegeln [Kim et al., 2003b; Bufe et al., 2005].

1.2.4.4 Signaltransduktion von Tas1- und Tas2-Rezeptoren

Obwohl die Rezeptoren der unterschiedlichen Geschmacksqualitäten in voneinander distinkten Zellpopulationen exprimiert werden [Nelson et al., 2001], weist die Signaltransduktion der Tas1- und Tas2-Rezeptoren große Ähnlichkeit auf [Zhang et al., 2003]. Die GPCRs aktivieren ein spezifisches trimeres G-Protein, das sich aus einer α -Untereinheit, zumeist α -Gustducin [McLaughlin et al., 1992; Wong et al., 1996], und den Untereinheiten β_3 und γ_{13} bzw. β_1 und γ_{13} [Rossler et al., 2000; Huang et al., 2003] zusammensetzt. An der Signaltransduktion können aber auch andere α -Untereinheiten, wie α -Transducin [Ruiz-Avila et al., 1995; He et al., 2004], $G_{\alpha 14}$ [Tizzano et al., 2008] und andere Vertreter der $G_{\alpha i/o}$ Proteinfamilie beteiligt sein [Kusakabe et al., 1998; Caicedo et al., 2003; Kim et al., 2003a; Sainz et al., 2007; Stone et al., 2007; Tizzano et al., 2008].

In der konservierten Signaltransduktionskaskade (Abbildung 1.10) kommt es nach Bindung eines Liganden an die Geschmacksrezeptoren zu einem Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit und damit zu deren Aktivierung und Dissoziation vom $\beta\gamma$ -Komplex. Dieser $\beta\gamma$ -Komplex aktiviert eine Phospholipase C β 2 (PLC) [Rossler et

al., 1998], die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet und über eine Aktivierung des IP_3 -Rezeptors zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Cytosol führt [Clapp et al., 2001; Miyoshi et al., 2001; Hisatsune et al., 2007; Roper, 2007]. Diese Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultiert in einer Aktivierung des TRPM5 (*transient receptor potential, melastatin family member 5*)-Kanals, der einen Einstrom von Kationen und damit die Depolarisation der Zelle vermittelt [Perez et al., 2002; Hofmann et al., 2003; Liu und Liman, 2003; Prawitt et al., 2003; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2007b]. In Folge des Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Zelldepolarisation wird Adenosin-5'-triphosphat (ATP), das vermutlich als Transmitter wirkt, durch Pannexin-Hemikanäle freigesetzt [Huang et al., 2007; Romanov et al., 2007; Huang und Roper, 2010; Murata et al., 2010].

Die dissoziierte α -Untereinheit Gustducin kann parallel dazu eine Phosphodiesterase (PDE) aktivieren und so den Abbau von zyklischen Nucleotiden induzieren (Abbildung 1.10) [Clapp et al., 2001; Clapp et al., 2008]. Zusätzlich wird auch eine Beteiligung von $G_{\alpha i}$ Proteinen an einer solchen Verminderung des intrazellulären cAMP-Gehaltes in Geschmackssinneszellen diskutiert [Abaffy et al., 2003; Ozeck et al., 2004; Trubey et al., 2006; Kinnamon und Vandenbeuch, 2009].

Da cAMP über eine Aktivierung von PKA zur Phosphorylierung und damit Inhibierung der $\text{PLC}\beta 2$ [Liu und Simon, 1996] und des IP_3 -Rezeptor [Giovannucci et al., 2000] führen kann, wird spekuliert, dass eine solche Reduzierung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch α -Gustducin daran beteiligt sein könnte, ein optimales Ca^{2+} -Signal beim Erkennen eines Liganden durch die Zelle zu gewährleisten bzw. die Signaltransduktion nach einer solchen Erkennung schnell wieder abzuschalten [Clapp et al., 2008; Kinnamon und Vandenbeuch, 2009].

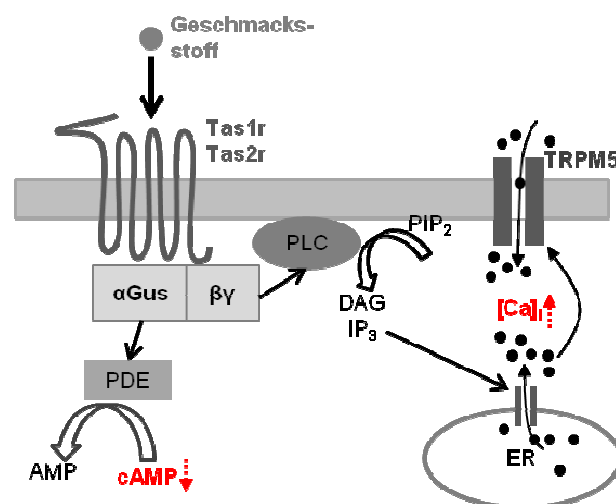


Abbildung 1.10: Modell der Signaltransduktion von Tas1- und Tas2-Rezeptoren in Zungengewebe.

Die Bindung eines Liganden an einen Geschmacksrezeptor [*Tas1r* bzw. *Tas2r*] resultiert in einer Aktivierung des heterotrimeren G Proteins, woraufhin α -Gustducin [α -Gus] vom $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert und zur Stimulation einer Phosphodiesterase [PDE] führt, die cAMP zu AMP hydrolysiert. Der gleichzeitig freigesetzte $\beta\gamma$ -Komplex aktiviert eine Phospholipase C [PLC], die PIP_2 spaltet, so dass die beiden *second*

messenger IP_3 [IP_3] und DAG [DAG] entstehen. IP_3 bewirkt eine Aktivierung des IP_3 -Rezeptors in der Membran des endoplasmatischen Retikulums [ER], wodurch es zu einem Einstrom von Calcium-Ionen [Ca^{2+}] ins Cytoplasma kommt. Durch eine anschließende Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung des TRPM5-Ionenkanals [TRPM5] kommt es im Folgenden zum Einstrom von Natrium-Ionen und so zur Depolarisation der Zelle. Modifiziert nach [Clapp et al., 2001].

1.2.4.5 Extra-orale Expression von Geschmacksrezeptoren und assoziierten Signaltransduktionskomponenten

Umfangreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass sich G Protein-gekoppelte Geschmacksrezeptoren und ihre Signaltransduktionsmoleküle nicht nur durch eine Expression in Geschmackssinneszellen der Zunge und der Mundhöhle, in denen sie ursprünglich entdeckt wurden, auszeichnen, sondern auch in chemosensorischen Zellen anderer Organe zu finden sind.

Eine solche extra-orale Expression von Geschmacksrezeptoren wurde im Gastrointestinaltrakt sowohl für Mitglieder der Tas1r- als auch der Tas2r-Familie nachgewiesen [Rozengurt, 2006]. So werden Tas1-Rezeptoren beispielsweise in chemosensorischen Zellen der Schleimhaut des Dünndarms [Dyer et al., 2005; Rozengurt et al., 2006; Jang et al., 2007; Mace et al., 2007; Margolskee et al., 2007], aber auch im Magen und Dickdarm [Bezencon et al., 2007] exprimiert; für Tas2-Rezeptoren wurde bisher lediglich eine Expression im Darm beobachtet [Wu et al., 2002; Rozengurt et al., 2006; Jeon et al., 2008; Janssen et al., 2011].

Auch Geschmacksrezeptor-assoziierte Signaltransduktionsmoleküle konnten in sensorischen Zellen des Magens und des Dünndarms nachgewiesen werden, wie z. B. α -Gustducin [Wattel und Geuze, 1978; Trier et al., 1987; Hofer und Drenckhahn, 1992; Hofer et al., 1996; Hass et al., 2007; Sutherland et al., 2007; Hass et al., 2010], aber auch PLC β 2 und der TRPM5 Ionenkanal [Bezencon et al., 2007; Kaske et al., 2007; Widmayer et al., 2011].

Die funktionelle Rolle dieser Vielzahl „gustatorischer“ Markerproteine im Gastrointestinaltrakt wird jedoch erst langsam verstanden. So wird diskutiert, dass Tas1-Rezeptoren in enteroendokrinen Zellen des Verdauungssystems als Glucose-Sensoren fungieren, die nach einer Aktivierung über assoziierte gustatorische Signaltransduktionsmoleküle die Freisetzung von Hormonen wie GLP-1 (*glucagon-like peptide*) und GIP (*glucose-dependent insulinotropic peptide*) regulieren könnten [Jang et al., 2007; Margolskee et al., 2007; Kokrashvili et al., 2009b]. Außerdem wird spekuliert, dass diese Geschmacksrezeptoren nach Bindung von Glucose auch direkt die apikale Glucose-Absorption von Zellen stimulieren könnten [Mace et al., 2007; Mace et al., 2009].

Die extra-orale Expression von Geschmacksrezeptoren ist allerdings nicht auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt. So konnten Mitglieder der Tas1 und Tas2-Rezeptorfamilien und ihrer Signaltransduktionskomponenten auch in chemosensorischen Zellen der Atemwege und der Lunge nachgewiesen werden [Finger et al., 2003; Sbarbati et al., 2004; Gulbransen und Finger, 2005; Kaske et al., 2007; Lin et al., 2008; Ohmoto et al., 2008; Tizzano et al., 2011]. In glatten Muskelzellen der Atemwege, die Tas2-

Rezeptoren exprimieren, konnte zudem kürzlich gezeigt werden, dass eine Stimulation mit Bitterrezeptoragonisten wie Chinin, Denatoniumbenzoat und Chloroquin zu einer Bronchodilatation führt [Deshpande et al., 2010]. Eine Expression von Tas1- und Tas2-Rezeptoren kommt zudem auch im Gehirn vor [Ren et al., 2009; Singh et al., 2011]. Dabei wurden Tas1-Rezeptoren u. a. auch im Hypothalamus nachgewiesen [Ren et al., 2009], einem Teil des Gehirns, der nicht nur an der Kontrolle des Glucose-Haushalts beteiligt ist, sondern dem auch eine zentrale Rolle bei der hormonellen Kontrolle der Spermio-genese im Hoden zukommt [Krsmanovic et al., 2009].

Interessanterweise konnten kürzlich auch Hinweise auf eine Expression von Geschmacksrezeptoren in männlichen Keimzellen gesammelt werden. So wurden mRNA-Transkripte des Tas1r3 in Hodengewebe nachgewiesen [Max et al., 2001; Kiuchi et al., 2006]; und auch für den Tas1r2 konnten durch LacZ-Färbungen an Hodengewebe einer transgenen Tas1r2 LacZ-Mauslinie Belege für eine Expression in Spermatogonien bzw. primären Spermatocyten gesammelt werden [Iwatsuki et al., 2010]. Ebenfalls mit Hilfe transgener Mauslinien konnte die Expression des Bitterrezeptors Tas2r105 im murinen Hoden gezeigt werden. Zusätzlich zu diesen Nachweisen von RNA-Transkripten oder der Promotoraktivität von Geschmacksrezeptorgenen im Hoden durch andere Arbeitsgruppen, konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit mit Hilfe verschiedener Antikörper gegen unterschiedliche Geschmacksrezeptoren zudem erste experimentelle Hinweise dafür sammeln, dass das Tas1r3 Rezeptorprotein auch in reifen murinen und humanen Spermien exprimiert wird (Diplomarbeit Dorke Meyer, 2006, Philipps-Universität Marburg). Diese Befunde deuten insgesamt darauf hin, dass Geschmacksrezeptoren auch in Spermien, ähnlich wie in anderen extra-oralen Geweben, funktionell an der Detektion chemosensorischer Stimuli beteiligt sein könnten.

1.3 Zielsetzung

Für die Aktivierung von Spermien und die Regulation der verschiedenen Aufgaben, die männliche Keimzellen bis zur eigentlichen Verschmelzung mit der Eizelle bewältigen müssen, ist das luminale Milieu des weiblichen Genitaltrakts, welches sich durch eine Vielzahl chemisch sehr diverser Liganden auszeichnet, essentiell. Doch trotz der elementaren Bedeutung der Wahrnehmung dieser extrazellulären Umgebung in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts sind die beteiligten Erkennungsmoleküle auf der Spermienoberfläche und assoziierte Signaltransduktionskomponenten, die diese chemosensorischen Leistungen in eine distinkte zelluläre Antwort übersetzen, bislang nur wenig verstanden.

Interessanterweise werden chemosensorische Rezeptormoleküle des Geschmackssystems nicht nur in Sinneszellen der Zunge, sondern in einer Vielzahl sensorischer Zellen in ganz unterschiedlichen extra-oralen Geweben exprimiert, wo sie bislang zumeist nicht näher geklärte chemosensorische Aufgaben erfüllen. Aufgrund ihres breiten Ligandenspektrums, das nicht nur die Perzeption chemisch sehr diverser Stoffe ermöglicht, sondern sich auch partiell mit den von Spermien wahrzunehmenden Liganden deckt, wie z. B. Zuckern, Aminosäuren, Proteinen und Änderungen im pH-Wert, kommen diese Rezeptoren als vielversprechende Kandidaten für die Detektion von Liganden im wässrigen Milieu des weiblichen Genitaltrakts in Betracht. Diese These scheint auch deshalb ein interessanter Ansatz zu sein, da die Aktivierung dieser Rezeptoren in Geschmackszellen zur Generierung von intrazellulären Botenstoffen wie cAMP und Ca^{2+} führt, zwei essentiellen Regulatoren der sekundären Reifung, Hyperaktivierung, Wegfindung und Akrosomreaktion von Spermien.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer, biochemischer und zellbiologischer Methoden geprüft werden, ob Rezeptormoleküle des Geschmackssystems, wie GPCRs der Tas1- und Tas2-Familie, assoziierte Signaltransduktionsmoleküle wie α -Gustducin, sowie potentielle Protonendetektoren der Zunge (PKD2L1/PKD1L3) in männlichem murinem Keimdrüsengewebe und in reifen Spermien der Maus und des Menschen exprimiert werden.

Um Hinweise auf die Funktion dieser Geschmacksrezeptoren in männlichen Keimzellen zu erhalten, sollten Stimulierungsexperimente an isolierten Mausspermien durchgeführt werden. Dabei sollte u. a. geprüft werden, ob eine Stimulation mit Geschmacksstoffen zu einer Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von cAMP und Ca^{2+} führen kann, um so eine funktionelle Rolle z. B. bei der Wegfindung oder der Akrosomreaktion aufzudecken. Eine Beteiligung der Rezeptoren am Prozess der akrosomalen Exocytose sollte in experimentellen Ansätzen überprüft werden, in denen die Auswirkungen einer Inkubation mit bekannten Geschmacksstoffen auf die Effizienz der Akrosomreaktion erfasst werden sollte.

Parallel zu diesen funktionellen Nachweisen der Geschmacksrezeptor-Expression in Spermien sollten Mausmodelle analysiert werden, die Gen-defizient für den umami-Rezeptor (Tas1r1) bzw. einen Bitterrezeptor (Tas2r131) sind. Da in diesen Mausmodellen eine Promotoraktivität der jeweiligen Geschmacksrezeptorgene die Expression fluoreszierender Proteine wie mCherry bzw. GFP induziert, sollten diese Tiere zunächst genutzt werden, um die Expression dieser beiden Geschmacksrezeptoren im männlichen Reproduktionsgewebe zu bestätigen. Um einen Einblick in die physiologische Funktion dieser ausgewählten Rezeptoren in Spermien zu erhalten, sollten die *Knockin*-Mäuse anschließend bezüglich ihres Reproduktionserfolges, aber auch in Hinblick auf distinkte Spermienfunktionen wie Motilität, Kapazisierung und Akrosomreaktion analysiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Acesulfam K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agar-Agar	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Calbiochem, über Merck, Darmstadt
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin-Natrium-Salz	Applichem, Darmstadt
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bouin-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Fermentas, St. Leon-Rot
Calcium-Ionophor A23187	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassieblau G250	Serva, Heidelberg
Denatoniumbenzoat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
desoxy-Nukleotid-5'-triphosphat (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dokumol Entwickler	Tetenal, Norderstedt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica, Nussloch
Eindeckmedium (Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium)	Dako Cytomation, Hamburg
Eosin Y-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Eukitt Eindeckmedium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Euparal	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching (Österreich)
Formalin	Carl Roth, Karlsruhe
Fura-2-AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hämalaun-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	DIFCO, Heidelberg
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Inosin 5'-monophosphat (IMP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropyl-thio-galactosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Lactat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Laminin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mononatriumglutamat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
normales Ziegen血清 (NGS)	Invitrogen, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Para-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehydlösung, 16 %	Science Services, München
Paraplast Plus	Carl Roth, Karlsruhe
Perchlorsäure (PCA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Percoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pluronic F-127 (10 % in H ₂ O)	Molecular Probes, Eugene (USA)
<i>Peanut agglutinin</i> (PNA), Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Peanut agglutinin</i> (PNA), Tetramethyl- rhodamin-isothiocyanat (TRITC)- gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S-Lösung mit 3 % Trichlorsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Bad Soden
Protease Inhibitor <i>Complete</i>	Roche, Mannheim
Proteinase K (recombinant, PCR Grade)	Roche, Mannheim
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNAse A (Typ II-A; R-5000)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Roti Blue-Färbelösung	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sigmacote	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TAPS (C ₇ H ₁₇ NO ₆ S)	Riedel-de Haen, Seelze
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
Thaumatococcus	E. Tareilus, Unilever, Rotterdam, (Niederlande)
TO-PRO-3	Invitrogen, Karlsruhe
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TriFast	Peqlab, Erlangen
Trioctylamin	VWR, Ismaning
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth, Karlsruhe, und Sigma-Aldrich, Deisenhofen, bezogen.

2.2 Enzyme, Kits und Größenstandards

<i>Artikel</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Amplex Red Cholesterol Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>cAMP EIA Kit</i> (RPN2251)	GE Healthcare, München
DNA-Größenstandard (100 bp und 1 kbp)	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase A	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Dream Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Klonierungskit (pGEM-T)	Promega, Mannheim

<i>Artikel</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Nucleobond AX-100</i>	Macherey Nagel, Düren
<i>NucleoSpin DNA-Säulen</i>	Macherey Nagel, Düren
<i>NucleoSpin RNA II</i>	Macherey Nagel, Düren
Proteingrößenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
<i>SuperScript III First-Strand Synthesis Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Testosteron EIA Kit (582701)</i>	Cayman Chemicals, Ann Arbor (USA)
<i>Titanium Taq PCR Kit</i>	Clontech, Mountain View (USA)
<i>Tunel Assay Kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein)</i>	Roche, Mannheim

2.3 Primer

2.3.1 Primer für die RT-PCR

<i>Gen</i>	<i>Accession Nummer</i>	<i>Ann. Temp</i>	<i>Produkt -größe</i>	<i>Sequenz</i>
β-Aktin	NM007393	60 °C	425 bp	5' GGCTACAGCTTCACCACCAC 3' 5' GAGTACTTGGCGTCAGGAGG 3'
L8 mouse	NM 012053	60 °C	406 bp cDNA; 631 bp genom.	5' CCTACGTGCTGTGGACTTCGC 3' 5' TCTGTTGGCAGAGGAAATGACC 3'
Tas1r1	AY032623	61 °C	468 bp	5' ACGGCCATGGCTATCACCTCTTCC 3' 5' CGCCCAGCTGCCCCGTAGTCA 3'
Tas1r2 A	AY032622	61 °C	403 bp	5' CTTTCGGGGGAGCGTGTGGTCTAC 3' 5' ACGGGTGGAGGCCTATGGGTTTTT 3'
Tas1r2 B	AY032622	60 °C	851 bp	5' CCTAACGAGACCAGCCTGAG 3' 5' CGGCAGAAACAGGAGAAGAC 3'
Tas1r2 C	AY032622	60 °C	581 bp	5' CCCCCAACAACACGGTCCCCA 3' 5' GGGCCCGTGGTAACGCATCC 3'
Tas1r3	NM0311872	60 °C	510 bp	5' TGAGCTGGGCAAACCTGGCTA 3' 5' TCTTGGCATTCTTCCCAGG 3'
Tas2r102	NM_199153	50 °C	802 bp	5' CATAGTGTTGTCAAACCTTCTTGG 3' 5' CAGCATACAAAGAGAAGTCTGC 3'

<i>Gen</i>	<i>Accession Nummer</i>	<i>Ann. Temp</i>	<i>Produkt -größe</i>	<i>Sequenz</i>
Tas2r103	NM_053211.1	55 °C	281 bp	5' ACACTCACCCCATTCGCTGTGTCT 3' 5' CAGGAGTGGCCTGTGGGAAAAGC 3'
Tas2r104	NM_207011	55 °C	847 bp	5' GCCACTAGTGAAGTGGG 3' 5' GCAGTGGCCTCATAGTGGCTTGC 3'
Tas2r105	NM_020501	55 °C	869 bp	5' GCTGAGTGCGGCAGAAGGCATCC 3' 5' CAAAGGCTTGCTTTAGCTGGCTG 3'
Tas2r106	BC107180	55 °C	921 bp	5' GCTGACTGTAGCAGAAGGAATCC 3' 5' CATGTCACCTCTGACGTCCTTGTC 3'
Tas2r107	NM_199154	50 °C	839 bp	5' AGGGGACACATATATTGCAC 3' 5' TTGTCTCACAGCATTTTAG 3'
Tas2r108	NM_020502	55 °C	728 bp	5' GACTTGGGTCAACAGTCGCAGA 3' 5' CAGAATGTCCTGGAGGGTAAGC 3'
Tas2r109	NM_207017	55 °C	809 bp	5' GGATTCACAGCCTTGGTGCCTG 3' 5' GAGGCGTGTCTCAGCTTCCTGTC 3'
Tas2r110	NM_199155	55 °C	888 bp	5' CTCACAGATAATAAGCACCAGTG 3' 5' CATGGTGTCCATATCTTTGGATC 3'
Tas2r113	NM_207018	55 °C	818 bp	5' GGTGGCAGTTCTACAGAGCACAC 3' 5' CAGCATTTCCCAGAGCCCAGAC 3'
Tas2r114	NM_207019	50 °C	851 bp	5' GGCATTGTAGGGAACACATTC 3' 5' CCATTCTCACAGCACTTTAATAG 3'
Tas2r115	NM_207020	50 °C	909 bp	5' GTGCTGTTCTACGTAGCATACTG 3' 5' CACGCTTGCACCAATACTGTAGC 3'
Tas2r116a	NM_053212	50 °C	846 bp	5' GCAATGGATTTCATAGCGGTGGTG 3' 5' CTTTGTGCCTGCACCTCAGCCAC 3'
Tas2r116b	NM_053212	50 °C	251 bp	5' GAGATGCCAGCACTAAGGCCAC 3' 5' CAGGAGTGGCCTGTGGGAAAAGC 3'
Tas2r117	NM_207021	55 °C	802 bp	5' GTCCTGGTCCACTGTATGGACTG 3' 5' GCAGGCAGGCCTGTCTCAGCTTC 3'
Tas2r118	NM_207022	55 °C	886 bp	5' GTGCCAACGCAAGTCACCATCTTC 3' 5' CTGGGCTCCAGAACTGCAGCTTC 3'
Tas2r119	NM_020503	50 °C	957 bp	5' GTCGTGGTAGTGCAGTTTTTAAC 3' 5' GGCTTCTGAGCAGGATGTCTTG 3'
Tas2r120	NM_207023	55 °C	714 bp	5' CACATGGTCATCATGACAGCAGAG 3' 5' CCTTCTGTAGACAGATCATTCTCC 3'
Tas2r121	BC104411	50 °C	842 bp	5' TGGATTTCATATGGTCGATAAAC 3' 5' GCTTTTGCCACATTTAAGATATG 3'

<i>Gen</i>	<i>Accession Nummer</i>	<i>Ann. Temp</i>	<i>Produkt -größe</i>	<i>Sequenz</i>
Tas2r122	NM_0010391 28.1	55 °C	631 bp	5' AGCCTGTACAACGTGCATCAGTGT 3' 5' ACCTCCACAATGACACACCAGC3'
Tas2r123	NM_207025	50 °C	917 bp	5' CGGGAATCTTAGGACATGGATTTC 3' 5' GTCCATATCTTTGGACTGGCAC 3'
Tas2r124	NM_207026	55 °C	631 bp	5' CTAGCCACTTCAGTCTCTGGCTTG 3' 5' CTACATCCCAGCTGCCTCATTACC 3'
Tas2r125	NM_207027	50 °C	822 bp	5' GGAATATTGCAAATGGATTCATAG 3' 5' CATCCGTACATCTTTGGACTTGC 3'
Tas2r126	NM_207028	50 °C	842 bp	5' GGATCCTGGCCAACGGCTTCATTG 3' 5' CAGGAGTAGCTGCCTGAAGGTGC 3'
Tas2r129	NM_207029	55 °C	840 bp	5' GGATTCATAGCTCTGGTGAAGTGC 3' 5' CCTCTGCTTCAGCCACGATAGCAC 3'
Tas2r130	NM_199156	50 °C	721 bp	5' GGCTGGATGAAGAATAGGAAG 3' 5' CTATCAGCTCACCCCATATTAC 3'
Tas2r131	NM_207030	55 °C	552 bp	5' CATTTCCCATCCCCTTTTC 3' 5' GCAGGATCCTCATTGCTCTC 3'
Tas2r134	NM_199158	50 °C	853 bp	5' GTATGCAGTCTCTAGCTGCTTTG 3' 5' GATCTGGGAATACAAAGGTCTGG 3'
Tas2r135	NM_199159	50 °C	899 bp	5' GGGACCCATCATGTCCACAGGAG 3' 5' GTATCACTGTGCACAGATGAATC 3'
Tas2r136	NM_181276	50 °C	959 bp	5' CACAGCCAGTGACACAACAGCTCA3' 5' CAGCCAGAACCTTGCTCTCACCTG 3'
Tas2r137	NM_0010253 85	50 °C	984 bp	5' CAGAACAAAGCAAGGATCAGGGTG 3' 5' GAAGCAGAGGGTCCCTTAGATCC 3'
Tas2r138	NM_0010014 51	50 °C	993 bp	5' GCTGAGTCTGACTCCTGTCTTAAC 3' 5' CAGAGTGTCTTGGGAGGAACCTTG 3'
Tas2r139	NM_181275	55 °C	863 bp	5' CACTTGTGGCCACTGAGTGCACC 3' 5' CTGAAGATGCTTCCATGTTCTTC 3'
Tas2r140	NM_021562	55 °C	873 bp	5' GGAAATGGATTCATAGCTGTGGTG 3' 5' CTAAGGACCTGGGAGTTCTGCAGC 3'
Tas2r143	NM_0010014 52	55 °C	822 bp	5' GCCTCTATGTTGCAGAATGGCTTC 3' 5' CCTCATCTTCAGGGCCTTTCTCAG 3'
Tas2r144	NM_0010014 53	55 °C	855 bp	5' CGTCATTTGTTGGCATCATTGGC 3' 5' GGTGCTGAAACCGCCTCCAGGCTC 3'

Bei den Rezeptoren der Tas2-Familie stellt die angegebene Temperatur die niedrigste *Annealing*-Temperatur der durchgeführten *Touchdown*-PCR (siehe Abschnitt 3.1.3.2) dar.

2.3.2 Genotypisierungsprimer

<i>Allel</i>	<i>Produkt- größe</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Gustducin</i>		
Gus WT	589 bp	5' GAGCAAATCAACTGCCCAGC 3' 5' CCAACTCTGCCAGCTTGTTC 3'
Gus KO (Neo)	ca. 500 bp	5' CGGGAGCGGCGATACCGTAAAGC 3' 5' GAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTA 3'
<i>Tas1r1 mCherry</i>		
Tas1r1 WT	711 bp	5' GAATCCACCTGGTTTCCATCCACGTC 3' 5' CTCTCAGGGTGACTTCAGTCTTTAGAGATGG 3'
mCherry Ki	462 bp	5' GAATCCACCTGGTTTCCATCCACGTC 3' 5' GTTGTTGGGGCACTCCATGTTGCT 3'
<i>Tas2r131 GFP</i>		
Tas2r131 WT	455 bp	5' GCACACAAGTGATGATGTGGGCATAGAG 3' 5' GTTCTTGACCCAGTCAGAGCAGTTTGC 3'
GFP Ki	368 bp	5' AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC 3' 5' ATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCCTTCACC 3'

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried) und Thermo Electron (Karlsruhe) synthetisiert. Primer gegen Bitterrezeptoren wurden freundlicherweise von Dr. Karin Schwarzenbacher und Dr. Nicole Hass (AG Prof. H. Breer, Universität Stuttgart Hohenheim) zur Verfügung gestellt.

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

<i>Antigen (AK-Name)</i>	<i>Donor- spezies</i>	<i>Verdünnung</i>		<i>Herkunft</i>
		<i>IHC/ICC</i>	<i>WB</i>	
DsRed	Kaninchen	1 : 200	1 : 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Flag-Tag	Maus		1 : 2000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gustducin (Gustducin H)	Kaninchen	1 : 500	1 : 2000	AG Prof. H. Breer, Universität Hohenheim
Gustducin (Gustducin S)	Kaninchen	1 : 500	1 : 2000	Santa Cruz, Heidelberg
HSV-Tag	Maus	1 : 2000	1 : 10000	Novagen, Wisconsin (USA)

<i>Antigen (AK-Name)</i>	<i>Donor- spezies</i>	<i>Verdünnung</i>		<i>Herkunft</i>
		<i>IHC/ICC</i>	<i>WB</i>	
PKD2L1 (PKD2L1 M)	Kaninchen	1 : 100 - 1 : 500	1 : 2000	Prof. H. Matsunami, Duke University, Durham (USA)
PKD2L1 (PKD2L1 Z)	Kaninchen	1 : 50 - 1 : 200	1 : 2000	Prof. C. Zuker, Columbia University, New York (USA)
Phosphotyrosin	Maus	-	1 : 1500	Millipore, Schwalbach/Ts.
Tas1r1, human (Tas1r1 A)	Kaninchen	1 : 50 - 1 : 200	1 : 1000	Acris, Hiddenhausen
Tas1r1, human	Kaninchen	1 : 100	-	Genetex, Irvine (USA)
Tas1r2, human	Kaninchen	1 : 50 - 1 : 200	1 : 1000	Acris, Hiddenhausen
Tas1r2, human	Kaninchen	1 : 100	-	Genetex, Irvine (USA)
Tas1r3, human (Tas1r3 hA)	Kaninchen	1 : 50 - 1 : 200	1 : 1000	Acris, Hiddenhausen
Tas1r3, human (Tas1r3 hM)	Kaninchen	1 : 100	1 : 500	Prof. R. Margolskee, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia (USA)
Tas1r3, human	Kaninchen	1 : 100	-	Genetex, Irvine (USA)
Tas1r1, murin (Tas1r1 SC)	Ziege	1 : 100 - 1 : 200	-	Santa Cruz, Heidelberg
Tas1r2, murin Tas1r2 (SC)	Ziege	1 : 100 - 1 : 200	-	Santa Cruz, Heidelberg
Tas1r3, murin (Tas1r3 SC)	Ziege	1 : 100 - 1 : 200	-	Santa Cruz, Heidelberg
Tas1r3, murin (Tas1r3 A)	Kaninchen	1 : 200 - 1 : 500	1 : 1000	Abcam, Cambridge (Großbritannien)
Tas1r3, murin (Tas1r3 M)	Kaninchen	1 : 200 - 1 : 500	1 : 1000	Prof. R. Margolskee, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia (USA)
Tas1r3, Ratte (Tas1r3 R)	Kaninchen	1 : 200 - 1 : 500	-	Prof. D. Reed und J. Egan, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia (USA)
TR11	Kaninchen	1 : 100	-	Biotrend, Köln
TR21	Kaninchen	1 : 100	-	Biotrend, Köln
Tas2r138	Kaninchen	1 : 50 - 1 : 200	1 : 2000	Santa Cruz, Heidelberg

2.4.2 Sekundärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Donor- spezies</i>	<i>Verdünnung</i>		<i>Hersteller</i>
		<i>IHC/ICC</i>	<i>WB</i>	
anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt	Ziege		1 : 7500	Bio-Rad, München
anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt	Ziege	1 : 750		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor 546- gekoppelt	Esel	1 : 500		Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus IgG, FITC- gekoppelt	Ziege	1 : 750		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	Schaf		1 : 3000	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
anti-Ziege IgG, Peroxidase-gekoppelt	Esel		1 : 3000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Ziege IgG, FITC- gekoppelt	Kaninchen	1 : 500		Acris, Hiddenhausen

2.5 Bakterienstämme, Plasmide, Zelllinien

<i>Artikel</i>	<i>Herkunft</i>
<i>Bakterienstämme</i>	
<i>E. coli</i> XL1-blue	AG Prof. Dr. Röhm, Institut für Physiologische Chemie, Philipps-Universität Marburg
<i>Plasmide</i>	
Plasmid (pGEM-T)	Promega, Mannheim
pcDNA5-hTAS1R1 FRT TO PM	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, Deutsches Institut für Ernährungs- forschung (DIfE), Potsdam
pcDNA5-hTAS1R2 FRT TO PM	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
pcDNA5-hTAS1R1 FRT TO PM	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
pcDNA5-rT1R2-HSV FRT TO PM	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
pcDNA5-rT1R3-HSV FRT TO PM	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
pcDNA3-rTRX-HSV	AG Prof. Dr. H. Schmale, Universitäts- klinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg

<i>Artikel</i>	<i>Herkunft</i>
<i>Zellen</i>	
Hek293 Flip in TRex	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
HEK293 Flip in TRex mit pcDNA5 G15Gi3 FRT TO PM pcDNA3 rT1R3-HSV	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
HEK293 Flip in TRex mit pcDNA3 hTAS1R1 FRT TO HSV	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)
HEK293 Flip in TRex mit pcDNA3 hTAS1R3 FRT TO HSV	AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIfE)

2.6 Zellkultur

<i>Artikel</i>	<i>Hersteller</i>
Metafectene	Biontex, München
Medien, FCS, PBS, Trypsin	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

2.7 Puffer

<i>Standardpuffer</i>	<i>Standardpuffer</i>
LB Medium (1 l)	TAE
10 g Trypton	40 mM Tris
5 g Hefeextrakt	20 mM Essigsäure
10 g NaCl	2 mM EDTA
pH 7,0	pH 8,3
LB/Ampicillin Agar (1 l)	TBST
10 g Trypton	10 mM Tris
5 g Hefeextrakt	150 mM NaCl
10 g NaCl	0,05 % Tween 20 (v/v)
20 g Agar	pH 7,4
nach dem Abkühlen auf 55 °C wurden 100 µg/ml Ampicillin hinzugeben	

<i>Standardpuffer</i>	<i>Standardpuffer</i>
PBS 150 mM NaCl 1,4 mM K ₂ HPO ₄ 8 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4	Probenpuffer für Agarosegel (6 x) 0,25 % Bromphenolblau 40 % Glycerin, in 1 x TAE-Puffer
<i>Puffer für die Proteinbiochemie</i>	
Anodenpuffer I 300 mM Tris 20 % Methanol (v/v)	Homogenisierungspuffer 10 mM Tris 3 mM MgCl ₂ 2 mM EGTA pH 7,4
Anodenpuffer II 25 mM Tris 20 % Methanol (v/v)	Kathodenpuffer 40 mM ε-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v)
Bradford-Stammlösung 0,1 % Coomassieblau G250 (w/v) in Ethanol	Natriumphosphatpuffer 100 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
Bradford-Reagenz 5 % Bradford Stammlösung (v/v) 8,5 % Phosphorsäure (v/v)	Probenpuffer für SDS-PAGE (4 x) 250 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,08 % Bromphenolblau 8 % SDS 20 % Glycerin 10 % β-Mercaptoethanol
Citratpuffer 100 mM Natriumcitrat 100 mM Zitronensäure	Sammelgelpuffer (4 x) 500 mM Tris/HCl 0,4 % SDS pH 6,8
ECL-Reagenz ECL Lösung 1 : ECL Lösung 2 (1:1)	SDS-Laufpuffer 25 mM Tris 0,1 % SDS 190 mM Glycin
ECL-Lösung 1 1 % Luminol-Stocklösung 0,44 % Stabilisator Stocklösung 100 mM Tris/HCl pH 8,5	Trenngelpuffer (4 x) 1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS, pH 8,8
ECL-Lösung 2 0,018 % H ₂ O ₂ 100 mM Tris/HCl pH 8,5	

Puffer für die Proteinbiochemie

Luminol-Stocklösung

444 mg Luminol in 10 ml DMSO

Stabilisator-Lösung0,15 g ϵ -Aminocapronsäure
in 10 ml DMSO

Puffer für reproduktionsbiologische Techniken

HS Stammlösung

270 mM NaCl

10 mM KCl

2 mM MgSO_4 4 mM CaCl_2 **HS Puffer**

135 mM NaCl (HS Stammlösung 1:2)

5 mM KCl (HS Stammlösung 1:2)

1 mM MgSO_4 (HS Stammlösung 1:2)2 mM CaCl_2 (HS Stammlösung 1:2)

5 mM Glukose

30 mM HEPES (1 M Stock, pH 7,4)

10 mM Lactat (60 % w/w Sirup)

1 mM Pyruvat

pH 7,4

HS+ (HS/ NaHCO_3)

HS Puffer

+ 15 mM NaHCO_3 (Bicarbonat)**Kapazitierungspuffer (HS/ NaHCO_3 /BSA)**

HS Puffer

+ 15 mM NaHCO_3 (Bicarbonat)

+ 0,5 % BSA

HB Medium

150 mM NaCl

25 mM Triethanolamin

1 mM MgCl_2 1 mM CaCl_2

pH 8,5

HTF Puffer

100 mM NaCl

5 mM KCl

0,2 mM MgSO_4 5 mM CaCl_2 (HS Stammlösung 1:2)

3 mM Glukose

18 mM Lactat (60 % w/w Sirup)

0,34 mM Pyruvat

0,2 mM Penicillin G

70 μM Streptomycin25 mM NaHCO_3

0,4 % BSA

0,0002 % Phenolrot

Coomassieblau-Färbelösung

0,04 % Coomassieblau G250

50 % Methanol

10 % Essigsäure

40 % H_2O **Fixierungspuffer Coomassiefärbung**20 mM Na_2HPO_4

150 mM NaCl

7,5 % Formaldehyd

Waschpuffer Coomassiefärbung

100 mM Ammoniumacetat

pH 9,0

2.8 Gebrauchswaren

<i>Artikel</i>	<i>Hersteller</i>
Färbeeinsatz	Hartenstein, Würzburg
Fettstift (DakoCytomation Pen)	Dako Cytomation, Hamburg
Elektroden Papier Novablot	GE Healthcare, München
Folie für Western Blot Analysen, (PE-Schlauchfolie, 0,2 mm dick)	Rische + Herfurth, Hamburg
Glasdeckgläser	Menzel, Braunschweig
Glasfärbekasten	Carl Roth, Karlsruhe
Homogenisator	Kontes, New Jersey (USA)
Metallfärbekasten	VWR, Darmstadt
Nitrocellulose-Membran (Hybond extra)	GE Healthcare, München
Objektträger für CASA (2x-CEL)	Hamilton Thorne Biosciences Beverly (USA)
Objektträger (Super Frost Plus)	Menzel, Braunschweig
Objektträger (Mattrand)	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 14 ml, 15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
UV-Filme (X-OMAT)	Kodak, Stuttgart

2.9 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose-Gelelektrophorese-System	Peqlab, Erlangen
Bakterien-Inkubator	Heraeus, Hanau
Bakterien-Schüttler Orbital Shaker	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Binokular	Olympus, Hamburg
<i>Calcium (Ca^{2+}) Imaging System</i>	
- Mikroskop IX70	Olympus, Hamburg
- TILL Photometry System (Polychrome V)	T.I.L.L. Photonics, Martinsried
- CCD Kamera (Ixon +)	Andor, Belfast (Nordirland)

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Chemilumineszenz-System (Chemi-Smart)	Peqlab, Erlangen
Cryostat (Leica CM 3050 S)	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
FLUOstar Omega	BMG LABTECH, Offenburg
Gewebeeinbettautomat (VIP Vakuum Infiltrations Processor, Tissue-Tek)	Vogel, Gießen
Gewebeeinbettssystem (EG 1150)	Leica Microsystems, Wetzlar
Gewebeinfiltrationsautomat (TP1020)	Leica Microsystems, Wetzlar
IVOS Sperm Analyzer	Hamilton Thorne Research, Beverly (USA)
Kaltlichtquelle (KL 1500 compact)	Olympus, Hamburg
Kamera, Axiocam MRC	Zeiss, Jena
Kühlplatte für die Histologie	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor (5804R)	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Magnetrührer (Barnstead Thermolyne)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Messkammer für Einzelzell-Calcium-Messungen	Feinmechanikwerkstatt FB20 der Philipps-Universität Marburg
Mikroskop, konfokal (LSM 510 Meta, Laser Scanning Microscope)	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Severin, Sundern
pH Meter	Mettler-Toledo, Gießen
Photometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine (96 Universal Gradient)	Peqlab, Erlangen
PCR-Maschine (GeneAmp PCR System 2400)	Perkin Elmer, Wellesley (USA)
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson Middleton (USA); Peqlab, Erlangen
Pipettierhilfen	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg
Protein-Gelelektrophorese-System	Bio-Rad, München
Rotationsmikrotom (Accu-Cut SRM 200)	Leica Microsystems, Wetzlar
Schüttelheizblock (HTMR 131)	Peqlab, Erlangen
Schüttelwasserbad (WBU 45)	Memmert, Schwabach
Spannungsquelle (Power Pack 35/60 und EV231)	Peqlab, Erlangen
Sterilbänke	Heraeus, Hanau

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Taumler (Polymax)	Heidolph, Schwabach
Tiefkühlschrank -80°C	New Brunswick Scientific (Eppendorf), Hamburg
Ultraschallbad (Sonorex RK255)	Bandelin, Berlin
Ultra-turrax	Ika, Staufen
UV-Geldokumentations-System	Peqlab, Erlangen
Vakuumzentrifuge (Speedvac)	Bachofer, Reutlingen
Vortexer (MS2 Minishaker)	Ika, Staufen
Waage	Kern, Balingen
Wasserbad für die Histologie	Leica Microsystems, Wetzlar
Western Blot Apparatur, Semi-Dry	Feinmechanikwerkstatt FB20 der Philipps-Universität Marburg
Wippe (Duomax)	Heidolph, Schwabach
Zellkultur-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifugen (Biofuge Stratos, Biofuge Pico 17 und Biofuge Fresco 21)	Heraeus, Hanau

2.10 Versuchstiere

<i>Spezies, Stamm</i>	<i>Herkunft</i>
Mäuse, C57BL/6, 129SV und Balb/C	Charles River Wiga Deutschland, Sulzfeld Janvier, St. Berthevin, Frankreich Tierzuchtanlage des Walther-Straub-Instituts, LMU München
Ratten, Wistar	Fachbereich Medizin, Philipps- Universität Marburg
<i>Gen-defiziente und genetisch modifizierte Mauslinien</i>	
α -Gustducin <i>Knockout</i>	Prof. R. Margolskee, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia (USA)
Tas1r1 ^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131 ^{BL-IRES-hrGFP}	Dr. Anja Voigt AG Prof. Dr. W. Meyerhof, (DIFE), Potsdam AG Dr. Ulrich Boehm, Zentrum für Molekulare Neurobiologie [ZMNH], Hamburg

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von RNA aus Geweben

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden Mäusen nach zervikaler Dislokation die gewünschten Organe rasch entnommen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Isolierung der RNA wurden die Gewebe bei -70 °C gelagert. Die Isolierung von RNA erfolgte unter Verwendung von RNA-bindenden Säulen des *NucleoSpin* Systems (Macherey-Nagel). Dazu wurde das Gewebe zunächst in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser überführt und mit einem Pistill fein zermahlen. Um ein Erwärmen des Gewebes zu verhindern, wurde dieses dabei mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann in den mit beta-Mercaptoethanol versetzten Lysepuffer überführt und gründlich gemischt. Um Gewebsverluste beim Mörsern zu vermeiden wurden zur Gewinnung von RNA aus Geschmacksgewebe einzelne Wallpapillen (CV, *Papilla circumvallate*) mit einer Kapillare aus der Zunge ausgestanzt und direkt in den Lysepuffer überführt. Das Gewebe wurde dann im Puffer mit einem Reaktionsgefäß-Pistill homogenisiert und intensiv gemischt. Das jeweilige Homogenisat wurde anschließend durch eine Säule filtriert und zur Bindung auf die RNA-Säule gegeben. Nach einem Entsalzungsschritt, dem Verdau von genomischer DNA und mehreren Waschschritten (s. Protokoll des Herstellers) wurde die RNA mit 60 µl H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Synthese von cDNA (*complementary* DNA)

Die Methode der Reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) beruht auf der Generierung von cDNA durch Umschreiben aus mRNA mittels einer viralen reversen Transkriptase und einer anschließenden PCR [Buell et al., 1978]. Mit Hilfe der RT-PCR können sehr kleine Transkriptmengen einer bestimmten mRNA in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.

Zur Generierung von cDNA wurde das *SuperScript III First-Strand Synthesis* System (Invitrogen) verwendet. Als Primer wurde ein Oligo(dT) Primer gewählt, der spezifisch an die Poly-A-Enden der mRNA bindet; als Template diente die Gesamt-RNA, die nach dem Protokoll in Abschnitt 3.1.1 isoliert wurde. Zunächst wurden 16 µl RNA mit 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2 µl Oligo(dT) Primer (50 µM) gemischt und zur Denaturierung der RNA und des Primers fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach dem

Abkühlen der Proben auf 4 °C wurden diese mit 4 µl 10x RT-Puffer, 8 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl DTT (100 mM), 2 µl RNase Inhibitor (RNaseOUT, 40 U/µl) und 2 µl reverser Transkriptase (SuperScript, 200 U/µl) versetzt. Die reverse Transkription erfolgte bei 50 °C für 50 Minuten und wurde durch eine fünfminütige Inkubation bei 85 °C beendet, bevor die Proben auf 4 °C abgekühlt wurden. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert. In Kontrollansätzen (-RT) wurde statt des Transkriptionsenzym H₂O eingesetzt. Um die Qualität der gewonnenen cDNA zu überprüfen, wurde eine Standard-PCR (siehe Abschnitt 3.1.3.1) mit Primern für das β-Aktin Gen oder das mitochondriale L8 Gen durchgeführt.

3.1.3 Methoden der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten [Saiki et al., 1985]. Ausgehend von einer Vorlagen-DNA (*template*) und unter Verwendung von *sense* und *antisense* Primern und dNTPs als Substrat, werden durch eine thermostabile Polymerase spezifische DNA-Fragmente amplifiziert.

3.1.3.1 Standard-PCR an cDNA

Aus der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA wurden mittels PCR spezifische Bereiche amplifiziert, um das Vorkommen der entsprechenden mRNAs und damit der Genexpression in den Testgeweben nachzuweisen. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.3.1 aufgeführt. Für die PCR Reaktion wurden Primer, Puffer und Polymerase in folgenden Volumina eingesetzt: 2,5 µl zehnfach PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP Mix (10 mM), 0,3 µl Taq Polymerase (*Dream Taq*), 1 µl *sense* Primer (10 µM) und 1 µl *antisense* Primer (10 µM). Dem Reaktionsansatz wurde 1 µl cDNA als *template* bzw. 1 µl H₂O als Kontrolle hinzugefügt und mit H₂O auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Alternativ wurde das *Titanium Taq PCR Kit* (Clontech, Mountain View [USA]) nach Herstellerangaben verwendet.

Die PCR Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 5 Minuten bei 94 °C; 35 Amplifikationszyklen: Denaturierung 1 Minute bei 94 °C, Anlagerung der Primer (*Annealing*) für 1 Minute bei einer Primer-abhängigen Temperatur (siehe Abschnitt 2.3.1), Elongation für 1 Minute bei 72 °C. Nach den Zyklen folgte eine finale Elongationsperiode bei 72 °C für 7 Minuten. Der Ansatz wurde anschließend auf 4 °C abgekühlt. Zur Analyse der PCR Produkte wurden die Amplifikationsprodukte in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.1.5).

3.1.3.2 Touchdown PCR

Zur Analyse der Expression von Bitterrezeptoren wurden „Touchdown PCRs“ durchgeführt. Dabei wurde zur Anlagerung der Primer zunächst eine höhere Temperatur gewählt, als für die spezifische Bindung des Primers an das DNA-Template notwendig ist. Durch ein schrittweises Herabsetzen der *Annealing*-Temperatur in den folgenden Zyklen (-1 °C pro Zyklus) wurde eine Anlagerung des Primers ermöglicht. So fand

zunächst eine hochspezifische Amplifikation des Zielproduktes statt und Primerdimere und Artefakte wurden vermieden. Nachdem so in den ersten zehn Zyklen nur wenige, aber sehr spezifische Amplifikate synthetisiert wurden, schließt sich dann eine Standard PCR (siehe Abschnitt 3.1.3.1) mit der zuletzt erreichten niedrigsten *Annealing*-Temperatur an. So werden vor allem die bereits vorhandenen hochspezifischen Produkte weiter amplifiziert, während unspezifische Produkte deutlich weniger stark amplifiziert werden. Durch Verwendung der *Touchdown* PCR ließen sich so auch geringe Mengen cDNA-Transkripts spezifisch amplifizieren, auch ohne dass die *Annealing*-Temperatur für jeden Primer einzeln optimiert werden muss [Don et al., 1991].

3.1.4 Sequenzanalyse von Tas2-Rezeptoren

Zur Darstellung des Verwandtschaftsgrades der murinen Tas2-Rezeptoren wurden die Sequenzen der Bitterrezeptoren (für *Accession* Nummern siehe 2.3.1) mit Hilfe des Computerprogramms *ClustalW* miteinander verglichen [Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007]. Aus dem so erhaltenen *Alignment* der 35 Tas2-Rezeptoren wurde im Programm *Treeview* (Roderic D. M. Page, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Glasgow, [Schottland]) ein Dendrogramm erstellt, um die Verwandtschaft der Bitterrezeptoren graphisch darzustellen.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuremoleküle sind aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen Polyanionen, die im elektrischen Feld zur Anode wandern. Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle in einer Agarose-Gelmatrix in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt [Sharp et al., 1973]. Die Matrix bietet den kleineren Molekülen einen geringeren Widerstand als den größeren, so dass kleinere Moleküle schneller durch das Gel wandern als größere.

Zur Auftrennung von DNA wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 1 - 1,5 % verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, nach leichtem Abkühlen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25 µg/ml) versetzt und in einen mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren des Gels wurde es in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingehängt und mit den mit Ladepuffer versetzten Proben beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Zur Größenbestimmung wurde ein 100 bp DNA-Marker auf eine separate Gelspur aufgetragen. Durch die Anregung mit UV-Licht (UV-Geldokumentationssystem, Peqlab, Erlangen) konnte anschließend die DNA im Gel visualisiert werden.

3.1.6 Aufreinigen von DNA aus einem Agarosegel

Unter niederenergetischem UV-Licht wurden die DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. In die Spitze eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes wurde mit einer Kanüle ein Loch gestoßen und das Gefäß in ein zweites Reaktionsgefäß gesetzt. In dieses einfache „Sieb“ wurde das Gelstück gelegt und die DNA durch fünfminütige Zentrifugation bei 3000 rcf in das untere Eppendorfgefäß eluiert.

3.1.7 Ligation eines DNA-Fragments in einen Klonierungsvektor

Zur Klonierung von aufgereinigten PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T Kit (Promega) verwendet. Der im Kit enthaltene Vektor pGEM-T ist linear und hat an seinen Enden Thymidin-Überhänge. Die für die PCR verwendete Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität und erzeugt somit Adenosin-Überhänge an den 3'-Enden eines PCR-Produkts. Im Ligationsansatz kommt es zur unmittelbaren Nähe zwischen dem PCR-Produkt und dem Plasmidvektor, deren Überhänge sich mittels Wasserstoffbrücken komplementär paaren können. Die zugefügte T4 DNA-Ligase verknüpft dann den Vektor und das PCR-Produkt kovalent.

Für die Ligation wurde ein Gesamtansatz von 10 µl mit 1 µl pGEM-T Vector, 3 µl eluierter DNA, 5 µl zweifach Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim) hergestellt, der zur Ligation über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde.

3.1.8 Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden

3.1.8.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Unter dem Einfluss niedriger Wachstumstemperatur und einer Behandlung mit MnCl_2 und CaCl_2 wird bei *E. coli* Bakterien eine fehlerhafte Zellwand erzeugt. Dadurch werden die Bakterien in die Lage versetzt, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen [Mandel und Higa, 1970].

Eine Kolonie des *E. coli* Stammes XL1-blue wurde von einer LB-Agar-Platte in 250 ml SOB Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , pH 7,0) gegeben und bei 18 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm (OD_{600}) vermehrt (logarithmische Wachstumsphase). Danach wurden die Bakterien für 10 Minuten auf Eis gekühlt, bevor sie 10 Minuten lang bei 2500 rcf bei 4 °C sedimentiert wurden. Das Pellet wurde im Anschluss in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer (10 mM Hepes, 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl, 55 mM MnCl_2 , pH 6,7) resuspendiert und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einer wiederholten Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml mit 7 % DMSO versetztem Transformationspuffer aufgenommen, in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.1.8.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Um eine größere Menge eines rekombinanten Plasmids zu erhalten, wurde das Plasmid in kompetente Bakterien eingebracht und dort vermehrt. Hierfür wurde die Hitzeschock-Methode [Inoue et al., 1990] verwendet: Durch das Erhitzen der Bakterien wird deren Membran fluider, und die DNA kann vom Bakterium aufgenommen werden. Die anschließende Selektion der transformierten Bakterien erfolgt mittels eines auf dem Plasmidvektor enthaltenen Antibiotika-Resistenz-Gens; bei pGEM-T handelt es sich um ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Von den auf Ampicillin-haltigem LB-Agar ausgestrichenen Bakterien konnten somit nur die Bakterien wachsen, die den Vektor erfolgreich aufgenommen hatten.

Das Wachstum allein gibt aber keine Auskunft darüber, ob das gewünschte PCR-Produkt auch korrekt im Vektor eingefügt ist oder ob es bei der Ligation zum Schließen des Vektors ohne inseriertes DNA-Fragment (*Insert*) gekommen ist. Die Auswahl von Bakterien, die den Vektor mit *Insert* enthalten, erfolgt mit Hilfe eines *lacZ* Gens, welches in der *Multiple-Cloning-Site* des Vektors lokalisiert ist. Kommt es nicht zum Einbau des *Inserts*, ist das *lacZ* Gen intakt, und die Bakterien bilden das Enzym β -Galactosidase, sofern ihr *lac*-Operon durch einen Induktor, wie IPTG (Isopropyl-thio-galactosid) angeschaltet worden ist. Sie sind dann in der Lage, das Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) mit Hilfe der β -Galactosidase zu einem blau gefärbten Produkt umzuwandeln. Dieses Prinzip der Blau-Weiß-Selektion [Messing, 1983] erlaubt es somit, Bakterienkolonien, die nur den religierten Vektor enthalten, zu detektieren und auszuschließen.

Vor der Transformation wurden LB/Ampicillin-Agarplatten mit jeweils 75 μ l 2 %iger IPTG- und 2 %iger X-Gal-Lösung bestrichen. 200 μ l kompetente XL1-blue *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit dem kompletten Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 Sekunden. Nach einer Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden die Bakterien dann auf die vorbereiteten und getrockneten Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Wachstumsperiode über Nacht bei 37 °C im Brutschrank konnten Bakterienkolonien detektiert und einzelne weiße Kolonien zur weiteren Verwendung ausgewählt werden.

3.1.8.3 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

Einzelne Bakterienkolonien einer LB/Ampicillin-Platte wurden isoliert und in 2,5 ml ampicillinhaltiges LB Medium überführt. Nach einer Übernachtinkubation bei 37 °C wurden 2 ml der Bakteriensuspension für 30 Sekunden bei 6000 rcf zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 200 μ l S1-Lösung (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A, pH 8,8) durch Vortexen resuspendiert. Die Proben wurden auf Eis gekühlt und anschließend 400 μ l S2-Lösung (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurden 300 μ l einer 3 M Natriumacetat Lösung (pH 5,5) hinzugefügt. Die Lösungen wurden bei 13000 rcf 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe von 0,6 Volumenteilen Isopropanol und 30 Minuten Inkubation bei -20 °C wurde die

Plasmid-DNA anschließend gefällt. Erneut wurde für 10 Minuten bei 13000 rcf zentrifugiert und das Pellet mit 0,5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Vor der weiteren Verwendung wurden noch vorhandene Proteine durch fünfminütige Zentrifugation bei 13000 rcf aus der Lösung entfernt.

3.1.8.4 Isolierung großer Mengen von Plasmid DNA aus *E. coli*

Um größere DNA-Präparationen durchzuführen, wurden 250 ml ampicillinhaltiges LB Medium aus einer Übernachtskultur angeimpft. Nach einer Wachstumsphase bei 37 °C über Nacht im Bakterienschüttler erfolgte die DNA-Aufreinigung mit dem *Nucleobond AX 100 Kit* entsprechend der Herstellerangaben. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch anhand ihrer Absorption bei 260 nm bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert.

3.1.9 Sequenzierungen

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente wurde von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt und erfolgte in Anlehnung an die von Sanger entwickelte Nukleotid-Abbruch-Methode [Sanger et al., 1977]. Zur Vorbereitung der Sequenzierungsreaktionen wurde die DNA zunächst gefällt, indem 1 µg Plasmid-DNA in 10 µl H₂O mit 1 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 32 µl Ethanol versetzt und bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert wurde. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 13000 rcf und 4 °C für 20 Minuten bildete sich ein Pellet, das mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation (10 Minuten, 13000 rcf, 4 °C) vollständig an der Luft getrocknet wurde.

Für Sequenzvergleiche wurde die *BLAST search* Funktion des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) genutzt. Für die Bearbeitung und Auswertung von Sequenzen wurden das Programm *DNASTAR* (DNASTAR, Madison, USA) sowie das Programm *Genamics Expression* (Genamics, Hamilton, Neuseeland) verwendet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Aufbereitung der Gewebeproben

3.2.1.1 Herstellung von Membranfraktionen isolierter Organe und Zellen

Grobe Membranfraktionen für die durchgeführten Western Blot Analysen wurden durch fraktionelle Zentrifugation gewonnen. Dazu wurden die frisch entnommenen oder nach der Entnahme bei -80 °C gelagerten Organe bzw. Zellen mit 1 - 3 ml Homogenisierungspuffer mit 0,1 mM PMSF, 0,25 % NP-40 und 1 : 100 verdünntem Protease-Inhibitor-Cocktail in einen auf Eis vorgekühlten Glashomogenisator gegeben. Der

Aufschluss der Organe bzw. Zellen erfolgte unter ständiger Kühlung auf Eis durch Homogenisation im Potter, wobei Schaumbildung vermieden wurde. Im Anschluss wurden die Suspensionen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal 20 Sekunden im Ultraschallbad in Eiswasser behandelt. Durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 1500 rcf und 4 °C wurden Zellkerne und nicht-homogenisierte Gewebereste entfernt. Die anschließende Sedimentierung der Membranen erfolgte durch Ultrazentrifugation des Überstandes bei 50000 rcf für 30 Minuten bei 4 °C. Das dabei entstandene Pellet enthielt die grobe Membranfraktion und wurde in Homogenisierungspuffer mit anti-Protease-Cocktail, aber ohne Detergenz resuspendiert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (siehe 3.2.1.3) wurde die Konzentration mit Homogenisierungspuffer auf 2 mg/ml eingestellt und die Membranproben in 100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2 Herstellung eines Spermienhomogenisats

Zur Gewinnung von Mauspermien für Western Blot Analysen wurden die unmittelbar nach zervikaler Dislokation entnommenen Nebenhoden vom umgebenden Fett befreit und einmal mit HS Puffer gespült. Im Anschluss wurden jeweils zwei Nebenhoden in einer 3,5 cm großen Petrischale mit 2 ml auf 37 °C vorgewärmtem Kapazitierungs-puffer (HS/15 mM Natriumhydrogencarbonat/0,5 % BSA) überführt. Die Nebenhoden wurden mit einer Schere fünf- bis zehnmal eingeschnitten und dann für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch die Zusammensetzung der die Nebenhoden umgebende Lösung konnten die Spermien aktiv aus dem Nebenhoden heraus schwimmen. Die Spermien-suspension wurde im Folgenden bei 8000 rcf bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail und Detergenz (siehe 3.2.1.1) aufgenommen und in einem Potter auf Eis homogenisiert. Im Anschluss wurde die Spermien-suspension zweimal 20 Sekunden in Eiswasser im Ultraschallbad behandelt. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 3.2.1.3) und der Einstellung der Proteinkonzentration auf 2 mg/ml wurden 100 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Humane Spermien wurden nach Aufklärung und einer Einverständniserklärung von jungen gesunden Spendern zur Verfügung gestellt und durch zweimaliges Waschen mit PBS aus dem frischen Ejakulat aufgereinigt. Dafür wurde das verflüssigte Ejakulat mit dem neunfachen Volumen an PBS gemischt und mit 500 rcf bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Spermienpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Grobe Membranfraktionen humaner Spermien wurden anschließend wie unter 3.2.1.1 für isolierte Organe beschrieben hergestellt.

3.2.1.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der blaue Säurefarbstoff Coomassieblau G250 bindet kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Bei der Bildung des Farbstoff-Protein-komplexes wird vor allem die anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, was eine

Absorptionsmessung bei 595 nm in Anwesenheit des freien Farbstoffs ermöglicht [Bradford, 1976].

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer aufgearbeiteten Gewebeprobe wurden 2 µl der Proben und ein BSA-Standard (2 mg/ml) mit 98 µl H₂O verdünnt und mit 1,5 ml des Bradford-Reagenzes in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in eine Halbmikroküvette überführt und die Absorption bei 595 nm im Photometer bestimmt.

3.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate poly-acrylamid gel-electrophoresis*) können Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichts während ihrer Wanderung durch eine Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer Hitze-denaturiert. Dabei erhalten alle Proteine durch den Zusatz des stark anionischen Detergenzes SDS eine negative Ladung, so dass SDS-Protein-Komplexe entstehen, die proportional zu ihrem Molekulargewicht geladen sind. SDS eliminiert außerdem nicht-kovalente Wechselwirkungen im nativen Protein. Niedermolekulare Thiole wie β-Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirken zusätzlich eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Demzufolge verlieren die für ein bestimmtes Protein charakteristischen Ladungen und Tertiärstrukturen bei der gelelektrophoretischen Auftrennung ihren Einfluss auf das Laufverhalten des Moleküls, so dass die Proteine ausschließlich entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Polyacrylamid-Gelen mit 7 - 10 % Acrylamid (Acrylamid / Bisacrylamid-Verhältnis 37,5 : 1) nach Laemmli [Laemmli, 1970]. Bei der SDS-PAGE Methode nach Laemmli wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, in dem der Puffer im Sammelgel einen saureren pH-Wert (6,8) und eine andere Ionenstärke (0,5 M Tris/HCl) aufweist als der Puffer, der zur Herstellung des Trenngels verwendet wird (pH 8,8, 1,5 M Tris/HCl). Nachdem die Proben durch das poröse Sammelgel gelaufen sind, sammeln sie sich in einer schmalen Zone am Übergang zum Trenngel. Durch das diskontinuierliche Puffersystem konzentrieren sich alle Komplexe der Probe in einem sehr schmalen Band direkt vor Beginn des Trenngels, wodurch sich die Auflösung des SDS-Polyacrylamidgels erhöht.

Für die Darstellung von Proteinen im Bereich bis 70 kDa wurden Trenngele mit 10 % Acrylamid-Anteil verwendet. Für Proteine mit einem Molekulargewicht über 100 kDa wurden 7 %ige Gele eingesetzt. In allen Fällen enthielt das Sammelgel 5 % Acrylamid. Durch Zugabe von 0,06 % TEMED und 30 µg/ml APS wurde die Polymerisation der Gele eingeleitet. Für die gelelektrophoretischen Untersuchungen wurden die aufzutrennenden Proteingemische mit vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer (s. Abschnitt 2.7) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Es wurden pro Spur etwa 30 µg Protein in einem Volumen von 20 µl aufgetragen. Neben den

Proben wurde ein Größenmarker (Fermentas), der aus Proteinen definierter Molekulargewichte besteht, mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte im Sammelgel bei 80 V zur Fokussierung der Proben; die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 120 V.

3.2.3 Immunoblotting

Mit Hilfe des Immunoblotting Verfahrens ist es möglich, Proteine nach Auftrennung im SDS-Gel auf eine Membran zu übertragen und anschließend durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Diese Technik ermöglicht es damit, das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Selektivität einer Antigen/Antikörper-Reaktion zu kombinieren.

Dazu ist es zunächst notwendig, die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel vollständig auf eine Nitrocellulose-Membran zu übertragen [Towbin et al., 1979], so dass ein genaues Abbild des Bandenmusters entsteht. Die fest an die Membrantextur gebundenen Moleküle sind für den dann folgenden immunologischen Nachweis gut zugänglich.

Für die Immunoblots in der vorliegenden Arbeit wurde das *Semi-Dry Blotting* Verfahren mit diskontinuierlichem Transferpuffersystem verwendet [Towbin et al., 1979; Dalton et al., 1988]. Dafür wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer in Anodenpuffer II überführt und anschließend auf die ebenfalls mit Anodenpuffer II getränkte Nitrocellulose-Membran aufgelegt. Das Gel war mit der Kathode durch neun mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere leitend verbunden; die Nitrocellulose-Membran wiederum war von drei Filterpapieren mit Anodenpuffer II überschichtet; sechs mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere stellten die leitende Verbindung zur Anode her (Abbildung 3.1).

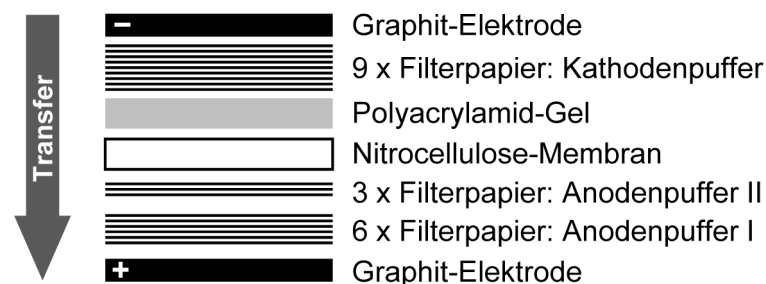


Abbildung 3.1: Schematische Übersicht der Komponenten des Semi-dry Blotting Transfer-systems.

Auf diese Weise wanderten die denaturierten und aufgetrennten Proteine entsprechend ihrer negativen Ladung in Richtung des elektrischen Feldes aus dem Gel in die Nitrocellulose. Für den Übertragungsvorgang wurde für zwei Stunden eine Spannung von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Nitrocellulose angelegt. Nach dem Elektrotransfer wurden die Proteine zur Kontrolle der Proteinübertragung mit einer Ponceau S Lösung angefärbt, die Größen-

marker des Standards mit einem Bleistift eingezeichnet, und die Nitrocellulose-Membran anschließend durch zweimaliges Waschen mit TBST wieder entfärbt.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in TBST für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran über Nacht bei 4 °C mit einem Protein-spezifischen Primärantikörper, der in 3 % Milchpulver in TBST verdünnt wurde, inkubiert. Die Verdünnung der einzelnen Antikörper ist in Abschnitt 2.4.1 aufgeführt. Ungebundene Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen der Membran für je zehn Minuten mit TBST entfernt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1 : 7500 in 3 % Milchpulver in TBST), der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, auf einem Taumler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal je zehn Minuten mit TBST gewaschen. Die Detektion des Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Nachweises. Je 3 ml ECL-Lösung 1 und 2 (s. Abschnitt 2.7) wurden in einer Schale gemischt, und die Nitrocellulose-Membran damit benetzt. Nach einminütiger Inkubation wurde die Membran luftblasenfrei mit einer Folie umhüllt (und auf einem Film (Kodak, Stuttgart) exponiert. Nach Entwicklung des Films mit Dokumol (Tetenal, Norderstedt) wurde der Film anschließend mit einer Lösung aus 1,26 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,11 M Kaliumdisulfid fixiert, ausgiebig in Wasser gespült und für die Auswertung getrocknet. Alternativ wurde die Chemilumineszenz des umgesetzten ECL-Reagenzes auf der Membran direkt in einem Chemilumineszenz-System (Peqlab) detektiert.

3.2.4 Immuncytochemische Untersuchungen an Spermien

Zum Nachweis der untersuchten Proteine und der Bestimmung ihrer subzellulären Lokalisation wurden immuncytochemische Färbungen durchgeführt. Mit Hilfe eines Zwei-Antikörper-Systems, bestehend aus einem Primärantikörper, der das gesuchte Protein erkennt, und einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, der den Primärantikörper detektiert, können dabei Zellpräparate angefärbt und anschließend am Mikroskop ausgewertet werden.

3.2.4.1 Herstellung von Spermienpräparaten für die Mikroskopie

Für die Herstellung von Spermienpräparationen für die Immuncytochemie wurden die Nebenhoden der Nager, wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben, präpariert, und eine Spermiesuspension durch „Herausschwimmen“ gewonnen. Durch schonende Zentrifugation bei 300 rcf und 25 °C wurden die Spermien auf dem Boden des Reaktionsgefäßes pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Um die Spermien so unversehrt wie möglich zu belassen, wurde besonders darauf geachtet, die Zellen möglichst geringen Scherkräften (zum Beispiel durch Pipettieren) auszusetzen. Dies wurde z. B. durch das vorherige Abschneiden der verwendeten Pipettenspitzen sowie

das Vermeiden von Erschütterungen des Reaktionsgefäßes erreicht. Die gewaschene Spermienpopulation wurde in PBS aufgenommen (etwa 250 µl/Nebenhoden) und je nach Dichte der Spermien wurden 10-15 µl Zellsuspension pro Präparat auf einen Glasobjektträger ausgestrichen, an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Um zu gewährleisten, dass bei der Färbung aufgetropfte Flüssigkeit in den mit Spermien versehenen Bereichen des Objektträgers verblieb, wurden die einzelnen Areale auf dem Objektträger vor der immuncytochemischen Färbung mit einem Fettstift umrundet.

Humane Spermien für immuncytochemische Untersuchungen wurden aus Sperma gewonnen, das von jungen gesunden Spendern nach Aufklärung und Einverständniserklärung gespendet wurde. Das Ejakulat wurde nach einer Verflüssigungszeit von 30 Minuten mit PBS überschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieser Zeit schwammen die vitalen Spermien aktiv in die obere PBS-Schicht. Die motilen Spermien wurden anschließend fünf Minuten bei 400 rcf zentrifugiert, in PBS resuspendiert und dann auf Objektträger aufgetropft und getrocknet; dabei wurde wie oben für Mausspermien beschrieben, verfahren.

Ejakulierte bovine Spermien wurden vom Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Gießen zur Verfügung gestellt und wie oben für humane Spermien beschrieben aufgearbeitet. Zur Isolation von epidymalen bovinen Spermien wurden Nebenhoden von frisch geschlachteten Rindern vom Schlachthof in Marburg zur Verfügung gestellt. Stücke des Nebenhodens wurden in HS Puffer gespült, anschließend in Kapazitätspuffer überführt und mehrfach eingeschnitten. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Spermiesuspension, wie vorangehend für Nagerspermien beschrieben, gewaschen und auf Objektträger ausgestrichen.

3.2.4.2 Immuncytochemische Färbungen

Für immuncytochemische Färbungen wurden die auf einem Glasobjektträger befindlichen Spermien zunächst 5 Minuten in PBS rehydriert. Die Fixierung und Permeabilisierung der Spermien erfolgte durch eine zweiminütige Inkubation mit -20 °C kaltem Methanol oder durch eine zehnminütige Fixierung mit Aceton bzw. mit Aceton/Methanol (1 : 1) bei -20 °C. Nach einem Waschschrift in PBS wurden unspezifische Bindestellen auf dem Zellpräparat blockiert, indem es für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 % FCS in PBS inkubiert wurde. Durch diesen Schritt wurde die unspezifische Hintergrundfluoreszenz deutlich reduziert. Die Primärantikörperverdünnungen (siehe Abschnitt 2.4.1) wurden in 10 % FCS in PBS angesetzt und auf die einzelnen Präparate aufgetropft. Die anschließende Inkubation erfolgte stets über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch drei Waschschriffe mit PBS für je zehn Minuten entfernt, bevor der Fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper in 10 % FCS in PBS angesetzt und auf die Objektträger aufgebracht wurde. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Inkubation mit diesem Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Durch dreimaliges

Waschen mit PBS wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Um die Morphologie der Spermien besser darstellen zu können, wurde im Anschluss eine Zellkernfärbung durchgeführt. Dazu wurde der DNA-interkalierende und rot fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid in einer Konzentration von 5 µg/ml in H₂O angesetzt [Heydecke et al., 2006]. Spermienpräparate der Maus und Ratte wurden zur Kernfärbung für 15 Minuten in Propidiumiodid inkubiert; humane Spermienpräparate wurden für 15 Sekunden mit 10 µg/µl Propidiumiodid behandelt. Anschließend wurden drei zehnminütige Waschschrte in PBS durchgeführt, bevor die Objektträger dann mit Deckgläschen und Fluoreszenz-Eindeckmedium konserviert wurden. Die Analyse der Färbungen erfolgte am Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss).

3.2.4.3 Peptidblockierung immuncytochemischer Färbungen

Um die Spezifität der Epitopbindung eines Peptidantikörpers zu überprüfen, wurden Peptidblockierungsanalysen durchgeführt. Bei diesen Blockierungen wurde der Primärantikörper vor dem Auftragen auf das Präparat mit dem Peptid inkubiert, gegen das er generiert wurde. Das Peptid wurde dabei im zehnfachen Überschuss eingesetzt und für 30 Minuten bei 4 °C rotierend mit dem Antikörper in PBS inkubiert. Erst im Anschluss an diese Inkubation wurde FCS (10 %) zur Lösung gegeben. Anschließend wurde die Immuncytochemie wie vorangehend beschrieben durchgeführt.

3.2.4.4 Co-Färbungen mit dem Akrosomenmarker *Peanut agglutinin*

Zur Darstellung des Akrosoms von Spermien wurden Fluoreszenz-gekoppelte Lectine, wie das *Peanut agglutinin* (PNA) verwendet [Aviles et al., 1997]. PNA bindet spezifisch an das intakte Akrosom von Nagerspermien; durch die Koppelung an FITC oder TRITC kann diese Bindung auch in Kombination mit anderen Färbungen visualisiert werden. Für Co-Färbungen des Akrosoms wurden Spermien zunächst, wie in Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben, behandelt. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper und den darauf folgenden Waschschrten wurden die Präparate für 30 Minuten mit dem Fluoreszenz-gekoppeltem PNA (1 : 500 in 10 % FCS in PBS verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Spermien dreimal für je zehn Minuten mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben für die Fluoreszenzmikroskopie eingedeckelt. Erfolgte die Färbung des Akrosoms ohne parallele immuncytochemische Untersuchung, wurden die Spermien direkt nach der Fixierung und Blockierung mit der PNA-Lösung inkubiert und nach dreimaligem Waschen in PBS eingedeckelt.

3.2.5 Immunhistochemische Untersuchungen an Formalin-fixierten Geweben

Beim immunhistochemischen Nachweis von Proteinen wurde, ähnlich wie bei der Immuncytochemie (Abschnitt 3.2.4), ein Zwei-Antikörper-Detektionssystem mit einem an den Sekundärantikörper-gekoppelten Fluorochrom eingesetzt. Anders als bei der

Immunocytochemie stand bei der Immunhistochemie die Untersuchung der Lokalisation eines Antigens in einem Gewebeschnitt im Mittelpunkt.

3.2.5.1 Entnahme, Fixierung und Einbetten der Gewebe

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden Mäusen und Ratten vorsichtig entnommen, um eine Beeinträchtigung der Gewebestruktur durch mechanische Einwirkungen zu minimieren. Zur Fixierung wurden die Präparate dann unmittelbar in eine 10 %ige Formalin-Lösung (3,7 % Formaldehyd in PBS) gegeben, in der sie etwa 24 - 48 Stunden gelagert wurden. Die Organe wurden anschließend für die weitere Bearbeitung in die Pathologische Abteilung des Universitätsklinikums Marburg bzw. das Rechtsmedizinische Institut der LMU München gebracht, wo sie mit Hilfe eines Gewebeeinbettautomaten bzw. eines Gewebeinfiltrationsautomaten über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und anschließend paraffiniert wurden. Die Präparate wurden dann in Paraffin (Paraplast Plus) eingebettet und bis zur Anfertigung der Schnitte bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.5.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Von den gekühlten eingebetteten Präparaten wurden mit einem Mikrotom 3 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und mit Hilfe eines Objektträgers in ein 45 °C warmes Wasserbad überführt. Im warmen Wasser konnte sich das Paraffin ausdehnen, so dass die Schnitte vorsichtig geglättet wurden. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf speziell beschichtete Objektträger (Super Frost Plus) wurden die Paraffinschnitte zum Schmelzen des Paraffins und zum Anheften der Präparate an die Objektträger für 2 Stunden bei 60 °C inkubiert. Die Lagerung der Schnitte erfolgte anschließend bei 4 °C.

3.2.5.3 Immunhistochemische Färbungen

Um den wasserlöslichen Antikörpern Zugang zu den in Paraffin eingebetteten Geweben zu gewähren, mussten die Gewebeschnitte zunächst rehydriert werden. Dazu wurden die Objektträger zum Lösen des Paraffins zweimal für zehn Minuten in Xylol-Ersatz (Rotihistol) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend zum Entfernen des Xylols zweimal für fünf Minuten in Ethanol überführt. Die eigentliche Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch eine absteigende Ethanolreihe, in der die Schnitte für jeweils fünf Minuten in 80 %igen, bzw. 70 %igen Ethanol und schließlich in H₂O inkubiert wurden. Da durch die Formalinfixierung Proteine kovalent miteinander vernetzt werden, sind viele Epitope für Antikörper nicht mehr zugänglich. Zur Demaskierung der Antigene wurden die gewässerten Schnitte für zehn Minuten bei ca. 95 °C in Citratpuffer gekocht, und anschließend wurde die Lösung mit den sich darin befindenden Schnitten innerhalb von 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Schnitte zuerst mit einer Lösung aus 10 % NGS in PBS mit 0,5 % Tween 20 für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei diente das Ziegenserum der Blockierung, während das beigegebene

Detergenz Tween 20 dafür sorgte, dass die Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms reduziert wurde, und das Präparat trotz kleiner Volumina gleichmäßig benetzt wurde. Die Verdünnung des Primärantikörpers (siehe Abschnitt 2.4.1) wurde in PBS mit 0,5 % Tween 20 und 5 % NGS angesetzt, und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS mit 0,5 % Tween 20 für zehn Minuten wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Präparate zum Nachweis des Primärantikörpers eine Stunde bei Raumtemperatur mit der in PBS mit 0,5 % Tween 20 und 5 % NGS angesetzten Verdünnung des Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers (FITC-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper) in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Bei Bedarf wurde der Kernfarbstoff TO-PRO-3 der Sekundärantikörperlösung zugefügt (1 : 500 konzentriert), um die Zellkerne im Gewebe darzustellen [Ploeger et al., 2008]. Die Gewebeschnitte wurden anschließend dreimal zehn Minuten mit PBS mit 0,5 % Tween 20 gewaschen und mit Deckgläschen und Fluoreszenz-Eindeckmedium konserviert. Die Auswertung der immunhistochemischen Markierung erfolgte am Laser Scanning Mikroskop.

3.2.6 Immunhistochemische Untersuchungen an cryokonservierten Geweben

3.2.6.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Zur Gewinnung von Präparaten für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Organe wurden vorsichtig und zügig entnommen, um eine Degradation von Proteinen zu vermeiden und das Gewebe möglichst intakt zu lassen. Das Gewebe wurde mit 4 % PFA in Natriumphosphatpuffer für zwei Stunden bei 4 °C fixiert und anschließend über Nacht in 25 % Sucrose in PBS bei 4 °C inkubiert. Nach einem kurzen Waschschriff mit PBS wurden die Organe dann in Einbettmedium überführt, auf Trockeneis gekühlt, dadurch gehärtet und nach dem kompletten Durchfrieren bei -80 °C gelagert.

Zum Anfertigen von Gefrierschnitten wurde der gefrorene Block in ein Gefriermikrotom (Leica Microsystems) eingespannt. Bei einer Innentemperatur von -18 °C wurden 6 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost Plus Objektträger übertragen. Diese Schnitte wurden direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.2.6.2 Immunhistochemische Färbungen an Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden zunächst aufgetaut und bei Raumtemperatur 30 Minuten luftgetrocknet. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 30minütige Blockierung und Permeabilisierung in 1 % NGS und 0,1 % Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in der feuchten Kammer; der Primärantikörper wurde dafür in PBS mit 1 % NGS und 0,1 % Triton X-100 verdünnt (für Verdünnungen siehe Abschnitt 2.4.1). Nichtgebundener Antikörper

wurde durch dreimaliges Waschen für je zehn Minuten mit PBS entfernt. Der Nachweis des Erstantikörpers erfolgte Spezies-spezifisch mithilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers. Dieser Zweitantikörper wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem Schnitt inkubiert. Eine Darstellung der Zellkerne erfolgte durch eine parallele Inkubation der Schnitte mit einer 1 : 500 Verdünnung des DNA-interkalierenden Kernfarbstoffs TO-PRO-3 (Invitrogen) [Ploeger et al., 2008]. Ungebundene Antikörper und Kernfarbstoff wurden durch Waschen mit PBS entfernt und die Schnitte mit Fluoreszenz-Eindeckmedium und einem Deckglas konserviert. Die immunhistochemischen Markierungen wurden am konfokalen Mikroskop ausgewertet. Um die Spezifität einer Antikörperbindung zu überprüfen, wurden Peptidblockierungsanalysen, analog zur Peptidblockierung der beschriebenen immunocytochemischen Färbungen (Abschnitt 3.2.4.3), durchgeführt.

3.2.7 Nachweis von Fluoreszenzproteinen im Mausgewebe

Zum Nachweis der Reporterfluoreszenzproteine mCherry (monomeric Cherry Protein) und GFP (*green fluorescent protein*) im Gewebe von genetisch modifizierten Mäusen wurden Gefrier- und Paraffinschnitte verwendet, die, wie in den Abschnitten 3.2.6.1 bzw. 3.2.5.1 und 3.2.5.2 beschrieben, hergestellt wurden. Co-Immunfärbungen des Gewebes mit Antikörpern und Zellkernfärbungen wurden analog zu denen in Abschnitt 3.2.6.2 und 3.2.5.3 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Um ein Ausbleichen der exprimierten Fluoreszenzproteine zu vermeiden, wurden die Schnitte bei allen Wasch- und Inkubationsschritten lichtgeschützt aufbewahrt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind immortalisierte humane embryonale Nierenzellen (*H*uman *E*mbryonic *K*idney; HEK), die durch Transfektion mit Adenovirus (Typ 5)-DNA entstanden sind und 1977 erstmals beschrieben wurden [Graham et al., 1977]. In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293-Zellen des *flip in T-Rex* Systems (Invitrogen) verwendet sowie stabil transfizierte HEK293-flip-in-Zellen, die von Prof. Meyerhof vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE, Potsdam) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit 0,45 % Glucose, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit 37 °C warmen PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA Lösung (1 x Viralex Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin, 1,2 g/l EDTA in PBS) vom Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von frischem Medium wurde das

Trypsin inaktiviert bzw. das EDTA komplexiert, so dass die Zellen in gewünschter Dichte neu ausgesät werden konnten. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Braun, Melsungen) bestimmt. Die Expression der stabil transfizierten humanen Geschmacksrezeptoren wurde durch eine 24 - 48stündige Inkubation mit 0,5 µg/ml Tetracyclin induziert.

3.3.2 Cryokonservierung von HEK293-Zellen

Zur Cryokonservierung der Zellen wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, und der Zellrasen in der Flasche mit 10 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA wurden die Zellen vom Boden gelöst und in DMEM resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt und bei 1000 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Zellpellet in DMEM mit 10 % DMSO und 5 % FCS resuspendiert und in Einfrierröhrchen langsam (circa 1 °C pro Stunde) auf -80 °C abgekühlt.

3.3.3 Transfektion mit Hilfe von Metafectene

Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des polykationischen Transfektionsreagenzes Metafectene der Firma Biontex. Hierzu wurden in eine 6-Lochplatte 200.000 Zellen pro Loch (bei späterer immuncytochemischer Untersuchung auf ein steriles Deckgläschen) in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion der Zellen, die in der Regel zu 60 - 80 % konfluent waren.

Für eine Transfektion wurde die gewünschte Menge Plasmid-DNA (0,5 - 3 µg DNA) in 50 µl serumfreiem DMEM in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Pro Ansatz wurde serumfreies Medium in ein zweites Reaktionsgefäß vorgelegt und das Transfektionsreagenz ohne Berührung der Gefäßwand zugegeben (Gesamtvolumen 50 µl). Das Verhältnis von Metafectene (in µl) zu DNA (in µg) betrug 1 : 2 bis 1 : 3. Nach kurzem Mischen wurden die Ansätze vereinigt und zur Bildung von DNA/Metafectene-Komplexen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen getropft.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde ein Kontrollansatz mit einer für das grün-fluoreszierende Protein kodierenden DNA durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurde ein pcDNA3-eGFP-Vector (*enhanced GFP*) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 und 48 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Transfektionsrate hin analysiert (Anregungswellenlänge 470 nm; Filterwellenlänge 505 - 530 nm). Dazu wurde der Anteil fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt.

3.3.4 Ernten transfizierter Zellen

3.3.4.1 Probengewinnung für Western Blot Untersuchungen

Um Proben für Immunoblotting-Versuche zu gewinnen, wurden die in 6-Lochplatten ausgesäten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. Stabil transfizierte Zellen wurden ebenfalls in 6-Lochplatten ausgesät und 24 - 48 Stunden nach Induktion der Tetrazyklin abhängigen Proteinexpression verwendet. Zur Probengewinnung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, in 800 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.4.2 Immuncytochemische Untersuchungen von Zellkulturzellen

Für immuncytochemische Untersuchungen wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 Minuten mit -20 °C kaltem Methanol fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen für fünf Minuten mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit 10 % FCS in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in 5 % FCS in PBS verdünnt wurde, erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nichtgebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor die Zellen mit einem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper (in 5 % FCS in PBS; Verdünnung siehe 2.4.1) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Zur Färbung des Zellkerns wurde die Zweitantikörperverdünnung mit 0,5 µg/ml DAPI versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit Fluoreszenz Eindeckmedium auf Objektträgern konserviert. Die Auswertung der immunhistochemischen Markierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M).

3.4 Reproduktionsbiologische Techniken

3.4.1 Morphometrische Analyse der männlichen Reproduktionsorgane der Maus

3.4.1.1 Bestimmung des Hodengewichts und der Spermienzahl

Um die Reproduktionsorgane von Wildtypmäusen und Gen-defizienten Tieren zu analysieren, wurden 12 - 26 Wochen alte Tiere durch zervikale Dislokation getötet und zunächst das Körpergewicht bestimmt. Anschließend wurden die Hoden entnommen und gewogen. Nach zwei Tagen Trocknung bei 37 °C wurde das testikuläre Trockengewicht ermittelt. Aus den bestimmten Massen wurde zusätzlich das Verhältnis von Hodengewicht zum Körpergewicht berechnet.

Zur Untersuchung der Zahl reifer Spermien wurde der caudale Teil des Nebenhodens entnommen und in 2 ml HS Puffer überführt. Unter optischer Kontrolle wurde das Organ mehrmals eingeschnitten und die Spermien vollständig herausgedrückt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Spermiesuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 20 µl dieser Zell-Suspension wurden 1 : 40 mit H₂O verdünnt, und die Spermienzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die beschriebenen Untersuchungen zur Größe der Reproduktionsorgane wurden mit genetisch modifizierten und Wildtyp-Tieren mit identischem Stammhintergrund (Generation N2-N6, siehe Abschnitt 3.6.2) und gleichem Alter durchgeführt.

3.4.1.2 Untersuchung der Spermienmorphologie

Zur Analyse der Spermienmorphologie wurden Spermien, wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben, isoliert, 90 Minuten *in vitro* kapazitiert, fixiert und zur Darstellung des Akrosoms mit einer Coomassieblau-Färbelösung (s. Abschnitt) gefärbt. Anschließend wurde die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch begutachtet. Zur Ermittlung von kleinen Unterschieden in der Form des Spermienkopfes wurden Bilder der Zellen aufgenommen, die anschließend mithilfe des *Cell A* Programms (Olympus, Hamburg) vermessen wurden. Dabei wurde die Länge des Spermienkopfes (Abbildung 3.2, [I]), die Länge der geraden Verbindung zwischen Beginn und Ende des sichelförmigen Akrosoms ([II]) sowie Umfang ([III]) und Fläche ([IV]) des Kopfes bestimmt (zur Übersicht über die einzelnen Parameter, siehe Abbildung 3.2). Es wurden 5 Tiere pro Genotyp analysiert, dabei wurden jeweils 8 - 15 Zellen ausgewertet und der Mittelwert mit Standardfehler berechnet.

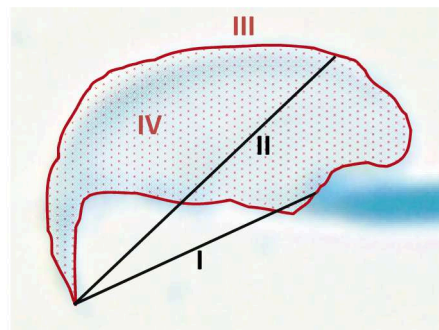


Abbildung 3.2: Morphometrische Untersuchung des Spermienkopfes.

Dargestellt ist eine Übersicht über einen mit Coomassieblau-Färbelösung gefärbten Spermienkopf mit den jeweils bestimmten Größen-Parametern. Es wurden die Länge des Spermienkopfes ([I]), der Abstand zwischen proximalem und distalem Ende des Akrosoms ([II]) sowie der Umfang ([III]) und die Fläche des Spermienkopfes ([IV]) ermittelt.

3.4.1.3 Analyse der Hodenmorphologie

Zur Darstellung der Hodenmorphologie wurden die Organe zunächst für 24 Stunden in Bouin-Lösung fixiert, anschließend für mehrere Tage mit 70 %igem Ethanol gewaschen und dann wie unter Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben in Paraffin eingebettet und

geschnitten (Abschnitt 3.2.5.2). Nach der Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Xylol-Alkohol-Reihe (Abschnitt 3.2.5.3) wurden diese einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen [Lillie et al., 1976], um einzelne Gewebsstrukturen wie Zellkerne und Cytoplasma sichtbar zu machen und einen Überblick über die Gewebemorphologie zu erhalten. Dabei färbt Hämalaun die basophilen, sauren Zellkerne blau, während überwiegend eosinophile Proteine des Cytoplasmas rötlich markiert werden. Zur Färbung wurden die rehydrierten Schnitte zunächst bei Raumtemperatur für zwölf Minuten in Mayer's Hämalaun-Lösung inkubiert und anschließend zum Bläuen zehn Minuten in H₂O gewaschen. Nach der Färbung mit 0,5 % wässriger Eosin Y-Lösung für zehn Minuten wurden die Schnitte erneut gewaschen und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 2 x 100 % Ethanol) und einem Bad in Xylol-Ersatz dehydriert und anschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Gewebemorphologie wurde mit Hilfe eines Olympus CX41 Mikroskops begutachtet und dokumentiert.

Zur Darstellung der Morphologie des Nebenhodens wurden Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Organe (Abschnitte 3.2.5.1 und 3.2.5.2) verwendet. Die HE-Färbung wurde wie für den Hoden beschrieben durchgeführt.

3.4.1.4 Nachweis von apoptischen Zellen im männlichen Keimdrüsengewebe der Maus

Um das Ausmaß apoptotischer Prozesse während der Keimzellentwicklung im Hoden von Gen-defizienten und Wildtyp-Tieren zu vergleichen, wurde die Zahl apoptotischer Zellen im Hoden mit Hilfe des TUNEL- (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*)-Verfahrens bestimmt [Gavrieli et al., 1992]. Dabei wurde die fragmentierte DNA apoptotischer Zellen enzymatisch mit einem Fluoreszenz-gekoppelten desoxy-Uridin-Triphosphat (dUTP) versehen und damit direkt im Gewebe fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht.

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen im Hodengewebe wurden Schnitte von Bouin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Organen verwendet (siehe Abschnitte 3.2.5.1, 3.2.5.2 und 3.4.1.2). Die rehydrierten Schnitte (siehe Abschnitt 3.2.5.3) wurden zunächst mit Proteinase K (20 µg/ml in 10 mM Tris, pH 7,4) bei 37 °C für 30 Minuten verdaut, um das Gewebe für die weitere Behandlung zugänglich zu machen. Nach zwei Waschschritten mit PBS (je fünf Minuten) wurden 50 µl *labeling*-Lösung des *Cell death detection kits* (Roche) auf die Schnitte gegeben, mit einer Laborfolie abgedeckt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert [Ramos und Wetzels, 2001]. Anschließend wurden die Schnitte dreimal gewaschen, zur Darstellung der Zellkerne mit 0,1 µg/µl DAPI für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS mit einem Fluoreszenz-geeigneten Eindeckmedium und einem Deckglas konserviert.

Zur Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen wurden die Schnitte fluoreszenzmikroskopisch betrachtet (Zeiss LSM 510 Meta) und die apoptotischen Zellen ausgezählt. Mithilfe der DAPI-Kernfärbung wurde dabei zunächst die Zahl der Hodentubuli pro Blickfeld bestimmt. Anschließend wurden die TUNEL-positiven Zellen im

Blickfeld gezählt, und ihre jeweilige Anzahl pro Tubulus und pro Blickfeld berechnet. Pro Hodenschnitt wurden 3-4 Blickfelder, die ca. 75 % der Gesamtfläche ausmachten, ausgezählt. Für jedes untersuchte Tier wurden 2 Objektträger mit 3 - 4 Hodenschnitten in zwei unabhängigen Ansätzen analysiert. Für den Vergleich der Apoptoserate im Keimdrüsengewebe wurden Wurfgeschwister der drei verschiedenen Genotypen verwendet (mindestens 5 Tiere pro Genotyp).

3.4.2 Motilitätsanalysen an isolierten Spermien (*computer assisted semen analysis* [CASA])

Die Spermienmotilitätsanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Susan Marschall am Helmholtz Zentrum München. Zur Gewinnung der Spermien wurde nach zervikaler Dislokation der Tiere der caudale Teil des Nebenhodens entnommen, in 0,9 % NaCl in H₂O gewaschen und von Fett und Bindegewebe befreit. Das Gewebe wurde in 500 µl vorgewärmten HTF Puffer überführt (siehe Abschnitt 2.7) und eingeschnitten, um ein Ausschwimmen der enthaltenen Spermien zu ermöglichen. Nach fünf Minuten wurden 10 µl der Spermiesuspension in 500 µl HTF Puffer gegeben, der mit Mineralöl überschichtet war, und die Keimzellen darin für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Computer-assistierte Spermienanalyse erfolgte mithilfe eines *IVOS Sperm Analyzer* (Hamilton Thorne Research) [Schneider et al., 2009]. Dazu wurden je 10 µl der Spermiesuspension in die beiden Messbereiche eines *2x-CEL* Objektträgers (80µm Tiefe; Hamilton Thorne Biosciences) gegeben und je fünf Messfelder ausgewählt, die bei optischer Kontrolle keine Luftblasen oder Gewebstücke aufwiesen. Die anschließende Analyse jedes Messfeldes erfolgte vollautomatisch mit 60 Hz für jeweils 0,5 Sekunden.

Folgende Parameter wurden erfasst [die jeweilige Einheit ist in eckigen Klammern angegeben]: Anteil der motilen Zellen (MOT) [%], Anteil progressiv motiler Zellen (PROG) [%], Pfadgeschwindigkeit (VAP, *average path velocity*) [µm/sec], Progressivgeschwindigkeit (VSL, *straight line velocity*) [µm/sec], Spurgeschwindigkeit (VCL, *curvilinear velocity*) [µm/sec], seitliche Kopfauslenkung (ALH, *amplitude of lateral head displacement*) [µm], Schlagfrequenz (BCF, *beat cross frequency*) [Hz], Linearitätsindex (STR, *straightness*, Quotient aus VSL und VAP) [%] und die Linearität (LIN, *linearity*, Quotient aus VSL und VCL) [%] (siehe Abbildung 3.3). Für jedes Tier wurden drei Objektträger mit jeweils zwei Messbereichen analysiert (mind. 2000 Zellen/Tier) und anschließend der Mittelwert für jeden Parameter errechnet.

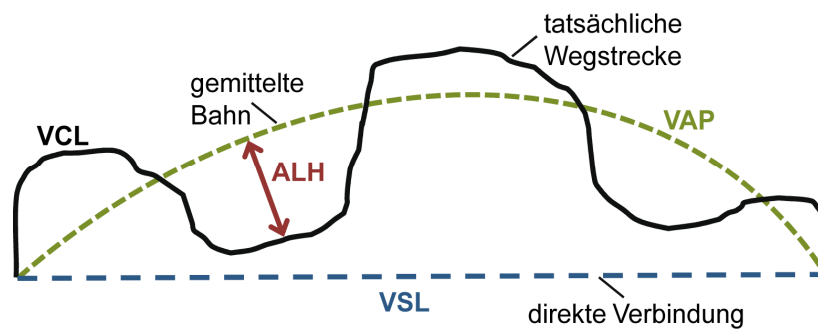


Abbildung 3.3: Motilitätsparameter der CASA-Messung.

Gezeigt ist eine schematische Übersicht über die Schwimmspur eines Spermiums (schwarz) und die daraus ermittelten Motilitätsparameter; zur Erklärung der Abkürzungen siehe oben stehenden Text.

Es wurden jeweils Geschwisterpaare der drei Genotypen (Wildtyp, heterozygot und homozygot) untersucht. Zur Auswertung wurde für jeden Parameter der Mittelwert \pm Standardfehler von drei Tieren ermittelt, die in unabhängigen Messungen analysiert wurden. Um die Spermienmotilität zwischen den jeweiligen Geschwistertieren besser vergleichen zu können, wurde zusätzlich eine Normierung vorgenommen. Dazu wurden die Werte eines Wildtyp-Tieres als 100 % festgelegt, und die Daten der Wurfgeschwister darauf bezogen. Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger gepaarter studentischer t-Test im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

3.4.3 Bestimmung des Serum-Testosteronspiegels

Zur Gewinnung von Serum wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und anschließend sofort dekapitiert. Das austretende Blut wurde in einer Petrischale gesammelt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um eine vollständige Gerinnung sicherzustellen. Durch eine Zentrifugation des Blutes bei 4500 rcf für zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden zelluläre Blutbestandteile sedimentiert. Anschließend wurde der Serumüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung des Testosteronspiegels im Serum erfolgte mithilfe eines *Testosteron EIA kits* der Firma Cayman Chemicals. Da Antikörper und andere Proteinbestandteile der Probe diese Bestimmung stören könnten, erfolgte zunächst eine Extraktion des Testosterons aus dem Serum nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurden 50 μl der aufgetauten Serumproben mit 250 μl Diethylether versetzt, kräftig gemischt, und anschließend wurde die organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion des Serums wurde zweimal wiederholt und die organischen Überstände vereinigt. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac, Bachofer) bei Raumtemperatur verdampft, und die Pellets im Reaktionspuffer resuspendiert. Die Bestimmung der Testosteronmenge erfolgte anschließend nach dem Protokoll des Herstellers. Die Messung der Absorption des Ellmanns Reagenzes wurde in einem Fluoreszenzspektrometer (FLUOstar Omega, BMG Labtech) durch-

geführt. Serumproben wurden in Triplikaten analysiert, und die Testosteronmenge in der jeweiligen Probe wurde durch Vergleich mit einer Standardkurve ermittelt. Untersucht wurden mindestens drei Geschwistertiere pro Genotyp.

3.4.4 Untersuchung der Spermienkapazitation durch Quantifizierung der Cholesterolauslagerung

Eine der grundlegenden Veränderungen, die eine Spermienzelle während des sekundären Reifungsvorgangs der Kapazitation erfährt, besteht in der Auslagerung von Cholesterol aus der Plasmamembran. Diese Verminderung der Cholesterolmenge in der Membran ist eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kapazitation *in vitro* und *in vivo* [Witte und Schafer-Somi, 2007; Gadella et al., 2008; Abou-Haila und Tulsiani, 2009; Sheriff und Ali, 2010].

Aufgrund ihrer essentiellen Bedeutung für die Kapazitation wurde die Auslagerung von Cholesterol aus der Spermienmembran als Parameter gewählt, um den Verlauf und das Ausmaß der Kapazitation von Wildtyp- und Gen-defizienten Spermien zu untersuchen. Dafür wurden Spermien wie unter Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben in Kapazitationspuffer isoliert, die Zellzahl bestimmt, die Zellen auf einzelne Reaktionsgefäße verteilt und bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurde je ein Reaktionsgefäß entnommen, bei 400 rcf für fünf Minuten zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde bis zur Bestimmung des Cholesterolgehaltes bei -20 °C gelagert. Parallel zur Inkubation wurde die Spermienkonzentration in der Probe mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Bestimmung der Cholesterolmenge im Kapazitationsüberstand [Butler et al., 2002] erfolgte unter Verwendung des *Amplex Red Cholesterol Systems* von Invitrogen nach Herstellerangaben. Dazu wurden in einer 96-Lochplatte 50 µl aufgetaute Probe mit der gleichen Menge *Amplex Red* Lösung gemischt, für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, und anschließend wurde die Fluoreszenz der Probe bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Ermittlung des Cholesterolgehaltes der Proben erfolgte durch Vergleich mit einer Cholesterolstandardkurve. Die Cholesterolmenge beim Start der Inkubation (Zeitpunkt $t = 0$) wurde als Basalwert angesehen und von allen Proben abgezogen. Angegeben ist die Menge an ausgelagertem Cholesterol pro Spermium. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte und Standardfehler von mindestens fünf Tieren pro Genotyp. Als Wildtyp-Tiere wurden C57BL/6 Tiere verwendet, die *Tas1r1*-defizienten Mäuse waren in erster Generation auf den C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt (N1; siehe Abschnitt 3.6.1).

3.4.5 Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion

3.4.5.1 Auslösen der Akrosomreaktion

Nach zervikaler Dislokation wurde Mäusen unverzüglich der caudale Teil des Nebenhodens entnommen, in HS Puffer gewaschen und in 2 ml auf 37 °C vorgewärmten Kapazitierungspuffer überführt und mehrfach eingeschnitten. Die Spermien wurden vorsichtig mit zwei Pinzetten aus dem Nebenhoden herausgedrückt und für 60 bis 90 Minuten bei 37 °C im CO₂-Schränk kapazitiert. Anschließend wurden die Spermien mit 2 - 4 ml Kapazitierungspuffer verdünnt und 50 - 200 µl der kapazitierten Spermien wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem die gewünschten Stimulationssubstanzen (zehnfach konzentriert) vorgelegt waren. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation im CO₂-Schränk wurden die Proben fixiert und der akrosomale Status bestimmt.

Um die spontane Rate der akrosomalen Exocytose ohne Stimulus zu überprüfen, wurden jeweils 50 µl Spermien suspension zum Zeitpunkt der Spermienisolierung (t = 0) und während der Kapazitierung (t = 30, 60, 90, 120 Minuten) entnommen und fixiert. Als Positivkontrolle zur Bestimmung der maximal möglichen Akrosomreaktion wurde jeweils ein Ansatz mit dem Calcium-Ionophor A23187 (10 µM) behandelt, Kontrollansätze wurden mit 0,1 % DMSO, in dem auch das A23187 gelöst war, inkubiert.

Um den Einfluss von Geschmacksstoffen auf die Akrosomreaktion zu testen, wurden kapazitierte Zellen, wie oben beschrieben, mit verschiedenen Süßsubstanzen (Glucose [10 mM, 100 mM], Saccharin [1 mM], Acesulfam K [1 mM, 10 mM, 100 mM], Thaumatin [1 µM, 10 µM, 100 µM]) bzw. mit den Umami-Stimuli Mononatriumglutamat [1 mM und 10 mM] und Inosin 5'-monophosphat (IMP, [1 mM, 5 mM]) inkubiert. Zur Kontrolle von Effekten des Natriums in den verwendeten Salzen wurden Kontrollansätze mit der gleichen Konzentration NaCl behandelt. Der Effekt von bitteren Substanzen auf die Akrosomreaktion wurde geprüft, indem Zellen mit 1 mM, 5 mM und 10 mM Denatoniumbenzoat stimuliert wurden.

Die Fähigkeit von Spermien auf den physiologischen Auslöser der Akrosomreaktion, die *Zona pellucida*, zu reagieren, wurde untersucht, indem 50 µl kapazitierter Spermien mit 350 - 500 solubilisierten *Zonae pellucidae* (7-10/µl) (siehe Abschnitt 3.4.6) für 30 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt und der akrosomale Status bestimmt [Butscheid et al., 2006].

3.4.5.2 Bestimmung des akrosomalen Status durch Coomassie-Färbung

Die Bestimmung des akrosomalen Status erfolgte durch eine Coomassie-Färbung [Jungnickel et al., 2001]. Zur Fixierung der Spermien wurden diese mit dem zehnfachen Volumen Fixierungspuffer gemischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Durch Zentrifugation (16000 rcf, 1 Minute, Raumtemperatur) wurden die fixierten Spermien sedimentiert, in 200 µl Waschpuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 20 µl des Überstandes resuspendiert. Diese Spermien suspension wurde auf Objektträger pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Spermien für

sechs Minuten in einer Coomassie-Färbelösung (s. Abschnitt 2.7) inkubiert, die das intakte Akrosom eines Spermiums aufgrund dessen hoher Proteindichte tiefblau anfärbt [Lu et al., 2002]. Die Objektträger wurden einmal in H_2O gewaschen und dann mit angewärmter Glyceringelatine unter einem Deckglas konserviert.

Zur Quantifizierung der Akrosomreaktion wurde der akrosomale Status von mindestens 200 Spermien pro Objektträger lichtmikroskopisch evaluiert. Das Bild einer Spermien-Coomassie-Färbung und eine Beurteilung des akrosomalen Status ist in Abbildung 3.4 beispielhaft gezeigt. Um eine objektive Quantifizierung zu gewährleisten wurde die Beschriftung aller Objektträger verdeckt und die Präparate „blind“ ausgezählt. Die Auswertung der Daten zur Ermittlung des prozentualen Anteils Akrosom-reagierter Spermien erfolgte mit Hilfe von *Microsoft Excel* (Redmont, USA).

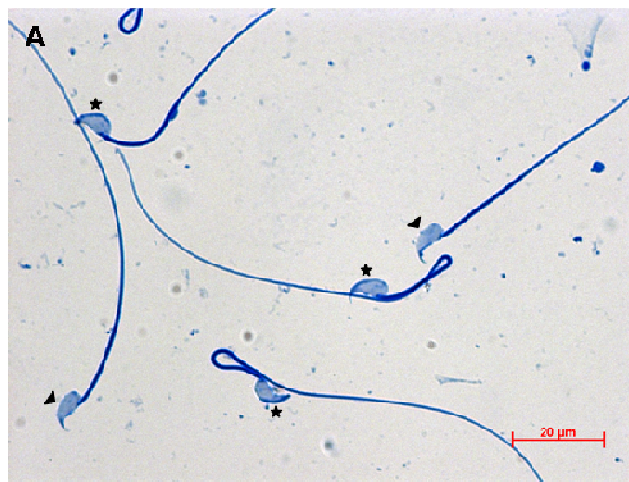


Abbildung 3.4: Coomassie-Färbung von Mausspermien.

Spermien der Maus wurden frisch isoliert, kapazitiert und dann mit A23187 (10 μM) stimuliert, um die Akrosomreaktion auszulösen. Nach der Fixierung wurden die Spermien mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Das intakte, proteinreiche Akrosom ist als dunkelblaue Sichel am Spermienkopf erkennbar (★). Bei Akrosom-reagierten Spermien ist diese dunkelblaue Färbung nicht mehr zu detektieren (▼).

3.4.6 Zona pellucida Präparation

Da die *Zona pellucida* aufgrund ihres Glykoproteinreichtums die Tendenz hat, an negativ-geladenen Plastikoberflächen zu haften, wurden für alle Aufreinigungs- und Versuchsansätze mit *Zona pellucida* ausschließlich mit Sigmacote (Sigma-Aldrich) beschichtete Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet.

3.4.6.1 Präparation von *Zona pellucida*

Zur Präparation von *Zona pellucida* wurden 20 adulten weiblichen Balb/C-Mäusen nach zervikaler Dislokation die Ovarien ohne Fett und Eileiter entnommen und in 2 ml 4 °C kalten HB⁺ Puffer (50 ml HB + Aprotinin [0,2 mg/ml], + DNase [0,2 mg/ml], + eine Tablette *Mini Complete* Protease Inhibitor) überführt. In einem Homogenisator (Kontes) wurde das Gewebe zunächst grob aufgeschlossen und nach Zugabe von 200 μl NP-40 (10 % in H_2O) und 200 μl Natriumdesoxycholat (10 % in H_2O) homogenisiert, bis keine

sichtbaren Gewebeteilchen mehr vorhanden waren. Das so gewonnene Homogenisat wurde auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten in einem 15 ml Reaktionsgefäß geschichtet, der sich aus einer 22 %igen-Schicht (3 ml), einer 10 %igen-Schicht (2 ml) und einer 2 %igen-Schicht (2 ml) von Percoll in HB⁺ Puffer zusammensetzte. Das Homogenisat wurde dann durch zweistündige Zentrifugation mit 200 rcf bei 4 °C im Gradienten aufgetrennt. Nach dieser Zentrifugation befanden sich die *Zonae* in der 10 %-Percoll-Fraktion des Gradienten. Diese Fraktion wurde vorsichtig entnommen, mit HB⁺ Puffer auf 10 ml aufgefüllt und dann auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Durch Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten bei 16000 rcf wurden die *Zonae* sedimentiert, und der Überstand bis auf jeweils 500 µl abgenommen. Die *Zonae* wurden im restlichen Überstand resuspendiert, in Reaktionsgefäßen vereinigt und erneut bei 4 °C für 10 Minuten mit 16000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf 500 µl abgenommen, und die *Zonae* durch drei- bis viermaliges Wiederholen dieses Vorgangs in einem Reaktionsgefäß vereinigt und durch Zentrifugation (4 °C, 16000 rcf, 10 Minuten) pelletiert. Die *Zonae* wurden dann in 100 µl des Überstandes aufgenommen.

Zur Quantifizierung der präparierten *Zona pellucida* wurden je drei Tropfen (je 1 µl) dieser Suspension auf einen Objektträger aufgetragen und im Lichtmikroskop die Gesamtzahl der *Zonae pellucidae* bestimmt. Diese wurden anschließend in 1 ml PBS verdünnt und dreimal mit PBS gewaschen (Pelletierung: 16000 rcf, 10 Minuten, 4 °C), um mögliche Percoll-Reste zu entfernen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die *Zonae pellucidae* für maximal zwei Tage bei 4 °C in PBS gelagert.

3.4.6.2 Solubilisierung von *Zona pellucida*

Um die Glykoproteine ZP1, ZP2 und ZP3 der *Zona pellucida* zu solubilisieren, wurde die *Zona*-Suspension einer starken Erniedrigung des pH-Wertes auf 2,5 und einem Erwärmungsschritt auf 60 °C unterzogen. Dazu wurden die in PBS aufbewahrten *Zonae pellucidae* zunächst durch Zentrifugation bei 4 °C für zehn Minuten mit 16000 rcf pelletiert, der Überstand wurde abgenommen, und das Pellet wurde in 1 ml 2,5 M NaH₂PO₄ (pH 7,0) resuspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten mit 16000 rcf wurde der Überstand bis auf 50 µl abgenommen, und die *Zonae* in 500 µl 2,5 M NaH₂PO₄ (pH 7,0) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt, und der Überstand bis auf 10 µl abgenommen. Durch die Zugabe von 20 µl 5 M NaH₂PO₄ (pH 2,5) wurde das Pellet resuspendiert, und die *Zonae* durch Erhitzen auf 60 °C für 20 Minuten solubilisiert. Eine Zentrifugation mit 16000 rcf für zwei Minuten bei Raumtemperatur trennte die solubilisierten, im Überstand befindlichen Proteine von Zelltrümmern und nicht-solubilisierter *Zona pellucida*. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und das Pellet nochmals in 20 µl 5 M NaH₂PO₄ (pH 2,5) resuspendiert und für 20 Minuten auf 60 °C erhitzt, um die Ausbeute an solubilisierten *Zona pellucida* Proteinen zu maximieren. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Überstände der beiden Solubilisierungs-

schritte vereinigt, mit 55 µl zweifachem HS Puffer mit BSA und NaHCO₃ (pH 7,6) versetzt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.5 Funktionelle Untersuchungen

3.5.1 Messung von intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen in Spermien mit dem Ca²⁺-Chelator Fura-2

Zur Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde der fluoreszierende Ca²⁺-Chelator Fura-2 eingesetzt [Grynkiewicz et al., 1985]. Zur Beladung von Zellen mit Fura-2 wurde der Acetoxymethylester des Farbstoffs gewählt (Fura-2-Acetoxy-methylester [Fura-2-AM]), da dieser durch seine Lipophilie leicht durch die Zellmembran hindurchtritt. Im Cytoplasma wird diese membranpermeable Form dann von ubiquitär exprimierten Esterasen zum freien Fura-2 gespalten, das aufgrund seiner hydrophilen Struktur die Zelle nicht mehr verlassen kann, so dass eine Rückdiffusion in den extrazellulären Raum verhindert wird (zur Übersicht siehe [Takahashi et al., 1999]). Nach Bindung von Ca²⁺ an Fura-2 verschiebt sich die Wellenlänge des Exitationsmaximums des Farbstoffs von 380 nm nach 340 nm, wobei die Emissionswellenlänge von 510 nm nahezu unverändert bleibt. Am isosbestischen Punkt, bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm ist die Fura-2 Fluoreszenz hingegen unabhängig von der Menge der gebundenen Calcium-Ionen. Damit bietet sich zum einen die Möglichkeit, die Beladung einer Zelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration in der Zelle zu überprüfen. Zum anderen kann die Relation der Fluoreszenzsignale bei 340 nm (F340) und 380 nm (F380) genutzt werden, um Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu quantifizieren. Dieser Quotient aus F340 und F380 wird im Weiteren als Fura-2-Ratio bezeichnet (siehe Abbildung 3.5). Durch diese ratiometrische Auswertung wird die Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration unabhängig von Änderungen der absoluten Fura-2 Fluoreszenz, wie sie z. B. durch Ausbleichen, Leck oder unterschiedlich starke Beladung der Zellen entstehen können.

Somit kann die Fura-2-Ratio genutzt werden, um die intrazelluläre freie Ca²⁺-Konzentration unabhängig von der absoluten Fura-2 Fluoreszenz zu berechnen. Die Umrechnung erfolgt mithilfe folgender Formel [Grynkiewicz et al., 1985]:

$$[Ca^{2+}]_i = K * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * F380_{min} / F380_{max}.$$

Dabei steht R (Fura-2-Ratio) für das Verhältnis der Fluoreszenzen F340/F380. R_{min} und R_{max} bezeichnen die Fura-2-Ratio unter Ca²⁺-freien Bedingungen (R_{min}) bzw. bei Ca²⁺-Sättigung (R_{max}); F380_{min} und F380_{max} stehen für die absoluten Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm unter den genannten Extrembedingungen; K bezeichnet die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Ca²⁺ und beträgt bei Raumtemperatur (22 °C) 264 nM.

R_{min}, R_{max}, sowie F380_{min} und F380_{max} sind stark vom verwendeten technischen System (Objektive, Deckgläser etc.) sowie dem analysierten Zelltyp abhängig und müssen

daher für jede Anwendung gesondert ermittelt werden. Zur Bestimmung der entsprechenden Parameter in Spermien wurden die Keimzellen zunächst für fünf Minuten in Ca^{2+} -freiem HS Puffer mit 15 mM NaHCO_3 , 5 μM Ionomycin und 10 mM EGTA inkubiert. Anschließend wurden die Fura-2-Ratio (R_{\min}) sowie die Fluoreszenzintensität bei 380 nm ($F_{380_{\min}}$) bestimmt (siehe Abschnitt 3.5.1.2). Durch Zugabe von CaCl_2 (60 mM Endkonzentration) wurde anschließend eine Ca^{2+} -Sättigung des Farbstoffs hervorgerufen, und der R_{\max} und $F_{380_{\max}}$ Wert bestimmt. Die Ergebnisse dieser Kalibrierung, unter Verwendung eines 60er Öl-Objektivs (Olympus) sind:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 264 \text{ nM} * (R - 0,203) / (1,133 - R) * 4,108$$

3.5.1.1 Vorbereiten und Beladen von Spermien zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2

Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von Spermienzellen zu untersuchen, wurden Spermien zunächst aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert und entweder für 15 Minuten in HS Puffer inkubiert (unkapazitiert) oder zunächst für 60 Minuten kapazitiert (siehe Abschnitt 3.4.5). Als Waschpuffer wurde im Folgenden bei unkapazitierten Spermien HS ohne Zusätze verwendet, bei kapazitierten Spermien HS mit 15 mM NaHCO_3 (HS^+). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit jeweils 1 ml Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 400 rcf, 5 Minuten, Raumtemperatur) und dann in 1 ml Puffer mit 3 μl Pluronic F-127 (10 %) und 25 μM Fura-2-AM resuspendiert. Zur Beladung wurden die Zellen dann 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde nicht aufgenommenes Fura-2 durch dreimaliges Waschen mit Puffer (HS bzw. HS^+) und Zentrifugationen bei 400 rcf für 5 Minuten entfernt, und die Spermien wiederum in ca. 500 μl Puffer resuspendiert. Um eine vollständige Verseifung des Fura-2 Esters zu gewährleisten, wurden die Zellen nochmals für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bevor mit der Messung begonnen wurde.

3.5.1.2 Einzelzellmessung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an Spermien

Die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration einzelner Spermien erfolgte mithilfe eines Mikroskop-basierten *Imaging Systems* (Till Photonics). Dabei wurde eine Mikroskop-Plattform von Olympus (IX70) und ein 60er Öl-Objektiv (Olympus, Hamburg) verwendet. Als Lichtquelle wurde ein Monochromator eingesetzt (Polychrom V, Till Photonics), der einen extrem schnellen Wechsel zwischen den verschiedenen Anregungswellenlängen ermöglicht. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einer CCD Kamera (Andor, Belfast [Großbritannien]) detektiert.

Da Spermien nur über eine schwache Fura-2 Fluoreszenz verfügen, wurde mit einem vierfachen *binning* gearbeitet, bei dem jeweils vier Pixel des Kamerachips gemeinsam ausgelesen werden, um die Quantenausbeute und damit den Signal-Rauschabstand zu erhöhen und gleichzeitig Phototoxizität durch lange Belichtungszeiten zu vermeiden.

Um die Spermien für die Messung an Glasdeckgläser anheften zu können, wurden diese zunächst für eine Stunde mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Laminin (in PBS) beschichtet, dann mit H_2O

gewaschen und anschließend mit Poly-L-Ornithin (0,01 % in H₂O) bedeckt. Nach circa einstündiger Inkubation wurde das Poly-L-Ornithin abgesaugt und die Deckgläser zweimal mit H₂O gewaschen, getrocknet und bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

Um die Spermien für die Messung an Glasdeckgläser anzuheften, wurden die Oberfläche dieser Deckgläser zunächst für eine Stunde mit 50 µg/ml Laminin (in PBS) beschichtet, dann mit H₂O gewaschen und anschließend mit Poly-L-Ornithin (0,01% in H₂O) bedeckt. Nach circa einstündiger Inkubation wurde das Poly-L-Ornithin abgesaugt und die Deckgläser zweimal mit H₂O gewaschen, trocknen gelassen und bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

Zur Messung wurde ein Deckglas in die Messkammer eingespannt und 10 - 15 µl Spermiesuspension aufgetropft. Dabei wurde bei kapazitierten Spermien besonders darauf geachtet, die Spermien aus dem oberen Teil des aufrecht stehenden Reaktionsgefäßes zu verwenden, um die Menge an immotilen, toten Zellen zu minimieren. Nach einer Anheftungszeit von einer Minute wurde das Deckglas zweimal mit HS (unkapazitierte Zellen) bzw. HS⁺ (kapazitierte Zellen) gewaschen, und die Zellen mit 400 µl des Puffers bedeckt. Zur Stimulation der Zellen wurden während der Messung 200 µl der jeweiligen Stimulationssubstanz mithilfe einer Mikroliterpipette per Hand zugegeben.

Zur Überprüfung, ob die Zellen vital waren, wurden diese gegen Ende der Messung mit 1 - 5 µM Ionomycin, einem Calcium-Ionophor, das einen Einstrom von Ca²⁺ vermittelt [Liu und Hermann, 1978], stimuliert, um die Höhe des maximal möglichen Ca²⁺-Signals zu testen.

Die Spermien wurden zunächst bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm betrachtet, um die Anheftung und die Fura-2 Beladung zu kontrollieren. Die Schwanzbewegung der angehefteten Spermien erlaubte darüber hinaus eine Einschätzung der Vitalität der verwendeten Zellen. Eine Aufnahme der Fluoreszenzintensität bei 360 nm wurde benutzt, um die *regions of interest* (ROI), also die Bereiche, aus denen die Fura-2-Ratios für jede einzelne Zelle extrahiert wurden, zu markieren. Dabei wurden nur morphologisch intakte und gleichmäßig beladene Zellen berücksichtigt, die mit dem Kopf am Deckglas angeheftet waren.

Zur Bestimmung der basalen Ca²⁺-Konzentration und deren Veränderung nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen wurden die Zellen alternierend mit 340 nm und 380 nm angeregt und jeweils die Fluoreszenz bei 510 nm registriert. Bei Spermien wurde eine Belichtungszeit von 10 ms und eine Zyklusdauer von einer Sekunde gewählt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten und der Fura-2-Ratios in den markierten Bereichen (ROIs) erfolgte mithilfe des Programms *Tillvision* (Tillphotonics). Für die Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration wurde die ROI sehr eng um den Spermienkopf gezogen, um möglichst wenig Hintergrund mit einzubeziehen. Wurde der Effekt eines Stimulus auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration bestimmt, wurde der Bereich, aus dem die Fluoreszenzintensitäten extrahiert wurden, großflächiger angelegt,

um auch Spermienköpfe, die sich leicht oszillierend bewegten, über den gesamten Messzeitraum erfassen zu können.

Für die Analyse der Ca^{2+} -Konzentration in Spermien wurden Gen-defiziente und Wildtyp-Spermien aus einem Wurf bzw. gleichaltrige Tiere mit identischem Stammhintergrund (N2 und N3) verwendet.

3.5.1.3 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Zellpopulationen

Um Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in ganzen Zellpopulationen und nicht nur im Kopfbereich einzelner Spermien zu messen, wurde ein Fluoreszenzspektrometer mit einem Excitationsfilter von 340 ± 15 nm und 380 ± 15 nm und einem Emissionsfilter von 520 ± 20 nm eingesetzt. Die Beladung der Zellen mit Fura-2 erfolgte analog zu Abschnitt 3.5.1.1. Um immotile und tote Zellen auszuschließen wurden nach der Esterspaltung nur die oberen 700 - 800 μl der Spermien suspension im Reaktionsgefäß zur Messung verwendet. Dazu wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und auf 5 bzw. 10 Mio/ml eingestellt. 90 μl dieser Spermien suspension wurden dann in ein Loch einer für Fluoreszenzmessungen geeigneten 96-Lochplatte gefüllt. Um Stimulationseffekte mit hoher Sensitivität innerhalb des linearen Messbereichs des Gerätes untersuchen zu können, wurden die Signalstärken für die beiden Fluoreszenzanregungswellenlängen optimiert. Dazu wurde die Intensität des Gerätes (*gain*) so eingestellt, dass die basale Fluoreszenzemission 65 % der maximal messbaren Fluoreszenz (260000 Fluoreszenzeinheiten) betrug.

Nach dem Start der Messung wurden zu einem festgelegten Zeitpunkt 10 μl bzw. 20 μl der jeweiligen Testsubstanz durch das integrierte Pumpensystem automatisiert zugegeben. Während der Messung wurde die Fluoreszenz nach Anregung mit 340 nm (F340) bzw. 380 nm (F380) in Intervallen von 1,16 Sekunden bestimmt. Aus den so gewonnenen Emissionswerten wurde dann die Fura-2-Ratio berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Ein beispielhafter Verlauf von F340, F380 und der Fura-2-Ratio nach Injektion von 1 μM Ionomycin ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Die Untersuchung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Spermienpopulationen wurde an Gen-defizienten (Stammhintergrund N1, N2 und N3) und Wildtyp-Tieren (identischer Stammhintergrund und C57BL/6 Mäuse) durchgeführt.

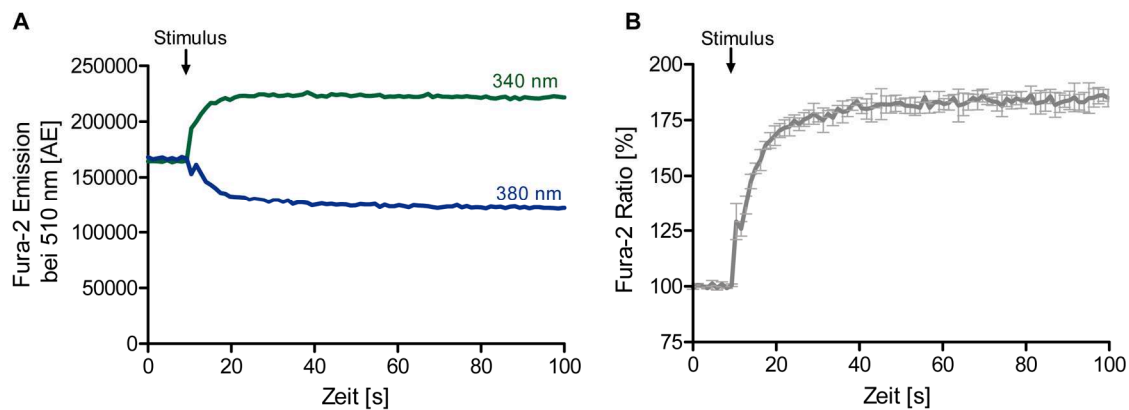


Abbildung 3.5: Exemplarische Fura-2 Messung einer Spermien-Zell-Population.

Dargestellt ist ein typischer Verlauf der Fura-2 Fluoreszenzemissionen von Spermien nach Injektion von 1 μM Ionomycin ([Stimulus], Pfeil). Durch das Ionophor strömt Ca^{2+} in die Zelle ein, was zu einer Zunahme der Anregungseffizienz bei 340 nm ([A], grüne Kurve) und zu einer Abnahme der Fluoreszenz bei Excitation mit 380 nm führt ([A], blaue Kurve). [B] zeigt einen deutlichen Anstieg der Fura-2-Ratio (F340/F380) nach der Stimulation mit dem Calcium-Ionophor. Gezeigt sind Mittelwerte [A] bzw. Mittelwerte \pm Standardfehler [B] von drei Messungen einer Spermienpopulation. AE: arbiträre Einheiten

3.5.2 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration von Spermien

3.5.2.1 Stimulation der Spermien

Für die Analyse der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden sowohl unkapazitierte als auch kapazitierte Spermien verwendet. Dazu wurde einer Maus der caudale Teil des Nebenhodens entnommen, in HS Puffer gewaschen und dann entweder in HS (unkapazitiert) oder in Kapazitierungs-puffer (kapazitiert) überführt und mehrfach eingeschnitten, um ein Ausschwimmen der Spermien zu ermöglichen (vergleiche auch Abschnitt 3.2.1.2). Unkapazitierten Spermien wurden für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert; kapazitierte Spermien wurden für eine Stunde bei 37 °C in Kapazitierungs-puffer inkubiert.

Anschließend wurden die Spermien bei 400 rcf für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und in HS (unkapazitiert) bzw. HS^+ (kapazitiert) resuspendiert. Die kapazitierten Spermien wurden anschließend nochmals mit 2 ml HS^+ gewaschen, um BSA-Reste aus dem Puffer zu entfernen. Anschließend wurde die Zellzahl auf circa 10 Mio/ml eingestellt, und je 100 μl Spermien-suspension wurden zu 100 μl auf 37 °C vorgewärmter Stimulationssubstanz gegeben, durch sanftes Pipettieren gemischt und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt, und die Proben bis zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes bei -80 °C gelagert. Die jeweiligen Stimulationssubstanzen wurden in dem Puffer gelöst, in dem sich auch die Spermien befanden, also in HS-Puffer (unkapazitierte Spermien) bzw. in HS^+ (kapazitierte Spermien). Als Stimuli wurde Puffer (Basalwert), 500 μM IBMX, 50 mM NaHCO_3 , 10 mM Mononatriumglutamat, 1 mM IMP oder eine

Kombination der verschiedenen Substanzen verwendet; angegeben sind jeweils Endkonzentrationen in der Spermiesuspension.

3.5.2.2 cAMP Extraktion

Zur Extraktion des cAMP aus den Spermienproben wurden diese nach Zugabe von 100 µl 10%iger Perchlorsäure unter ständigem Schütteln bei 37 °C aufgetaut. Die ausgefallenen Proteine wurden dann durch 15minütige Zentrifugation mit 3000 rcf bei 4 °C pelletiert. 250 µl des Überstandes wurden für die anschließende Neutralisation in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Der Überstand wurde zunächst mit 62,5 µl 10 mM EDTA (pH 7,0) und 340 µl einer 1 : 1 Mischung aus Chloroform und Tri-n-octylamin versetzt und anschließend je dreimal zehn Sekunden lang gevortext. Eine Phasentrennung wurde durch fünfminütige Zentrifugation mit 1500 rcf bei Raumtemperatur erreicht. Der wässrige Überstand, in dem sich das cAMP befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend für die cAMP-Bestimmung eingesetzt.

3.5.2.3 cAMP-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der cAMP-Konzentration in den extrahierten Proben erfolgte unter Verwendung des *cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) Systems*. Dieses Kit besteht aus einer 96-Lochplatte, die mit einem Esel-anti-Kaninchen-Antikörper beschichtet ist, der wiederum einen Kaninchen-anti-cAMP-Antikörper bindet. Das Prinzip des Assays beruht auf der Konkurrenz zwischen dem cAMP in der Probe und einer definierten Menge an exogen zugegebenem Peroxidase-gekoppeltem cAMP um die Bindung an die anti-cAMP IgG. Je mehr cAMP in der Probe vorliegt, umso weniger cAMP-Peroxidase wird gebunden. Der Nachweis der cAMP-Peroxidase Bindung erfolgt dann mithilfe des Substrats TMB (Tetramethylbenzidin), das durch die Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird, der bei 630 nm absorbiert. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird dieser Farbstoff gelb, absorbiert bei 450 nm und bleibt bis zu 60 Minuten stabil.

Zur Quantifizierung der cAMP-Konzentration in den Spermien wurden je 100 µl der extrahierten Probe pro Loch eingesetzt und mit 100 µl anti-cAMP Antiserum versetzt. Für die Standardkurve wurden entsprechend 100 µl einer definierten cAMP-Konzentration und 100 µl Antiserum eingesetzt. Die Platte wurde dann für zwei Stunden auf Eis stehend auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl cAMP-Peroxidase zugegeben und erneut für eine Stunde taumelnd auf Eis inkubiert. Nachdem die Löcher der 96-Lochplatte viermal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen wurden, wurde die Platte durch leichtes Aufschlagen auf ein saugfähiges Papier getrocknet, mit 150 µl des auf Raumtemperatur vorgewärmten TMB Substrats versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur sanft taumelnd inkubiert. Im Anschluss wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt, und die Absorption bei 450 nm gemessen. Zur Auswertung wurde parallel eine Standardkurve

mit definierten Mengen an cAMP erstellt. Alle extrahierten Proben und die Standardkurve wurden in Doppelansätzen bestimmt.

Zum Vergleich der basalen und induzierten cAMP-Konzentrationen in Mausspermien von genetisch-veränderten und Wildtyp-Tieren wurden Geschwistertiere und gleichaltrige Tiere mit identischem Stammhintergrund (N2 und N3) verwendet.

3.6 Arbeiten mit Tieren

3.6.1 Zucht der Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten verschiedenen Wildtyp-Inzuchtmausstämme (C57BL/6, 129SV und Balb/C) sowie die Geschmacksrezeptor-defizienten Reportermauslinien (Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}, siehe Abschnitt 0) und Gen-defizienten Tiere (Gustducin *Knockout*, siehe Abschnitt 0) wurden in der Tierzuchtanlage des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München oder in der zentralen Tierzuchteinrichtung des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg gezüchtet und gehalten. Die Tiere waren in isolierten, einzeln belüfteten Käfigen (IVC: *isolated ventilated cages*) der Firma Techniplast (Hohenpeißenberg) bei 22 °C Raumtemperatur und circa 50 % Luftfeuchtigkeit mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Nagerfutter, SNIFF Spezialdiät GmbH, Soest) und einem Hell/Dunkel-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden untergebracht. Pro Käfig wurden maximal sechs Tiere gehalten und das staubarme Einstreu-Material (Lignocel select, Rettermaier und Söhne, Rosenberg) wurde ein- bis zweimal pro Woche gewechselt. Zur Zucht der Tiere wurden die Tiere in einem kontinuierlichen, monogamen Zuchtsystem gehalten; in einzelnen Zuchtansätzen wurden zwei Weibchen mit einem Männchen verpaart. Zuchtpaare erhielten spezielles Zuchtfutter (SNIFF Spezialdiäten, Soest) und Nestbaumaterialien (Nestlets, Plexx, PW Elst [Niederlande]). Jungtiere wurden 21 Tage nach der Geburt abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Bei Tieren der genetisch veränderten Mauslinien erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Markierung der Mäuse durch Lochen der Ohren und das Schneiden der Schwanzspitzen (siehe Abschnitt 3.6.3.1).

3.6.2 Geschmacksrezeptor-defiziente Reportermauslinien

Die Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} Mauslinien wurden freundlicherweise von Dr. Anja Voigt (AG Prof. Dr. W. Meyerhof, [DIFE], Potsdam und AG Prof. Ulrich Boehm, Institut für neurale Signaltransduktion, Zentrum für Molekulare Neurobiologie [ZMNH] in Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Die Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} Linie wurde durch eine *Gene-Targeting*-Strategie generiert, bei der die gesamte kodierende Tas1r1 Gensequenz durch ein *Targeting*-Konstrukt ersetzt wurde (Abbildung 3.6). Die *Knockin*-Kassette besteht aus der Sequenz des trans-

synaptischen Markerproteins Gerstenlektin (*barley lectin* [BL]), einer *internal ribosome entry site* (IRES) und des *mCherry* Proteins. In den Reportermäusen (Abbildung 3.6 [Mutanten Allel II]) enthält das Allel somit statt der Tas1r1-kodierenden Sequenz die BL-IRES-mCherry *Knockin*-Kassette. Durch diese Mutation werden anstelle des Tas1r1 Rezeptors das monomere *Cherry* (mCherry) Protein, das sich durch eine rote Fluoreszenz auszeichnet, und das transsynaptische Markerprotein Gerstenlektin (*barley lectin* [BL]) unter Kontrolle des Tas1r1 Promotors exprimiert. Da die Expression des Gerstenlektins in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurde, werden die homozygoten Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} Tiere, die Tas1r1-defizient sind und sich durch einen *Knockin* des Reporterkonstruktes auszeichnen, in der vorliegenden Arbeit vereinfacht auch als Tas1r1-Reportermäuse, Tas1r1 mCherry Ki bzw. Tas1r1-defiziente Mäuse bezeichnet.

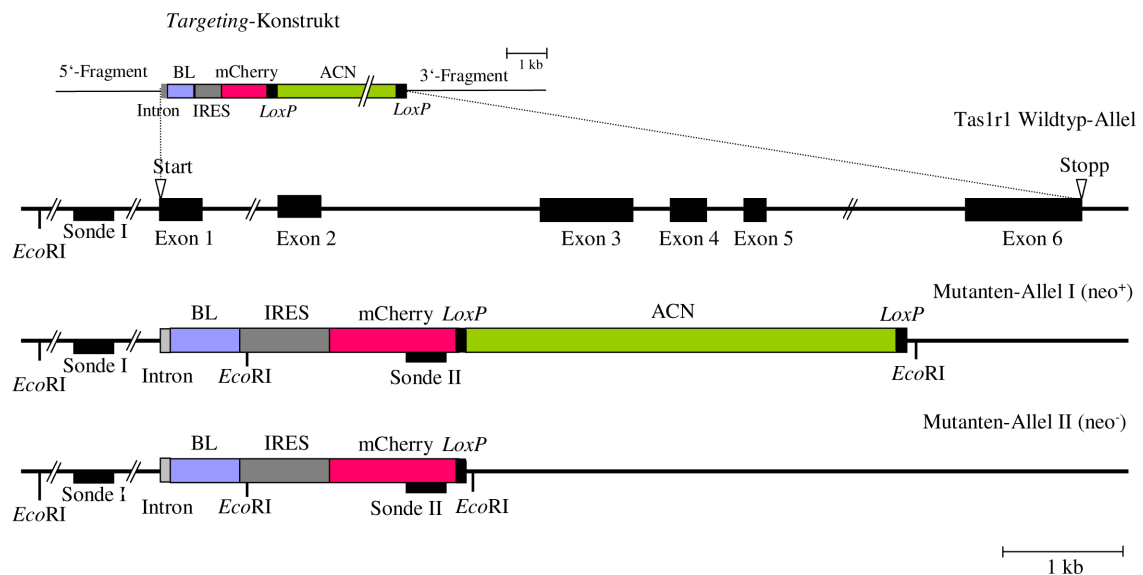


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von „BL-IRES mCherry“ unter Kontrolle des Tas1r1-Promotors.

Gezeigt sind der Targeting-Vektor, das Tas1r1 Wildtyp-Allel, sowie das modifizierte Tas1r1-Allel vor (neo⁺) und nach (neo⁻) dem Entfernen der Neomycin-Selektionskassette ACN (tACE-Cre/Neo). Die Restriktionsstellen *EcoRI* und die Bereiche, an denen die Sonde für die Genotypisierung (I) und die Sonde zur Kontrolle des Ausschneidens der ACN-Kassette (II) binden, sind entsprechend markiert; die schwarzen Felder markieren die Exons. Die eingesetzte Kassette besteht aus der kodierenden Region für das transsynaptische Markerprotein barley lectin [BL], einem IRES-Element und dem stationären Markerprotein monomeric Cherry [mCherry]. Das resultierende Allel (Mutanten-Allel II) (neo⁻) trägt nach dem Ausschneiden der Selektionskassette die kodierende Sequenz für BL, IRES, mCherry, sowie eine LoxP-Erkennungsstelle.

(mit freundlicher Genehmigung übernommen aus: Dissertation Anja Voigt, „Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen zur Aufklärung der peripheren und zentralen gustatorischen Kommunikationsbahnen“, 2011).

Die Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} Mauslinie wurde analog zur Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} Mauslinie durch Ersetzen der Gensequenz des Tas2r131 Rezeptors durch eine BL-IRES-hrGFP *Knockin*-Kassette erzeugt (Abbildung 3.7). Diese Kassette setzt sich aus der kodierenden Sequenz des Gerstenlektins [BL], einer IRES-Sequenz und der Sequenz

des *humanized renilla green fluorescent protein* (hrGFP) sowie einer Lox P Erkennungsstelle zusammen. Durch diese genetische Manipulation wird das stationäre grün fluoreszierende Protein GFP anstelle des Tas2r131 unter Kontrolle des Tas2r131-Promotors exprimiert (Abbildung 3.7).

Diese Mäuse werden im Folgenden zur Vereinfachung auch als Tas2r131 GFP-Mäuse, Tas2r131 GFP Ki Mäuse bzw. Tas2r131-defiziente Mäuse bezeichnet.

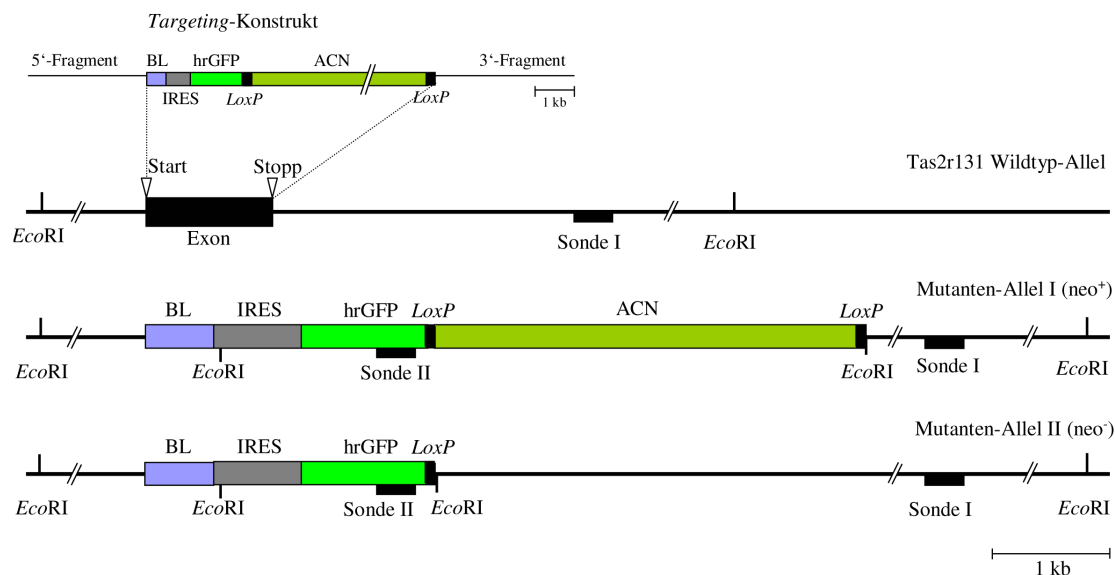


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von „BL-IRES-hrGFP“ unter Kontrolle des Tas2r131-Promotors.

Gezeigt sind der Targeting-Vektor, das Tas2r131 Wildtyp-Allel, sowie das modifizierte Tas2r131-Allel vor (neo+) und nach (neo-) dem Entfernen der Neomycin-Selektionskassette ACN (tACE-Cre/Neo). Die Restriktionsstellen *EcoRI* und die Bereiche, an der die Sonde für die Genotypisierung (I) und die Sonde zur Kontrolle des Ausschneidens der ACN Kassette (II) binden, sind entsprechend markiert. Das schwarze Kästchen markiert das Exon. Die eingesetzte Kassette besteht aus der kodierenden Region für das transsynaptische Markerprotein barley lectin [BL], einem IRES-Element und dem stationären Markerprotein humanized renilla green fluorescent protein [hrGFP]. Das resultierende Mutanten-Allel II (neo-) trägt nach dem Ausschneiden der Selektionskassette die kodierende Sequenz für BL, IRES, hrGFP, sowie eine LoxP-Erkennungsstelle.

(mit freundlicher Genehmigung übernommen aus: Dissertation Anja Voigt, „Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen zur Aufklärung der peripheren und zentralen gustatorischen Kommunikationsbahnen“, 2011).

Für funktionelle Versuche mit genetisch modifizierten Tieren wurden Mäuse mit gemischtem genetischem Hintergrund (129SV and C57BL/6) verwendet, die in erster (N1, 50 % C57BL/6), zweiter (N2, 75 % C57BL/6), dritter (N3, 88 % C57BL/6) usw. bis sechster Generation (N6, 98 % C57BL/6) auf den C57BL/6 Mausstamm zurückgekreuzt waren. Als Kontrollmäuse wurden Wurfgeschwister, Tiere mit identischem genetischen Hintergrund oder C57BL/6 Wildtyp-Mäuse verwendet. Der Stammhintergrund der verwendeten Mäuse ist für die jeweiligen Versuche angegeben.

3.6.3 Genotypisierung

3.6.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Um genomische DNA für die Genotypisierung genetisch modifizierter Tiere zu erhalten, wurden Schwanzspitzenbiopsien verwendet. Dafür wurde den Mäusen im Alter von drei Wochen ein circa 3 mm großes Stück der Schwanzspitze mit einer Schere abgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Gewebe bis zur Isolierung der genomischen DNA bei 4 °C gelagert.

Zum Verdau des Gewebes wurden die Schwanzspitzen zunächst mit 1 mg/ml Proteinase K in 330 µl Verdaupuffer (25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 1 % SDS, pH 8,0) bei 55 °C über Nacht im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl RNase A (10 mg/ml in H₂O) zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl gesättigter NaCl-Lösung (35 % w/v in H₂O) wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 17000 rcf für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur Fällung der DNA mit 860 µl Ethanol versetzt, kurz gemischt und dann bei 17000 rcf 15 Minuten lang zentrifugiert, um die gefällte DNA zu präzipitieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut bei 17000 rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Waschüberstand abgenommen und die DNA bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung des Pellets wurde dieses in 100 µl H₂O gelöst und als Matrize in einer PCR verwendet (siehe Abschnitt 3.6.3.2).

3.6.3.2 PCR zur Feststellung des Genotyps

Zur Feststellung des Genotyps wurde eine PCR mit den in Abschnitt 2.3.2 angegebenen Primern unter Verwendung des DreamTaq Systems (Fermentas) durchgeführt. Der PCR-Ansatz von 25 µl enthielt 1 µl genomische DNA, je 4 pmol der entsprechenden Primer, 2,5 µl PCR-Puffer, 0,8 mM dNTPs, 0,125 µl Taq Polymerase. Die gewählten Temperaturbedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 3.1 bzw. Tabelle 3.2 gezeigt. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte mit 5 µl sechsfachem Probenpuffer versetzt, auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt (siehe Abschnitt 3.1.5). Anhand des Bandenmusters, das unter UV-Licht visualisiert wurde, konnte dann der Genotyp der Tiere bestimmt werden.

Tabelle 3.1: Temperaturprogramm der Genotypisierungs-PCR der Tas1r1 mCherry und der Tas2r131 GFP Mauslinien

Temperatur [°C]	Zeit [Min]	Zyklen	
94	5		
94	1	}	5x
65	1		
72	1		
94	1	}	5x
63	1		
72	1		
94	1	}	35x
61	1		
72	1		
72	1		
4	∞		

Tabelle 3.2: Temperaturprogramm zur Genotypisierung der Gustducin-defizienten Mauslinie

Temperatur [°C]	Zeit [Min]	Zyklen	
94	3		
94	0,5	}	35x
60	0,5		
72	0,5		
72	1		
4	∞		

3.6.4 Analyse des Reproduktionsverhaltens Gen-defizienter Tiere

3.6.4.1 Analyse des Zuchterfolgs

Um zu prüfen, inwieweit sich die Gendefizienz der Geschmacksrezeptor-Reportermauslinien auf deren Fortpflanzung auswirkt, wurde der Zuchterfolg Gen-defizienter Tiere (N1 - N6) mit dem von Wildtyp (C57BL/6) Zuchtpaaren verglichen. Dazu wurden 8 - 12 Wochen alte Tiere in einer monogamen, kontinuierlichen Zucht verpaart, und die Zeit bis zum ersten Wurf, die Zeit zwischen den Würfen und die Anzahl der Nachkommen pro Wurf protokolliert. Als weiterer Parameter wurde das Verhältnis der Anzahl weiblicher und männlicher Nachkommen sowie die Überlebensrate der Nachkommen aus den verschiedenen Verpaarungen bestimmt.

3.6.4.2 Genotyp-Verteilung der Nachkommen

Der Genotyp von Nachkommen heterozygoter Zuchtpaare wurde nach dem Absetzen durch eine Genotypisierungs-PCR (siehe Abschnitt 3.6.3) festgestellt. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen homozygoten (-/-), heterozygoten (+/-) und Wildtyp-Tieren (+/+) ermittelt und mittels χ^2 -Test mit der erwarteten Mendelschen Verteilung (25 % [+/+]; 50 % [+/-]; 25 % [-/-]) verglichen. Ein p -Wert kleiner als 0,05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen. Analog erfolgte die Auswertung von Zuchtpaaren, bei denen ein homozygotes Tier mit einem Wildtyp-Tier verpaart wurde (erwartete Mendelsche Verteilung: 50 % [+/+]; 50 % [+/-]).

3.7 Statistische Methoden

Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen *Excel 2007* (Microsoft) und *Prism 5.0* (GraphPad). Zur Überprüfung einer statistischen Signifikanz wurde ein zweiseitiger studentischer t -Test angewendet. p -Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Expression des potentiellen Sauerdetektors PKD2L1 im Reproduktionssystem der männlichen Maus

Um der Frage nachzugehen, ob der potentielle Sauerrezeptor der Zunge, ein aus den Untereinheiten PKD1L3 und PKD2L1 zusammengesetztes Heterodimer, im Keimdrüsengewebe männlicher Nager exprimiert wird, sollten immunhistochemische Analysen mit Hodengewebe durchgeführt werden. Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen kein PKD1L3-spezifischer Antikörper erhältlich war, waren die Analysen auf einen Proteinnachweis des PKD2L1 beschränkt. Zur Detektion des PKD2L1 wurden zwei verschiedene Kaninchen-Antiseren verwendet, die beide gegen die gleiche Aminosäuresequenz einer C-terminal gelegenen Region (AS 731-749) des Mausproteins generiert worden waren (Abschnitt 2.4.1) und die uns freundlicherweise von Prof. C. Zuker (Howard Hughes Medical School, USA; Bezeichnung des Antiserums in dieser Arbeit: PKD2L1 Z, [Huang et al., 2006]) bzw. Prof. H. Matsunami (Duke University, USA; Bezeichnung: PKD2L1 M, [Ishimaru et al., 2006]) zur Verfügung gestellt wurden.

Um zunächst die Spezifität der PKD2L1 Antikörper zu verifizieren, wurden in Einstiegsexperimenten Gefrierschnitte der Wallpapille (*Papilla circumvallata*, [CV]) der Zunge mit den Antiseren inkubiert und die Bindung des Primärantikörpers anschließend mit Hilfe von FITC-gekoppelten anti-Kaninchen IgG visualisiert. Zur Prüfung der Antikörperspezifität wurde der Erstantikörper in Parallelansätzen durch eine Vorbehandlung des Serums mit einem Überschuss des immunogenen Peptids neutralisiert, das als Antigen für die Immunisierung des Kaninchens eingesetzt worden war. Erkennen die verschiedenen Antikörper eines polyklonalen Serums spezifisch die Aminosäuresequenz oder eine spezielle räumliche Struktur des immunogenen Peptids, so lassen sich diese Immunglobuline durch das Peptid selektiv absättigen. Dies hat zur Folge, dass die Reaktivität des Antikörpers gegen das Antigen im Gewebeschnitt stark reduziert oder ganz eliminiert wird. Ist die Immunmarkierung jedoch nicht auf eine spezifische Bindung des immunogenen Peptids zurückzuführen, sondern erkennen die Antikörper des Serums unspezifisch andere Epitope, so bleibt die Reaktivität des Antiserums nach Vorinkubation mit dem Peptid unverändert.

Um auszuschließen, dass die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper zu unspezifischen Bindungen und damit zu nicht-spezifischen Fluoreszenzsignalen führt, wurden Kontrollgewebeschnitte nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Abbildung 4.1 [A] zeigt eine schematische Übersicht über den Aufbau einer Wallpapille, in der sich einzelne zwiebelartige Geschmacksknospen befinden; eine einzelne Geschmacksknospe ist in der unteren grauen Box vergrößert dargestellt. Eine solche Knospe setzt sich typischerweise aus in Stützzellen (grau) eingebetteten spindelförmigen Sinneszellen (rosa) zusammen, die mit ihren apikalen Mikrovilli-besetzten Fortsätzen bis in die Geschmackspore reichen.

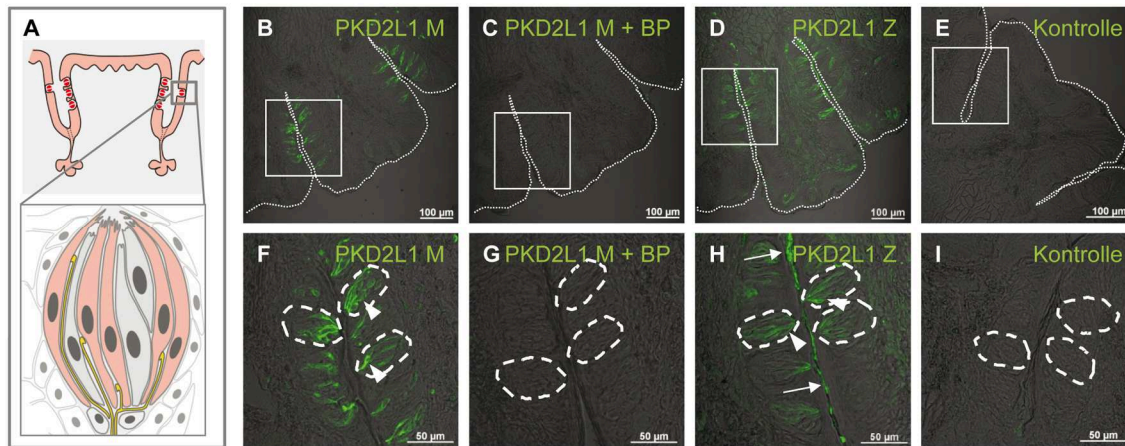


Abbildung 4.1: Nachweis der PKD2L1 Antikörperspezifität in der Wallpapille der Maus.

[A] Schematische Übersicht über den Aufbau einer Wallpapille und einer Geschmacksknospe.

Die obere schematische Darstellung zeigt einen Querschnitt durch eine Wallpapille. In das Epithel der Papille (rosa) sind die Geschmacksknospen (rot) eingebettet. Eine einzelne Geschmacksknospe (graue Box) ist unten vergrößert dargestellt. Modifiziert nach <http://www.uni-duesseldorf.de/MedFak/mai/teaching/content/neuroanatomie>, Universität Düsseldorf, Med. Fakultät, Neuroanatomie.

[B - I] Immunhistochemische Analyse der PKD2L1 Antikörperreaktivität in einer murinen Wallpapille.

Gefrierschnitte der Wallpapille einer adulten Maus wurden mit einem der zwei PKD2L1 Antiseren (1:200) bzw. mit dem PKD2L1 M Antiserum und dem immunogenen Peptid (fünffach konzentriert) inkubiert. Die Visualisierung der gebundenen Primärantikörper erfolgte mit Hilfe FITC-gekoppelter anti-Kaninchen IgG (1:750 verdünnt, grün).

Das PKD2L1 M Antiserum zeigt eine deutliche Immunreaktivität in den Geschmacksknospen der Wallpapille [PKD2L1 M], deren Umrisse zur Verdeutlichung umrandet sind [B]. Die Immunmarkierung ist auf einzelne Sinneszellen (Pfeilspitze) innerhalb der zwiebelartigen Geschmacksknospe beschränkt [F]. Nach Vorinkubation des Antiserums mit seinem immunogenen Peptid [PKD2L1 M + BP] ist, wie auch in den Kontrollansätzen, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden [E, I], keine Immunreaktivität zu registrieren [C, G]. Mit dem PKD2L1 Z Antiserum ist ebenfalls eine Markierung in einzelnen Geschmackssinneszellen zu detektieren [D, H; Pfeilspitze]; zusätzlich tritt auch eine Färbung des Wallgrabens [H, Pfeil] durch das Antiserum auf.

Zur besseren Übersicht wurden in [B - E] die Umrisse der Wallpapille eingezeichnet (dünne gepunktete Linie) und in [F - I] einzelne Geschmacksknospen umrandet (dicke gestrichelte Linie). Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen. Die Boxen in den oberen Bildern [B - E] markieren den Ausschnitt, der im jeweiligen unteren Bild vergrößert dargestellt ist [F - I].

Die Analyse der durch die anti-PKD2L1 Antiseren erzeugten Fluoreszenzsignale im Gewebeschnitt der Wallpapille machte deutlich, dass die Immunreaktivität des PKD2L1 M Antiserums auf die Geschmacksknospen im Zungenepithel beschränkt war (Abbildung 1.1 [B] und [F]), während im nicht-sensorischen Gewebe sowie im umliegenden Muskelgewebe keine Markierung auszumachen war. Bei stärkerer Vergrößerung waren innerhalb einer Knospe einzelne immunpositive Zellen auszumachen, die die typische längliche Gestalt einer Geschmackssinneszelle aufwiesen (Abbildung 1.1 [F], Pfeilspitze). Die Spezifität der Immunreaktion des Antiserums konnte durch

eine erfolgreiche Neutralisation des Antikörpers mit seinem immunogenen Peptid verifiziert werden: Abbildung 1.1 [C] und [G] macht deutlich, dass die Vorinkubation des PKD2L1 M Antiserums mit seinem korrespondierenden Peptid [*PKD2L1 M + BP*] zu einer vollständigen Aufhebung der Immunreaktivität führte. In einem Kontrollansatz, bei dem Gewebsschnitte lediglich mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurden, konnte ebenfalls keine Immunmarkierung detektieren werden (Abbildung 1.1 [E] und [I], [Kontrolle]).

Gefrierschnitte der Wallpapille, die mit dem zweiten anti-PKD2L1 Antikörper (PKD2L1 Z) inkubiert wurden, zeigten ein sehr ähnliches Markierungsmuster: Nach Inkubation mit diesem Antiserum wurde ebenfalls eine Immunfärbung einzelner spindelförmiger Zellen innerhalb der Geschmacksknospen registriert (Abbildung 1.1 [D] und [H], Pfeilspitze); zusätzlich dazu waren aber auch Fluoreszenzsignale im Wallgraben der Papille auszumachen (Abbildung 1.1 [H], Pfeil). Die Immunreaktivität des PKD2L1 Z Antiserums war demnach nicht ausschließlich auf potentielle Geschmackssinneszellen beschränkt, so dass sich die nachfolgend zusammengefassten Untersuchungen am Reproduktionsgewebe männlicher Mäuse vor allem auf das PKD2L1 M Antiserum konzentrierten.

4.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des PKD2L1 Proteins im männlichen Keimdrüsengewebe der Maus

Die validierten Antiseren wurden anschließend in immunhistochemischen Untersuchungen an männlichen Reproduktionsorganen eingesetzt, um zu klären, ob die kürzlich im Hoden nachgewiesenen mRNA Transkripte des PKD2L1 [Ishimaru et al., 2006] auch tatsächlich translatiert werden; dabei sollte gleichzeitig untersucht werden, ob die Expression auf bestimmte Stadien der Keimzellreifung (Abbildung 4.2 [A]) beschränkt ist. Zu diesem Zweck wurden Gefrierschnitte des Hodens mit dem PKD2L1 M Antiserum inkubiert und die Immunreaktivität, wie oben beschrieben, durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Der Hoden ist aus einzelnen stark gewundenen Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) aufgebaut, die von interstitiellem Gewebe umgeben sind, das reich an Nerven und Blutgefäßen ist und peritubuläre Zellen und androgenbildende Leydigische Zwischenzellen enthält. Die *Tubuli seminiferi*, in denen die Spermatogenese stattfindet, werden von Keimepithel ausgekleidet, das sich aus Keimzellen verschiedener Entwicklungsstadien und Sertoli-Zellen zusammensetzt. In Abbildung 4.2 [A] ist ein schematischer Querschnitt durch ein solches Samenkanälchen gezeigt. Die Spermatogenese beginnt auf der Stufe der spermatogonialen Stammzellen, die der Basalmembran der Samenkanälchen anliegen. Durch mitotische Teilungen entstehen zunächst Spermatogonien (mittelbau) des Typs A und anschließend des Typs B, die zu Spermatocyten vom Typ I (hellblau) differenzieren. Durch die erste meiotische Teilung werden daraus Typ II-Spermatocyten (hellblau), aus denen nach der zweiten meiotischen Teilung Spermatiden (dunkelblau) entstehen. Während der sich anschließenden Spermiogenese differenzieren diese

Spermatiden durch Ausbildung des Akrosoms, Kernkondensation und Entstehung des Spermischwanzes zu Spermatozoen, die schließlich ins Lumen der Hodenkanälchen abgegeben werden (Spermiation). Im Verlauf dieser Reifung wandern die Zellen im Keimepithel langsam von basal nach luminal. Dabei bleiben die Keimzellklone über Cytoplasmabrücken verbunden, so dass ihre Entwicklungsschritte innerhalb eines bestimmten Tubulusbereichs synchronisiert ablaufen (siehe auch Abbildung 4.27 [A]) [Handel, 1987; Hendriksen, 1999]. Somit ist in einem bestimmten Tubulusabschnitt immer eine spezifische Kombination von Keimzellen verschiedener Stadien der Spermatogenese zu finden [Bergmann, 2005; Cheng und Mruk, 2010].

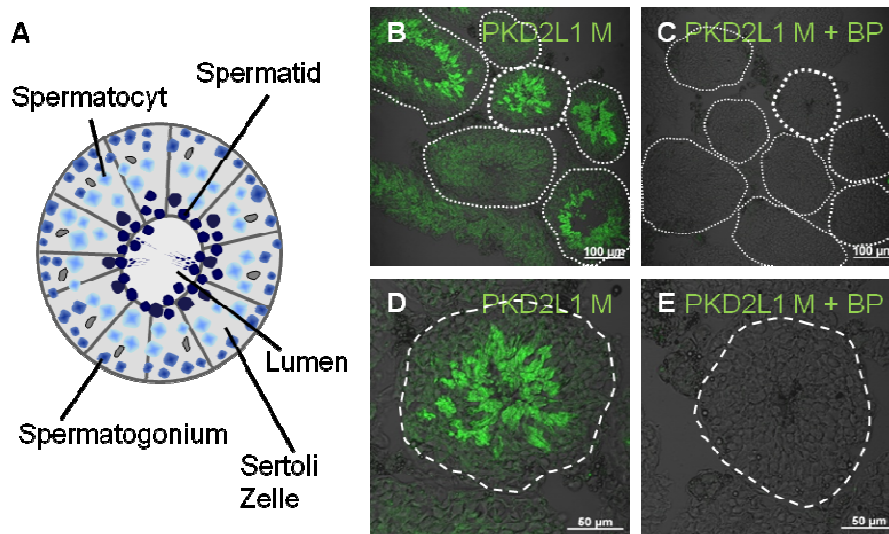


Abbildung 4.2: Immunhistochemische Analyse der PKD2L1 Expression im Hoden.

[A] Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Hodenkanälchen.

[B - E] Immunhistochemischer Nachweis des PKD2L1 Proteins im Mausehod.

Gefrierschnitte, die Tubuli des Hodens einer adulten Maus im Querschnitt zeigen, wurden mit dem anti-PKD2L1 M Antiserum (1:200) bzw. mit dem Antikörper und seinem immunogenen Peptid (fünffach konzentriert) inkubiert. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mittels eines FITC-markierten Sekundärantikörpers.

In den Präparaten, die mit dem PKD2L1 M Antikörper behandelt wurden [*PKD2L1 M*], zeigt sich eine grüne Immunreaktivität in den luminalen Bereichen der angeschnittenen Hodenkanälchen [B]. Die Vergrößerung in [D] zeigt, dass die Immunfärbung in den Zellschichten der Spermatiden stark ausgeprägt ist, während frühe Keimzellstadien keine Färbung aufweisen [D, *PKD2L1 M*]. In Ansätzen, in denen das Antiserum durch eine Vorinkubation mit dem korrespondierenden Peptid neutralisiert wurde [*PKD2L1 M + BP*], ist keine Immunmarkierung mehr zu erkennen [C, E].

Die Abbildungen [B - E] zeigen eine Überlagerung der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. In [B, C] sind die Umrisse der einzelnen Tubuli eingezeichnet (weiße Linie). Die dick gestrichelt umrandeten Tubuli sind in [D bzw. E] vergrößert dargestellt.

In immunhistochemischen Ansätzen, in denen das PKD2L1 M Antiserum eingesetzt wurde, war in allen angeschnittenen Hodentubuli, die durch eine schematische Umrandung hervorgehoben wurden, ein deutliches Fluoreszenzsignal sichtbar (Abbildung 4.2 [B]). Diese Immunmarkierung konzentrierte sich auf die luminal lokalisierten Spermatiden, während die weiter basal gelegenen frühen Entwicklungsstadien der Keimzellen kaum Immunreaktivität erkennen ließen (Abbildung 4.2 [D]). In Kontroll-experimenten, in denen das PKD2L1 M Antiserum mit seinem immunogenen Peptid

vorinkubiert wurde, konnte hingegen keine Immunreaktivität detektiert werden (Abbildung 4.2 [C] und [E], [PKD2L1 M + BP]), was die Spezifität des Expressionsnachweises des PKD2L1 im Hoden der Maus unterstrich.

Nach Abschluss der Spermio-genese lösen sich die ausdifferenzierten Spermien vom Keimepithel der *Tubuli seminiferi* und werden ins Lumen der Samenkanälchen abgegeben. Über die ableitenden Hodenkanälchen (*Ductuli efferentes testis*) werden die Zellen dann in den Nebenhoden transportiert (Abbildung 4.3 [A]). Während ihrer Passage durch die verschiedenen Abschnitte des Nebenhodens, den Nebenhodenkopf (*Caput epididymidis*), Nebenhodenkörper (*Corpus epididymidis*) und den Nebenhodenschwanz (*Cauda epididymidis*) (Abbildung 4.3 [A], [caput, corpus und cauda]) finden weitere Reifungsschritte und Modifizierungen der Zellen statt, welche schließlich im distalen Teil der Cauda bis zur Ejakulation gespeichert werden [Yeung et al., 1993; Robaire et al., 2002; Cornwall, 2009].

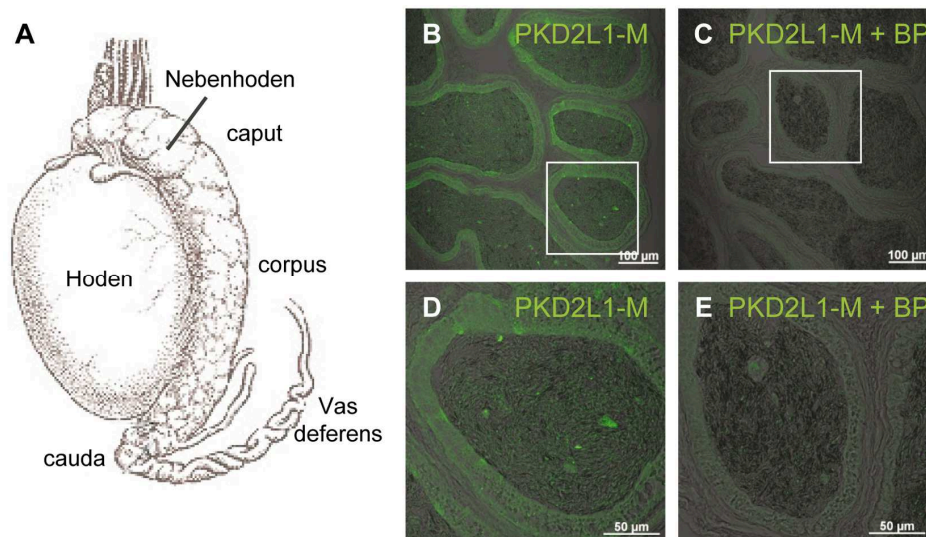


Abbildung 4.3: Immunhistochemischer Nachweis der PKD2L1 Expression im Nebenhoden.

[A] Übersicht über den Aufbau des Nebenhodens.

Vom Hoden gelangen die Spermien zunächst in den Nebenhodenkopf [*caput*]. Sie werden dann durch den Corpus [*corpus*] bis in den caudalen Teil des Nebenhodens [*cauda*] transportiert und schließlich in den Samenleiter [*Vas deferens*] abgegeben.

[B - E] Analyse der PKD2L1 Expression im Nebenhodenschwanz.

An Gefrierschnitten des caudalen Teils eines murinen Nebenhodens wurden immunhistochemische Untersuchungen mit dem anti-PKD2L1 M Antiserum (1:200) bzw. mit dem Antiserum und seinem korrespondierenden Peptid durchgeführt.

Im Lumen der angeschnittenen Nebenhodengänge, die dicht mit Spermien gefüllt sind, ist ein schwaches Fluoreszenzsignal zu detektieren [B, D]. Außerdem zeigt das Antiserum eine schwache Immunreaktivität im zylindrischen Gangepithel. Nach Prä-Inkubation des Antiserums mit dem immunogenen Peptid [PKD2L1 M + BP] ist keine Immunmarkierung mehr zu erkennen [C, E].

Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. Die Boxen in den oberen Bildern [A, B] markieren die Ausschnitte, die im jeweiligen unteren Bild vergrößert dargestellt sind [C, D].

Um die Expression des PKD2L1 im weiteren Verlauf der Spermienreifung zu untersuchen und erste Hinweise darüber zu erhalten, ob das Protein auch in reifen Spermien vorhanden ist, wurden immunhistochemische Analysen an Gefrierschnitten des

caudalen Teils des Nebenhodens, in dem reife Spermienpopulationen gespeichert werden, durchgeführt. Abbildung 4.3 macht deutlich, dass nach der Inkubation von Schnitten des Nebenhodenschwanzes mit dem PKD2L1 M Antiserum eine schwache Immunreaktivität im Epithel des Nebenhodenganges ([B] und [D]) detektiert werden konnte. Die reifen Spermien, die im Lumen des Nebenhodenganges gespeichert wurden, zeigten ebenfalls eine Immunmarkierung (Abbildung 4.3 [B] und [D]). Diese konnte aufgrund der hohen Spermiedichte jedoch auch bei stärkerer Vergrößerung (Abbildung 4.3 [D]) keinem subzellulären Kompartiment der Spermien zugeordnet werden. Die Spezifität der Immunreaktivität im Nebenhoden konnte durch Blockierungsansätze, in denen das Antiserum mit seinem immunogenen Peptid vorinkubiert wurde und in denen keine Immunreaktivität mehr auszumachen ist (Abbildung 4.3 [C] und [E]), bestätigt werden.

4.1.2 Western Blot Analyse des Sauerdetektors PKD2L1 im Keimdrüsengewebe der Maus

Das Verfahren des Western Blottings erlaubt es, ein Protein durch die Bestimmung seiner molekularen Größe zu identifizieren und Hinweise auf eventuell vorhandene Splicevarianten zu sammeln. Um die bereits erbrachten Indizien für die Expression des PKD2L1 Proteins im männlichen Keimdrüsengewebe zu untermauern, wurde daher zusätzlich diese Technik eingesetzt.

Aufgrund von Sequenzanalysen und der Verwandtschaft zu TRP-Kanälen wird für das PKD2L1 Protein mit seinen sechs Transmembrandomänen eine membranständige Lokalisation prognostiziert [Delmas et al., 2004; Murakami et al., 2005]. Membranproteine können durch fraktionelle Zentrifugation homogenisierter Organe in einer bestimmten Fraktion angereichert werden. In einer Membranfraktion liegt dann, bezogen auf die Proteingesamtmenge, anteilig eine größere Menge von Membranproteinen vor, die im Western Blot konzentriert eingesetzt werden können. Für die Immunoblot Analysen wurden deshalb Membranpräparationen aus Hoden- und Nebenhodengewebe verwendet; als Positivkontrolle wurden isolierte Wallpapillen der Zunge aufgearbeitet. Die Auftrennung der Proben nach ihrer molekularen Größe erfolgte durch SDS-PAGE, anschließend wurden die Proteine mittels des *Semi-Dry Blotting* Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Abschnitt 3.2.3). Diese Membran wurde anschließend mit dem PKD2L1 M Antiserum bzw. mit dem Antiserum in Kombination mit seinem immunogenen Peptid inkubiert und die Bindung des Primärantikörpers mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers und des ECL-Verfahrens nachgewiesen.

Bei dieser Analyse wurde in der Probe der Wallpapille neben einigen schwachen Banden verschiedener Proteingrößen eine stark immunreaktive Bande mit einer molekularen Größe von ca. 90 kDa detektiert (Abbildung 4.4 [A]; [CV], Pfeil). Diese Größe entsprach dem berechneten Molekulargewicht des PKD2L1 Proteins von 87 kDa (*Accession Nummer* NP_852087). In den Membranpräparationen des Hodens und des

Nebenhodens wurde ebenfalls jeweils eine prominente immunpositive Bande detektiert, deren molekulare Größe jedoch ca. 130 kDa betrug (Abbildung 4.4 [A]; [Ho], [Nh], Pfeilspitze). Darüber hinaus traten auch im Keimdrüsengewebe einzelne schwächere Banden auf, die zumeist kleiner als 130 kDa waren; darunter war auch eine leicht immunreaktive Bande mit einer Größe von ca. 90 kDa, die der molekularen Masse der publizierten Aminosäuresequenz des PKD2L1 Proteins entsprach [Murakami et al., 2005].

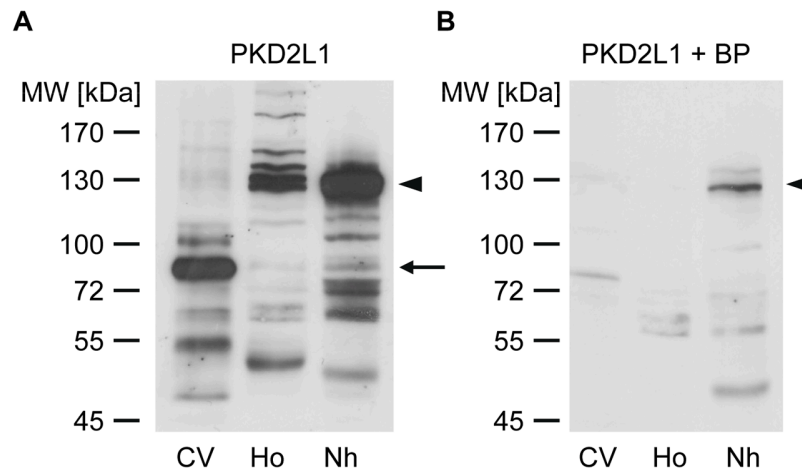


Abbildung 4.4: Western Blot Nachweis der PKD2L1 Expression in männlichem Keimdrüsengewebe.

Proteine von Membranpräparationen (P_2 -Fraktionen) aus Wallpapillen [CV], Hoden- [Ho] und Nebenhodengewebe [Nh] wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Elektro-Transfer auf Nitrocellulose übertragen. Anschließend wurde die Transfermembran mit dem anti-PKD2L1 M Antiserum (1:4000) [A, PKD2L1] bzw. mit dem Antikörper und dem korrespondierenden Blockierungspeptid (fünffach konzentriert) [B, PKD2L1 + BP] über Nacht inkubiert und die Antikörperbindung durch einen Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL-Systems sichtbar gemacht.

[A] Der eingesetzte Antikörper markiert in der Wallpapille [CV] eine Bande mit einer molekularen Masse von ca. 90 kDa (Pfeil) sowie mehrere schwächere Banden unterschiedlicher Größe. Im Hoden [Ho] und Nebenhoden [Nh] zeigt sich eine stark immunreaktive Bande mit einer Masse von ca. 130 kDa (Pfeilspitze) sowie einige weitere, deutlich schwächere Banden kleinerer Masse.

[B] Durch Vorinkubation des Antikörpers mit seinem immunogenen Peptid [PKD2L1 + BP] bleibt die Immunreaktivität fast vollständig aus: Es bleibt lediglich eine Bande von ca. 130 kDa in der Nebenhodenpräparation [Nh] erhalten (Pfeilspitze), die jedoch deutlich weniger intensiv ausgeprägt ist als ohne Peptidblockierung [A].

Nach einer Präinkubation des PKD2L1 M Antiserums mit seinem immunogenen Peptid war eine fast vollständige Elimination der immunreaktiven Banden sowohl im Geschmacks- als auch im Reproduktionsgewebe auszumachen. Lediglich im Nebenhoden konnte die Antikörperbindung nicht vollständig durch das Peptid blockiert werden, so dass noch eine schwache Immunmarkierung bei 130 kDa zu registrieren war (Abbildung 4.4 [B], Pfeil). Diese schwache Markierung könnte darin begründet liegen, dass ein Antikörper nur Antigen reversibel bindet. Wenn eine große Menge des antigenen Proteins auf der Nitrocellulose-Membran vorliegt, kann es deshalb vorkommen, dass der Antikörper auch das auf die Nitrocellulose-Membran transferierten Antigens detektiert, so dass die Reaktivität bei einer großen Menge

antigenen Proteins im Vergleich zum nicht-neutralisierten Antikörper nur stark vermindert ist, aber nicht vollständig ausbleibt.

Der Umstand, dass die detektierten PKD2L1 Banden mit dem neutralisierten Antikörper in ihrer Intensität deutlich reduziert waren und die Immunreaktivität zudem auf eine stark ausgeprägte Bande konzentriert war, deutete somit auf eine spezifische Erkennung des PKD2L1 Proteins im Western Blot durch den eingesetzten Antikörper hin. Ob das Molekulargewicht der dominanten immunreaktiven Bande im Keimdrüsengewebe, das mit 130 kDa deutlich höher war als die berechnete molekulare Masse von 87 kDa, auf bislang unbekannte Splicevarianten oder auf eine sehr stabile Bindung des PKD2L1 an einen noch nicht identifizierten Interaktionspartner im Reproduktionsgewebe zurückzuführen war und ob die deutlich schwächere Bande mit der molekularen Masse von 90 kDa nicht-assoziiertes PKD2L1 repräsentieren könnte, konnte durch diese Analysen nicht abschließend geklärt werden.

4.1.3 Subzelluläre Lokalisation des PKD2L1 in Mausspermien

Nachdem der potentielle Sauerdetektor PKD2L1 im Hoden und Nebenhoden der Maus nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob das Protein auch in reifen Spermien vorhanden ist und welche physiologische Rolle ihm in diesen Zellen zukommen könnte. Aufgrund der starken funktionellen Kompartimentierung (Abbildung 4.5 [A]) von Spermienzellen [Zitanski et al., 2010] (siehe auch Abschnitt 1.1.1) können Kenntnisse hinsichtlich der subzellulären Lokalisation eines Proteins erste Hinweise auf seine möglichen Funktion in Spermien ergeben.

Zum Nachweis des PKD2L1 Proteins und zur Untersuchung seiner subzellulären Verteilung wurden deshalb immuncytochemische Analysen an isolierten Spermien durchgeführt. Die Visualisierung gebundener Primärantikörper erfolgte in diesen Ansätzen mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Sekundärantiköpers; darüber hinaus wurde der Zellkern durch eine Inkubation der Präparate mit Propidiumiodid [Heydecke et al., 2006] sichtbar gemacht. Um Verwechslungen mit anderen roten Fluoreszenz-Co-Färbungen (z. B. TRITC, Alexa546) zu vermeiden, wird diese Kernmarkierung, wie auch alternativ durchgeführte Kernfärbungen mit TO-PRO3 [Ploeger et al., 2008], im Folgenden in blau dargestellt.

Abbildung 4.5 zeigt eine starke Immunmarkierung des Spermienschwanzes durch das PKD2L1 M Antiserum. Im Kopfbereich konnte hingegen keine Immunreaktivität detektiert werden (Abbildung 4.5 [B]). Eine vergrößerte Aufnahme des Flagellums macht deutlich, dass die Immunfärbung im Hauptstück konzentriert war (Abbildung 4.5 [D]). Das PKD2L1, für das eine membranständige Lokalisation zu erwarten war (siehe 4.1.2), schien dabei in der Zellmembran angereichert zu sein (Abbildung 4.5 [E]). In Kontrollpräparaten, die mit dem Antiserum und dem immunogenen Peptid zusammen inkubiert wurden, war hingegen keine Reaktivität zu detektieren (Abbildung 4.5 [C] und [E]).

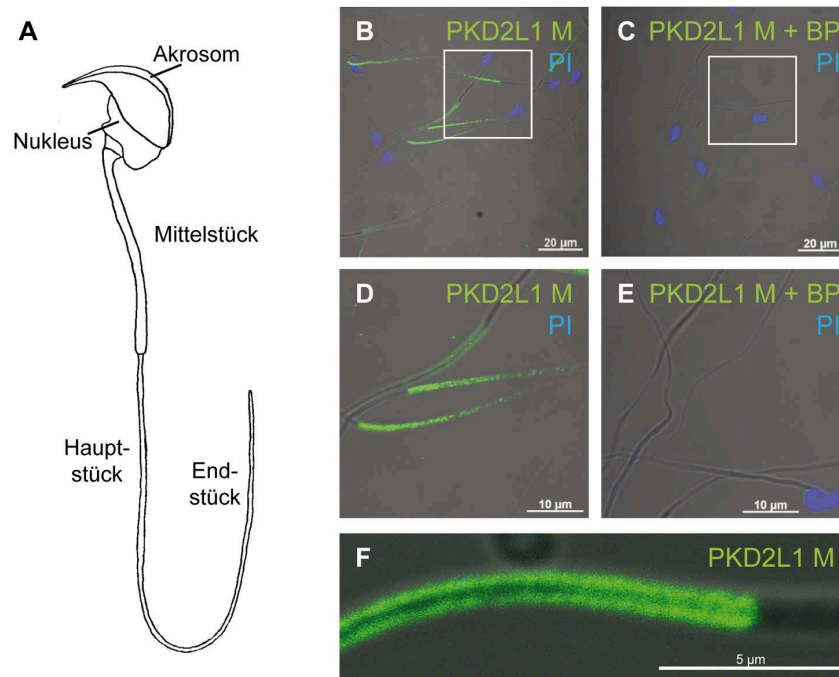


Abbildung 4.5: Analyse der subzellulären Lokalisation des PKD2L1 in murinen Spermien.

[A] Schematische Übersicht über den Aufbau eines Mausspermiums.

[B - F] Immunocytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation des PKD2L1 in Mausspermien.

Methanol-fixierte Spermienpräparate der Maus wurden mit einem PKD2L1 spezifischen Antiserum (1:200 verdünnt) [*PKD2L1 M*] bzw. mit dem Antikörper und dem entsprechenden Blockierungspeptid [*PKD2L1 M + BP*] inkubiert. Die Immunreaktivität wurde durch FITC-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:750 verdünnt) nachgewiesen. Zur Visualisierung des Zellkerns wurden die Präparate 15 Minuten mit Propidiumiodid ([*PI*]; blau dargestellt) gefärbt.

Die Inkubation mit dem PKD2L1 M Antiserum [*PKD2L1 M*] resultiert in einer starken Markierung im Hauptstück des Flagellums [B und D], die eine deutliche Konzentrierung entlang der Membran zeigt [F]. Nach einer Vorinkubation des Antiserums mit dem korrespondierenden Peptid [*PKD2L1 M + BP*] ist keine Immunmarkierung mehr zu registrieren [C, E].

Dargestellt sind Überlagerungen der Phasenkontrastaufnahme und der Fluoreszenzkanäle (grün: FITC; blau: Propidiumiodid). Die in [D, E] vergrößert dargestellten Bereiche sind in den oberen Bildern [B, C] durch weiße Kästchen gekennzeichnet.

Mit dem PKD2L1 Z Antikörper konnte in isolierten Mausspermien eine ähnliche Immunfärbung beobachtet werden: Auch dieses Antiserum markierte im Flagellum ausschließlich das Hauptstück (Abbildung 4.6 [A] und [C]). Es führte jedoch zusätzlich auch zu einer sichelförmigen Immunfärbung im Spermienkopf (Abbildung 4.6 [C]). Um zu prüfen, ob diese Markierung im Akrosom des Spermiums lokalisiert war, wurden Co-Färbungen mit dem Lektin PNA (*Peanut Agglutinin*), das spezifisch an glykosylierte Proteine des Akrosoms bindet [Aviles et al., 1997], durchgeführt. Abbildung 4.6 [E] zeigte, dass nach der Inkubation mit einem TRITC-gekoppelten PNA ein halbmondförmiges rotes Fluoreszenzsignal im Spermienkopf zu detektieren war, das dem Akrosom entsprach. In Abbildung 4.6 [H] ist die Überlagerung dieser PNA-Färbung [E] mit der PKD2L1 Z Markierung [F] dargestellt. Die gelbe Farbe, die bei einer Übereinstimmung der beiden Fluoreszenzsignale entstand, machte deutlich, dass die PKD2L1 Z Immunreaktivität des Spermienkopfes tatsächlich auf das Akrosom konzentriert war (Abbildung 4.6 [H], gelbes Signal).

Interessanterweise stimmt diese PKD2L1 Z Immunreaktivität im Akrosom (Abbildung 4.6 [C] und [H]) mit der Verteilung eines weiteren Mitglieds der PKD-Familie überein: Das PKDREJ-Protein, das bereits zuvor in murinen Säugerspermien nachgewiesen wurde, zeigt eine vergleichbare akrosomale Lokalisierung [Butscheid et al., 2006]. Die Immunreaktivität des PKD2L1 Z Antikörpers ließ sich durch das immunogene Peptid des PKD2L1 M Antikörpers, der gegen die gleiche Sequenz gerichtet ist, jedoch nicht blockieren (Daten nicht gezeigt). Somit konnte die Spezifität des PKD2L1 Z Antiserums und damit der akrosomalen Markierung, die nur mit diesem Antiserum zu detektieren war, nicht durch eine Peptidblockierung validiert werden.

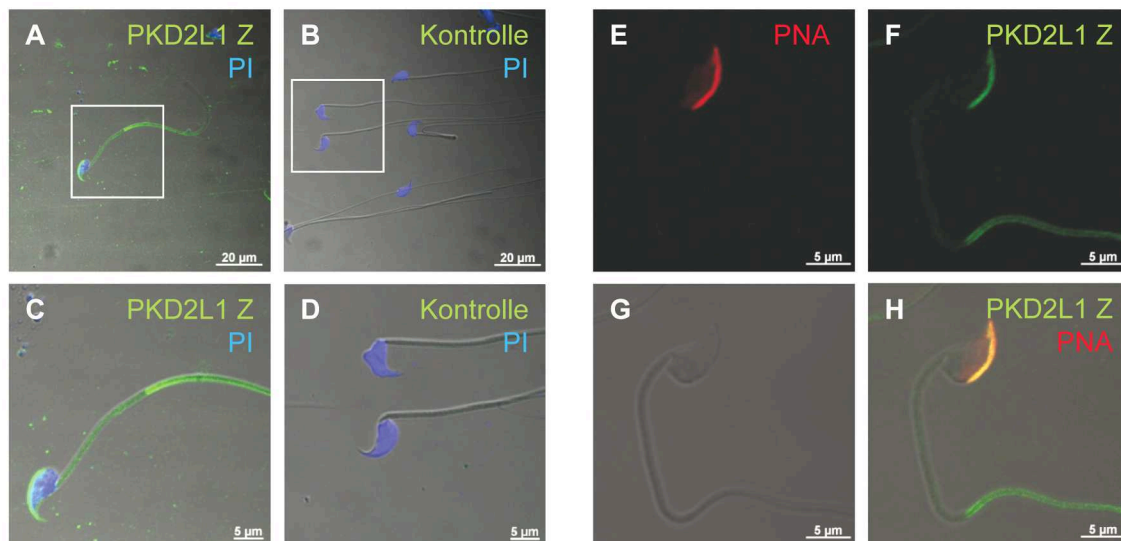


Abbildung 4.6: Immunreaktivität des PKD2L1 Z Antiserums in Mausspermien.

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der PKD2L1 Immunmarkierung in Spermien der Maus wurden immunocytochemische Färbungen mit dem PKD2L1 Z Antiserum (1 : 50) durchgeführt. In ([A - D]) wurde der Zellkern zusätzlich mit Propidiumiodid [PI] anfärbt (blau dargestellt). Die Co-Färbung mit einem TRITC-gekoppelten PNA ([PNA], rot) ist in [E - H] gezeigt.

Das PKD2L1 Z Antiserum [PKD2L1 Z] zeigt eine starke Immunreaktivität im Hauptstück des Flagellums und in der akrosomalen Sichel des Spermienkopfes [A, C]. In Kontrollansätzen ohne Primärantikörper [Kontrolle] ist hingegen keine Immunmarkierung zu detektieren [B, D].

Durch das Lektin PNA wird das sichelförmige Akrosom des Mausspermiums gefärbt [E, PNA], das auch immunopositiv für das PKD2L1 Z Antiserum ist [F, PKD2L1 Z]. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale zeigt eine deutliche Co-Lokalisation (gelbe Färbung) [H].

[A - D] zeigen Überlagerungen der Phasenkontrastaufnahme und der Fluoreszenzkanäle (grün: FITC; blau: Propidiumiodid). In [E - H] sind die Fluoreszenzkanäle separat [E, F] und als Überlagerung [H] mit dem Phasenkontrastbild [G] gezeigt. Die in [C, D] vergrößert dargestellten Bereiche sind in den oberen Bildern [A, B] durch weiße Boxen gekennzeichnet.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der G Protein α -Untereinheit Gustducin im Reproduktionssystem männlicher Mäuse

Auf ihrem Weg durch den weiblichen Genitaltrakt kommen Spermien neben verschiedenen Protonenkonzentrationen, die die männlichen Keimzellen möglicherweise mit Hilfe des potentiellen Sauerdetektors PKD2L1 registrieren können, auch mit einer Vielzahl anderer chemischer Liganden wie verschiedenen Aminosäuren, Zuckern und Hormonen (z. B. Progesteron) in Kontakt. Die Beobachtung, dass im Geschmackssystem der Zunge chemisch so diverse Substanzen wie Zucker, Aminosäuren, Proteine und aromatische Bitterstoffe durch die GPCRs der Tas1r- und Tas2r-Familie detektiert werden, führte zu der Frage, ob Mitglieder dieser Proteinfamilien ebenfalls in Spermien exprimiert werden und an der Detektion von potentiellen Liganden im weiblichen Genitaltrakt beteiligt sein könnten.

Um erste Hinweise auf eine Expression dieser sensorischen Proteine sammeln zu können, konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf die G Protein Untereinheit α -Gustducin [McLaughlin et al., 1992], da diese in Geschmackszellen der Zunge an der Signaltransduktion beider GPCR-Familien beteiligt ist [Wong et al., 1996; Ruiz-Avila et al., 2001; He et al., 2004]. Im Rahmen dieser bereits veröffentlichten Analysen [Fehr, Meyer et al., 2007] konnte gezeigt werden, dass Spermien verschiedener Säugerspezies tatsächlich eine α -Gustducin Immunreaktivität aufweisen: Abbildung 4.7 fasst die Ergebnisse der immunocytochemischen Untersuchungen an Spermien der Maus, der Ratte, des Rindes und des Menschen zusammen [Fehr, Meyer et al., 2007]. Zur Übersicht ist die Morphologie der Spermien der untersuchten Säugerspezies im oberen Teil der Abbildung 1.7 schematisch gezeigt. Da sich diese Spermatozoen vor allem in ihrer Kopfform unterscheiden, ist der Aufbau des Kopfes jeweils vergrößert dargestellt. Während sich Maus- und Rattenspermien durch eine für Nagetiere typische hakenförmige Gestalt des Kopfes und des aufliegenden akrosomalen Vesikels auszeichnen (Abbildung 4.7 [A] und [B]), weisen bovine und humane Spermien eine ovale Kopfform auf (Abbildung 4.7 [C] und [D]). Bei Spermien dieser beiden Säugerarten liegt das Akrosom dem Nukleus eher kappenartig auf (Abbildung 4.7 [C] und [D]) und schließt mit dem Äquatoralsegment ab (Abbildung 4.7 [D], Pfeil).

In den immunocytochemischen Ansätzen mit Mausspermien konnte unter Verwendung eines anti- α -Gustducin Antikörpers (Gustducin S) eine Markierung des Flagellums detektiert werden, die im Hauptstück besonders stark ausgeprägt war (Abbildung 4.7 [A] und [E]) und die durch das korrespondierende immunogene Peptid neutralisiert wurde ([Fehr, Meyer et al., 2007], Daten nicht gezeigt). Eine vergleichbare α -Gustducin Immunreaktivität wurde auch im Spermenschwanz der Ratte, des Rindes und des Menschen beobachtet (Abbildung 4.7 [F], [G] und [H]; Pfeilspitze). In Ratten- und Rinderspermien konnte darüber hinaus auch eine Immunfärbung des Akrosoms nach-

gewiesen werden (Abbildung 4.7 [B] und [C]). Keine Markierung war hingegen in Kontrollansätzen zu detektieren, in denen lediglich der Fluorchrom-konjugierte Sekundärantikörper eingesetzt wurde. Die spezifische Immunreaktivität des Gustducin Antikörpers konnte zudem durch eine Neutralisation mit dem immunogenen Peptid in Parallelansätzen für alle Spezies verifiziert werden [Fehr, Meyer et al., 2007] (Daten nicht gezeigt).

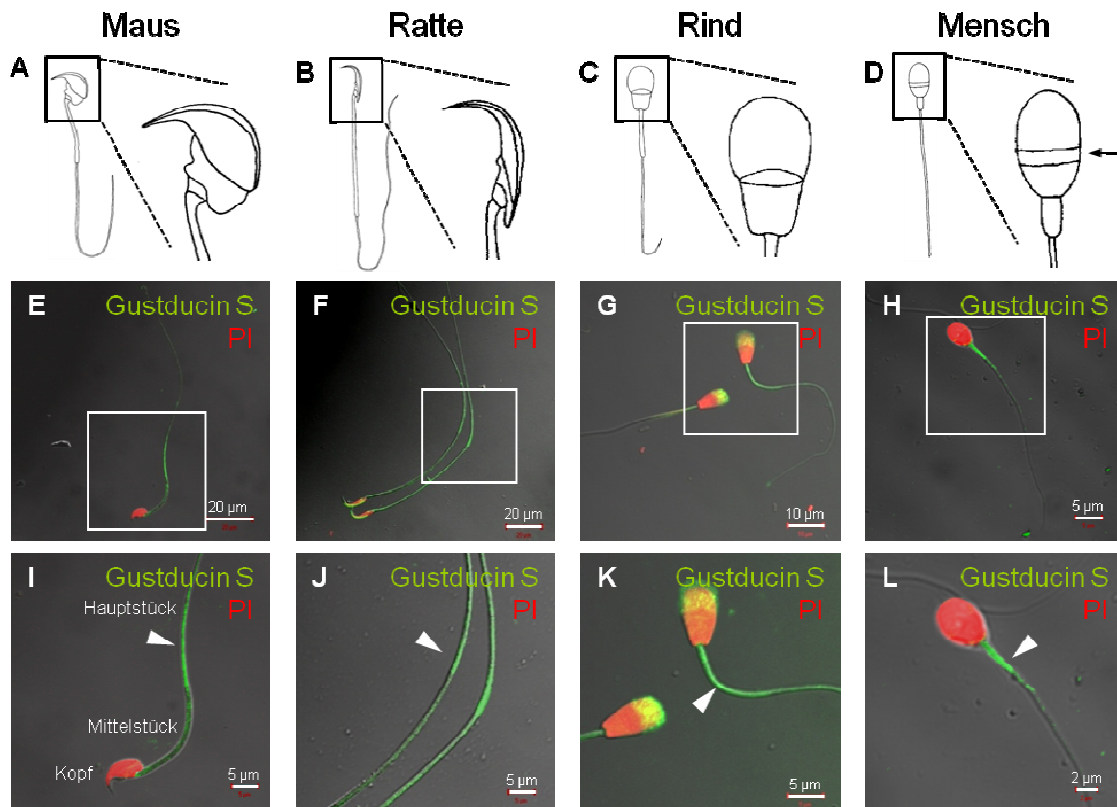


Abbildung 4.7: Immuncytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation von α -Gustducin in Säugerspermien.

[A - D] zeigen schematische Zeichnungen der Spermien der angegebenen Säugerspezies, dabei ist die Morphologie des Spermienkopfes jeweils vergrößert dargestellt. In [D] ist die Lage des Äquatorial-segments durch einen Pfeil verdeutlicht. Die Größenverhältnisse der Spermien der verschiedenen Spezies sind nicht proportional zueinander dargestellt.

In [E - L] sind immuncytochemische Färbungen von isolierten Spermien verschiedener Spezies mit einem α -Gustducin Antiserum [Gustducin S] gezeigt, dessen Bindung durch FITC-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG nachgewiesen wurde. Die Markierung der Zellkerne erfolgte durch eine Inkubation mit dem Farbstoff Propidiumiodid ([PI], rot).

In Mausspermien [E] ist die Gustducin-Immunreaktivität auf das Flagellum beschränkt; innerhalb des Schwanzes ist das Fluoreszenzsignal im Hauptstück am stärksten ausgeprägt [I; Pfeilspitze]. Rattenspermien zeigen neben der Markierung des Flagellums ([F, J]; Pfeilspitze) auch eine Färbung des Akrosoms [F]. In Rinderspermien [G, K] ist neben der Immunreaktivität im Spermenschwanz [K; Pfeilspitze] ebenfalls eine Markierung des kappenförmigen Akrosoms zu detektieren. In humanen Spermien ist die Gustducin-Immunfärbung auf das Mittelstück des Flagellums konzentriert [H, L; Pfeilspitze].

Die markierten Bereiche in [E - H] sind in [I - L] vergrößert gezeigt. Die jeweilige Spezies der analysierten Spermien ist oberhalb der Bilder angegeben.

Weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben darüber hinaus, dass α -Gustducin im Flagellum offenbar mit Cytoskelett-Elementen und Mitochondrien

assoziiert ist [Fehr, Meyer et al., 2007]. Damit käme Gustducin in Spermien z. B. als Kandidat für die Vermittlung chemotaktischer Reize, die im Flagellum durch GPCRs detektiert werden, in Betracht.

4.2.1 Reproduktionsbiologische Analyse einer Gustducin-defizienten Mauslinie

Durch die Entwicklung von Gen-defizienten und transgenen Tieren haben sich in den vergangenen Jahren neue, vielversprechende Möglichkeiten zur Untersuchung der physiologischen Rolle einzelner Proteine ergeben. So erlauben es *Knockout*- (KO) Mäuse, bei denen durch gezielte genetische Manipulation ein bestimmtes Gen eliminiert oder inaktiviert wurde, die Auswirkungen des Fehlens eines Proteins zu analysieren, um so Rückschlüsse auf die biologische Funktion des Proteins ziehen zu können.

Auch für die gustatorische G Protein α -Untereinheit Gustducin konnte bereits eine Gen-defiziente Mauslinie generiert werden [Wong et al., 1996]. Im Genom dieser Mäuse wurde das erste Exon der Gustducin-Sequenz, das neben den ersten 18 Aminosäuren des Proteins auch die Transkriptionsinitiationssequenz kodiert, durch eine Neomycin-Resistenz-Gen-Kassette ersetzt [Wong et al., 1996]. Die erfolgreiche Deletion von α -Gustducin wurde in der Zunge u. a. durch *in situ* Hybridisierungsstudien gezeigt, in denen keine Gustducin-mRNA in den Gen-defizienten Mäusen mehr nachzuweisen war [Wong et al., 1996]. Zusätzlich konnte das Fehlen des Gustducin-Proteins durch immunhistochemische Untersuchungen an Wallpapillen von Gustducin-KO Mäusen bestätigt werden [Ruiz-Avila et al., 2001].

Diese Gustducin-defizienten Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. R. Margolskee (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia [USA]) zur Verfügung gestellt, so dass die Auswirkungen einer α -Gustducin-Defizienz auf die Fertilität im Mausmodell untersucht werden konnten. Außerdem bietet diese Mauslinie eine sehr gute Möglichkeit, die Spezifität der Immunreaktivität der verwendeten Antikörper zu testen, da die Tiere kein Gustducin-Protein mehr exprimieren. Bei einer spezifischen Bindung der Antikörper an Gustducin sollte demnach im Gewebe der Gen-defizienten Tiere keine Immunmarkierung mehr zu detektieren sein.

4.2.1.1 Überprüfung der Gustducin-Antikörper-Immunreaktivität an Zungengewebe von Wildtyp- und Gustducin-KO Mäusen

Um zunächst die Spezifität der im Wildtyp-Gewebe beobachteten Gustducin-Immunreaktivität zu überprüfen, wurden deshalb immunhistochemische Untersuchungen an Zungengewebe von Gustducin-KO und Wildtyp-Tieren durchgeführt. Für diese Analysen wurden zwei α -Gustducin-spezifische Antiseren verwendet: Zum einen der bereits oben erwähnte α -Gustducin Antikörper der Firma Santa Cruz (Bezeichnung in dieser Arbeit: Gustducin S), der gegen die Aminosäuren 93 - 113 des Mausproteins gerichtet ist [Clapp et al., 2001], sowie ein Serum, das durch die Arbeitsgruppe von

Prof. Breer (Universität Stuttgart-Hohenheim) zur Verfügung gestellt wurde. Für dieses Antiserum wurde eine um eine Aminosäure kürzere Variante des gleichen Peptids (AS 94 – 113) zur Immunisierung eingesetzt (Bezeichnung: Gustducin H). Für das Gustducin H Antiserum war kein eigenes Blockierungspeptid vorhanden; aufgrund der fast völligen Übereinstimmung der beiden antigenen Peptide konnte das immunogene Peptid des Gustducin S Antiserums jedoch auch erfolgreich zur Neutralisation des Gustducin H Antiserums eingesetzt werden.

In Gewebsschnitten der Wallpapille von Wildtyp-Tieren (Abbildung 4.8, obere Bildserie) ließ sich mit beiden anti- α -Gustducin Antiseren eine Immunmarkierung ausmachen (Abbildung 4.8, [A] und [B]), die auf einzelne spindelförmige Sinneszellen innerhalb der Geschmacksknospen beschränkt war (Abbildung 4.8 [D] und [E]). In Kontrollpräparaten, die nur mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurden, zeigte sich keinerlei Fluoreszenzsignal durch den Sekundärantikörper (Abbildung 4.8 [C] und [F]).

In der Zunge der Gustducin-KO Maus (Abbildung 4.8, untere Bildserie) war hingegen keine Immunreaktivität in den Geschmacksknospen der Wallpapille zu beobachten (Abbildung 4.8 [G, H, J, K]): Weder mit dem Gustducin S noch mit dem Gustducin H Antiserum war eine Immunmarkierung von Geschmackssinneszellen zu detektieren (Abbildung 4.8 [J, K]). Durch diese vollständige Abwesenheit einer Immunreaktivität im Gewebe von KO-Tieren, in dem kein Gustducin mehr exprimiert wird, konnte die Spezifität der verwendeten α -Gustducin Antiseren erfolgreich bestätigt werden.

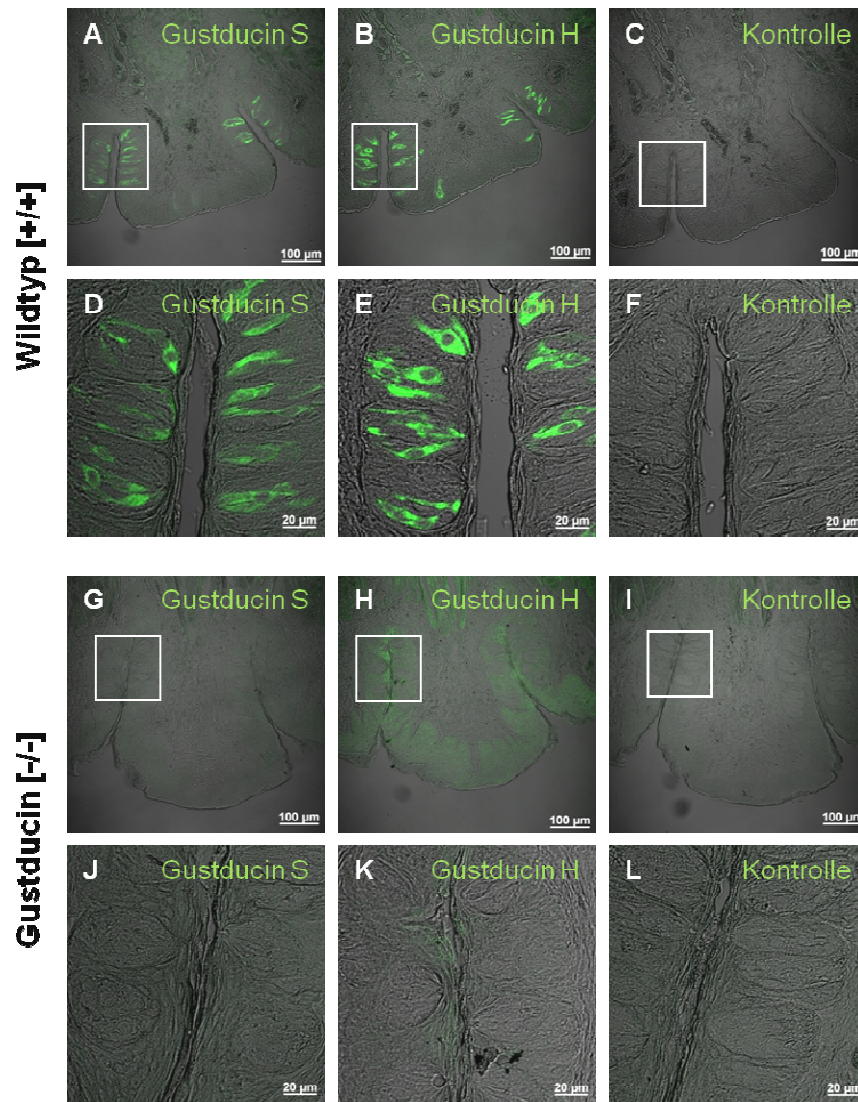


Abbildung 4.8: Immunhistochemischer Nachweis von α -Gustducin in Wallpapillen von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Mäusen.

Zum Nachweis der Expression von Gustducin in Paraffinschnitten der CV wurden Immunfärbungen mit den zwei Gustducin-spezifischen Antisera [*Gustducin S*, *Gustducin H*] durchgeführt, deren Bindung durch FITC-konjugierte anti-Kaninchen IgG visualisiert wurde.

Im Wildtyp-Gewebe ([A - F]; *Wildtyp* [+/+]) führt die Inkubation mit beiden Gustducin-Antisera zu einer Immunmarkierung einzelner Sinneszellen innerhalb der Geschmacksknospen [A, D; B, E]. In der Wallpapille der Gustducin-defizienten Maus ([G - L], *Gustducin* [-/-]) ist hingegen sowohl mit dem [*Gustducin S*] als auch mit dem [*Gustducin H*] Antiserum keine Immunreaktivität erkennbar. Kontrollpräparate, die nur mit dem Sekundärantikörper [*Kontrolle*] inkubiert wurden, zeigen bei beiden Genotypen kein Fluoreszenzsignal [C, F; I, L].

Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. Die Boxen in [A - C] und [G - I] repräsentieren die Bereiche, die in [D - F] bzw. [J - L] vergrößert dargestellt sind. Die verwendeten Primärantikörper sind im Bild angegeben.

4.2.1.2 Züchterfolg von α -Gustducin-defizienten Mäusen

Da in Mausspermien eine Immunreaktivität für α -Gustducin beobachtet wurde, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob die Deletion des α -Gustducins, die in der Zunge für eine deutliche Einschränkung der Geschmackswahrnehmung für süße und bittere Geschmacksstoffe verantwortlich ist [Wong et al., 1996], auch zu einer Beein-

trächtigung der Spermienfunktion führt, was sich in einer Veränderung des Reproduktionserfolgs der Gustducin-defizienten Tiere widerspiegeln könnte.

Um diese Frage zu klären, wurde der Zuchterfolg von Gustducin-defizienten Zuchtpaaren (Zuchtweibchen (f) x Zuchtmännchen (m): [-/-] x [-/-]) und reinen Wildtyp-Paaren (f x m: [+/+] x [+/+]) in einem kontinuierlichen monogamen Zuchtansatz miteinander verglichen. Um eine mögliche Fertilitätseinschränkung aufgrund eines Defekts der Spermienfunktion von KO-Männchen von einer etwaigen verminderten Fruchtbarkeit Gustducin-defizienter Weibchen unterscheiden zu können, wurde in Parallelansätzen außerdem der Zuchterfolg von Mauspaaren untersucht, bei denen jeweils entweder das Weibchen oder aber das Männchen Gen-defizient für Gustducin war, während der entsprechende Paarungspartner ein Wildtyp-Tier war (f x m: [-/-] x [+/+]) und (f x m: [+/+] x [-/-]). Der Reproduktionserfolg wurde für alle Verpaarungen anhand der Zahl der Nachkommen und der Zeitspanne zwischen den Würfen bestimmt.

Tabelle 4.1 macht deutlich, dass in den durchgeführten Zuchtexperimenten kein Reproduktionsdefizit der Gustducin-KO Tiere zu verzeichnen war: So war weder die Zahl der Nachkommen pro Wurf signifikant verändert, noch brauchten die Gustducin-defizienten Tiere längere Zeit bis sie sich erfolgreich fortpflanzten.

Tabelle 4.1: Analyse der Fertilität von α -Gustducin-defizienten Mäusen

In einem kontinuierlichen monogamen Zuchtsystem wurden Wildtyp-C57BL/6 [+/+] und Gustducin-KO [-/-] Tiere in den jeweils aufgeführten Kombinationen verpaart, und die links aufgeführten Fertilitätsparameter bestimmt (je drei Zuchtpaare pro Genotyp-Kombination). Die Anzahl der analysierten Würfe ist in Klammern (n = x) angegeben. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Reproduktionserfolg der verschiedenen Genotypen detektiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

Fertilitätsparameter	F x M: [Genotyp] x [Genotyp]			
	[+/+] x [+/+]	[+/+] x [-/-]	[-/-] x [+/+]	[-/-] x [-/-]
Zeit zwischen den Würfen [d]	29,3 \pm 4,5 (n = 9)	27,6 \pm 4,4 (n = 11)	25,6 \pm 1,6 (n = 10)	30,0 \pm 6,1 (n = 9)
Anzahl Nachkommen/Wurf	6,0 \pm 0,8 (n = 5)	4,9 \pm 0,6 (n = 8)	7,6 \pm 0,9 (n = 8)	4,4 \pm 0,8 (n = 8)

Dieses Fehlen eines Reproduktionsphänotyps könnte darin begründet liegen, dass Gustducin keine essentielle physiologische Funktion in Spermien hat, oder aber, dass der Mangel an funktionellem Protein durch die Expression eines anderen G Proteins kompensiert werden kann. Ein solcher Effekt, konnte bei einer anderen G Protein Untereinheit bereits beobachtet werden. So kommt es z. B. in Mäusen, die Gen-defizient für G₁₂ sind, zu einer kompensatorischen Expression von G₁₃ [Gohla et al., 2007; Young et al., 2011].

4.2.1.3 Gustducin-Immunreaktivität im Keimdrüsengewebe der Gustducin-defizienten Mauslinie

Die unbeeinträchtigte Fertilität der Gustducin-defizienten Mäuse könnte aber auch dadurch bedingt sein, dass im Hoden eine trunkierte Variante des α -Gustducins

vorkommt, die auch nach der Deletion des ersten Exons noch exprimiert wird. Eine solche, möglicherweise durch Hoden-spezifische Transkriptionsfaktoren regulierte Form [Howard et al., 1990], könnte, falls sie funktionell aktiv ist, ebenfalls für das fehlende Fertilitätsdefizit im KO-Tier verantwortlich sein. Um dieser Überlegung nachzugehen, wurde immunhistochemisch untersucht, ob analog zum Zungengewebe auch in männlichen Keimzellen der Gustducin-defizienten Mäuse kein Gustducin-Protein mehr nachweisbar ist und die Immunreaktivität ausbleibt.

Für diese Analysen wurden die bereits an Gefrierschnitten der Zunge validierten Antikörper eingesetzt (Abbildung 4.8). Diese sind gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die von den Exons 3 und 4 der Gustducin-Sequenz kodiert wird (Abbildung 4.9) und die damit geeignet sein sollten, auch eine um Exon 1 trunkierte Proteinvariante des Gustducins zu detektieren.

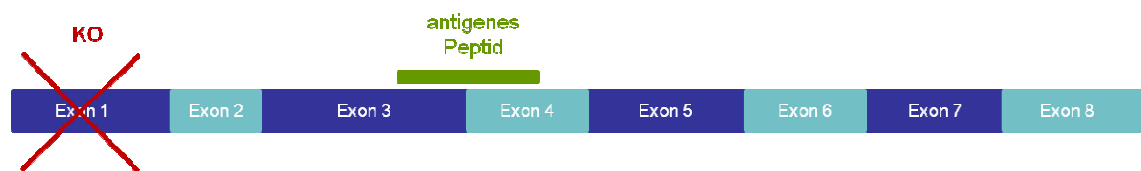


Abbildung 4.9: Schematischer Überblick über die Exon-Struktur des α -Gustducins.

Dargestellt ist eine Übersicht der Verteilung der kodierenden Gustducin-Sequenz auf die 8 Exons des Gustducin-Gens. In Gustducin-KO Mäusen ist Exon 1 deletiert (rotes Kreuz). Das immunogene Peptid, das zur Generierung der α -Gustducin Antiseren eingesetzt wurde, wird von Exon 3 und Exon 4 kodiert (grün dargestellt).

Abbildung 4.10 macht deutlich, dass die Immunreaktivität der α -Gustducin Antikörper im Keimdrüsengewebe, im Gegensatz zur Wallpille, keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Gewebe zeigte: In Hodenschnitten eines Wildtyp-Männchens war mit beiden α -Gustducin Antiseren eine Immunmarkierung in den Samenkanälchen zu registrieren (Abbildung 4.10 [A] und [C]), die vergleichbar zur Immunreaktivität in früheren Analysen war [Fehr et al., 2007]. Diese Immunfärbung war in Spermatiden besonders intensiv, während in den basalen Zellschichten nur ein schwaches Fluoreszenzsignal zu detektieren war (Abbildung 4.10 [E] und [G]). Nach Neutralisation des Gustducin S Antikörpers mit dem immunogenen Peptid (Abbildung 4.10 [B] und [F]) war ebenso wie in Kontrollansätzen, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden (Abbildung 4.10 [D] und [H]), keine Immunmarkierung des Keimzell-epithels mehr zu beobachten; es blieb lediglich eine schwache unspezifische Färbung der Leydigschen Zwischenzellen erkennbar (Abbildung 4.10 [D] und [H], Pfeilspitze).

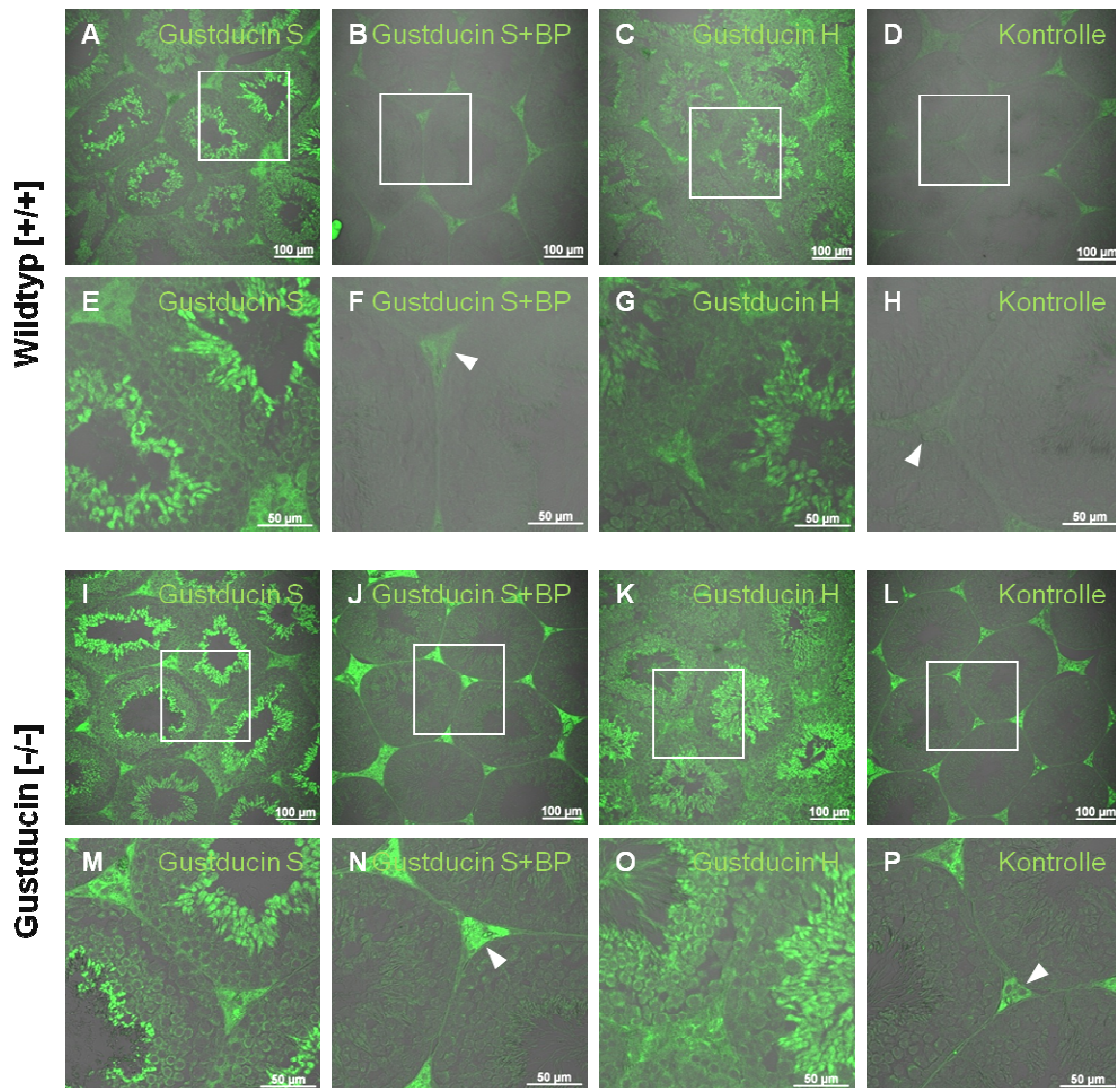


Abbildung 4.10: α -Gustducin Immunreaktivität im Hoden von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Mäusen.

Hodenparaffinschnitte einer Wildtyp-Maus [A - H, *Wildtyp* $+/+$] bzw. einer Gustducin-defizienten Maus [I - P, *Gustducin* $-/-$] wurden mit Gustducin-spezifischen Antikörpern [*Gustducin S*, *Gustducin H*] inkubiert, und die Antikörperbindung anschließend durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (1:750; grün dargestellt) visualisiert.

Beide Gustducin-spezifischen Antikörper resultieren im Hoden der Wildtyp-Maus (obere Bildserie) in einer deutlichen Immunreaktivität luminal gelegenen reiferen Keimzellen der angeschnittenen Tubuli [A, E; C, G]. Durch Vorinkubation des Gustducin S Antiserums mit dem korrespondierenden Peptid lässt sich die Immunfärbung stark reduzieren und es bleibt nur eine leichte Markierung der Leydigschen Zwischenzellen zurück [B, F, Pfeilspitze], die in Kontrollschnitten, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden, ebenfalls zu beobachten ist [D, H, Pfeilspitze].

Im Hoden der Gustducin-defizienten Maus (untere Bildserie, [*Gustducin* $-/-$]) lässt sich ebenfalls eine deutliche Immunreaktivität beider anti-Gustducin-Antikörper detektieren [I, K, M, O], die auch hier in den Spermatiden am stärksten ausgeprägt ist [M, O]. Die Immunmarkierung des Gustducin S Antiserums innerhalb der Tubuli lässt sich wie im Wildtyp-Gewebe durch das immunogene Peptid blockieren [J, N]; auch die Markierung der Leydigschen Zwischenzellen [N; Pfeilspitze] ist mit der Färbung der Kontrollpräparate vergleichbar [L, P; Pfeilspitze].

Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. Die Boxen in [A - D] und [I - L] sind in [E - H] bzw. [M - P] vergrößert dargestellt. Die jeweils verwendeten Primärantikörper sind im Bild oben rechts angegeben.

Dieser zunächst unerwartete Befund, dass die α -Gustducin-Immunreaktivität in männlichen Keimzellen unabhängig vom Genotyp war, konnte in reifen Spermien bestätigt werden, die aus dem Nebenhoden von Gustducin-Wildtyp und Gustducin-defizienten Tieren isoliert wurden: Die Spermien von Gustducin-KO Mäusen zeigten mit beiden Antisera die gleiche Markierung des Mittelstücks, die auch in Wildtyp-Spermien beobachtet wurde (Abbildung 4.11 [A, B, E, F] und [I, J, M, N]).

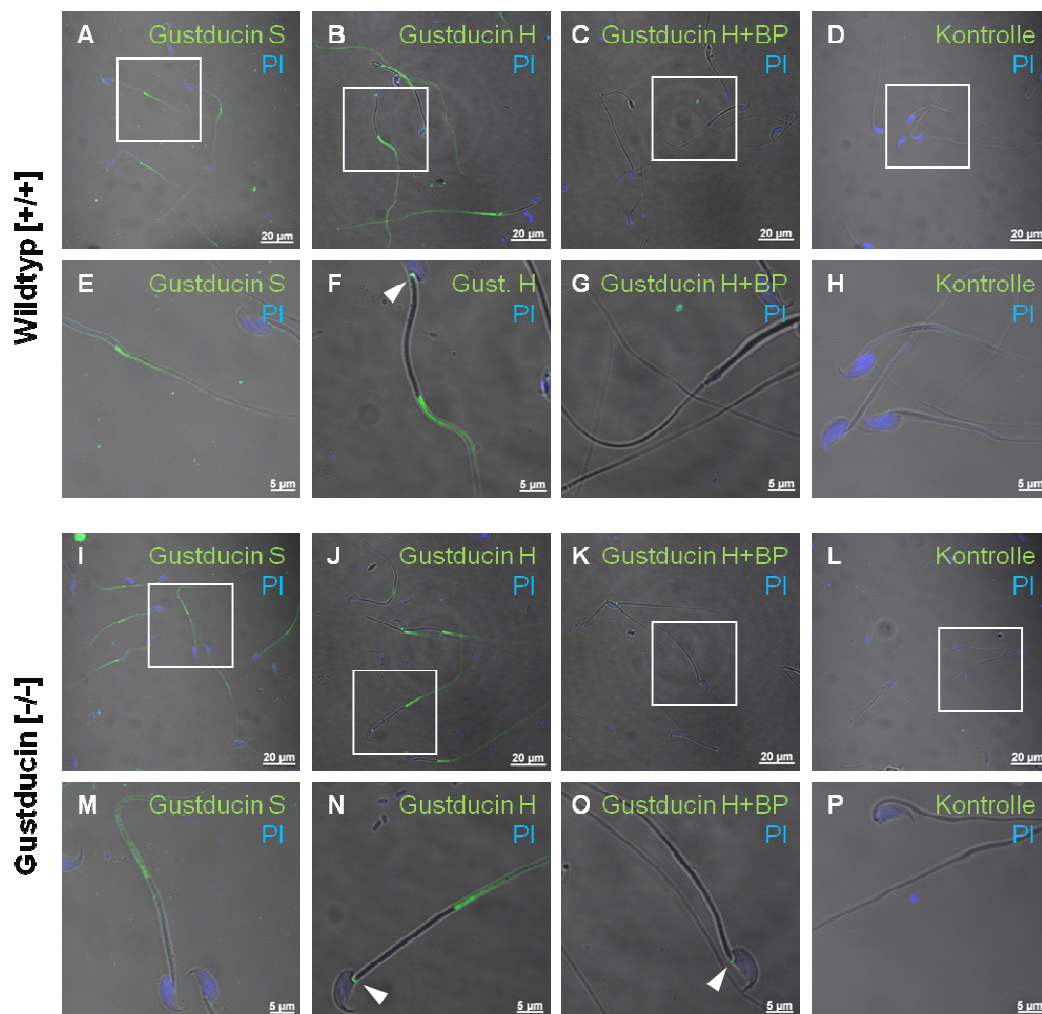


Abbildung 4.11: Analyse der Gustducin-Immunreaktivität in Gustducin-KO und Wildtyp-Spermien. Die Immunreaktivität der beiden α -Gustducin Antiseren in isolierten Gustducin-defizienten [**I - P**, *Gustducin* $[-/-]$] und Wildtyp-Spermien [**A - H**, *Wildtyp* $[+/+]$] wurde mit FITC-gekoppelten anti-Kaninchen IgG (1:750, grün) visualisiert. Anschließend wurde der Zellkern durch eine Inkubation mit Propidiumiodid [**Pf**] (blau dargestellt) gegengefärbt.

In beiden Genotypen zeigt sich mit den verwendeten Antiseren eine deutliche Gustducin-Immunreaktivität im Mittelstück des Flagellums [*Gustducin S*, *Gustducin H*]. Das Gustducin H Antiserum markiert außerdem das Verbindungsstück am Übergang vom Kopf zum Spermischwanz ([F; N], Pfeilspitze). Die Immunreaktivität des Flagellums ist sowohl in Wildtyp- als auch in Gustducin-KO Spermien durch Inkubation mit dem korrespondierenden Peptid blockierbar [C, G; K, O]; lediglich das Fluoreszenzsignal im Verbindungsstück bleibt auch in den Peptid-blockierten Ansätzen bestehen ([O], Pfeilspitze). In Kontrollpräparaten [D, H; L, P], die nicht mit den Antiseren inkubiert wurden, ist keine Immunfärbung detektierbar.

Darüber hinaus ließ sich in beiden Genotypen mit dem Gustducin H Antiserum zusätzlich ein Fluoreszenzsignal im Verbindungsstück des Spermiums detektieren (Abbildung 4.11 [F] und [N]). Diese Färbung des Verbindungsstücks im Halsbereich war jedoch im Gegensatz zur Markierung des Mittelstücks durch Vorinkubation des Antiserums mit seinem immunogenen Peptid nicht vollständig blockierbar (Abbildung 4.11 [O], Pfeil) und ist deshalb vermutlich auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers an dieses vesikuläre Organell zurückzuführen.

Die Immunreaktivität der α -Gustducin-Antiseren zeigte demnach im Hoden und in Spermien der Gustducin-defizienten Mauslinie keinerlei Abschwächung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dieser Befund warf die Frage auf, ob tatsächlich residuales Gustducin im Hoden der Gustducin-defizienten Tiere vorhanden war, oder ob die Immunmarkierung auf eine unspezifische Kreuzreaktivität des Antikörpers mit einem anderen Protein zurückzuführen sein könnte.

Da sich die Immunfärbung des Hodens und der Spermien beider Genotypen durch eine Prä-Inkubation des Antikörpers mit dem Peptid unterbinden ließ, war davon auszugehen, dass die erkannten Gewebsepitope große Ähnlichkeit zu den antigenen Epitopen des immunogenen Peptids aufweisen bzw. mit diesen übereinstimmen. In einer Sequenzanalyse der gängigen Datenbanken (Blast, NCBI; Bethesda [USA]) des zur Immunisierung eingesetzten Gustducin-Peptids (AS 94-113, Abbildung 4.9) konnte jedoch keine auffällige Homologie mit anderen Proteinen gefunden werden (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Übersicht über Proteine mit Homologie zum immunogenen Peptid der verwendeten Gustducin-Antisera.

Zusammengefasst ist eine Übersicht über die Proteine, die in einer Datenbankanalyse die stärkste Homologie zur Peptidsequenz des Gustducins (DYVNPRSREDQEQQLHSMANT) aufweisen, gegen die die verwendeten Antisera generiert wurden. Diese Proteine wurden nach dem Blast Score, der das Ausmaß der Homologie zwischen den beiden Sequenzen repräsentiert, absteigend geordnet. Neben dem Namen des homologen Proteins [*Name*] sind dessen Accession Nummer [*Accession Nummer*], der entsprechende Blast Score [*Blast Score*], die Sequenz-Identität (nur identische Aminosäuren werden berücksichtigt) [*Iden.*] und Sequenz-Ähnlichkeit (identische Aminosäuren und Aminosäuren mit gleicher Ladung sind relevant) [*Ähnl.*] sowie die erwartete molekulare Masse des Proteins [*Proteingröße*] angegeben.

<i>Name</i>	<i>Accession Nummer</i>	<i>Blast Score [bits]</i>	<i>Iden. x/x [%]</i>	<i>Ähnl. x/x [%]</i>	<i>Größe [kDa]</i>
Alpha-Gustducin (guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3)	NP_001074612	69,8	20/20 (100)	20/20 (100)	40
Akap9 (A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9)	NP_919444	28,2	8/10 (80)	9/10 (90)	434
ectopic P granules protein 5 homolog	NP_001182562.1	26,1	9/14 (64)	9/14 (64)	291
5-azacytidine-induced protein 1 (pre-acrosome localization protein 1)	NP_033864	25,7	8/12 (67)	9/12 (75)	120
Ggnbp1 (gametogenetin binding protein 1) isoform b	NP_001238810.1	25,2	9/13 (69)	9/13 (69)	30
Lsp1 (lymphocyte specific 1) isoform 1	NP_001129543.1	24,4	7/13 (54)	11/13 (85)	37
Gbf1 (golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1)	NP_849261	24,0	6/6 (100)	6/6 (100)	207
Nbea (neurobeachin)	NP_085098.1	24,0	6/10 (60)	8/10 (80)	327
		und			
		14,6	4/5 (80)	4/5 (80)	

Der Überblick über die Proteine mit der größten Übereinstimmung zum immunogenen Peptid in Tabelle 4.2 zeigt deutlich, dass die maximale zusammenhängende Übereinstimmung mit anderen Proteinen, wie z. B. AKAP 9 oder *gametogenetin binding protein 1*, bei nur 8 bzw. 9 der insgesamt 20 Aminosäuren des immunogenen Peptids lag. Durch diesen methodischen Ansatz konnte also kein eindeutiger Hinweis auf ein Protein gefunden werden, welches möglicherweise zusätzlich zum Gustducin bzw. anstelle dieser G Protein α -Untereinheit erkannt wurde. Die durch die α -Gustducin-Antikörper gebundene Struktur könnte aber auch in der räumlichen Anordnung der

Aminosäurekette eines Proteins (Sekundär- und Tertiärstruktur) begründet liegen, ohne dass eine Sequenzhomologie der Primärstruktur zwischen dem Protein und Gustducin festzustellen ist.

Um zu klären, ob eines der Proteine, die Homologien zum Gustducin-Peptid zeigen (siehe Tabelle 4.2), für die Immunreaktivität des Gustducin Antiserums verantwortlich sein könnte, oder ob möglicherweise eine verkürzte Gustducin-Variante durch die Antikörper erkannt wird, wurde die molekulare Masse des durch die α -Gustducin Antiseren detektierten Proteins in Western Blot Analysen mit Keimdrüsengewebe von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Tieren ermittelt.

Abbildung 4.12 [A] zeigt, dass im Hoden von Wildtyp-Tieren nach Inkubation mit dem Gustducin S Antiserum zwei stark ausgeprägte immunpositive Banden auszumachen waren. Diese entsprachen mit einem Molekulargewicht von ca. 55 und ca. 45 kDa der Größe der bereits in vorangegangenen Analysen detektierten Banden [von Buchholtz et al., 2004; Fehr et al., 2007]. Für diese immunreaktiven Banden wird diskutiert, dass es sich bei der größeren um einen ungelösten Komplex aus Gustducin und einem anderen bisher nicht identifizierten Protein handeln könnte [von Buchholtz et al., 2004], während die untere Bande nicht komplexiertes α -Gustducin (berechnete Masse: ca. 40 kDa) repräsentiert. Im Wildtyp-Nebenhoden traten diese beiden Banden ebenfalls auf, waren jedoch deutlich weniger intensiv als im Hoden (Abbildung 4.12, [A], linker Blot, [N h]). Analog zu den immunhistochemischen und immuncytochemischen Studien ließ sich die Immunmarkierung der Proben beider Gewebe durch eine Vorinkubation des Antiserums mit seinem immunogenen Peptid eliminieren (Abbildung 4.12 [B], linker Blot).

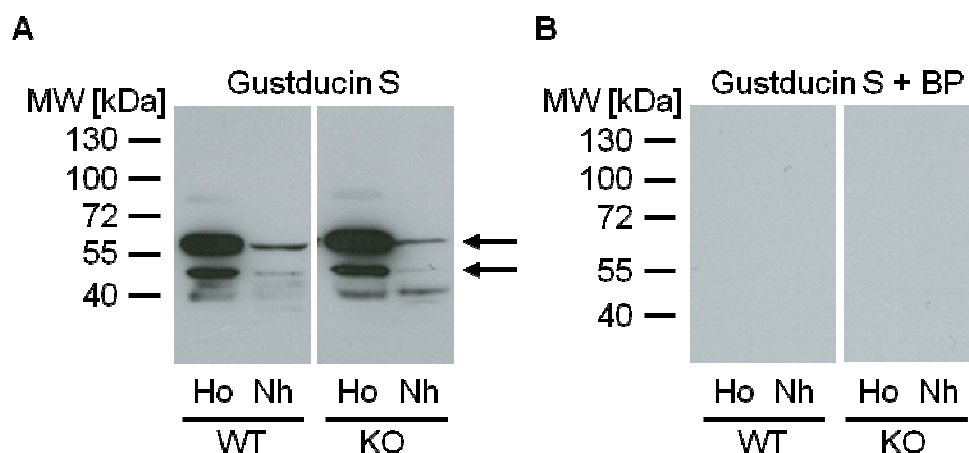


Abbildung 4.12: Western Blot Analyse der α -Gustducin Immunreaktivität im Keimdrüsengewebe von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Mäusen.

Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen (40 μ g) einer S₁-Proteinfraktion von Hoden- [Ho] und Nebenhodengewebe [Nh] einer Wildtyp-Maus [WT] bzw. einer Gustducin-defizienten Maus [KO] mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend mit dem Gustducin S Antiserum [Gustducin S] inkubiert (1:1000 verdünnt) [A]. In einem parallelen Ansatz [B] wurde der Antikörper vor der Inkubation der Membranen mit seinem korrespondierenden Peptid neutralisiert [Gustducin S + BP].

[A] Ohne eine Vorinkubation mit dem immunogen Peptid detektiert der Antikörper im Hoden des Wildtyp-Tieres zwei stark immunopositive Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa und ca. 45 kDa ([WT], Pfeile), die im Nebenhodengewebe auch auftreten, dort aber schwächer ausgeprägt sind ([Nh], Pfeile). Im Gewebe der Gustducin-defizienten Maus [KO] werden durch das Antiserum zwei Banden derselben Größe markiert, die eine vergleichbare Intensität wie die im Wildtyp-Gewebe aufweisen.

[B] Durch eine Vorinkubation des Antiserums mit dem korrespondierenden Blockierungspeptid wird die Reaktivität des Antikörpers im Gewebe beider Genotypen vollständig aufgehoben.

Das Molekulargewicht [MW] des mitgeführten Proteingrößenstandards ist jeweils links angegeben.

Die Analyse entsprechender Proben des Reproduktionsgewebes Gustducin-defizienter Tiere zeigte interessanterweise ein Bandenmuster, das dem von Gewebe männlicher Wildtyp-Mäuse entsprach (Abbildung 4.12 [A], rechter Blot-Streifen) und das nach einer Peptidneutralisation des Primärantikörpers ebenfalls ausblieb (Abbildung 4.12 [B], rechter Blot-Streifen). Im Hoden waren zwei prominente Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 45 und 55 kDa auszumachen (Abbildung 4.12 [A], rechter Blot, [Ho], Pfeile), deren Intensität mit den Banden des Immunoblots von Wildtyp-Tieren vergleichbar war. Diese Banden konnten ebenfalls in Gewebeproben des Nebenhodens registrieren werden und zeigten auch hier eine sehr viel schwächere Intensität als die Proben des Hodengewebes (Abbildung 4.12, [A], rechter Blot, [Nh]). In Proben beider Genotypen waren darüber hinaus auch einzelne, deutlich schwächere immunreaktive Banden einer molekularen Größe von ca. 40 kDa auszumachen (Abbildung 4.1 [A]).

Da die berechneten Massen der Proteine, die die stärksten Homologien zum immunogenen Peptid der Gustducin-Antiseren aufwiesen (siehe Tabelle 4.2), jeweils deutlich größer (120 - 434 kDa) bzw. kleiner (30 - 37 kDa) als die im Western Blot beobachteten Banden der Masse von ca. 45 und 55 kDa waren, kommen diese Proteine wahrscheinlich nicht als Kandidaten für eine mögliche Kreuzreaktivität der Gustducin-Antiseren in Frage. Allerdings machen diese Befunde auch deutlich, dass in Gustducin-defizienten Tieren offenbar keine spezielle verkürzte Form des Gustducins exprimiert wurde, die im Wildtyp-Gewebe nicht vorhanden war. Es wäre demnach möglich, dass im Hoden eine spezielle Gustducin-Isoform vorkommt, die auch im Wildtyp unabhängig vom deletierten Exon 1 (Abbildung 4.9) exprimiert wird. Eine solche Hoden-spezifische Isoform könnte eventuell für eine oder beide der detektierten immunreaktiven Banden verantwortlich sein.

Da die Reaktivität der verwendeten Gustducin-Antikörper anhand der bisher durchgeführten Analysen nicht abschließend geklärt werden konnte, war kein eindeutiger Proteinnachweis dieser G Protein α -Untereinheit möglich; eine Expression im männlichen Keimdrüsengewebe konnte allerdings ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Da die verwendeten Gustducin-defizienten Mäuse aufgrund ihres Hygienestatus beim Umzug unserer Arbeitsgruppe nicht nach München transferiert werden konnten, musste ihre Zucht eingestellt werden. Deshalb waren weitere Analysen am KO-Gewebe, wie beispielsweise der Nachweis von Gustducin-Isoformen Varianten mit Hilfe des Northern-Blot Verfahrens, *in situ* Hybridisierungen, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight)-Analysen zur Aufklärung der

Identität des im Gewebe von KO-Tieren durch die Antikörper detektierten Proteins oder auch experimentelle Ansätze mit isolierten Spermien Gustducin-defizienter Tiere, nicht möglich.

Zur Klärung der Frage, ob ein Spermium die Wahrnehmung chemischer Substanzen im weiblichen Genitaltrakt mit Hilfe von gustatorischen GPCRs und assoziierten Signaltransduktionskaskaden realisiert, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen deshalb auf experimentelle Ansätze zur Expression und Funktion von Geschmacksrezeptoren der Tas1- und Tas2-Familie im männlichen Reproduktionssystem. Da die Signaltransduktion dieser beiden Rezeptorfamilien im Geschmackssystem überwiegend, aber nicht ausschließlich über α -Gustducin verläuft [He et al., 2004; Ozeck et al., 2004; Sainz et al., 2007; Tizzano et al., 2008], könnten diese Rezeptoren im Reproduktionssystem auch ganz unabhängig von α -Gustducin für die Erkennung chemosensorischer Liganden verantwortlich sein.

4.3 Bitterrezeptoren im Keimdrüsengewebe der männlichen Maus

4.3.1 RT-PCR Untersuchung zum Expressionsnachweis von Tas2-Rezeptoren im Hoden der Maus

Um der Frage nachzugehen, ob Mitglieder der umfangreichen Tas2r-Familie von Bitterrezeptoren als Kandidaten für Sensorproteine des Spermiums zur Wahrnehmung von Liganden in dessen Umgebung in Frage kommen könnten, wurde zunächst geprüft, ob mRNA Transkripte von Vertretern dieser GPCR-Familie im männlichen Keimdrüsengewebe nachzuweisen sind. Dazu wurden Reverse Transkriptase PCRs (RT-PCR) mit spezifischen Primerpaaren für die 35 Mitglieder der Bitterrezeptorfamilie der Maus durchgeführt (Abschnitt 2.3.1). Die Qualität der eingesetzten cDNAs wurde durch PCRs mit einem β -Aktin-spezifischen Primerpaar sichergestellt (siehe Abschnitt 4.4.1 und Abbildung 4.32 [B]). Um zu gewährleisten, dass die gewählten PCR-Bedingungen und Primerpaare geeignet waren, um Subtyp-spezifische Tas2r-Transkripte zu amplifizieren, wurde cDNA der Wallpapille als Positivkontrolle eingesetzt. Um nicht für jedes der 35 Primerpaare die optimale *Annealing*-Temperatur separat ermitteln zu müssen, wurde dabei die Technik der *Touchdown* PCR angewandt, die ein breites Spektrum an *Annealing*-Temperaturen abdeckt und trotzdem eine spezifische Amplifikation ermöglicht (Abschnitt 3.1.3.2). Die exemplarisch dargestellten Befunde der RT-PCRs in Abbildung 4.13, Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16 machen deutlich, dass mit der verwendeten Wallpapillen-cDNA die *Touchdown*-PCRs so optimiert werden konnten, dass PCR-Produkte der berechneten Größe generiert wurden. Eine Ausnahme machte dabei nur der Tas2r116 (Abbildung 4.14), dessen Transkript nicht aus cDNA der Wallpapille amplifiziert werden konnte, obwohl zwei unterschiedliche Primerpaare und eine Vielzahl verschiedener Amplifikationsbedingungen getestet wurden (Abbildung 4.14, [*Tas2r116a*] und [*Tas2r116b*]).

Die erfolgreich validierten Primerpaare wurden anschließend in RT-PCR Analysen mit cDNA des Hodens eingesetzt. Um eine zu falsch positiven Resultaten führende DNA-Kontamination der PCR-Reagenzien auszuschließen, wurden in jeder Versuchsreihe Kontrollansätze mitgeführt, in denen H₂O statt cDNA verwendet wurde. Außerdem wurden für jeden Versuchsansatz ebenfalls RT-PCR Proben mit cDNA der CV als *Template* eingesetzt; so konnte für jeden einzelnen Ansatz sichergestellt werden, dass die Versuchsbedingungen der PCR-Reaktion auch tatsächlich zur Amplifikation von Rezeptortranskripten geeignet waren.

In diesen RT-PCR Analysen konnten unter den gewählten Bedingungen für sechs der 35 Bitterrezeptoren zwar reproduzierbar Amplifikate der erwarteten Größe aus cDNA

der CV generiert werden (Abbildung 4.13, [CV]); mit cDNA aus Hodengewebe konnten hingegen in keinem der durchgeführten Ansätze PCR-Banden für diese Rezeptoren, den Tas2r102, Tas2r104, Tas2r118, Tas2r120, Tas2r121 und den Tas2r124, generiert werden (Abbildung 4.13, [Ho]), so dass eine Expression dieser sechs Rezeptoren im Hoden weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

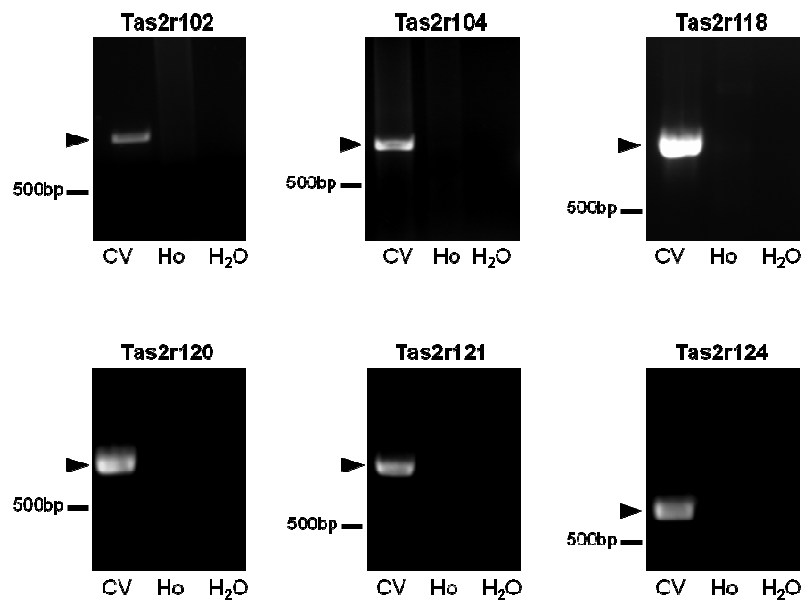


Abbildung 4.13: Übersicht über nicht im Hoden exprimierte Bitterrezeptoren.

Zum Nachweis von Bitterrezeptor-Transkripten im männlichen Reproduktionsgewebe wurden RT-PCRs mit Tas2r-spezifischen Primerpaaren und cDNA aus Hoden [Ho] und der Wallpapille [CV] der Maus durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert. Zur Größenorientierung ist der 500 bp-Marker gezeigt; die Lage des jeweils erwarteten Amplifikationsprodukts ist durch eine Pfeilspitze markiert.

Während für alle dargestellten Rezeptoren eine Bande mit der erwarteten Größe (Pfeilspitze) aus cDNA der CV [CV] amplifiziert werden konnte, wurden mit Hoden cDNA [Ho] keine Amplifikationsprodukte detektiert. Eine Kontamination der PCR-Reaktion konnte durch die H₂O-Kontrollproben [H₂O], in denen keine Banden auftraten, ausgeschlossen werden. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von 3-5 unabhängigen PCRs pro Tas2-Rezeptor-Subtyp.

Auch mit den Tas2r116-spezifischen Primerpaaren ließ sich bei Verwendung der Hoden-cDNA kein Amplifikationsprodukt generieren (Abbildung 4.14, [Ho]). Da für diesen Rezeptor jedoch mit der cDNA der CV ebenfalls kein PCR-Produkt nachzuweisen war (Abbildung 4.14, [CV]), scheinen die gewählten Primer und PCR-Bedingungen nicht geeignet, um Tas2r116-Transkripte zu amplifizieren, so dass eine Expression dieses Rezeptors im Hoden nicht geklärt werden konnte.

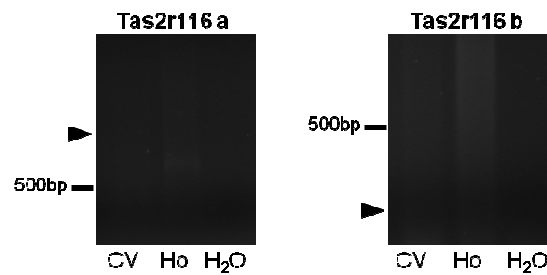


Abbildung 4.14: Ergebnisse der RT-PCR Analysen mit Tas2r116-spezifischen Primerpaaren.

Gezeigt sind ausgewählte Resultate einer RT-PCR mit muriner cDNA der Wallpapille [CV] und des Hodens [Ho] unter Verwendung zweier unterschiedlicher Primer-Paare [*Tas2r116 a*, *Tas2r116 b*] gegen den Tas2r116 Rezeptor. In keiner der durchgeführten PCRs konnte ein Tas2r116-Transkript aus der cDNA der CV [CV] oder des Hodens [Ho] amplifiziert werden. Die jeweilige Größe der erwarteten PCR-Produkte mit den beiden eingesetzten Primer-Paaren ist durch eine Pfeilspitze angezeigt.

Interessanterweise konnten jedoch, im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen sieben Bitterrezeptoren (s. Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14), für alle anderen 28 Mitglieder der Tas2r-Familie mRNA-Transkripte im Hoden der Maus nachgewiesen werden. Wie Tabelle 4.3 deutlich macht, zeigt der Anteil der positiven PCR-Resultate mit testikulärer cDNA an der Gesamtzahl der durchgeführten PCRs deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptor-Subtypen: So waren einzelne Rezeptoren (z. B. Tas2r131, Tas2r143, Tas2r144) in jeder der PCRs nachzuweisen, während Transkripte anderer Rezeptoren (z. B. Tas2r115, Tas2r130) nur in einzelnen Ansätzen registriert werden konnten. Auch die Intensität der detektierten PCR-Banden variierte stark zwischen den einzelnen Subtypen. Zur Quantifizierung der Bandenstärke wurde deshalb die absolute Intensität des PCR-Produktes mit cDNA der CV und des Hodens qualitativ als „stark“, „mittel“ oder „schwach“ eingeschätzt und daraus die mittlere Bandenintensität der Amplifikationsprodukte für jeden Rezeptor ermittelt (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Übersicht über die Amplifikation von Bitterrezeptor-Transkripten aus murinem Hodengewebe mittels RT-PCR.

Gezeigt ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse von jeweils 3 - 6 RT-PCR Ansätzen mit unabhängigen cDNA Präparationen; dabei ist der Anteil der PCRs mit einem Amplifikationsprodukt aus Hoden cDNA an allen positiven PCR Ansätzen, die ein Amplifikat aus gustatorischer cDNA zeigten, angegeben. Darüber hinaus ist die mittlere Intensität der jeweiligen PCR-Banden gezeigt, die aus den einzelnen Ansätzen qualitativ ermittelt wurde. Intensität: (+) schwach; + mittel; ++ stark; - kein Amplifikat; (*) kein positiver CV Befund.

<i>Tas2r</i>	<i>Anzahl der positiven Nachweise im Hoden / Gesamtzahl der pos. PCRs</i>	<i>Mittlere Banden- Intensität der PCR mit Hoden cDNA</i>	<i>Mittlere Banden- Intensität der PCR mit cDNA der CV</i>
102	0 / 3	-	+
103	3 / 3	+	++
104	0 / 4	-	++
105	3 / 5	(+)	+
106	2 / 4	+	++
107	2 / 4	(+)	+
108	4 / 5	+	++
109	4 / 5	+	+
110	4 / 5	+	++
113	3 / 6	(+)	++
114	4 / 5	(+)	+
115	2 / 5	(+)	++
116	0 / (9*)	-	-
117	4 / 5	+	+
118	0 / 3	-	++
119	2 / 3	+	++
120	0 / 3	-	+
121	0 / 4	-	+
122	2 / 3	(+)	(+)
123	4 / 6	+	+
124	0 / 3	-	+
125	2 / 3	+	+
126	2 / 3	(+)	(+)
129	2 / 4	+	++
130	1 / 4	(+)	(+)
131	3 / 3	++	++
134	3 / 3	+	+
135	4 / 4	+	+
136	2 / 3	(+)	(+)
137	3 / 4	+	+
138	2 / 6	(+)	++
139	3 / 5	+	+
140	3 / 4	(+)	(+)
143	4 / 4	++	++
144	5 / 5	++	++

Für einen Großteil dieser Bitterrezeptoren konnte in mindestens der Hälfte der PCR-Ansätze eine eindeutige Bande der erwarteten Größe mit mittlerer bis starker Intensität in den Hodenproben detektiert werden (siehe Tabelle 4.3, [+] und [++]).

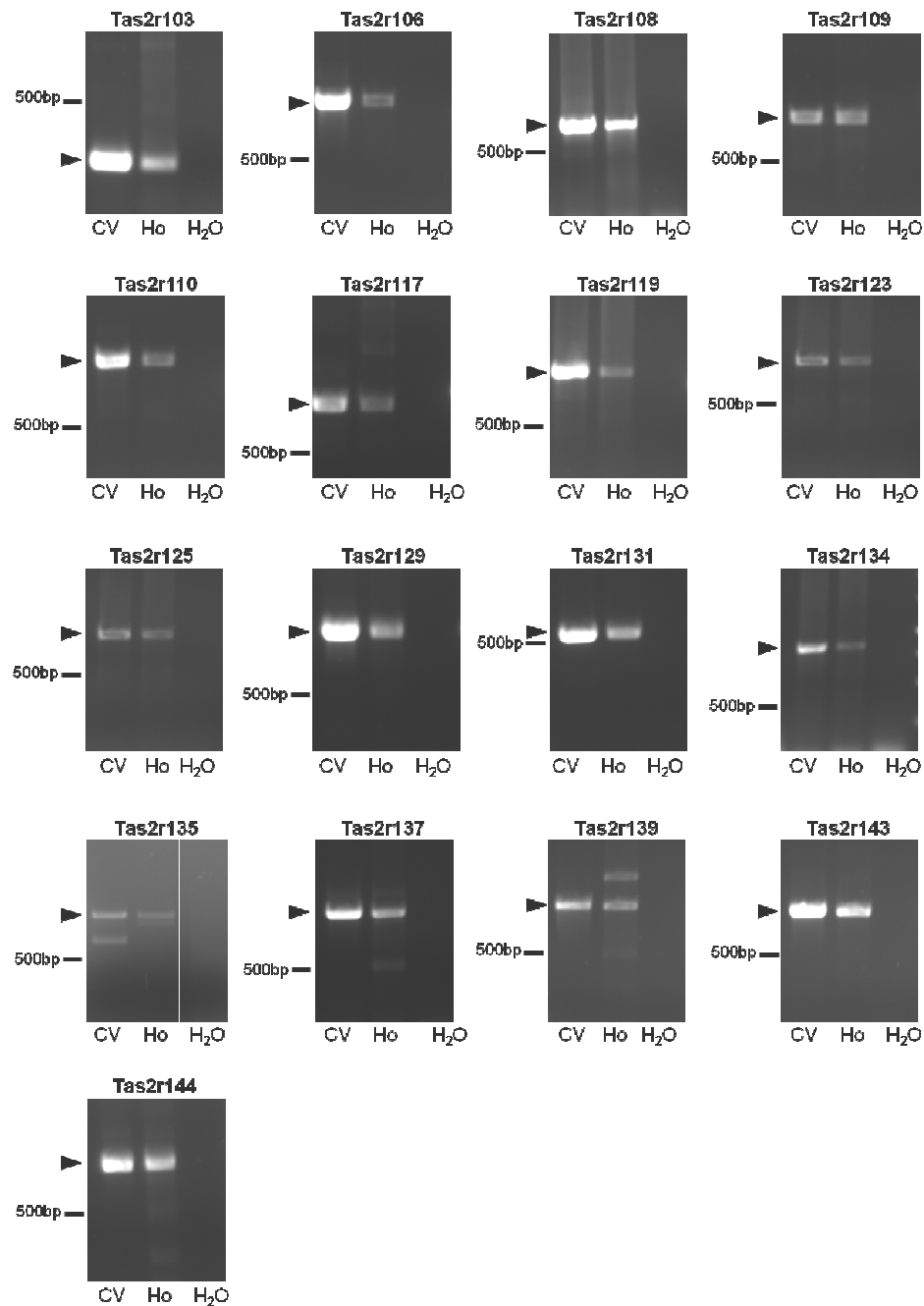


Abbildung 4.15: Nachweis von Bitterrezeptor-Transkripten mit mittlerer bis starker Bandenintensität in RT-PCRs mit cDNA des Maushodens.

Gezeigt sind die PCR-Ansätze der 17 spezifischen Tas2-Primerpaare, die zu einem Amplifikationsprodukt mit mittlerer und starker Intensität im Hodengewebe führten. Für alle eingesetzten Tas2r Primer konnte ein Amplifikationsprodukt mit der erwarteten Größe (Pfeilspitze) sowohl im Geschmacksgewebe [CV] als auch im Hoden [Ho] nachgewiesen werden.

Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von 3 - 6 unabhängigen PCRs pro Primerpaar.

Abbildung 4.15 zeigt die Ergebnisse von repräsentativen RT-PCR-Experimenten dieser 17 Tas2-Rezeptoren, des Tas2r103, Tas2r106, Tas2r108, Tas2r109, Tas2r110, Tas2r117, Tas2r119, Tas2r123, Tas2r125, Tas2r129, Tas2r131, Tas2r134, Tas2r135, Tas2r137, Tas2r139, Tas2r143 und des Tas2r144. In PCR-Analysen für den Tas2r139 war neben dem erwarteten Amplifikationsprodukt mit einer Größe von 863 bp noch ein zusätzliches Transkript von ca. 1100 bp zu registrieren, das in den Geschmackspapillen-Proben nicht auszumachen war (Abbildung 4.15 [*Tas2r139*]). Auch mit dem Tas2r135-spezifischen Primerpaar trat eine zusätzliche PCR-Bande auf; dieses PCR-Produkt zeigte allerdings eine geringere Größe (ca. 700 bp) als erwartet (900 bp) und trat nur in der cDNA Probe der Wallpapille auf (Abbildung 4.15 [*Tas2r135*]).

Die noch verbleibenden elf Bitterrezeptoren der Tas2r-Familie zeigten hingegen entweder nur eine sehr schwache Intensität des Amplifikationsproduktes der erwarteten Größe in cDNA des Hodens oder waren in den verschiedenen unabhängigen cDNA-Präparationen nur in Einzelfällen zu registrieren (s. Tabelle 4.3). In diese Bitterrezeptor-Gruppe fallen der Tas2r105, Tas2r107, Tas2r113, Tas2r114, Tas2r115, Tas2r122, Tas2r126, Tas2r130, Tas2r136, Tas2r138 und Tas2r140 (Abbildung 4.16). Bei den Tas2r136 und Tas2r138 Rezeptoren waren zusätzlich potentiell unspezifische Amplifikate nachzuweisen, die eine geringere als die berechnete Größe des PCR-Produkts aufwiesen (Abbildung 4.16, [*Tas2r136*], [*Tas2r138*]).

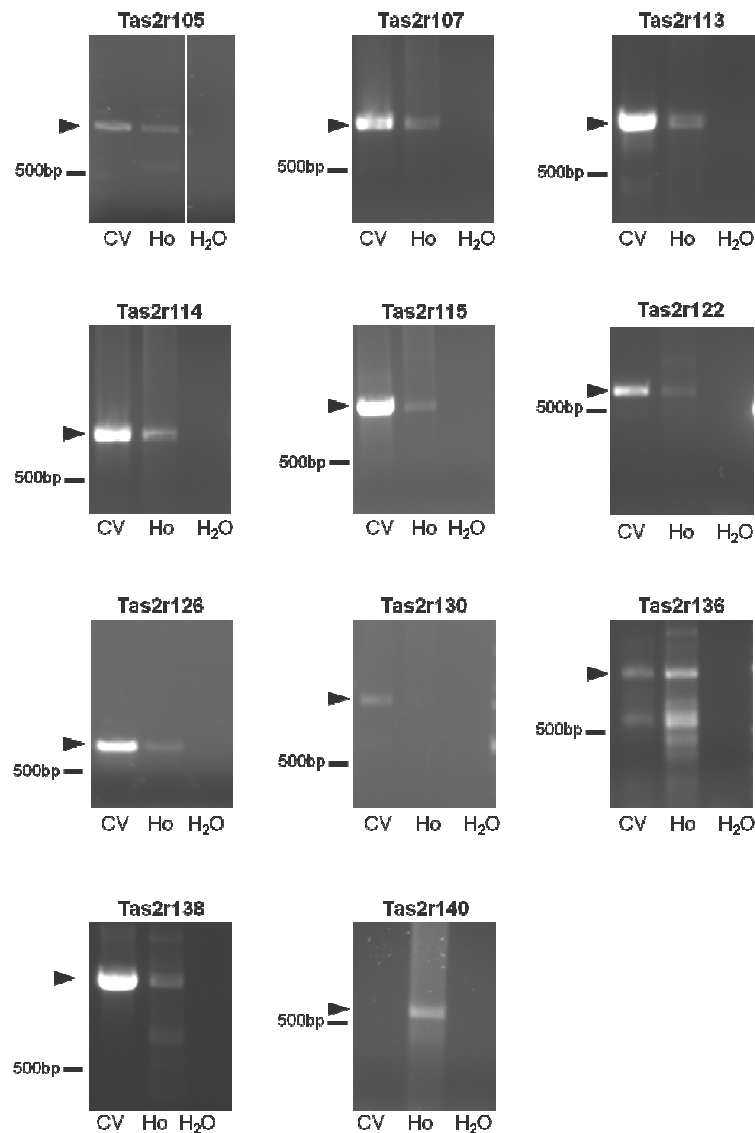


Abbildung 4.16: Exemplarische Dokumentation der RT-PCR-Befunde der Bitterrezeptor Subtypen mit schwacher Amplifikationsintensität aus cDNA des Hodens.

Die gezeigten exemplarischen PCR-Befunde umfassen die Bitterrezeptoren, die in RT-PCR Analysen mit Hoden cDNA nur zu einer Amplifikationsbande mit sehr geringer Intensität führten und die sich teilweise nur in einzelnen PCR-Ansätzen (Tas2r115, Tas2r130, Tas2r138) amplifizieren ließen. Neben den Amplifikationsprodukten der erwarteten Größe waren mit dem Tas2r136-spezifischen Primerpaar weitere kleinere, vermutlich unspezifische Banden zu detektieren. Im Geschmacksgewebe amplifizierten die Primer für die Tas2r140 Sequenz eine sehr schwache Bande [CV].

Die Beobachtung, dass Transkripte vieler Bitterrezeptor-Subtypen im Hoden detektiert werden können, während es für andere keinerlei Hinweise auf eine Expression in testikulärem Gewebe ergab (Abbildung 4.13), führte zu der Frage, ob die exprimierten bzw. nicht-exprimierten Rezeptoren sich durch weitere Gemeinsamkeiten auszeichnen, beispielsweise bezüglich ihres Ligandenspektrums oder ihrer Proteinsequenz. Da bisher nur für sehr wenige murine Bitterrezeptor-Subtypen aktivierende Liganden identifiziert werden konnten [Chandrashekar et al., 2000; Meyerhof et al., 2010], wurde die Sequenzhomologie der Rezeptoren untersucht, um so Hinweise auf mögliche Unter-

schiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den Gruppen amplifizierbarer und nicht-amplifizierbarer Rezeptoren zu sammeln. Dazu wurde die Homologie der 35 Bitterrezeptorsubtypen der Maus in vergleichenden Aminosäuresequenzanalysen mit Hilfe des *ClustalW* Computerprogramms bestimmt und anschließend in einem Stammbaum-Dendrogramm dargestellt. Diese Form der Darstellung erlaubt eine visuelle Abschätzung, ob Rezeptorsubtypen, deren Transkripte im Hoden nicht (blau eingefärbt), nur in sehr geringer Menge (rosa) oder eindeutig (rot) nachgewiesen wurden (Abbildung 4.13), sich durch eine Sequenzhomologie auszeichnen. Ebenfalls in das Dendrogramm eingezeichnet wurde die Lage der jeweiligen Tas2r-Gene der Maus, die bis auf den Tas2r119 (Chromosom 15) und den Tas2r134 Rezeptor (Chromosom 2) von zwei Clustern auf Chromosom 6 kodiert werden [Conte et al., 2003], wobei Cluster 2 sich in zwei Subcluster (Subcluster 1 und 2) unterteilen lässt (Abbildung 4.17). In dieser Darstellung fällt auf, dass nah verwandte Tas2-Rezeptoren meist auch chromosomal dicht nebeneinander lokalisiert sind und im gleichen Cluster bzw. Subcluster vorliegen (Abbildung 4.17).

Im Dendrogramm der Bitterrezeptoren ist zu erkennen, dass die Intensität der RT-PCR-Amplifikationsprodukte der Tas2-Rezeptoren innerhalb eines Clusters deutlich variieren kann (Abbildung 4.17). Da keiner der Cluster ausschließlich Rezeptoren enthält, die im Hoden exprimiert bzw. nicht exprimiert werden oder die eine starke Übereinstimmung in ihrer Bandenintensität zeigen, ist kein auffälliger Zusammenhang zwischen der Rezeptorhomologie, der Lokalisation auf dem Chromosom und der Expression der jeweiligen Rezeptoren zu erkennen.

Die Verwandtschaft der Hoden-positiven und Hoden-negativen Rezeptoren scheint jedoch auch nicht gänzlich zufällig verteilt zu sein. So weisen beispielsweise drei der sechs im Hoden nicht nachweisbaren Rezeptorsubtypen eine starke Homologie zueinander (ca. 70 %) und damit einen relativ „nahen“ Verwandtschaftsgrad auf (Tas2r102, Tas2r124, Tas2r121, obere Äste des Dendrogramms), während die anderen drei nicht in cDNA des Keimdrüsengewebes nachgewiesenen Rezeptoren (Tas2r104, Tas2r118, Tas2r120) weder zu dieser Klein-Gruppe noch untereinander ausgeprägte Homologien zeigen. Auffällig ist auch, dass der Subcluster 1 von Cluster 2 überwiegend Rezeptoren mit sehr schwacher (Tas2r105, Tas2r107, Tas2r114, Tas2r130) oder ohne Hoden-Expression (Tas2r104) beinhaltet; der Tas2r106 zeigt als einziger Vertreter dieses Clusters ein eindeutig nachweisbares Transkript im Hoden auf.

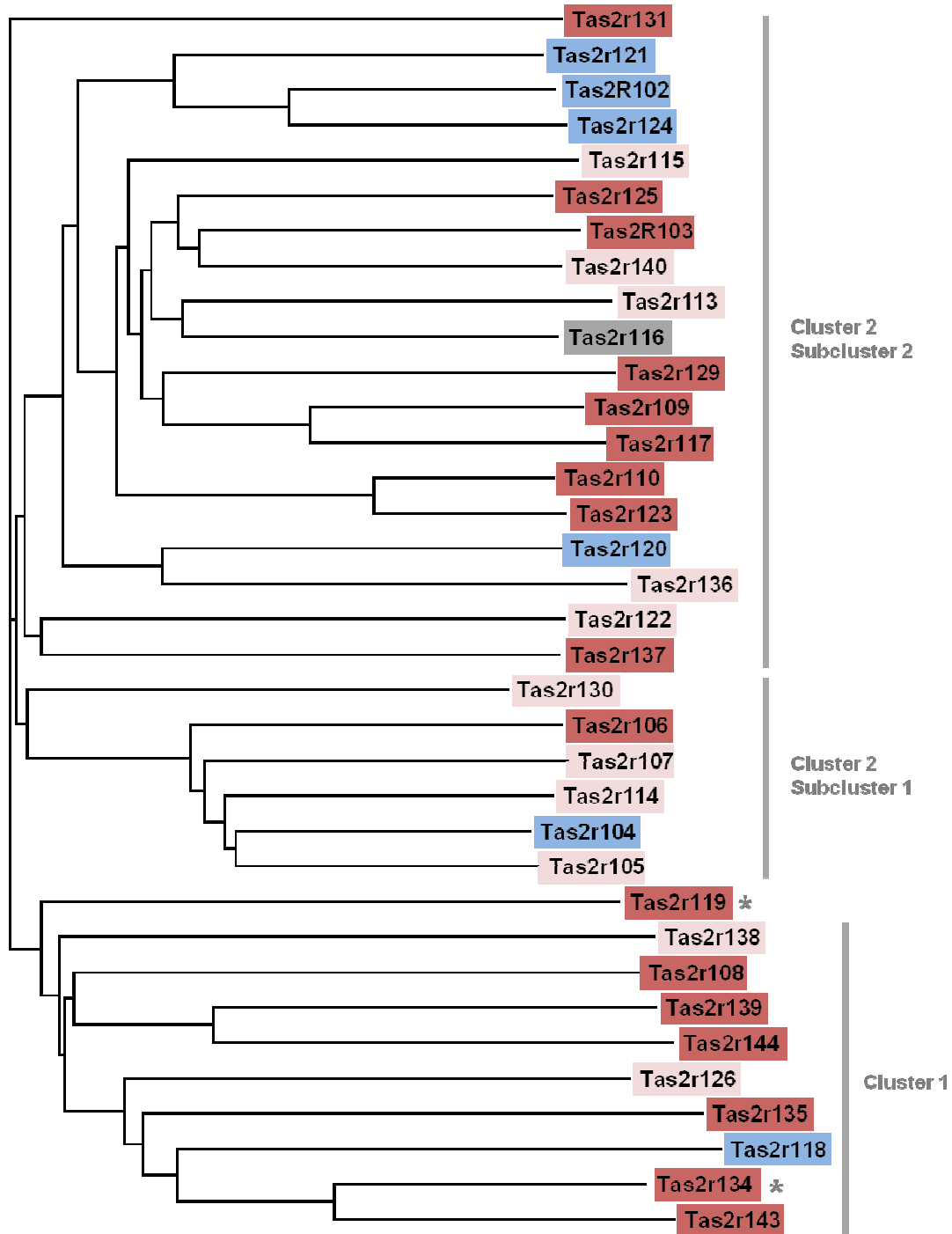


Abbildung 4.17: Graphische Darstellung der Sequenzähnlichkeit und Intensität der RT-PCR-Produkte von Tas2-Rezeptoren im Hoden der Maus.

Mit Hilfe des Computerprogramms *ClustalW* wurde ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen der 35 murinen Tas2rs erstellt und ihre Sequenz-Verwandtschaft in *Treeview* in einem Dendrogramm dargestellt. Die chromosomale Lokalisation der Rezeptorsequenzen in Clustern ist rechts angegeben. Die Cluster 1 und 2 liegen beide auf Chromosom 6 und beinhalten alle Bitterrezeptoren außer dem Tas2r119 ([*], Chromosom 15) und dem Tas2r134 ([*], Chromosom 2). Zur Übersicht über die Expression der Bitterrezeptor-Transkripte im Maushoden ist die mittlere Intensität des jeweiligen PCR-Produkts aus testikulärer cDNA farblich kodiert angegeben (rot: mittlere bis hohe Intensität, hellrosa: schwache oder nur vereinzelte PCR-Banden; blau: nicht im Hoden amplifizierbar; grau: unklar). Die Länge und Entfernung der Äste repräsentieren das Ausmaß der Sequenzunterschiede der einzelnen Rezeptoren.

Die 17 Rezeptoren, für die ein RT-PCR-Produkt mittlerer bis starker Intensität registriert werden konnte, sind auf alle Cluster bzw. Subcluster verteilt und umfassen auch die beiden Rezeptoren, die nicht durch Chromosom 6 kodiert werden. Auch bei diesen Rezeptoren ist eine häufige Übereinstimmung in der Bandenintensität bei starker Verwandtschaft, wie zwischen dem Tas2r109, Tas2r117 und Tas2r129, dem Tas2r108, Tas2r139 und Tas2r144, sowie dem Tas2r125 und Tas2r103 zu beobachten. Eine ähnliche Amplifikationsmenge ist auch beim Tas2r143 und Tas2r134 zu detektieren (Abbildung 4.17, unterster Ast), die zwar nicht im selben Cluster liegen, aber trotzdem einen hohen Grad an Homologie aufweisen. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch der Tas2r131, dessen spezifische Primer unter Verwendung von Hoden cDNA zu einer RT-PCR-Bande mit starker Intensität führt, der jedoch nur wenig Ähnlichkeit zu den weiteren Rezeptoren mit vergleichbarer Transkript-Stärke aufweist (Abbildung 4.17, ganz oben).

Da für die durchgeführten RT-PCR-Analysen cDNA aus dem gesamten Hoden verwendet wurde, könnten die nachgewiesenen Rezeptor-Transkripte nicht nur aus Keimzellen aller Reifungsstadien, sondern auch aus Sertoli-Zellen und interstitiellen Hodengewebe stammen. Angesichts der Vielzahl an verschiedenen Bitterrezeptoren, deren Transkripte in unterschiedlicher Menge im Hoden nachgewiesen werden konnten (s. Tabelle 4.3), sollte deshalb im nächsten Schritt untersucht werden, welche dieser Bitterrezeptoren im Hoden tatsächlich in ein funktionelles Rezeptorprotein translatiert werden und somit an der Detektion von chemosensorischen Liganden durch Keimzellen beteiligt sein könnten.

4.3.2 Immunhistochemischer Spezifitätstest eines Tas2r138 Antikörpers

Um die Frage zu klären, welche der Tas2r-Rezeptortranskripte translatiert werden und um gleichzeitig prüfen zu können, in welchen Zelltypen und Stadien der Keimzellreifung (s. Abbildung 4.2 [A]) die Bitterrezeptoren im Hoden exprimiert werden, sollte die Existenz der Tas2-Rezeptoren auf Proteinebene untersucht werden.

Bisher sind jedoch nur sehr wenige Antikörper kommerziell erhältlich, die gegen murine Bitterrezeptoren generiert wurden. Deswegen beschränkte sich der Proteinachweis der murinen Bitterrezeptoren auf den Tas2r138 Rezeptor, der im Hoden der Maus schwach exprimiert wird (s. Abbildung 4.16) und für den ein Antiserum der Firma Santa Cruz zur Verfügung stand.

Die Spezifität dieses Antikörpers wurde zunächst an Gewebe der Zunge und des Gastrointestinaltrakts geprüft, für das bereits eine Expression von Bitterrezeptoren beschrieben wurde [Rozengurt, 2006; Meyerhof et al., 2010; Janssen et al., 2011]. Dazu wurden Gefrierschnitte der Wallpapille und des Duodenums mit dem Antikörper inkubiert und die Bindung des Primärantikörpers durch FITC-gekoppelte anti-Kaninchen IgG visualisiert.

Abbildung 4.18 zeigt die Resultate dieser immunhistochemischen Ansätze: Weder in der Wallpapille [CV] noch im Duodenum war eine zelluläre Markierung durch den Antikörper zu detektieren. In der Wallpapille war zwar eine sehr schwache, diffuse Immunreaktivität im Epithel zu beobachten (Abbildung 4.18 [A] und [E]); die Sinneszellen der Knospe zeigten hingegen keine Fluoreszenzsignale (Abbildung 4.18 [A] und [E], weiße Umrandung). Auch im Dünndarm, für den in RT-PCR-Studien die Expression von Bitterrezeptoren mehrfach gezeigt werden konnte [Wu et al., 2002; Rozengurt und Sternini, 2007; Behrens und Meyerhof, 2011], war keine Immunfärbung einzelner Zellen, wie sie für Tas2r-assoziierte Signalmoleküle wie PLC β 2 und α -Gustducin beschrieben wurde [Hofer et al., 1996; Behrens und Meyerhof, 2011; Janssen et al., 2011], zu detektieren. Es waren lediglich einzelne stark fluoreszierende Partikel zu beobachten, die beim Mikroskopieren als dem Gewebe aufgelagert erschienen (Abbildung 4.18 [B-C] und [F-G], Pfeil).

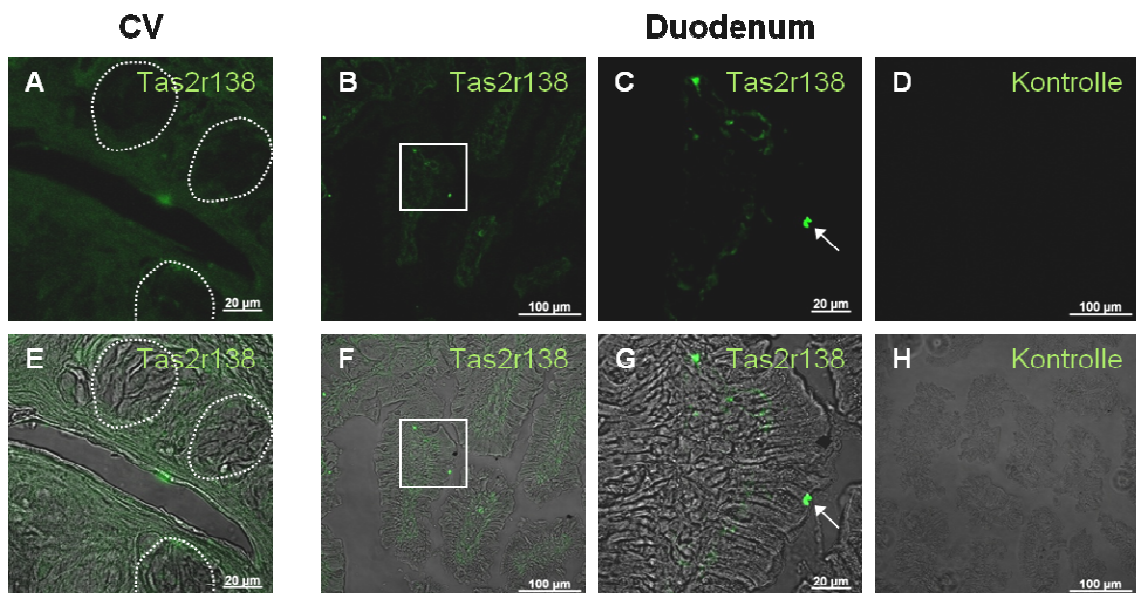


Abbildung 4.18: Immunhistochemische Analyse mit einem anti-Tas2r138 Antikörper.

Gefrierschnitte der Wallpapille [CV] [A, E] und des Dünndarms [Duodenum] [B - D, F - H] einer Maus wurden mit einem anti-Tas2r138 Antiserum inkubiert; anschließend wurde die Bindung des Primärantikörpers mit Hilfe FITC-gekoppelter anti-Kaninchen IgG (1:750 verdünnt, grün) visualisiert. Kontrollschnitts [Kontrolle] wurden nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Das Antiserum zeigt eine sehr schwache, diffuse Immunreaktivität im Zungengewebe, jedoch keine Markierung der Sinneszellen innerhalb der Geschmacksknospen, die zur Übersicht umrandet wurden [A, E]. Auch im Duodenum ist keine spezifische Immunmarkierung zu detektieren [B, F]. Es sind einzelne, dem Gewebe aufgelagerte stark fluoreszierende Partikel (Pfeil) zu erkennen [C, G], die wahrscheinlich unspezifische Ablagerungen des Primärantikörpers repräsentieren. In Kontrollansätzen ist keine Immunreaktivität auszumachen [D, H].

Dargestellt ist eine Aufnahme der FITC-Fluoreszenz [A - D, obere Bildreihe, grün] sowie eine Überlagerung des FITC-Signals mit der dazugehörigen Phasenkontrastaufnahme [E - H, untere Bildreihe]. [C] bzw. [G] stellen vergrößerte Ausschnitte des markierten Bereiches in [B] bzw. [F] dar.

Auch in parallel durchgeführten Western Blot Analysen mit Gewebeaufarbeitungen aus dem Duodenum der Maus (Daten nicht gezeigt) war mit dem Antikörper keine immunreaktive Bande mit der erwarteten molekularen Größe von 37 kDa zu detektieren.

Diese negativen Befunde machen deutlich, dass das Antiserum keine spezifische Immunreaktivität im Gewebe der Wallpapille und des Duodenums, die als Positivkontrollen verwendet wurden, aufwies und somit auch für eine Detektion des Tas2r138-Rezeptorproteins im Reproduktionsgewebe ungeeignet war.

4.3.3 Reproduktionsbiologische Charakterisierung einer Tas2r131 GFP Mauslinie

Da keine weiteren funktionstüchtigen Antikörper gegen murine Bitterrezeptoren zur Verfügung standen, war ein direkter immunologischer Proteinnachweis von Tas2-Rezeptoren in Mausgewebe nicht möglich. Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Meyerhof (Deutsches Institut für Ernährungsforschung [DIfE], Potsdam) ergab sich jedoch die Möglichkeit, die Expression und Funktion des Tas2r131 Rezeptors, für den im Hoden eine RT-PCR-Bande mit starker Intensität detektiert wurde (siehe Tabelle 4.3 und Abbildung 4.15), mit Hilfe eines genetisch veränderten Mausmodells zu charakterisieren.

Diese Mauslinie, die im Weiteren als Tas2r131 GFP bezeichnet wird, wurde generiert, indem die Tas2r131-kodierende Sequenz durch eine für das GFP-Protein (*green fluorescent protein*) kodierende Kassette ersetzt wurde (Abschnitt 3.6.2). Durch diese genetische Veränderung sind die Mäuse zum einen Tas2r131-defizient, zum anderen exprimieren die Tiere das Fluoreszenzprotein GFP unter der Kontrolle des Tas2r131-Promotors. Dies bedeutet, dass das leicht zu visualisierende grün fluoreszierende Protein in all jenen Zellen vorkommt, in denen der Tas2r131-Promotor aktiv ist. Die Tas2r131 GFP Mauslinie erlaubt es somit, sowohl die funktionellen Auswirkungen einer Rezeptor-Deletion im Tiermodell zu untersuchen als auch die Expression des Tas2r131 in extra-oralen Geweben [Behrens und Meyerhof, 2010] anhand der induzierten GFP-Fluoreszenz zu charakterisieren.

Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation des Fluoreszenzproteins ist allerdings zu berücksichtigen, dass im Gewebe das cytosolische Protein GFP anstatt des Rezeptors und nicht ein Tas2r131-GFP-Fusionsprotein exprimiert wird. Die subzelluläre Verteilung des GFPs ist somit von der physiologischen Lokalisation des ersetzten Rezeptors unabhängig und überwiegend auf das Cytoplasma konzentriert [Tsien, 1998; Tanudji et al., 2002]. Eine vergleichbare cytosolische Lokalisierung von ungekoppelten Fluoreszenzreporterproteinen wurde ebenfalls in analog generierten anderen Mausmodellen beobachtet, wie einer Tas1r3 GFP- und der TRPM5 GFP-Mauslinie, in denen ein Membranprotein durch GFP ersetzt wurde [Clapp et al., 2006].

4.3.3.1 Analyse der GFP Expression in Wallpapillen der Tas2r131 GFP Maus

Um zu prüfen, ob in den Tieren der Tas2r131 GFP-Mauslinie ausreichend GFP translatiert wird, um dieses nach Anregung mit Laserlicht (488 nm Wellenlänge) im Gewebe detektieren zu können, wurden zunächst histologische Untersuchungen an

Wallpapillen von homozygoten Tas2r131 GFP Ki (*Knockin*) Mäusen durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte zudem sichergestellt werden, dass die genetische Modifikation bei der Herstellung der Tas2r131 GFP Mauslinie nicht zu unvorhergesehenen Veränderungen in der Expression von Geschmacks-spezifischen Signalmolekülen führt und dass das Fluoreszenzprotein das typische zelluläre Expressionsmuster eines Bitterrezeptors zeigt.

Dazu wurden Gefrierschnitte der CV von Tieren der Tas2r131 GFP Mauslinie, deren Zellkerne zur besseren Orientierung mit dem Kernfarbstoff TO-PRO3 gefärbt wurden, auf ihre GFP-Fluoreszenz hin untersucht. Abbildung 4.19 macht deutlich, dass in den Geschmacksknospen einer Tas2r131 GFP Maus tatsächlich ein deutliches grünes Fluoreszenzsignal auszumachen war. Diese GFP-Fluoreszenz war in einzelnen Zellen innerhalb der Knospe zu registrieren, die die typische längliche Morphologie von Geschmackssinneszellen aufwiesen (Abbildung 4.19 E) und [F]) (s. auch Abbildung 4.1 [A]). Im Bindegewebe, das die Geschmacksknospen umgibt, und im nicht-sensorischen Epithel der Wallpapille war hingegen kein Fluoreszenzsignal zu detektieren. Bei detaillierter Betrachtung des GFP-Signals konnte zudem bestätigt werden, dass das Fluoreszenzprotein überwiegend cytosolisch lokalisiert war (Abbildung 4.19 [E] und [F]).

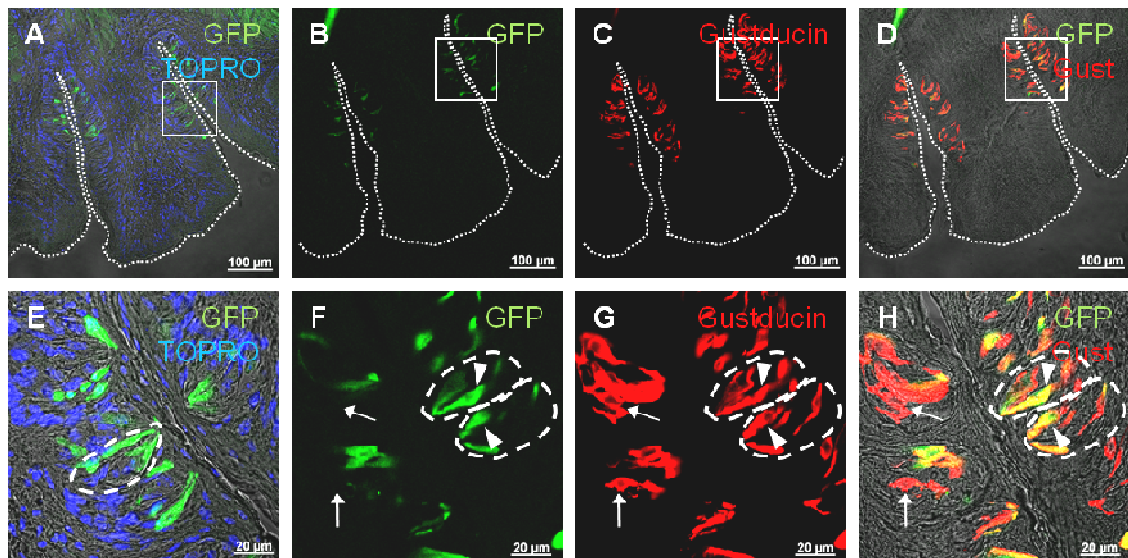


Abbildung 4.19: Analyse des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP in Wallpapillen.

CV-Gefrierschnitte einer homozygoten Tas2r131 GFP Reportermaus wurden mit dem Kernmarker TO-PRO3 ([*TOPRO*], blau dargestellt) bzw. mit einem anti- α -Gustducin Antiserum (Gustducin H 1:500) inkubiert, der durch Alexa-526-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:500 verdünnt, rot) nachgewiesen wurde. Nach spezifischer Laseranregung (488 nm) ist eine deutliche grüne Fluoreszenz des Tas2r131 Reporterproteins GFP in einzelnen Sinneszellen der Wallpapille zu detektieren [A, E]. Das GFP-Signal zeigt eine klare zelluläre Co-Lokalisation [D, H; gelb, Pfeilspitzen] mit α -Gustducin. Es sind allerdings auch einzelne Gustducin-positive Zellen zu erkennen, die keine GFP-Fluoreszenz aufweisen [B - D, F - H; Pfeile].

Gezeigt sind Überlagerungen der Fluoreszenzkanäle [A, E: TOPRO: blau; D, H: Alexa-546, rot] mit den Phasenkontrastaufnahmen bzw. nur die Fluoreszenzaufnahmen [B, C, F, G]. Die Boxen in [A - D] sind in den unteren Bildern [E - H] vergrößert dargestellt. Zur Orientierung wurden die Umrisse der Wallpapille [A - D] mit einer gepunkteten Linie umrandet und einzelne Geschmacksknospen [E - H] mit einer gestrichelten Linie hervorgehoben.

Um weiterhin zu prüfen, ob die GFP-positiven Zellen sich wie erwartet durch eine Expression der G Protein α -Untereinheit Gustducin auszeichnen, die an der Signaltransduktion von Tas2-Rezeptoren beteiligt ist [Wong et al., 1996; Ruiz-Avila et al., 2001], wurden CV-Gewebsschnitte von Tas2r131 GFP Tieren Co-Färbungen mit einem anti- α -Gustducin Antiserum (Gustducin H) unterzogen. Die Bindung des Antiserums wurde in diesen Ansätzen mit Hilfe eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 546, rot) visualisiert. Abbildung 4.19 [C] und [G] macht deutlich, dass diese Inkubation mit einem anti-Gustducin Antiserum zu einer roten Immunfärbung in einzelnen Geschmackssinneszellen führte, die vergleichbar zur Gustducin-Immunreaktivität in Wildtyp-Papillen war (s. Abbildung 4.8). Im Vergleich mit dem GFP-Fluoreszenzsignal (Abbildung 4.19 [B] und [F]) fiel auf, dass deutlich mehr Zellen immunopositiv für Gustducin waren als grün fluoreszierende Zellen registriert wurden. In Überlagerungen der beiden Einzel-Fluoreszenzkanäle (GFP [grün] und Gustducin [rot]) war in einzelnen Zellen der Geschmacksknospe eine Co-Lokalisation [gelb] dieser Markierungen auszumachen. Dabei war in allen Zellen mit GFP-Fluoreszenz auch eine α -Gustducin Immunfärbung zu detektieren (Abbildung 4.19 [F-H], Pfeilspitze). Der Umkehrschluss galt jedoch nicht: Nicht alle Gustducin-positiven Zellen zeigten auch eine GFP-Fluoreszenz (Abbildung 4.19 [F-H], Pfeile). Da Gustducin an der Signaltransduktion von Tas1- und Tas2-Rezeptoren des Geschmackssystems beteiligt ist und Tas1r-positive Geschmackssinneszellen keine Bitterrezeptoren exprimieren [Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2006], repräsentieren die Gustducin-positiven Zellen ohne GFP-Fluoreszenz wahrscheinlich Tas1r-exprimierende Sinneszellen (Abbildung 4.19 [F-H], Pfeile).

Da die beobachtete Verteilung des GFP-Signals in einzelnen spindelförmigen Sinneszellen, die Gustducin-positiv waren, dem typischen Expressionsmuster eines Bitterrezeptors entsprachen [Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2006; Tizzano et al., 2008], kann von einer spezifischen GFP-Expression durch eine Aktivierung des Tas2r131 Promotor ausgegangen werden. Die zum Wildtyp-Gewebe vergleichbare Gustducin-Immunreaktivität der in ihrer Gestalt normal erscheinenden Wallpapille der Tas2r131-GFP Mauslinie belegt außerdem, dass kein offensichtlicher negativer Einfluss der genetischen Manipulation auf die Proteinausstattung und auf die Morphologie der Sinneszellen vorliegt. Nach dieser Analyse der Expression von GFP in Geschmacksknospen der Tas2r131 GFP Tiere scheint die verwendete Mauslinie folglich sehr gut geeignet zu sein, um Tas2r131-exprimierende Zellen im Gewebe anhand ihrer grünen Fluoreszenz zu identifizieren.

4.3.3.2 Nachweis des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP im männlichen Reproduktionssystem

Vorangegangene Experimente haben gezeigt, dass der Tas2r131 Rezeptor u. a. aufgrund der starken Intensität seines RT-PCR-Produktes (Abbildung 4.15) als interessanter Kandidat für einen funktionell aktiven Bitterrezeptor in männlichen Keimzellen in Frage kommen könnte (siehe Abschnitt 4.3.1). Im nächsten Schritt sollte deshalb

geprüft werden, ob die Expression dieses Bitterrezeptors in Keimzellen mit Hilfe der Tas2r131 GFP Mauslinie bestätigt werden kann, und in welchen Stadien der Keimzellreifung (s. Abbildung 4.2 [A]) der Tas2r131 exprimiert wird.

Abbildung 4.20 zeigt die GFP-Fluoreszenz in Hoden-Gefrierschnitten einer adulten homozygoten Tas2r131 GFP Maus. Diese Schnitte wurden zur Visualisierung der Zellkerne mit dem DNA-Marker TO-PRO3 (blau dargestellt) gefärbt. Die mikroskopische Analyse dieser Gewebsschnitte machte deutlich, dass tatsächlich in allen angeschnittenen Hodentubuli ein GFP-Fluoreszenzsignal zu detektieren war (Abbildung 4.20 [A-D]). Betrachtete man die Verteilung des Fluoreszenzproteins innerhalb eines Samenkanälchens bei stärkerer Vergrößerung, so fiel auf, dass die Intensität des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Keimzellreifung zunahm: Während in den basal gelegenen Zellschichten kein GFP vorhanden war (Abbildung 4.20 [E]), zeigten späte Spermatozyten und Spermatoiden eine deutliche grüne Färbung, die in den luminalen Zellschichten der elongierten Spermatoiden am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 4.20 [I]).

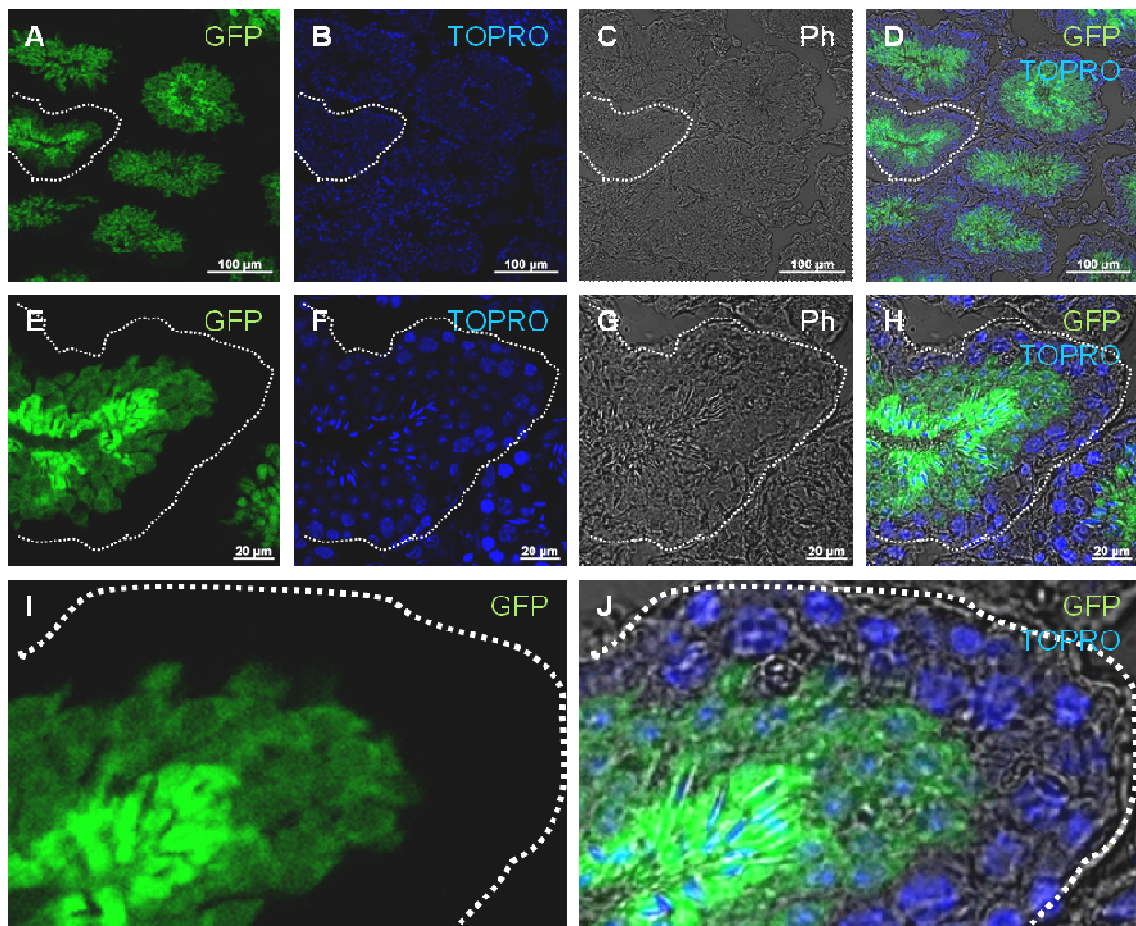


Abbildung 4.20: Lokalisation des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP im Maushoden.

Gefrierschnitte des Hodens einer Tas2r131 GFP Maus wurden mit TO-PRO-3 ([*TOPRO*], blau dargestellt) inkubiert, um die Zellkerne sichtbar zu machen, und anschließend auf das Fluoreszenzmuster des Tas2r131 Reporterproteins GFP [*GFP*] hin untersucht.

In allen angeschnittenen Hodenkanälchen ist eine deutliche GFP-Fluoreszenz nach spezifischer Anregung mit einem Laser (488 nm) zu erkennen [A, D]. In den basal gelegenen Keimzellschichten ist kein GFP sichtbar; die Expression des Fluoreszenzproteins beginnt erst in späten Spermatocyten/frühen Spermatiden und ist in den reifen, elongierten Spermatiden des Tubuluslumens am stärksten ausgeprägt [I, J].

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz [A, E, I; grün], der TO-PRO-3 Fluoreszenz [B, F; blau], eine Phasenkontrastaufnahme [Ph] [C, G] sowie eine Überlagerung dieser Aufnahmen [D, H, J]. Der exemplarisch umrandete *Tubulus seminiferus* aus [A - D] ist in [E - J] vergrößert gezeigt.

Diese GFP-Fluoreszenz deutete auf eine hohe Aktivität des Tas2r131-Promotors im Hoden hin und lieferte damit weitere Hinweise für die Expression dieses Bitterrezeptors im Keimdrüsengewebe. Die Zunahme des GFP-Signals während der Spermatogenese ist zudem ein Indiz dafür, dass der Rezeptor in den späten Keimzellstadien besonders stark exprimiert wird. Diese späte Expression ist besonders interessant, weil in reifen Spermien Transkription und Translation fast vollständig zum Erliegen kommen [Vogt, 2004], so dass praktisch die gesamte Proteinbiosynthese einer Spermienzelle bereits während der Keimzellreifung erfolgt. Die Konzentrierung der Tas2r131-Expression in späten Stadien der Keimzellentwicklung könnte deshalb darauf hindeuten, dass der Rezeptor auch in reifen Spermien als funktionelles Protein vorliegt.

Nach Abschluss der Spermiogenese gelangen die ausdifferenzierten Spermien in den Nebenhoden, in welchem wichtige Reifungsschritte der Zellen erfolgen [Yeung et al., 1993; Robaire et al., 2002; Cornwall, 2009]. Um die Fluoreszenz des Tas2r131-Expressionsmarkers GFP im Verlauf der weiteren Spermienreifung zu verfolgen, wurden deshalb Schnitte des Nebenhodens auf ihre GFP-Fluoreszenz hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse, die in Abbildung 4.21 zusammengefasst sind, machen deutlich, dass sowohl im Nebenhodenkopf ([*Caput*] [A] und [B]), der unreife Spermienpopulationen enthält als auch im caudalen Teil [C] und [D], in dem die reifen Spermien gespeichert werden (s. Abbildung 4.3), GFP-Signale auszumachen waren. Das Fluoreszenzprotein war in beiden untersuchten Abschnitten des Nebenhodens auf das Tubuluslumen, in dem die Spermien gespeichert werden, beschränkt (Abbildung 4.21 [E] und [G]). Interessanterweise war das Fluoreszenzprotein nicht gleichmäßig in den Spermien verteilt, sondern in kugelförmigen Ansammlungen konzentriert, die eine ähnliche Größe wie die Spermienkern aufwiesen, jedoch nicht mit der Zellkernmarkierung überlappten (Abbildung 4.21 [J] und [K], Pfeilspitzen). Diese Anhäufung von GFP in speziellen Strukturen zeigte deutliche Unterschiede zu der bei einem cytosolischen Protein zu erwartenden gleichmäßigen Verteilung innerhalb der Zellen (siehe auch Abbildung 4.19).

Da das GFP, welches unter Kontrolle des Tas2r131-Promotors artifiziell exprimiert wird, unter normalen Bedingungen nicht im Spermium vorkommen würde, hat es höchstwahrscheinlich keinerlei physiologische Funktion in der Spermienzelle. Proteine, die vom Spermium nicht mehr benötigt werden oder die nicht funktionell sind, werden während der Spermienreifung in Form von Residualkörpern beim Ablösen vom Keim-epithel [Breucker et al., 1985] und als *Cytoplasmic Droplets* während der Passage durch den Nebenhoden [Cooper, 2011] aus den Zellen entfernt. Die Anreicherung des GFPs in

rundlichen Strukturen könnte demnach ein Hinweis auf eine Auslagerung des nicht-funktionellen, „überflüssigen“ Fluoreszenzproteins aus den Spermien sein.

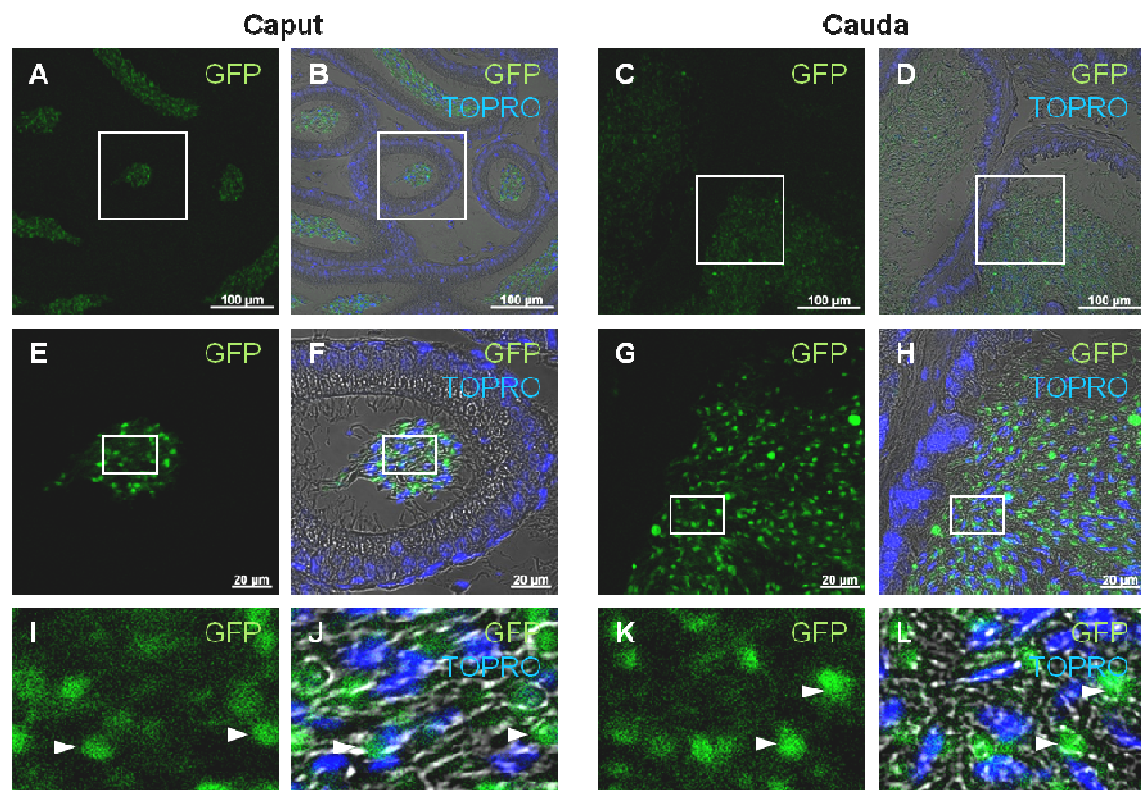


Abbildung 4.21: Analyse der GFP-Lokalisation in verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens einer Tas2r131 GFP Reportermaus.

Gefrierschnitte des Caputs [*Caput*] und der Cauda [*Cauda*] des Nebenhodens einer Tas2r131 GFP Ki Maus wurden mit TO-PRO-3 [*TOPRO*], blau) inkubiert, um die Zellkerne sichtbar zu machen.

Die Fluoreszenz des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP ist sowohl im Caput als auch in der Cauda im Lumen der Nebenhodengänge, in denen sich die reifenden Spermien befinden, zu detektieren [A, B; C, D; grüne Färbung]. Die GFP-Fluoreszenz [GFP] ist überwiegend in rundlichen, vesikulären Strukturen lokalisiert, die nicht mit den Zellkernen [TOPRO] co-lokalisiert sind [I - L, Pfeilspitzen]. Neben dieser, wahrscheinlich in *cytoplasmic droplets* konzentrierten GFP-Markierung, ist auch eine sehr schwache, diffuse GFP-Fluoreszenz im gesamten Lumen zu erkennen [I, K].

Gezeigt sind Einzelaufnahmen [A, C, E, G, I, K] des grünen Fluoreszenzkanals [GFP] sowie eine Überlagerung [GFP + TOPRO] der Fluoreszenzkanäle mit der jeweiligen Phasenkontrastaufnahme [Ph] [B, D, F, H, J, L].

Um zu prüfen, ob in reifen Spermien noch residuales GFP nachzuweisen ist, wurden in weiteren experimentellen Ansätzen isolierte Spermien von Tas2r131 GFP Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In den Spermien von Wildtyp-Mäusen (Tas2r131 [+/+]) der Tas2r131 GFP Mauslinie war erwartungsgemäß keine GFP-Fluoreszenz auszumachen (Abbildung 4.22 [A] und [D]). Beim Vergleich der Morphologie der heterozygoten (Tas2r131 [+/-]) und homozygoten (Tas2r131 [-/-]) mit Wildtyp-Spermien wurde deutlich, dass sowohl das Flagellum als auch der Spermienkopf der Tas2r131-defizienten Spermien normal geformt waren (Abbildung 4.22 [B] und [C]) und keine offensichtlichen morphologischen Defekte zu detektieren waren. Dieser Eindruck konnte durch parallel durchgeführte Färbungen mit

dem Akrosommarker PNA (siehe auch Abschnitt 4.1.3, Abbildung 4.6) bestätigt werden, in denen für alle drei Genotypen eine vergleichbare sichelförmige Morphologie des Akrosoms beobachtet wurde (Abbildung 4.22 [G-I]).

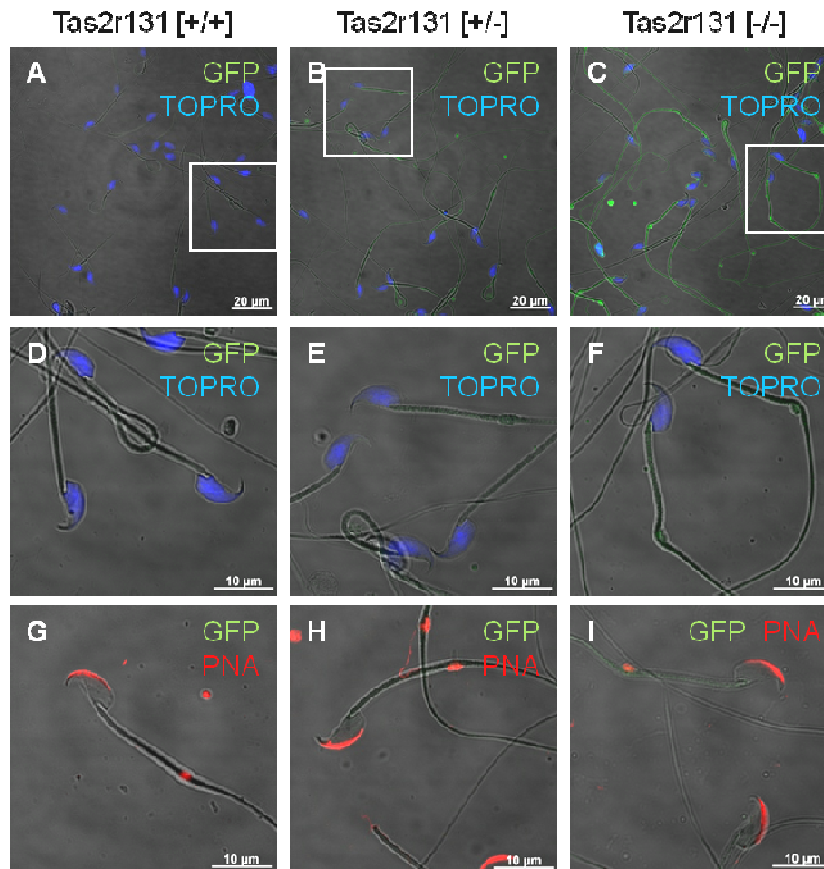


Abbildung 4.22: Nachweis von GFP in isolierten Spermien von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tas2r131 GFP Reportermäusen.

Aus dem Nebenhoden von Tas2r131 Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten adulten Mäusen (Stammhintergrund N2) wurden Spermien isoliert, mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend mit TO-PRO3 ([*TOPRO*], blau) oder mit TRITC-gekoppeltem PNA ([*PNA*], rot) inkubiert.

Während in Tas2r131 Wildtyp-Spermien [*Tas2r131* *+/+*] keine GFP-Fluoreszenz zu erkennen ist [A, D, G], zeigen heterozygote Spermien [*Tas2r131* *+/-*] ein schwaches GFP-Signal [B, E], das bei Spermien homozygoter Tas2r131 GFP Tiere [*Tas2r131* *-/-*] deutlich stärker ausgeprägt ist [C, F]. Die Fluoreszenz ist dabei über den ganzen Schwanz verteilt und zeigt eine leichte Anreicherung in den *Cytoplasmic Droplets* [C, F]. In der Morphologie der Spermien, der Form des Spermienkopfes [*TOPRO*] und in der sichelförmigen Färbung des Akrosoms durch PNA [*PNA*] ist kein Unterschied zwischen den Spermien der drei Genotypen zu erkennen.

Gezeigt ist eine Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (grün: GFP; [A - F] blau: TOPRO), [G - I] rot: PNA) mit der Phasenkontrastaufnahme. Die in [A - C] markierten Bereiche sind in [D - F] vergrößert dargestellt. Die Co-Färbungen sind jeweils im Bild oben rechts angegeben.

Bei der Analyse der GFP-Fluoreszenz, die durch Anregung mit einem 488 nm Laser entstand, wurde ebenfalls deutlich, dass Tas2r131 GFP heterozygote und homozygote Tas2r131 GFP Spermien im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen eine grüne Fluoreszenzmarkierung aufwiesen: Während das GFP-Signal in den Spermatozoen von heterozygoten Tieren nur sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 4.22 [B] und [E]), zeigten die Spermien von Tas2r131 GFP Ki Mäusen eine etwas stärkere GFP-Fluoreszenz, die

überwiegend diffus über im gesamten Flagellum verteilt war (Abbildung 4.22 [C] und [F]); in einzelnen Spermien konnte auch eine leichte Anreicherung im Bereich des *Cytoplasmic Droplet* beobachtet werden (Abbildung 4.22 [C]).

Da das GFP jedoch unabhängig von der physiologischen Rezeptorverteilung überwiegend cytosolisch vorliegt, konnte dieses Fluoreszenzmuster keine Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation des Bitterrezeptors geben.

4.3.4 Funktionelle Analyse des reproduktionsbiologischen Phänotyps männlicher Tas2r131 GFP Mäuse

Nachdem die histologischen Untersuchungen des männlichen Keimdrüsengewebes der Tas2r131 GFP Mauslinie die Vermutung bestätigen konnten, dass dieser Rezeptor in Keimzellen exprimiert wird, stellte sich im Folgenden die Frage, welche physiologische Funktion das Rezeptorprotein im Hoden und in reifen Spermien erfüllen könnte.

Da es sich bei den Tas2r131 GFP Mäusen nicht um eine reine Reportermauslinie handelt, sondern das Fluoreszenzprotein GFP anstatt des Tas2r131 exprimiert wird, wurde diese Mauslinie genutzt, um funktionelle Effekte der Gen- und damit Protein-Defizienz dieses Bitterrezeptors *in vivo* zu analysieren. Um die physiologische Rolle des Tas2r131 Proteins in männlichen Keimzellen besser verstehen zu können, wurde experimentell geprüft, welche Auswirkungen das Fehlen des Tas2r131 auf die Fertilität männlicher Mäuse und auf die Funktion männlicher Keimzellen hatte. Im Rahmen dieser phänotypischen Studien wurden Wildtyp- (Tas2r131 [+/+]), heterozygote (Tas2r131 [+/-]) und homozygote (Tas2r131 [-/-]) Tiere der Tas2r131 GFP Mauslinie verwendet; die Tas2r131-defizienten Mäuse werden aufgrund der anstelle des Tas2r131 ins Genom eingebrachten GFP-Sequenz im Folgenden auch als *Knockin* (Ki)-Mäuse bezeichnet.

4.3.4.1 Histologische Analyse der männlichen Reproduktionsorgane Tas2r131-defizienter Mäuse

Die allgemeine Analyse des Tas2r131 GFP Ki Phänotyps zeigte zunächst keine gravierenden Unterschiede zu Wildtyp-Tieren der Mauslinie: Die Tas2r131 Gen-defizienten Tiere waren lebensfähig, erschienen gesund, waren in der Lage Nachkommen zu zeugen und zeigten keine offensichtlichen anatomische Fehlbildungen oder Verhaltensauffälligkeiten. Bei der Präparation männlicher Geschlechtsorgane der Tas2r131-defizienten Mäuse waren zudem keine makroskopischen Unterschiede in der Form und Lage von Hoden, Nebenhoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen im Vergleich zum Wildtyp zu detektieren.

Um zu prüfen, ob sich das Fehlen des Tas2r131 Rezeptors auf die zelluläre Organisation und Struktur der männlichen Reproduktionsorgane auswirkt und möglicherweise die Spermatogenese beeinträchtigen könnte, wurden Hoden und Nebenhoden von Tas2r131-defizienten Tieren histologisch untersucht. Zur Darstellung der Hodenmorphologie wurden die Organe von 12 - 24 Wochen alten Tieren mit einer

Bouin-Lösung fixiert, um die Integrität des Gewebes möglichst vollständig zu erhalten und Fixierungsartefakte zu vermeiden, und in Paraffin eingebettet (siehe Abschnitt 3.4.1.3). Das eingebettete Gewebe wurde anschließend 3 µm dick geschnitten und nach einer Rehydrierung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Diese HE-Färbung (Hämatoxylin/Eosin) repräsentiert eine klassische histologische Färbemethode, um morphologische Mängel erkennen und analysieren zu können [Lillie et al., 1976]. Dabei färbt Hämatoxylin saure Strukturen, wie die DNA-reichen Zellkerne blau, und Eosin das überwiegend basische Cytoplasma rötlich, so dass diese mikroskopisch gut zu unterscheiden sind und die Gewebsstruktur beurteilt werden kann [Lillie et al., 1976].

In Abbildung 4.23 [A] ist eine solche HE-Färbung eines Hodenschnitts eines Wildtyp-Tieres exemplarisch gezeigt. Im Querschnitt sind die einzelnen Samenkanälchen, aus denen der Hoden zusammengesetzt ist (siehe auch Abbildung 4.2), angeschnitten. Die *Tubuli seminiferi* liegen dicht nebeneinander, im Bindegewebe zwischen ihnen sind Leydig Zellen vorhanden (Abbildung 4.23 [A]). Das Keimepithel in den Tubuli ist durch kompakte Keimzellschichten mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien aufgebaut. Entsprechend der von basal nach luminal hierarchisch verlaufenden Keimzellreifung sind in der Mitte der Tubuli elongierte Spermatiden zu finden, während Spermatocyten und Spermatogonien weiter basal lokalisiert sind (Abbildung 4.23 [A]). Diese konzentrische Organisation des Keimepithels war auch im Hoden von Tas2r131-defizienten Tieren zu beobachten. Im Querschnitt des HE-gefärbten Hodenpräparats des Tas2r131 GFP Ki Tieres sind Tubuli mit einem kompakten Keimepithel, das alle Stadien der Spermatogenese aufweist, zu erkennen (Abbildung 4.23 [B]). Die Verteilung der verschiedenen Keimzellen innerhalb der quer angeschnittenen Samenkanälchen entspricht ganz überwiegend der typischen hierarchischen Organisation der verschiedenen Reifungsstadien. Nur in einem der gezeigten Tubuli waren einzelne der ansonsten auf basale Schichten beschränkte Spermatocyten zu detektieren, die im Lumen eines Samenkanälchens vorlagen (Abbildung 4.23 [B], Pfeilspitze). Bis auf diese vereinzelt auftretenden miss-lokalisierten Zellen konnten jedoch keine morphologischen Defekte beobachtet werden, was auf einen ungestörten Verlauf der Spermatogenese und damit eine normale Spermatozoenbildung in den Tas2r131-defizienten Tieren hindeutet.

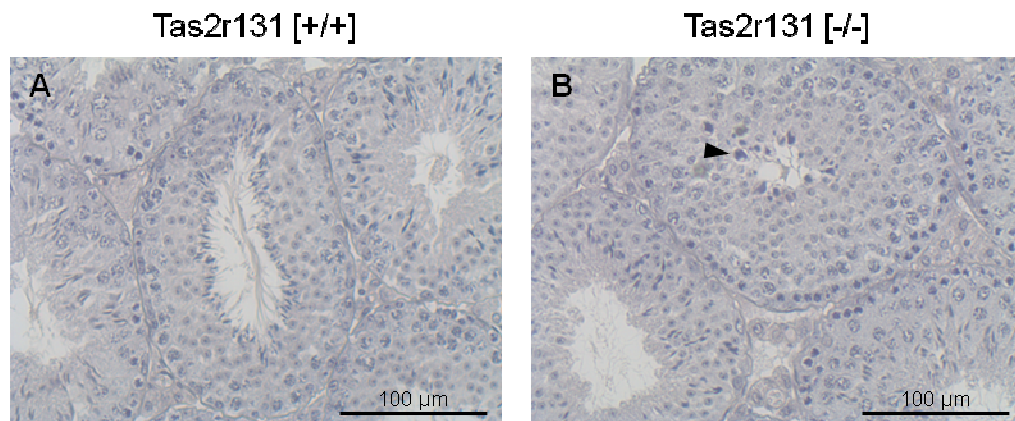


Abbildung 4.23: Morphologie des Hodens von Tas2r131-defizienten Mäusen.

Bouin-fixierte Hodenschnitte von Wildtyp [*Tas2r131* *+/+*] und Tas2r131-defizienten [*Tas2r131* *-/-*] Geschwistertieren (N2) wurden einer HE-Färbung unterzogen, um die Hodenmorphologie darzustellen. Die Hodenarchitektur von Tas2r131-defizienten Tieren [B] zeigt keine gravierenden Unterschiede zu Wildtyp-Tieren [A]. Sehr vereinzelt kommt es zu miss-lokalisierten Zellen im Tubuluslumen der Tas2r131-defizienten Tiere [B, Pfeilspitze].

Nach Abschluss der Spermiogenese und der Freisetzung ins Lumen der *Tubuli seminiferi* gelangen Spermien in den Nebenhoden, bei einer normalen Spermatogenese der Tas2r131 GFP Ki Mäuse sollte deshalb in diesem Reifungsorgan eine Vielzahl von Spermien zu finden sein, die vom *Caput* über den *Corpus* zur *Cauda* transportiert werden.

Um sicherzustellen, dass die Tas2r131-defizienten Mäuse ausreichend Spermien produzieren und um zu prüfen, ob der Tas2r131-Mangel zu pathologischen Veränderungen des Nebenhodens führen könnte, wurden histologische Untersuchungen an Paraffinschnitten verschiedener Abschnitte des Nebenhodens von C57BL/6-Wildtyp- und Tas2r131 GFP Ki Mäusen durchgeführt. Dazu wurde die Gewebemorphologie des Nebenhodenkopfes [*Caput*] und des Nebenhodenschwanzes [*Cauda*] mit Hilfe einer HE-Färbung dargestellt (Abbildung 4.24). Die Analyse des Nebenhodens der Wildtyp-Maus zeigte rundliche Querschnitte der Nebenhodengänge, die von lockerem Bindegewebe umgeben waren (Abbildung 4.24 [A] und [E]). Die Tubuli, in deren Lumen die Spermien modifiziert und transportiert werden, waren mit einschichtigem Epithel ausgekleidet (Abbildung 4.24 [C] und [G]). Während der Durchmesser des Nebenhodengangs im *Caput* noch relativ klein war und im Lumen einzelne Spermien zu erkennen waren (Abbildung 4.24 [C]), wurde er im Verlauf der Nebenhodenpassage deutlich größer und die Spermien wurden zur Speicherung immer enger konzentriert (Abbildung 4.24 [G], [*Cauda*]).

In den histologischen Schnitten des Nebenhodens der Tas2r131 GFP Ki Tiere war kein gravierender morphologischer Unterschied zum Wildtyp-Gewebe erkennbar. Der Querschnitt durch den Nebenhodenkopf zeigt eine Vielzahl einzelner Tubuli; insgesamt erschien das Gewebe in diesem Schnitt etwas weniger kompakt, was jedoch wahrscheinlich durch eine leicht veränderte Schnittebene und milde Fixierungsartefakte zu erklären ist. Im Lumen der Tubuli waren, vergleichbar zum Wildtyp, auch bei den

Tas2r131-defizienten Männchen viele Spermien auszumachen, die in den distalen Abschnitten des Nebenhodens immer dichter gedrängt erschienen (Abbildung 4.24 [F], [H]).

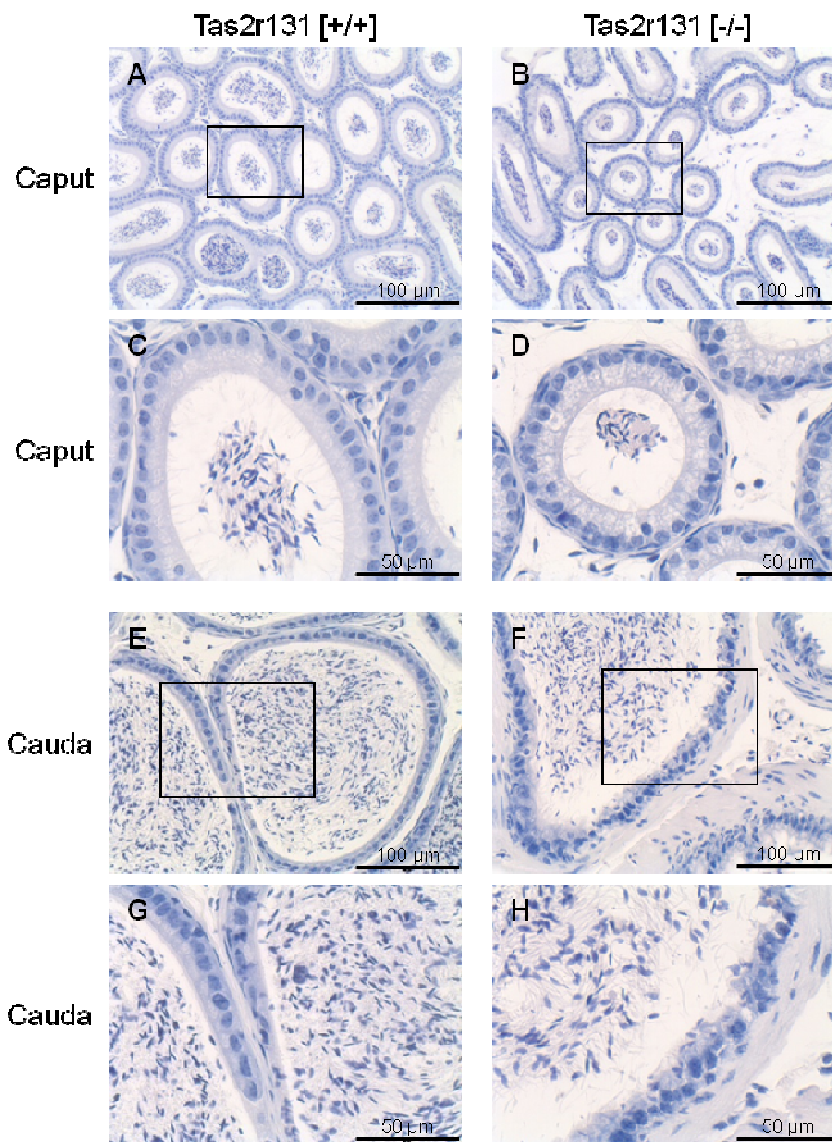


Abbildung 4.24: HE-Färbung des Nebenhodens von Wildtyp-Mäusen und Tas2r131 GFP Reporter-mäusen.

Paraffin-Schnitte des Nebenhodens von C57BL/6 Wildtyp- [*Tas2r131* *+/+*] und homozygoten Tas2r131 GFP Mäusen (N1) [*Tas2r131* *-/-*] wurden mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt und die Gewebsarchitektur lichtmikroskopisch untersucht.

Der strukturelle Aufbau des Nebenhodens von Wildtyp- und Tas2r131-defizienten Mäusen weist weder im Caput [*Caput*] noch in der Cauda [*Cauda*] offensichtliche Unterschiede auf. In beiden Genotypen ist das Nebenhodenepithel normal aufgebaut und die im Lumen des Nebhodenganges gelegenen Spermien zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten.

Die Boxen in [A, B] und [E, F] sind in [C, D] bzw. [G, H] vergrößert dargestellt.

Durch die bisherigen Befunde konnte sichergestellt werden, dass die männlichen Reproduktionsorgane Tas2r131-defizienter Tiere morphologisch unauffällig sind und dass Tas2r131 GFP Ki Männchen erfolgreich Spermien bilden können. Da die starke GFP-

Markierung in den späten Stadien der Spermatogenese der Tas2r131 GFP Tiere darauf hindeutet, dass das Bitterrezeptor-Protein auch in reifen Spermien präsent sein könnte, wurde im Weiteren untersucht, ob und inwieweit sich die Tas2r131 Gen-Defizienz auf die Funktion der gebildeten Keimzellen auswirkt.

Dazu wurde zunächst die Morphologie der Spermatozoen näher begutachtet, um mögliche Funktionsbeeinträchtigungen durch Entwicklungsdefekte oder Malformationen aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens von adulten Männchen isoliert, fixiert und mit einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Durch das Coomassie G250 in der Färbelösung werden die Proteine des Spermiums blau angefärbt. So wird zum einen die Silhouette der Zellen lichtmikroskopisch gut sichtbar gemacht, zum anderen kann das sehr proteindichte Akrosom durch seine tiefblaue Färbung identifiziert werden. Abbildung 4.25 [A - D] zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer solchen Coomassie-Färbung an Tas2r131 [+/+] und [-/-] Spermien. Bei beiden Genotypen war eine klare Kompartimentierung der Zellen in Kopf und Schwanz zu erkennen (Abbildung 4.25 [A - B]). Beide Spermienpopulationen zeigten die für Mauspermien typische gebogene Kopfform (siehe auch Abbildung 4.5) und ein normal ausgebildetes Flagellum. Auch in der dunkelblauen Färbung des sichelförmigen Akrosoms (Abbildung 4.25 [C und D]) war kein Unterschied zwischen beiden Genotypen zu detektieren, ein Befund, der die Resultate der zuvor gezeigten PNA-Färbung (Abbildung 4.22) bestätigte.

Um auch eventuell geringe Unterschiede in der Kopfform der Spermien registrieren zu können, wurden morphometrische Analysen am Kopf der gefärbten Zellen durchgeführt. Dafür wurden in den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Spermien zwei Längenparameter, sowie Umfang und Fläche des Spermienkopfes (zur Übersicht siehe Abbildung 4.25 [F]) bei Tas2r131 GFP Ki Tieren bestimmt und mit den morphometrischen Parametern der Spermien von Wildtyp-Tieren verglichen. Wie Abbildung 4.25 [E] verdeutlicht, war in diesen Analysen an 5 Tieren pro Genotyp weder ein signifikanter Unterschied in der Länge des Spermienkopfes ([I]), im Abstand zwischen Beginn und Ende des sichelförmigen Akrosoms ([II]), noch im Umfang ([III]) oder der Fläche ([IV]) des Kopfes zu detektieren.

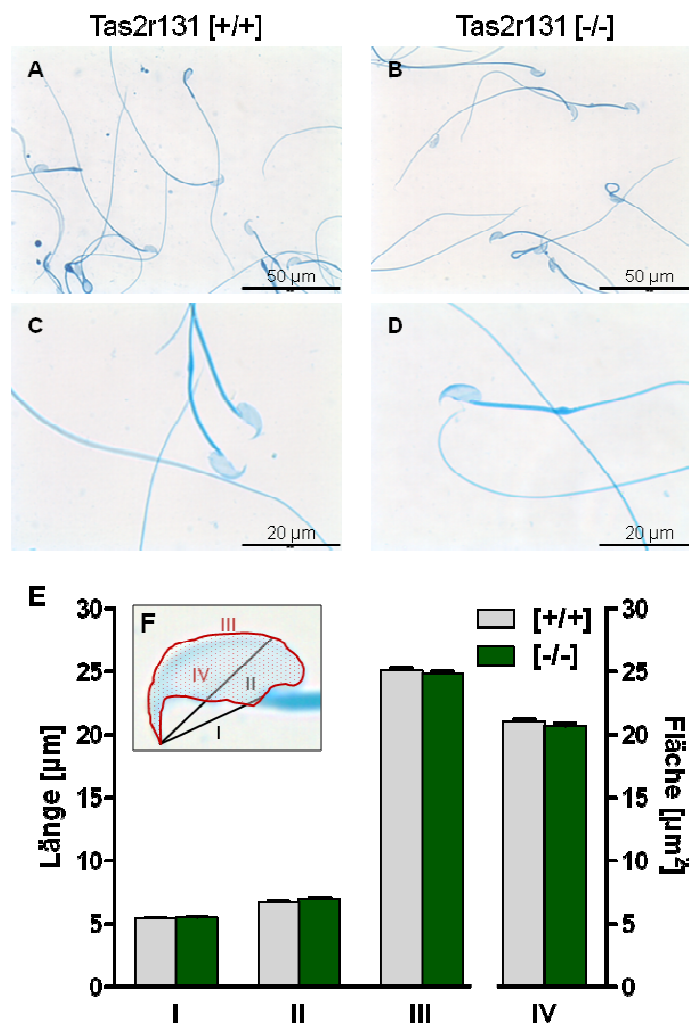


Abbildung 4.25: Analyse der Morphologie der Spermien von Wildtyp- und Tas2r131-defizienten Tieren.

[A - D] Exemplarische Coomassie-Färbung von Wildtyp- und Tas2r131 [-/-] Spermien.

Isolierte caudale Spermien von C57BL/6 Wildtyp-Tieren [*Tas2r131* +/+] und homozygoten Tas2r131 GFP Tieren (N1) [*Tas2r131* -/-] wurden fixiert und mit Coomassie gefärbt. Die Morphologie von Tas2r131-defizienten Spermien [B, D] weist keine Unterschiede zu Wildtyp-Spermien [A, C] auf; Flagellum, Kopf und das sichelförmige Akrosom [C, D] sind normal ausgebildet.

[E - F] Morphometrische Analyse des Kopfes von Tas2r131-defizienten Spermien.

In [E] dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der bestimmten morphometrischen Längen-, Umfangs- und Flächenparameter [I-IV] von jeweils 5 Tieren pro Genotyp (WT: C57BL/6, Tas2r131 [-/-]: N1); insgesamt wurden 60 - 64 Zellen vermessen. [F] zeigt eine Übersicht über die ermittelten Parameter (siehe auch Abschnitt 3.4.2).

Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps der männlichen Reproduktionsorgane der Tas2r131 GFP Mauslinie wurde das Hodengewicht sowie die Anzahl reifer Spermien im caudalen Teil des Nebenhodens von adulten Tas2r131 Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen mit gleichem Stammhintergrund (75-98 % C57BL/6) bestimmt. Dazu wurde nach zervikaler Dislokation der Tiere zunächst das Körpergewicht ermittelt und die Hoden frei präpariert und gewogen. Anschließend wurde der caudale Teil des Nebenhodens entnommen, in HS Puffer überführt und mehrfach eingeschnitten um ein Ausschwimmen der Spermien aus dem Nebenhodengang zu ermöglichen. Um zu

gewährleisten, dass möglichst wenige Keimzellen im Gewebe zurück blieben, wurden die Spermien zusätzlich aus dem eingeschnittenen Nebenhoden herausgedrückt; der Erfolg dieser Prozedur wurde unter einem Binokular optisch kontrolliert. Die isolierten Spermien wurden dann mit Wasser verdünnt und ihre Gesamtzahl bestimmt.

Abbildung 4.26 zeigt die Befunde der Gewichtsbestimmung und Spermienzählung von mindestens 16 Tieren pro Genotyp. Im Körpergewicht, das durchschnittlich bei 32 - 34 g (Abbildung 4.26 [A]) lag, und auch beim Hodengewicht, das im Mittel 179 - 197 mg betrug, war kein signifikanter Unterschied zwischen Männchen der drei Genotypen auszumachen. In der Anzahl reifer Spermien zeigen sich hingegen deutliche Unterschiede zwischen den Männchen der drei Tas2r131 GFP Genotypen. So wiesen Tas2r131 GFP Ki Mäuse eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Zahl caudaler Spermien auf als vergleichbare Wildtyp-Tiere oder als entsprechende heterozygote Tiere. Die durchschnittliche Spermienzahl der Gen-defizienten Tiere war mit 42 ± 3 Mio Zellen um ca. 50 % höher als bei Wildtyp-Tieren (30 ± 3 Mio) (Abbildung 4.26 [C]).

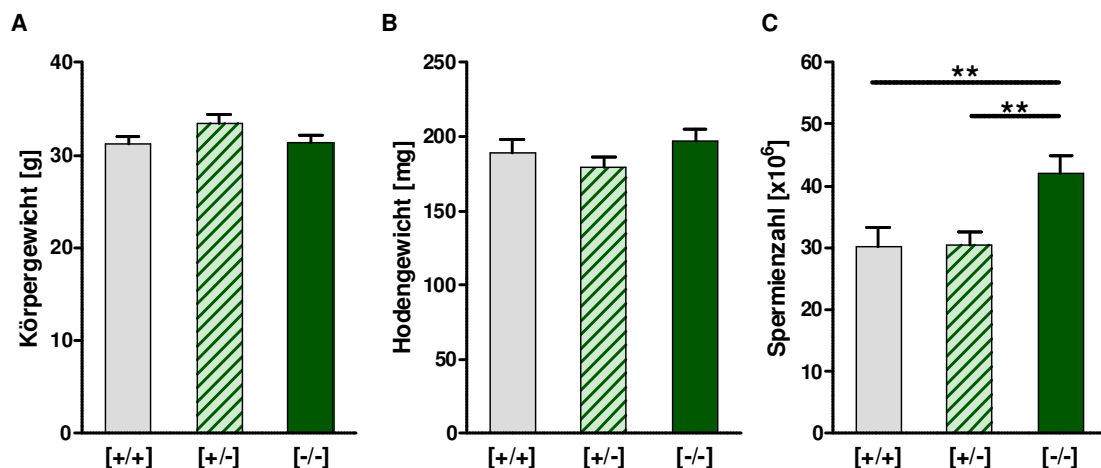


Abbildung 4.26: Auswirkungen der Tas2r131-Defizienz auf das Körpergewicht und die Reproduktionsorgane männlicher Mäuse.

Bei adulten männlichen Mäusen (N2, N3, N5) mit unterschiedlichem Tas2r131 Genotyp wurde das Körpergewicht [A] und das Gewicht beider Hoden [B, Hodengewicht] sowie die Zahl der Spermien im caudalen Teil des Nebenhodens [C] ermittelt.

Das Körpergewicht der Tiere [A] ist wie das Hodengewicht [B] nicht durch den Genotyp beeinflusst. Die Zahl reifer Spermien im Nebenhoden ist in Tas2r131-defizienten [-/-, dunkelgrün] Tieren im Vergleich zu heterozygoten [+/-, grün gestreift] und Wildtyp-Mäusen [+/+, grau] signifikant erhöht [C, **].

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Messwerte von mindestens 16 Tieren pro Genotyp mit gleichem Stammhintergrund. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen studentischen t-Test (**: $p < 0,01$).

4.3.4.2 Untersuchung der Fertilität von Tieren der Tas2r131 GFP Mauslinie

Die beobachtete stark erhöhte Spermienzahl der Tas2r131 GFP Ki Tiere im Tierstall des Walther-Straub-Instituts in München warf die Frage auf, ob sich diese Veränderung auch auf den reproduktiven Erfolg der Tas2r131 GFP Ki Männchen auswirkt, so dass diese möglicherweise effektiver Nachkommen zeugen könnten. Falls der Tas2r131 hingegen eine essentielle physiologische Rolle in Spermien erfüllt, könnte sich die

Tas2r131-Defizienz auch negativ auf die Fruchtbarkeit der *Knockin*-Männchen auswirken.

Zur Klärung der Fertilität Tas2r131-defizienter Tiere wurde deshalb der Zuchterfolg von Tas2r131 [-/-] Tieren mit dem von heterozygoten und Wildtyp-Zuchtpaaren in einem kontinuierlichen monogamen Verpaarungsansatz anhand der durchschnittlichen Wurfgröße und der Zeit, die zur erfolgreichen Reproduktion nötig war, verglichen (siehe auch 4.2.1.2). Die in Tabelle 4.4 dargestellten Ergebnisse dieser Zuchtanalyse zeigen, dass Tas2r131 [+/+], [+/-] und [-/-] Zuchtpaare keine signifikanten Unterschiede in der Zeit zwischen den Würfen, der benötigten Zeit bis zum ersten Wurf oder in der mittleren Zahl von Nachkommen pro Wurf aufwiesen. Auch in der Geschlechtsverteilung der geborenen Jungtiere war keine Veränderung bei Tas2r131-defizienten Tiere zu erkennen, so dass unter diesen Zuchtbedingungen kein Einfluss des Genotyps auf die Fertilität festzustellen war.

Tabelle 4.4: Fertilität von Tas2r131-defizienten Mäusen

Zur Analyse des Reproduktionserfolgs von Tas2r131-defizienten Mäusen wurden C57BL/6, Tas2r131 heterozygote (Stammhintergrund N2 und N3; 75 - 87,5 % C57BL/6) und Tas2r131 homozygote (Stammhintergrund N1; 50 % C57BL/6) Zuchtpaare in einem monogamen, kontinuierlichen Zuchtsystem gehalten und die unten aufgeführten Fertilitätsparameter für jedes Zuchtpaar bestimmt. Die Anzahl der jeweils analysierten Zuchtpaare ist in Klammern (n = x) angegeben. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt.

Fertilitätsparameter	Tas2r131 Genotyp		
	[+/+] x [+/+]	[+/-] x [+/-]	[-/-] x [-/-]
Zeit zwischen den Würfen [d]	31,5 ± 1,7 (n = 49)	33,1 ± 1,7 (n = 57)	33,6 ± 3,3 (n = 25)
Zeit bis zum ersten Wurf [d]	26,1 ± 2,1 (n = 16)	22,5 ± 1,7 (n = 12)	30,8 ± 7,5 (n = 8)
Anzahl Nachkommen / Wurf	6,2 ± 0,5 (n = 52)	6,8 ± 0,5 (n = 57)	6,3 ± 0,6 (n = 26)
Geschlecht m / f [%]	53 / 47	51 / 49	56 / 44

Die durchgeführten Verpaarungsansätze zeigen, dass Tas2r131 GFP Ki Mäuse genauso erfolgreich Nachkommen produzieren wie Wildtyp-Tiere. Dieser Befund belegt, dass Spermien auch ohne den deletierten Bitterrezeptor grundsätzlich in der Lage sind, Eizellen zu befruchten. Aufgrund der vergleichbaren Wurfgröße konnte außerdem ein fataler Entwicklungsdefekt von Tas2r131 [-/-] Embryonen ausgeschlossen werden. Gleichzeitig wurde auch deutlich, dass die größere Anzahl von Spermatozoen im caudalen Teil des Nebenhodens der Ki-Tiere nicht zu einer größeren Zahl von Nachkommen führt. Dieser Effekt könnte auf eine Limitierung der Wurfgröße durch den weiblichen Zuchtpartner zurückzuführen sein, da pro Zyklus nur eine begrenzte Zahl von befruchtungsfähigen Eizellen zur Verfügung steht und vom Weibchen ausgetragen werden kann [Rolland et al., 2003; Firman und Simmons, 2008].

Da keine Veränderung der Fertilität von Tas2r131 GFP Tieren zu beobachten war, ließen sich durch die oben beschriebenen Verpaarungsexperimente zwar keine direkten Hinweise auf die funktionelle Rolle des Tas2r131 Rezeptors für die Reproduktion gewinnen. Das Ausbleiben eines Effektes auf die Reproduktion muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass der Bitterrezeptor keine physiologische Funktion in Spermien hat, sondern könnte durch eine kompensatorische Expression verwandter Proteine, wie sie u. a. schon für GPCRs [Karasinska et al., 2003; Parnot und Kobilka, 2004], aber auch TRP-Kanäle [Dietrich et al., 2005] und G Proteine (siehe auch 4.2.1.2) [Gohla et al., 2007; Young et al., 2011] beschrieben wurde, bedingt sein. Außerdem könnten dezente Funktionseinschränkungen der Gen-defizienten Spermien durch die optimierten Haltungsbedingungen einer modernen Tierzuchtanlage, die z. B. eine Konkurrenz zwischen Spermien verschiedener Männchen ausschließt, ausgeglichen werden [Gingrich und Hen, 2000; Sutton et al., 2008].

Um Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Funktion und Befruchtungskompetenz von Tas2r131-defizienten Spermien sammeln zu können, sollte deshalb der Reproduktionserfolg heterozygoter Tas2r131 GFP Männchen untersucht werden, in deren Ejakulat genetisch Tas2r131-positive [+] mit genetisch Tas2r131-negativen [-] Spermien konkurrieren. Zum Verständnis dieses experimentellen Ansatzes muss jedoch berücksichtigt werden, dass haploide Tas2r131-Gen-defiziente und Tas2r131-positive Keimzellen, die aus einer gemeinsamen diploiden Tas2r131 GFP [+/-] Keimzelle hervorgehen, während ihrer gesamten Entwicklung durch cytoplasmatische Brücken verbunden bleiben (Abbildung 4.27 [A], rote Pfeilspitzen) [Handel, 1987; Hendriksen, 1999]. Innerhalb dieses Keimzell-Synzytiums ist ein Austausch von RNA-Transkripten und/oder Proteinen zwischen genetisch unterschiedlichen postmeiotischen Spermatiden möglich, so dass sich diese genetisch nicht-identischen Zellen (Abbildung 4.27 [B]) synchron zu biochemisch und funktionell äquivalenten Spermien differenzieren können [Handel, 1987; Hendriksen, 1999]. Eine solche Bildung phänotypisch identischer Spermienpopulationen wurde u. a. bei verschiedenen X-chromosomal kodierten Proteinen [Moss et al., 1997] und Protamin [Caldwell und Handel, 1991] beobachtet (siehe Abbildung 4.27 [C], i). Es konnten jedoch auch experimentelle Hinweise dafür gefunden werden, dass nicht alle Transkripte bzw. Proteine gleichermaßen über die Cytoplasmabrücken ausgetauscht werden, so dass auch phänotypisch unterschiedliche Spermienpopulationen gebildet werden können (siehe Abbildung 4.27 [C], ii). Sind die Spermien des einen Genotyps erfolgreicher im Zeugen von Nachkommen, so kann bei den Jungtieren eine Verschiebung der Genotyp-Verteilung zugunsten dieses genetischen Merkmals beobachtet werden. Eine solche, seltene Abweichung von der statistisch erwarteten Mendel-Verteilung wird als *transmission ratio distortion* bezeichnet und taucht unter anderem beim t-Haplotyp [Olds-Clarke, 1988; Veron et al., 2009] oder dem SPAM1 (*Sperm Adhesion Molecule 1*) [Martin-DeLeon et al., 2005] auf.

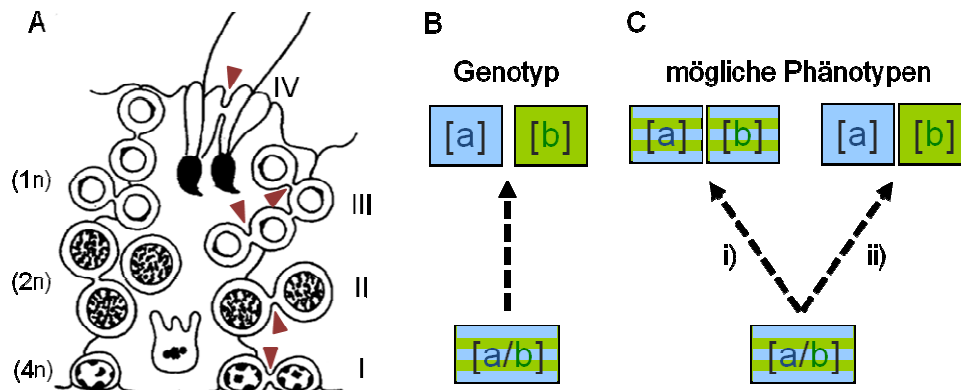


Abbildung 4.27: Übersicht über die Keimzellbildung im Hoden heterozygoter Tiere.

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die Bildung von Spermien aus heterozygoten Keimzellen. In [A] ist eine Übersicht über die Keimzellreifung dargestellt. Die cytoplasmatischen Brücken, die einzelne Keimzellklone während des gesamten Reifungsprozesses miteinander verbinden, sind zur Verdeutlichung markiert (rote Pfeilspitzen). Der DNA-Gehalt der jeweiligen Keimzellen ([I]: Spermatogonien; [II]: Spermatocyten; [III]: runde Spermatiden; [IV]: elongierte Spermatiden) ist links neben dem Schema aufgeführt (modifiziert nach [Hendriksen, 1999]).

[B] zeigt beispielhaft den Genotyp [Genotyp] von Spermien, die aus einer Stammzelle hervorgehen. Bei der Meiose entstehen aus einer Keimzelle, die zwei verschiedene Allele eines Gens trägt [a/b] (grün-blau gestreift) zwei genetisch unterschiedliche Spermien, von denen jeweils eins das [a] Allel trägt (blau) und das andere das [b] Allel (grün).

[C] stellt eine Übersicht über die möglichen biochemischen Phänotypen der gebildeten Spermien dar. Es können Spermatozoen entstehen, in denen, wie in der Ursprungszelle ([a/b], grün-blau gestreift) Proteine, die durch beide Allele ([a] (blau) und [b] (grün)) kodiert werden, vorhanden sind (grün-blau gestreift). Diese Spermien zeigen eine gleichmäßige Proteinverteilung und sind biochemisch identisch ([i], beide Zellen mit beiden Proteinen, grün-blau gestreift). Oder es werden zwei Zellen gebildet, die nur das Protein beinhalten, das durch das jeweilige Allel kodiert wird [ij] (blau: genetisches [+] Spermium mit dem „blauen“ Protein; grün: genetisches [-] Spermium, das Proteinvariante b exprimiert).

Ob das Tas2r131 Protein in Spermien heterozygoter Männchen der Tas2r131 GFP Mauslinie gleichmäßig verteilt ist oder ob sich diese Spermien in ihrer Rezeptorausstattung unterscheiden, konnte aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers zum Nachweis des Rezeptorproteins nicht geprüft werden. Ein Rückschluss von der Verteilung des Reporterproteins GFP auf die Rezeptormenge in den unterschiedlichen Spermienpopulationen war ebenfalls nicht möglich, da das GFP im Gegensatz zum membranständigen Bitterrezeptor überwiegend cytosolisch lokalisiert ist und keine Funktionen erfüllt. Sollte in Verpaarungsexperimenten mit heterozygoten Tas2r131 GFP eine Genotyp-Verschiebung detektierbar sein, könnte dieser Befund deshalb nicht nur Hinweise auf eine funktionelle Rolle des Proteins in Spermien liefern, sondern könnte auch auf eine eingeschränkte Verteilung des Bitterrezeptors bzw. seiner Transkripte über die cytoplasmatischen Verbindungen der sich entwickelnden Keimzellklone hindeuten.

Um festzustellen, ob es beim Tas2r131 zu einer männlich bedingten *transmission distortion* kommt, sollte deshalb mit Hilfe von Zuchtexperimenten geklärt werden, ob Tas2r131 Gen-defiziente Spermien möglicherweise eine höhere oder niedrigere Befruchtungskompetenz als genetische Wildtyp-Spermien aufweisen und dementsprechend ihre Tas2r131 Gen-Defizienz vermehrt oder vermindert an Nachkommen weitergeben können.

Wie aus Abbildung 4.28 [A] deutlich wird, konnte bei Verpaarungen von heterozygoten Tas2r131 GFP Männchen mit heterozygoten Weibchen keine Abweichung in der Genotypverteilung der Nachkommen festgestellt werden: Der Anteil von wildtypischen, heterozygoten und homozygoten Jungtieren war mit 27 %, 46 % bzw. 27 % Nachkommen vergleichbar zur statistisch zu erwartenden Mendelschen Verteilung von 25 % WT, 50 % HT und 25 % Ki-Tieren.

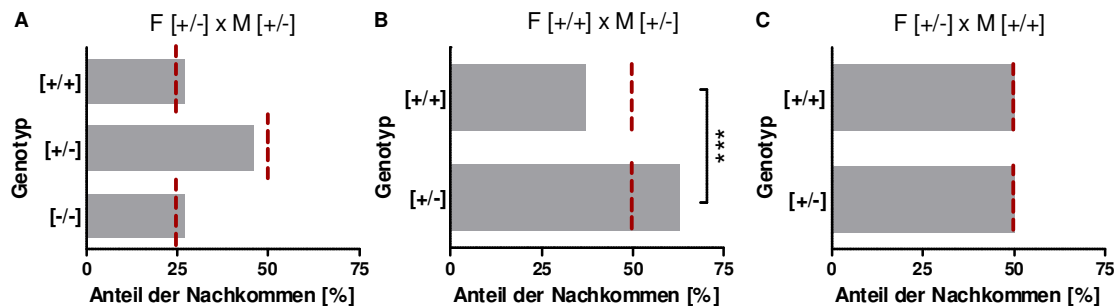


Abbildung 4.28: Genotyp-Verteilung von Nachkommen Tas2r131-heterozygoter Zuchtpaare.

Der Genotyp der Nachkommen aus Verpaarungen mit mindestens einem Tas2r131 heterozygoten Elternteil wurde durch Genotypisierung ermittelt und der Anteil des jeweiligen Genotyps an der Gesamtnachkommenzahl bestimmt. Dargestellt sind die ermittelten Prozent-Anteile der Genotypen der Nachkommen [Genotyp]. Die roten gestrichelten Linien repräsentieren die nach Mendel zu erwartende Genotyp-Verteilung. Der Genotyp der Zuchtpartner ist jeweils oben angegeben.

Bei Zuchtpaaren mit zwei heterozygoten Partnern entspricht die beobachtete Verteilung des Genotyps der Nachkommen der erwarteten Mendel-Verteilung [A]. Ist nur das männliche Zuchttier heterozygot, so verschiebt sich die Genotyp-Verteilung der Nachkommen signifikant zugunsten heterozygoter Jungtiere [B]. In Zuchtpaaren, in denen nur das Muttertier heterozygot ist [C], ist eine solche Abweichung von der erwarteten Verteilung nicht zu beobachten.

Ausgewertet wurden 633 Nachkommen aus 99 Würfen [A], 174 Nachkommen aus 29 Würfen [B] bzw. 137 Jungtiere aus 18 Würfen [C] (Stammhintergrund N2 - N6). Zur statistischen Auswertung wurde der Chi²-Test angewandt (***: $p < 0,001$).

Bei Verpaarungen von heterozygoten Tas2r131 GFP Männchen mit Wildtyp-Weibchen war im Gegensatz dazu überraschenderweise eine signifikante Verschiebung (Chi²-Test, $p < 0,001$) im Genotyp der Jungtiere zugunsten heterozygoter Nachkommen zu detektieren (Abbildung 4.28 [B]): Während nach Mendel jeweils 50 % der Jungtiere als wildtypisch und 50 % als heterozygot zu erwarten waren, traten bei diesen Zuchten 63 % Nachkommen mit heterozygoten Genotyp und nur 37 % Wildtyp-Tiere auf. Um zu prüfen, ob diese Verschiebung auf eine vermehrte Zeugung von heterozygoten Tieren zurückzuführen oder eine erhöhte Überlebensrate der Embryonen ursächlich sein könnte, wurden in parallelen Zuchtansätzen heterozygote Tas2r131 GFP Weibchen mit Wildtyp-Männchen verpaart. Wie in Abbildung 4.28 [C] dargestellt, konnte in diesen Zuchtpaaren interessanterweise beobachtet werden, dass das [-] Allel der Mutter nicht vermehrt an die geborenen Nachkommen (50 % WT, 50 % HT) weitergegeben wurde. Der erhöhte Anteil heterozygoter Nachkommen bei heterozygoten Vätern, der bei den korrespondierenden Verpaarungen beobachtet wurde (Abbildung 4.28 [B]) könnte also durchaus auf eine Beeinflussung der Spermienfunktion durch den Tas2r131 Genotyp hindeuten, die eine vermehrte Weitergabe des [-] Allels durch den Vater verursacht.

Da andere Einflüsse wie embryonale Entwicklungsdefekte, kompensatorische Expression anderer Proteine oder auch eine veränderte Anzahl von [+] und [-] Spermien nicht ausgeschlossen werden können, können diese Zuchtansätze zunächst nur Anhaltspunkte für eine Veränderung der Befruchtungskompetenz von Tas2r131-defizienten Spermien liefern. Um weitere Hinweise auf die physiologische Rolle des Tas2r131 in Spermien zu sammeln, wurde deshalb die Funktionsfähigkeit von isolierten Tas2r131-defizienten Spermien mit der von Wildtyp-Spermien verglichen.

4.3.4.3 Funktionelle Charakterisierung von Spermien Tas2r131-defizienter Mäuse

Bis zur erfolgreichen Befruchtung einer Eizelle müssen Spermien eine Reihe ganz unterschiedlicher Aufgaben bewältigen (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1.2), die u. a. die Wegfindung zur Oocyte und auch die direkte Interaktion mit der weiblichen Keimzelle umfassen. Um der Frage nachzugehen, bei welcher dieser physiologischen Funktionen möglicherweise eine Veränderung in Bitterrezeptor-defizienten Keimzellen auftreten könnte, wurden deshalb die Motilität und akrosomale Exocytose von Spermien der Tas2r131 GFP Mauslinie näher untersucht.

Zum Vergleich der Spermienmotilität von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tas2r131 GFP Mäusen wurde eine Computer-assistierte Spermienanalyse (*computer assisted semen analysis* [CASA]) durchgeführt. Bei diesem automatisierten Standardverfahren werden Spermien in eine Messkammer mit definierter Tiefe überführt und ihre Bewegung über eine am Mikroskop angebrachte Kamera in kurzen Videosequenzen mit hoher Bildrate aufgenommen; die so entstehenden Bildsequenzen werden dann durch eine spezielle Software ausgewertet. Dabei erfolgt eine automatisierte Erkennung der einzelnen Spermien, so dass für jedes Spermium die während der Aufnahme zurückgelegte Wegstrecke von der Software ermittelt wird. Da bei einer Messung innerhalb weniger Sekunden mehrere hundert Zellen gleichzeitig analysiert werden können, erlaubt dieses computergestützte Verfahren eine objektive Beurteilung der Motilität und des Bewegungsmusters einer großen Spermienpopulation [Lenzi, 1997; Waberski et al., 1999].

Die CASA-Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Susan Marschall vom Institut für experimentelle Genetik am Helmholtz Zentrum München mit Hilfe eines *IVOS Sperm Analyzer* (Hamilton Thorne Research) [Schneider et al., 2009]. Dabei wurden neben dem Anteil motiler und progressiv motiler Spermien verschiedene kinetische Parameter wie unterschiedliche Richtungs-Geschwindigkeiten, die Linearität der Bewegung sowie die seitliche Kopfauslenkung bestimmt (zur detaillierten Übersicht siehe Abschnitt 3.4.2). In Abbildung 4.29 sind die Befunde von drei unabhängigen Motilitätsmessungen an Spermien von Tas2r131 GFP [+/+], [+/-] und [-/-] Wurfgeschwistern gezeigt. Dabei stellt Abbildung 4.29 [A] die Daten als Absolutwerte dar, in [B] wurden diese auf die Werte des jeweiligen Wildtyp-Tieres normiert. Der Überblick über die gemessenen Parameter macht deutlich, dass keine gravierenden Motilitätsunterschiede zwischen Spermien der drei Genotypen zu detektieren waren. Der Anteil motiler Zellen war bei Tas2r131 GFP Ki Mäusen mit 72 % vergleichbar zum

Wildtyp (69 %) und zu heterozygoten Tieren (75 %). Gleiches gilt für den Prozentsatz der progressiv motilen Zellen, der keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen aufwies (WT: 38 %; Ki: 39 %). Auch in den meisten kinetischen Parametern wie der Pfadgeschwindigkeit [VAP] oder der Spurgeschwindigkeit [VCL] waren keine Veränderungen bei den Tas2r131-defizienten Spermien zu registrieren. Im Vergleich zum Wildtyp war eine signifikante Änderung lediglich im Linearitätsindex [STR] der Tas2r131 GFP Ki Tiere ($p < 0,01$) sowohl in den absoluten als auch in den normierten Werten zu detektieren (Abbildung 4.29 [A] und [B]). Bei heterozygoten Spermien waren signifikante Unterschiede hingegen nur in den Absolutwerten der Progressivgeschwindigkeit [VSL] auszumachen (Abbildung 4.29 [A]). In beiden Fällen waren die Abweichungen von den gemessenen Werten der Wildtyp-Geschwistertiere allerdings sehr gering, so dass nur minimale Änderungen des Bewegungsmusters vorlagen, die keinen Rückschluss auf eine veränderte Fertilität ermöglichten.

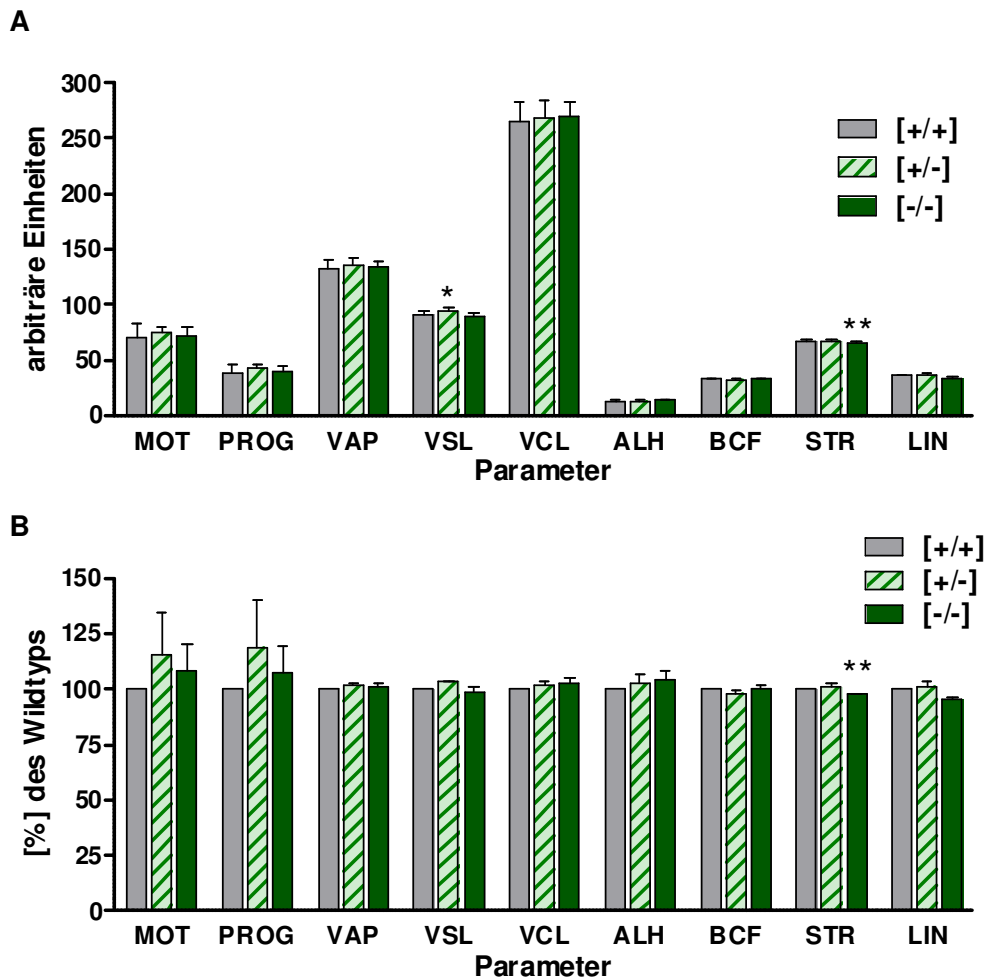


Abbildung 4.29: Vergleich der Spermienmotilität von Tieren mit unterschiedlichem Tas2r131 Genotyp.

Die Motilität der Spermien von Wildtyp ([+/+], grau), heterozygoten ([+/-], grün gestreift) und Tas2r131 homozygoten ([-/-], grün) Geschwistertieren (N2, N5, N6) wurde mit Hilfe eines CASA-Systems bestimmt [A]. Ermittelt wurden folgende Motilitätsparameter: Anteil der motilen Zellen [MOT] (%), Anteil progressiv motiler Zellen [PROG] (%), Pfadgeschwindigkeit [VAP] ($\mu\text{m}/\text{sec}$), Progressivgeschwindigkeit [VSL]

($\mu\text{m}/\text{sec}$), Spurgeschwindigkeit [*VCL*] ($\mu\text{m}/\text{sec}$), seitliche Kopfauslenkung [*ALH*] (μm), Schlagfrequenz [*BCF*] (Hz), Linearitätsindex [*STR*] (%) und die Linearität [*LIN*] (%). In [B] wurden die einzelnen Motilitätsparameter auf den Wert des jeweiligen Wildtypieres [100 %] normiert.

Der Vergleich der einzelnen Parameter zeigt, dass nur geringfügige Unterschiede in der Motilität zwischen Spermien der verschiedenen Genotypen vorliegen. Tas2r131 [-/-] Spermien zeigen im Linearitätsindex (*straightness* [*STR*]) einen signifikant niedrigeren Wert [**] als Wildtyp-Spermien in beiden Auswertungen (absolute und normierte Werte). Heterozygote Spermien weisen nur in den nicht-normierten Analysen eine signifikant erhöhte Progressivgeschwindigkeit auf ([*VSL*], *straight line velocity*)

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen (gepaarter studentischer t-Test; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$).

Nach der erfolgreichen Navigation des Spermiums zur Eizelle durchläuft die männliche Keimzelle mit der Akrosomreaktion einen weiteren elementaren Prozess, der zur erfolgreichen Befruchtung einer Oocyte nötig ist [Yanagimachi, 1994]. Die akrosomale Exocytose wird beim Kontakt mit der Kohlenhydrat-reichen Schutzhülle der Eizelle, der *Zona pellucida*, ausgelöst [Brewis und Wong, 1999; Breitbart, 2003]. Dabei kommt es zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme aus der vesikulären Kappe des Spermiums [Adham et al., 1997; Breitbart und Spungin, 1997; Tranter et al., 2000], so dass eine Fusion des Spermiums mit der Oocyte ermöglicht wird [Yanagimachi, 1994]. Die akrosomale Exocytose wird, wie in Nervenzellen auch [Jahn et al., 2003], von einem starken Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst [Mayorga et al., 2007; Florman et al., 2008] und durch cAMP reguliert, u. a. über PKA [Evans und Morgan, 2003] und das cAMP-aktivierte Protein EPAC [Branham et al., 2006].

Da die zwei essentiellen sekundären Botenstoffe zur Kontrolle der Akrosomreaktion, Ca^{2+} und cAMP, auch maßgeblich an der Signaltransduktion von Geschmacksrezeptoren der Tas1r- und Tas2r-Familie involviert sind, stellte sich die Frage, ob diese Rezeptoren den Prozess der akrosomalen Exocytose regulieren könnten. Dies erscheint insbesondere interessant, da die Erkennungsmoleküle der *Zona pellucida* auf der Spermienoberfläche trotz ihrer essentiellen Bedeutung für eine erfolgreiche Reproduktion bislang ebensowenig eindeutig identifiziert werden konnten wie regulatorische Proteine, die den Ablauf der Akrosomreaktion koordinieren und beispielsweise eine spontane akrosomale Exocytose verhindern [Nixon et al., 2001; Evans und Florman, 2002; Rankin et al., 2003; Dean, 2004; Nixon et al., 2007; Ackermann et al., 2009].

Um der Frage nach einer physiologischen Rolle von Bitterrezeptoren bei der Akrosomreaktion nachzugehen, wurde deshalb die akrosomale Exocytose von Tas2r131-defizienten Spermien charakterisiert. Dazu wurde zunächst geprüft, ob die Exocytosemaschinerie des Akrosoms von Tas2r131-defizienten Spermien intakt ist. Die maximale Effizienz der Akrosomreaktion wurde dabei durch eine Inkubation mit dem Calcium-Ionophor A23187 ermittelt. A23187, ein bakterielles Antibiotikum, bindet selektiv divalente Kationen wie Calcium und transportiert diese effektiv über Membranen, was zu einem starken Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt [Malaisse, 1988]. Diese künstlich hervorgerufene starke Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kann dann, unabhängig von einer Bindung an die *Zona pellucida* und der Aktivierung

assoziierter Signaltransduktionsprozessen, die Exocytose des akrosomalen Vesikels induzieren [Aitken et al., 1993; Liu und Baker, 1996; Kirkman-Brown et al., 2002].

Zur Untersuchung des Einflusses eines solchen starken Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden isolierte caudale Spermien von Tas2r131 GFP Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tieren zunächst für 90 Minuten in einem Kapazitierungspuffer (HS Puffer mit Bicarbonat und BSA) inkubiert, um sie vollständig zu kapazitieren. Durch diesen sekundären Reifungsprozess, den Spermien *in vivo* im weiblichen Genitaltrakt durchlaufen, erlangen Spermien erst ihre vollständige Fähigkeit zur Akrosomreaktion [Austin, 1952; Witte und Schafer-Somi, 2007; Florman et al., 2008]. Nach dieser *in vitro* Kapazitierungsphase erfolgte eine 30minütige Stimulation mit 10 μM A23187 (in 0,1 % DMSO verdünnt) bzw. eine Kontrollinkubation mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %). Anschließend wurden die Spermien fixiert und der Anteil Akrosom-reagierter Spermien durch eine Färbung mit dem Farbstoff Coomassie G250 bestimmt, der intakte akrosomale Vesikel aufgrund ihrer hohen Proteindichte tiefblau markiert [Jungnickel et al., 2001; Lu et al., 2002], und so eine lichtmikroskopische Quantifizierung des akrosomalen Status ermöglicht.

Abbildung 4.30 zeigt die Auswertung dieser Stimulationen mit dem Calcium-Ionophor A23187 an 14 - 17 Tieren pro Genotyp. Bei der Stimulation mit dem Ionophor [A23187] war für Spermien aller drei Genotypen eine hoch signifikante Erhöhung ($p < 0,001$) der Akrosomreaktionsrate im Vergleich zum DMSO-Kontrollpuffer [Kontrolle] feststellbar. Zwischen den verschiedenen Genotypen war jedoch kein Unterschied in der durch A23187 erreichten absoluten akrosomalen Exocytoserate zu detektieren; diese lag unabhängig vom Genotyp bei ca. 45 %. Diese vergleichbare Effizienz der Ionophor-vermittelten Akrosomreaktion von Spermien der drei Tas2r131 GFP Genotypen konnte belegen, dass die Exocytosemaschinerie der Zellen nicht durch die Gen-Defizienz beeinträchtigt war. Interessanterweise waren jedoch bei Betrachtung der Kontrollansätze, die nur mit DMSO inkubiert wurden, deutliche Unterschiede in der Akrosomreaktionsrate der verschiedenen Spermienpopulationen auszumachen. In diesen Versuchen zeigten Tas2r131 GFP Ki Tiere eine signifikant niedrigere Rate Akrosom-reagierter Spermien ($17 \pm 0,9 \%$) als Wildtyp-Tiere ($22,3 \pm 1,3 \%$) oder heterozygote Mäuse ($24,5 \pm 1,8 \%$) (Abbildung 4.30 [Kontrolle]). Da das Lösungsmittel DMSO bei einer Konzentration von 0,1 % in anderen experimentellen Ansätzen keinen Einfluss auf die Akrosomreaktion hatte und keine Induktion der akrosomalen Exocytose bewirkte, spiegeln diese Kontrollansätze sehr wahrscheinlich die Rate der spontan erfolgten akrosomalen Exocytose wider [DasGupta et al., 1994; Yanagimachi, 1994].

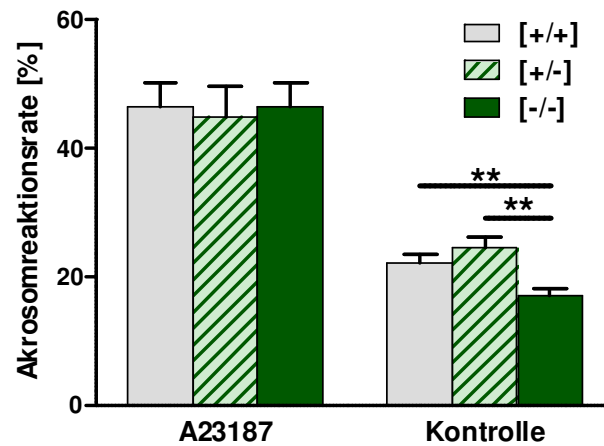


Abbildung 4.30: Calcium-IONOPHOR induzierte Akrosomreaktion in Wildtyp- und Tas2r131-defizienten Spermien.

Spermien der drei Tas2r131 Genotypen wurden aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert, kapazitiert und anschließend mit dem Calcium-IONOPHOR A23187 [A23187] bzw. mit 0,1 % DMSO [Kontrolle] stimuliert. Im Anschluss an die Fixierung wurde der akrosomale Status durch eine Coomassie-Färbung bestimmt.

Nach der Stimulation mit A23187 zeigen Wildtyp- ([+/+], grau), heterozygote ([+/-], grün gestreift) und Tas2r131-defiziente Spermien ([-/-], dunkelgrün) einen signifikanten Anstieg der akrosomalen Exocytose [A23187] im Vergleich zur Pufferkontrolle [Kontrolle]. Während in der absoluten Akrosomreaktionsrate nach Zugabe des Calcium-IONOPHORS kein Unterschied zwischen den Genotypen feststellbar ist, zeigt sich in den Tas2r131-defizienten Tieren eine signifikant erniedrigte akrosomale Exocytose in den DMSO-Kontrollansätzen [Kontrolle].

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 14 - 17 unabhängigen Experimenten mit Geschwister-tieren und Tieren mit identischem Stammhintergrund (N2, N3). Der statistische Vergleich der Tas2r131-defizienten Tiere mit dem Wildtyp-Tieren erfolgte mit Hilfe eines ungepaarten studentischen t-Tests (**: $p \leq 0,01$).

Um dem Verdacht einer verminderten spontanen Akrosomreaktionsrate in Tas2r131-defizienten Spermien nachzugehen, wurde im Folgenden der Umfang der Spontanrate unstimulierter Zellen näher charakterisiert. Dazu wurden Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert und 120 Minuten lang in Kapazitierungspuffer inkubiert. Zu Beginn und während der Inkubation wurden im Abstand von 30 Minuten Spermien aus der Suspension entnommen und unmittelbar fixiert, um den Anteil Akrosom-reagierter Spermien zum jeweiligen Zeitpunkt zu ermitteln. Die Quantifizierung der Akrosomreaktionsrate erfolgte mittels der oben beschriebenen Coomassie-Färbung. Abbildung 4.31, in der die Ergebnisse dieser Untersuchungen an 14 - 17 Tieren pro Genotyp (Tas2r131 [+/+], [+/-] und [-/-]) zusammengefasst sind, macht deutlich, dass die Rate an spontaner Akrosomreaktion im Verlauf der Kapazitierung bei allen drei Genotypen kontinuierlich anstieg. Da der sekundäre Reifungsprozess der Kapazitierung essentiell für die Ausbildung der Fähigkeit zur Akrosomreaktion ist, war eine solche Zunahme der akrosomalen Exocytose aufgrund der ansteigenden Zahl Fusions-kompetenter Zellen zu erwarten.

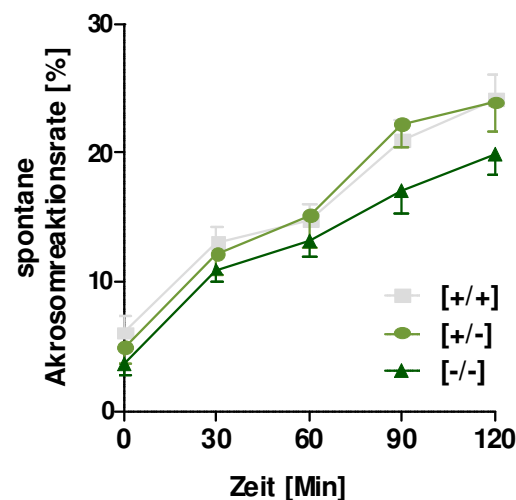


Abbildung 4.31: Spontane Exocytoserate in Mausspermien verschiedener Tas2r131 Genotypen.

Zur Analyse der spontanen akrosomalen Exocytose in Spermien von Tas2r131-Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Mäusen wurden isolierte caudale Spermien in Kapazitätsmedium inkubiert. Im Abstand von 30 Minuten wurden Proben entnommen, fixiert und der Anteil Akrosom-reagierter Spermien durch eine Coomassie-Färbung ermittelt. Die spontane Akrosomreaktionsrate der drei Genotypen wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

Die Spontanrate von Tas2r131 *Knockin*-Spermien ist zu jedem beobachteten Zeitpunkt niedriger als die spontane Exocytoserate von Wildtyp- oder Tas2r131 heterozygoten Tieren, diese Unterschiede sind jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant ($p \leq 0,05$, Studentischer t-Test).

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von unabhängigen Experimenten mit 14-17 Tieren pro Genotyp. Es wurden Tiere mit gleichem genetischen Hintergrund (N2-N3) verwendet.

Beim Vergleich der akrosomalen Sekretionsraten der Spermien der verschiedenen Tas2r131 GFP Genotypen fiel auf, dass die Spontanrate der Tas2r131 GFP-defizienten Spermien (dunkelgrün) zu jedem untersuchten Zeitpunkt niedriger war als die von Zellen vergleichbarer Wildtyp- (grau) oder heterozygoter (hellgrün) Tiere (Abbildung 4.31). Dieser Unterschied war zwar nicht signifikant – vermutlich bedingt durch starke Schwankungen in den spontanen Akrosomreaktionsraten einzelner Versuchstiere der jeweiligen Genotypen – es war jedoch während des gesamten Verlaufs der Kapazitierung ein Trend zu einer verminderten spontanen akrosomalen Exocytose bei den Spermien der Tas2r131 GFP Ki Tiere zu beobachten (Abbildung 4.31).

4.4 Geschmacksrezeptoren der Tas1r-Familie im männlichen Reproduktionssystem

Neben den Bitterrezeptoren stellt die Familie der Tas1-Rezeptoren eine weitere Gruppe von G Protein-gekoppelten Geschmacksrezeptoren dar. Auf der Zunge sind die drei Mitglieder dieser Rezeptor-Familie an der Detektion hydrophiler Liganden wie Kohlenhydraten, Proteinen und Aminosäuren beteiligt und damit für die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten „süß“ und „umami“ verantwortlich. Diese Tas1-Rezeptoren, für die bereits eine Expression in diversen extra-oralen Geweben gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 1.2.4.5), könnten somit potentielle Detektionsmoleküle für die Erkennung wasserlöslicher Lockstoffe der Eizelle bzw. des weiblichen Genitaltraktes darstellen oder in die Erkennung von Kohlenhydratresten der Glykoprotein-reichen *Zona pellucida* involviert sein.

4.4.1 Nachweis von Tas1-Rezeptor-Transkripten in Reproduktionsorganen der männlichen Maus

Um zu prüfen, ob die drei Tas1-Rezeptoren als chemosensorische Erkennungsmoleküle männlicher Keimzellen in Betracht kommen könnten, wurde zunächst geprüft, ob Tas1r-mRNA-Transkripte im Hoden nachzuweisen sind.

Zu diesem Zweck wurden RT-PCRs mit Subtyp-spezifischen Primerpaaren und cDNA aus dem Hoden und der Wallpapille der Maus durchgeführt. Die Qualität der verwendeten cDNAs wurde durch RT-PCR-Ansätze mit Primerpaaren überprüft, die gegen das *house-keeping* Gen β -Aktin [Ziegler et al., 1992] bzw. das mitochondriale Protein L8 (Daten nicht gezeigt) gerichtet waren. Abbildung 4.32 [B] zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer solchen PCR mit einem Exon-überspannenden, β -Aktin spezifischen Primerpaar [β -Aktin]. In diesen Ansätzen war unter Verwendung der cDNA der Wallpapille [CV] und des Hodens [Ho] jeweils ein einzelnes Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe (425 bp) zu registrieren, wodurch sichergestellt werden konnte, dass erfolgreich mRNA isoliert und in cDNA transkribiert wurde. Aus der validierten gustatorischen cDNA konnte in den anschließenden RT-PCR Ansätzen mit allen drei Tas1r-spezifischen Primerpaaren ein einzelnes PCR-Produkt der erwarteten Größe (Tas1r1: 468 bp; Tas1r2: 403 bp; Tas1r3: 510 bp) amplifiziert werden (Abbildung 4.32 [A], [CV]). Durch diese Kontroll-PCRs mit cDNA aus Geschmacksgewebe konnte sichergestellt werden, dass die gewählten PCR-Bedingungen und Primerkombinationen geeignet waren um Tas1r-Transkripte nachzuweisen.

Unter Verwendung der Tas1r1- und Tas1r3-spezifischen Primerpaare konnten auch aus der cDNA des Hodens Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe von 468 bp bzw. 510 bp generiert werden (Abbildung 4.32 [A], [Ho]). Um zu prüfen, ob die beobachteten PCR-Banden auf eine spezifische Amplifikation von Tas1r-Transkripten

zurückzuführen waren, wurden die PCR-Fragmente anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und in einen pGEMT-Vektor ligiert. Nach Transformation und Vermehrung des Plasmids in *E. coli* wurde die DNA aus den Bakterien aufgereinigt, das Amplifikationsfragment sequenziert und mit den bekannten Sequenzen des Tas1r1 und des Tas1r3 verglichen. Diese Datenbankanalyse ergab eine vollständige Übereinstimmung der kurzen PCR-Fragmente mit den Tas1r-Sequenzen aus Geschmackszellen der Maus, was die Spezifität der Transkript-Amplifikation des Tas1r1 und Tas1r3 unterstreicht.

Im Gegensatz zu den beiden Mitgliedern des Umami-Rezeptors, der sich aus dem Tas1r1 und Tas1r3 zusammensetzt, konnten mit den Subtyp-spezifischen Primerpaaren, die gegen den Tas1r2 gerichtet waren, keine Amplifikationsprodukte aus testikulärer cDNA generiert werden (Abbildung 4.32 [A], [Tas1r2]). Auch unter Verwendung zwei weiterer alternativer Tas1r2-spezifischer Primerpaare (Tas1r2 B und C, siehe Abschnitt 2.3.1), die erfolgreich zu Amplifikaten aus gustatorischer cDNA führten, konnte kein PCR-Produkt in Hoden-cDNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), obwohl eine Expression dieses Rezeptors im Hoden kürzlich in einer Tas1r2-LacZ Reporter-maus beschrieben wurde [Iwatsuki et al., 2010].

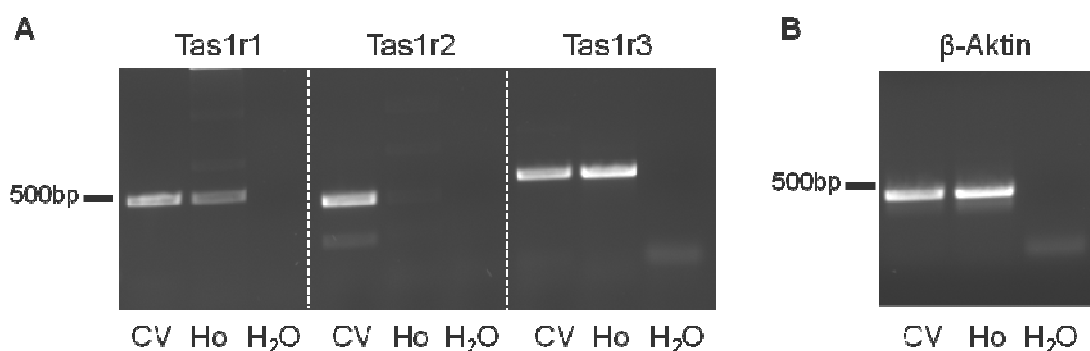


Abbildung 4.32: RT-PCR Analyse zum Nachweis der Expression von Tas1r-Transkripten im Hoden der Maus.

Mit spezifischen Primerpaaren gegen die drei Mitglieder der Tas1r Geschmacksrezeptorfamilie [A] bzw. gegen β-Aktin [B] wurde eine RT-PCR mit muriner cDNA aus Hoden [Ho] und der Wallpapille [CV] durchgeführt. In Kontrollansätzen wurde Wasser [H₂O] als *Template* verwendet.

[A] Aus der cDNA der Wallpapille konnte für alle drei Primerpaare ein einzelnes Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Tas1r1: 468 bp; Tas1r2: 403 bp; Tas1r3: 510 bp). Unter Verwendung der Hoden cDNA konnte nur mit den Tas1r1- und mit den Tas1r3-spezifischen Primerpaaren eine Bande der berechneten Größe detektiert werden. Transkripte des Tas1r2 Rezeptors konnten nicht aus cDNA des Hodens amplifiziert werden.

[B] In Kontrollansätzen mit einem β-Aktin spezifischen Primerpaar wurde für beide verwendete cDNAs jeweils nur ein einzelnes Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe von 425 bp nachgewiesen.

4.4.2 Immunhistochemische Analyse von Tas1-Rezeptorproteinen im Keimdrüsengewebe der männlichen Maus

Nachdem die Befunde der vorangehend beschriebenen RT-PCRs erste Hinweise auf eine Genexpression des Tas1r1 und Tas1r3 im Hoden ergaben, während eine Expression des Tas1r2 aufgrund fehlender Amplifikationsprodukte ungewiss erscheint,

stellte sich die Frage, welcher der Tas1-Rezeptoren translatiert wird und auch auf Proteinebene im Keimdrüsengewebe vorhanden ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Proteinexpression der Tas1-Rezeptoren im murinen Hoden immunhistochemisch untersucht.

Ähnlich wie bei den Bitterrezeptoren der Tas2r-Familie (siehe Abschnitt 4.3.2) war dieser experimentelle Ansatz jedoch aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit funktioneller Subtyp-spezifischer Antikörper stark eingeschränkt. Zur Detektion des Tas1r1 und Tas1r2 in Nagergewebe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Antiseren der Firmen Santa Cruz und Biotrend getestet (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.4.1). Keines der anti-Tas1r1- oder anti-Tas1r2 Antiseren führte zu einer Immunmarkierung in Wallpapillen der Maus oder der Ratte, die als Positivkontrolle verwendet wurden (Daten nicht gezeigt), so dass diese Antikörper nicht geeignet waren, die Rezeptorproteine im Nagerhoden nachzuweisen.

Um die Funktionalität von Nager-spezifischen Antikörpern, die gegen den gustatorischen Dimerisierungspartner der anderen beiden Tas1r-Subtypen, den Tas1r3, gerichtet waren, zu prüfen, wurden ebenfalls umfangreiche Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern an Zungengewebe der Maus und Ratte durchgeführt. In diesen experimentellen Ansätzen konnten insgesamt drei Antiseren identifiziert werden, die eine spezifische Immunfärbung einzelner Geschmackssinneszellen in Wallpapillen der untersuchten Nager bewirkten: Ein kommerziell erhältliches Antiserum der Firma Abcam, das nur zum Nachweis des murinen Tas1r3 eingesetzt wurde (Tas1r3 A), sowie zwei weitere polyklonale Antiseren, die uns freundlicherweise von Robert F. Margolskee (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, USA) bzw. Danielle Reed und Josephine Egan (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Das Tas1r3-spezifische Antiserum aus der Gruppe von Prof. Margolskee wurde gegen ein immunogenes Peptid generiert, das den Aminosäuren 239 bis 255 des Tas1r3 Proteins von Maus und Ratte entspricht [Damak et al., 2003]. Dieses als „Tas1r3 M“ bezeichnete Antiserum wurde deshalb zum Nachweis des Rezeptors in beiden Spezies verwendet. Das dritte validierte Antiserum (Tas1r3 R), das gegen die Aminosäuren 45 – 62 des Rattenrezeptors gerichtet war, war hingegen nur zur Detektion des Tas1r3-Rezeptors in Geweben der Ratte geeignet [Lu et al., 2005].

Die Resultate der experimentellen Ansätze zur Antikörper-Validierung an Gefrierschnitten von murinem Zungengewebe sind in Abbildung 4.33 exemplarisch dargestellt. Durch den Einsatz des Tas1r3 M Antiserums ließen sich in coronalen Schnitten der Wallpapille eine distinkte Zellpopulation innerhalb der zwiebel förmigen Geschmacksknospe, die zur besseren Übersicht schematisch umrandet wurde, anfärben (Abbildung 4.33 [A und E]): Einzelne Zellen innerhalb der Wand der Papille, die die typische Morphologie von Geschmackssinneszellen aufwiesen (siehe auch Abbildung 4.1 [A]), zeigten ein grünes Fluoreszenzsignal (Abbildung 4.33, [E], Pfeilspitze). Nach einer Prä-Inkubation des Tas1r3 M Antiserums mit seinem immunogenen Peptid war die Immun-

färbung sehr stark reduziert (Abbildung 4.33 [B und F]), was auf eine spezifische Erkennung des Tas1r3 Rezeptorproteins durch dieses Antiserum hindeutet.

Die Inkubation der histologischen Zungenschnitte mit dem Tas1r3 A Antiserum resultiert in einer Immunreaktivität, die der des Tas1r3 M Serums sehr ähnlich war: Es war eine Markierung in der Wallpapille zu detektieren (Abbildung 4.33 [C]), die überwiegend in einzelnen spindelförmigen Sinneszellen konzentriert war (Abbildung 4.33 [G], Pfeilspitze). Allerdings ist bei Verwendung des Tas1r3 A Antiserums auch eine Immunfärbung außerhalb des sensorischen Gewebes zu beobachten: Es ist ein intensives Fluoreszenzsignal im Spalt zwischen dem Papilleneithel zu registrieren (Abbildung 4.33 [G], Pfeil). Aufgrund des Fehlens eines Blockierungspeptids für diesen Antikörper konnte die Spezifität dieser Antikörperreaktion nicht geprüft werden. Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers konnte aber durch Kontrollansätze, in denen kein Primärantikörper eingesetzt wurde und die keine Immunreaktivität zeigten, ausgeschlossen werden (Abbildung 4.33 [D und H]).

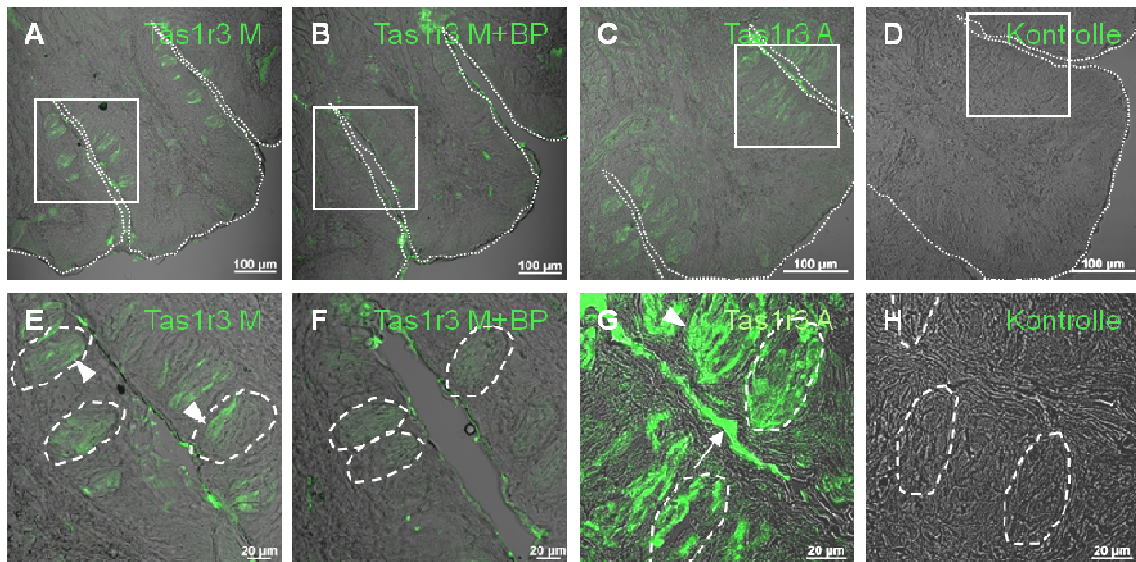


Abbildung 4.33: Immunhistochemischer Nachweis des Tas1r3 Proteins in der Wallpapille der Maus. Gefrierschnitte der CV einer adulten Maus wurden mit dem anti-Tas1r3 M bzw. mit dem anti-Tas1r3 A IgG (1:200) immunhistochemisch untersucht. In den Präparaten, die mit den Tas1r3-spezifischen Antiseren inkubiert wurden [*Tas1r3 M*; *Tas1r3 A*], ist eine deutliche Immunreaktivität (grün) in einzelnen Geschmackssinneszellen zu registrieren ([A, C, E, F]; Pfeilspitzen). Diese Reaktivität lässt sich durch Vorinkubation des Antikörpers mit seinem Blockierungspeptid [*Tas1r3 M + BP*] vollständig aufheben [B und F]. Das Tas1r3 A IgG zeigt zusätzlich eine unspezifische Markierung im Spalt zwischen dem Epithel ([G], Pfeil). In Kontrollansätzen ohne Primärantikörper [D, H; *Kontrolle*] ist keine Immunreaktivität detektierbar. Zur besseren Übersicht wurden in [A - D] die Umrisse der Wallpapille eingezeichnet und in [E - H] einzelne Geschmacksknospen umrandet. Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. Der jeweils verwendete Primärantikörper ist im Bild angegeben.

Anschließend wurden die validierten Antiseren in immunhistochemischen Analysen mit histologischen Schnitten des Hodens eingesetzt, um zu klären, ob der Tas1r3 auch im männlichen Keimdrüsengewebe als Rezeptorprotein nachzuweisen ist. Nach der Inkubation mit dem Tas1r3 M Antiserum war eine deutliche Immunfärbung einzelner Zellen in den quer angeschnittenen Hodentubuli auszumachen (Abbildung 4.34 [A und

D)). In Abbildung 4.34 [D] ist ein einzelner Tubulus mit starker Immunreaktivität vergrößert gezeigt. Anhand der angeschnittenen Hodenkanälchen wird deutlich, dass das Fluoreszenzsignal hauptsächlich in den luminalen Zellschichten, die späte Entwicklungsstadien der Keimzellreifung umfassen, zu detektieren war. In diesen Zellen war die Immunfärbung in sichelförmigen Strukturen konzentriert, die wahrscheinlich Akrosomen der sich entwickelnden Keimzellen darstellen (Abbildung 4.34 [D]). In experimentellen Ansätzen, in denen das Antiserum gemeinsam mit seinem immunogenen Peptid eingesetzt wurde, war eine Reduktion aber keine vollständige Blockierung der Immunreaktivität zu beobachten (Abbildung 4.34 [B und E]). In Kontrollschnitten, die lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, war hingegen keinerlei Färbung des Gewebes feststellbar (Abbildung 4.34 [C und F]).

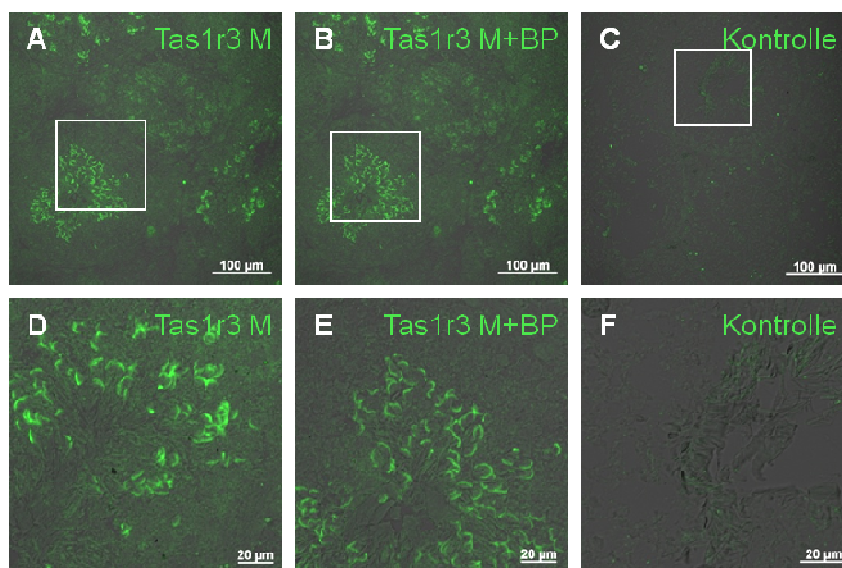


Abbildung 4.34: Immunhistochemische Analyse der Tas1r3 Expression im murinen Hoden.

Gefrierschnitte des Hodens der Maus wurden nach dem Schneiden fixiert und anschließend mit einer 1 : 200 Verdünnung des Tas1r3 M Antikörpers inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers wurde mit FITC-gekoppelten anti-Kaninchen IgG (1:750 verdünnt, grün) sichtbar gemacht. Die Inkubation mit dem Tas1r3 M IgG resultiert in einer deutlichen Immunreaktivität in einzelnen Hodentubuli [A]. Die Immunmarkierung ist in den reifen Keimzellen im luminalen Bereich der Tubuli besonders intensiv; die eine sichelförmige grüne Färbung zeigen [D]. Eine Vorbehandlung des Antikörpers mit dem korrespondierenden immunogenen Peptid [Tas1r3 M + BP] führt zu einer Verminderung, jedoch nicht zu einem vollständigen Ausbleiben der Markierung [B, E]. Im Kontrollansatz [C, F] ist keine Immunreaktivität erkennbar.

Da die Expression des Tas1r3 in späten Stadien der Spermatogenese darauf hindeutet, dass das Rezeptorprotein auch in den dort entstehenden Spermien präsent sein könnte, wurde anschließend untersucht, ob der Rezeptor auch im weiteren Verlauf der Spermienreifung im Nebenhoden nachzuweisen ist. Dazu wurden immunhistochemische Analysen an Gefrierschnitten verschiedener Abschnitte des Nebenhodens (*Caput* und *Cauda*) durchgeführt.

Bei der Inkubation von Nebenhodenschnitten mit dem Tas1r3 M Antiserum konnte wieder eine deutlich positive Reaktion sowohl im Nebenhodenkopf als auch im Nebenhodenschwanz registriert werden (Abbildung 4.35). Dabei waren die

Fluoreszenzsignale hauptsächlich im Lumen der angeschnittenen Tubuli beider Nebenhodenabschnitte sichtbar (Abbildung 4.35 [A] und [C]). Zusätzlich war auch eine schwache Immunmarkierung im Tubulusepithel des caudalen Teils auszumachen (Abbildung 4.35 [C]). Im Tubulusbinnenraum, in dem die Spermien gespeichert werden, war die Immunreaktivität auf sichelförmige Strukturen konzentriert (Abbildung 4.35, [E] und [G]), was auf eine akrosomale Markierung der Zellen hindeuten könnte. Eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers konnte durch Kontrollansätze, die keine Fluoreszenzsignale aufwiesen, ausgeschlossen werden (Abbildung 4.35 [B und F] und [D und H]).

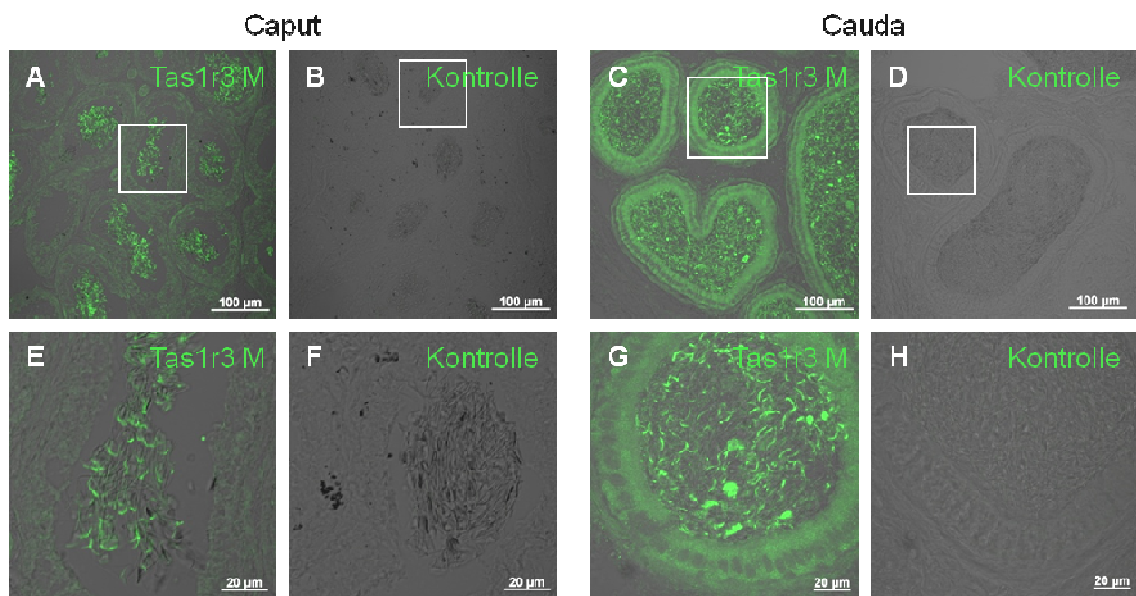


Abbildung 4.35: Immunhistochemische Analyse der Tas1r3 Expression im Nebenhoden der Maus.

Gefrierschnitte des Nebenhodens einer adulten Maus wurden mit dem anti-Tas1r3 M Serum inkubiert und der Primärantikörper wurde mit Hilfe von FITC-gekoppelten anti-Kaninchen IgG (grün) visualisiert. Die Abbildungen [A] und [E] zeigen eine deutliche Markierung im Lumen der Nebenhodengänge des Caputs. Im vergrößerten Ausschnitt [E] ist eine sichelförmige Immunreaktivität sichtbar, die wahrscheinlich die Akrosomen der luminal befindlichen Spermien repräsentiert [Tas1r3 M]. Im caudalen Teil des Nebenhodens ist neben einer diffusen Färbung des Epithels ebenfalls eine akrosomale Markierung der Spermien im Tubulusbinnenraum zu erkennen [C, G; Tas1r3 M]. Kontrollansätze [Kontrolle], in denen kein Primärantikörper eingesetzt wurde, zeigen weder im Caput [B, F] noch in der Cauda [D, H] eine Immunreaktivität. Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast und der Fluoreszenzaufnahme. Die Boxen in den oberen Bildern [A - D] markieren den Ausschnitt, der im jeweiligen unteren Bild vergrößert dargestellt ist [E - H].

Um zu untersuchen, ob das Tas1r3 Rezeptorprotein auch in reifen Spermien vorhanden ist und um über seine subzelluläre Lokalisation erste Hinweise auf eine mögliche physiologische Funktion zu erhalten, wurden immuncytochemische Analysen an reifen Spermien durchgeführt. Dazu wurden Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert, fixiert und mit den validierten Tas1r3 Antiseren inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers wurde mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers (grün) nachgewiesen. Zur Orientierung wurde daran anschließend der Zellkern der Spermien mit dem DNA-Marker Propidiumiodid (in blau dargestellt) gegengefärbt.

Bei den Analysen mit dem Tas1r3 M und dem Tas1r3 A Antiserum wurde eine deutliche Markierung in den Spermienzellen registriert (Abbildung 4.36, [A und E bzw. D und G]). Diese Immunreaktivität war im Kopfbereich auf die akrosomale Sichel konzentriert (Abbildung 4.36 [E] und [G], Pfeilspitze). Darüber hinaus war eine Markierung im Hauptstück des Flagellums auszumachen (Abbildung 4.36 [E] und [G], Pfeil). In Blockierungsexperimenten, in denen das Tas1r3 M Antiserum mit einem Überschuss seines immunogenen Peptids vorinkubiert wurde, ließ sich die Immunreaktivität des Tas1r3 M Antiserums im Spermium vollständig blockieren: Wie Abbildung 4.36 [B und F] zeigt, war die grüne Färbung sowohl im Kopfbereich des Spermiums als auch im Flagellum vollständig verschwunden. Das im Spermium erkannte Antigen scheint demnach dem immunogenen Tas1r3 Peptid zu entsprechen.

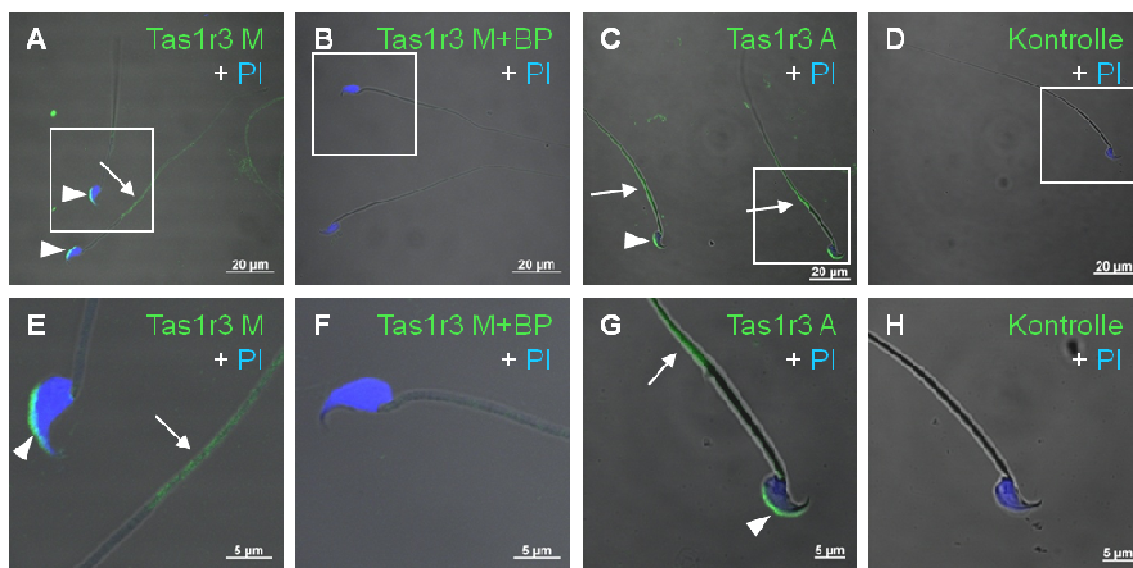


Abbildung 4.36: Immuncytochemischer Nachweis des Tas1r3 Proteins in Mausspermien.

Methanol-fixierte Spermienpräparate der Maus wurden mit einem der beiden Tas1r3 spezifischen Antisera [*Tas1r3 M*; *Tas1r3 A*] (1:200 verdünnt) bzw. mit einem Antikörper und dem entsprechenden Blockierungspeptid [*Tas1r3 M + BP*] inkubiert. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde dieser 15 Minuten mit Propidiumiodid ([PI], blau dargestellt) gefärbt.

Die Inkubation mit beiden Tas1r3-spezifischen Antisera resultierte in einer vergleichbaren Immunfärbung der akrosomalen Sichel [A, E und C, G; Pfeilspitze] sowie einer Markierung des Flagellums, die auf das Hauptstück konzentriert war [A, E und C, G; Pfeil]. Nach einer Vorinkubation des Antikörpers mit dem korrespondierenden Blockierungspeptid [*Tas1r3 M + BP*] ist keine Immunfärbung mehr auszumachen. Kontrollansätze, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden [D, H, Kontrolle], weisen keine Immunreaktivität auf.

Dargestellt sind Überlagerungen der Phasenkontrastaufnahme und der Fluoreszenzkanäle (grün: FITC; blau: Propidiumiodid). Der jeweils verwendete Primärantikörper ist im Bild angegeben.

Um zu prüfen, ob die beobachtete sichelförmige Immunreaktivität der Tas1r3 Antisera im Spermienkopf mit dem akrosomalen Vesikel übereinstimmt, wurden Co-Färbungen mit einem Fluorochrom-gekoppelten PNA (TRITC-PNA), einem Lektin, das spezifisch an Glykoproteine des Akrosoms bindet (siehe auch Abschnitt 4.1.3), durchgeführt. In Abbildung 4.37 [B und E] wird deutlich, dass nach der Inkubation der Zellen mit dem TRITC-gekoppelten PNA ein sichelförmiges rotes Fluoreszenzsignal im Akrosom des Spermienkopfes zu registrieren war. Der Vergleich dieser Markierung mit der Immun-

reaktivität der Tas1r3 Antiseren (Abbildung 4.37 [A und D]) zeigte eine klare Übereinstimmung der beiden Markierungen: In der Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzkanäle entstand ein halbmondförmiges gelbes Fluoreszenzsignal (Abbildung 4.37 [C und F]), das belegt, dass die Tas1r3 Immunreaktivität der Tas1r3 Antiseren im Spermienkopf tatsächlich auf das Akrosom konzentriert ist.

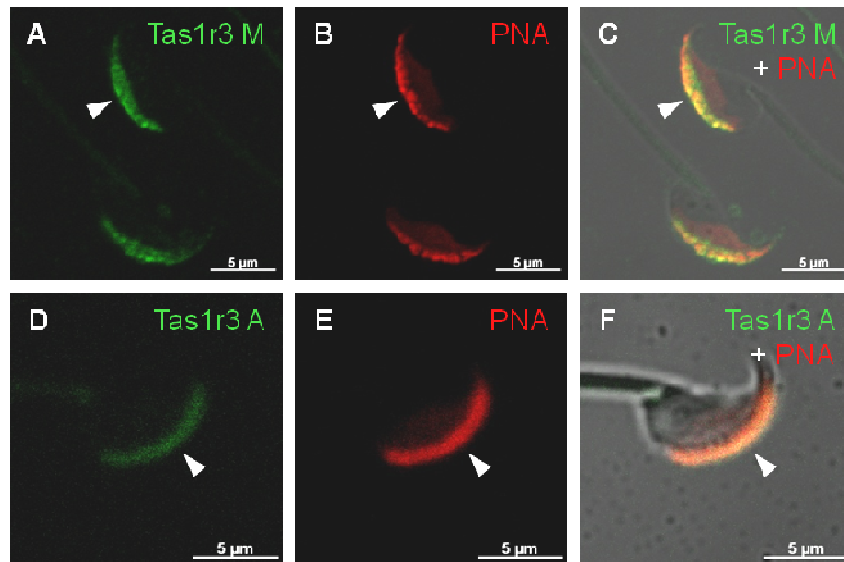


Abbildung 4.37: Analyse der subzellulären Lokalisation des Tas1r3 Rezeptors in Spermien der Maus.

Isolierte caudale Spermien der Maus wurden mit Methanol bzw. Aceton fixiert, mit einem der beiden Tas1r3-Antikörper inkubiert und der Primärantikörper dann mit Hilfe FITC-gekoppelter anti-Kaninchen IgG (grün) sichtbar gemacht. Zur Visualisierung des Akrosoms wurden die Spermien anschließend mit einem TRITC-gekoppelten *Peanut agglutinin* ([PNA], rot) inkubiert.

Die Tas1r3 Immunreaktivität [A, D; grün] zeigt für beide Antiseren eine deutliche Übereinstimmung [C, F; Tas1r3 M/A + PNA; gelb] mit der sichelförmigen PNA-Markierung [B, E; rot]; darüber hinaus ist keine weitere Immunfärbung des Spermienkopfes zu detektieren.

Dargestellt sind jeweils der grüne Fluoreszenzkanal [Tas1r3; links], das rote Fluoreszenzsignal [PNA; Mitte] sowie eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle mit der Phasenkontrastaufnahme [Tas1r3 M/A + PNA, rechts]. Überlappende Co-Färbungen werden durch ein gelbes Fluoreszenzsignal repräsentiert. Die verwendeten Primärantikörper bzw. das Lektin sind jeweils im Bild angegeben.

[A-C] Tas1r3 M; [D-F] Tas1r3 A.

Durch die bisher erfolgten immunhistochemischen und immuncytochemischen Analysen kann somit von einer Expression des Geschmacksrezeptors Tas1r3 in Keimdrüsengewebe und sowie im Akrosom und Flagellum reifer Spermien der Maus ausgegangen werden.

4.4.3 Expression des Tas1r3 Rezeptors im Keimdrüsengewebe der Ratte

Um zu klären, ob die Expression des Tas1r3 auf Mausspermien beschränkt ist oder auch in anderen Nagerspezies zu beobachten ist, wurden im Anschluss immunhistochemische und immuncytochemische Untersuchungen an männlichen Keimzellen der Ratte durchgeführt.

Abbildung 4.38 fasst die Resultate der zunächst durchgeführten Spezifitätstests des Tas1r3 M und des Tas1r3 R Antiserums (siehe auch Abschnitt 4.4.2) an Gefrierschnitten der Wallpapille der Ratte zusammen. Mit beiden Antiseren war eine Immunreaktivität in einzelnen Sinneszellen der Wallpapille, die zur Übersicht jeweils umrandet wurde, zu detektieren (Abbildung 4.38 [A und E] und [C und G]). Eine Vorinkubation des Tas1r3 M Antiserums mit dem korrespondierenden Peptid resultierte in der Wallpapille nur in einer leichten Verminderung aber keiner vollständigen Blockierung der Immunreaktivität (Abbildung 4.38 [B und F]).

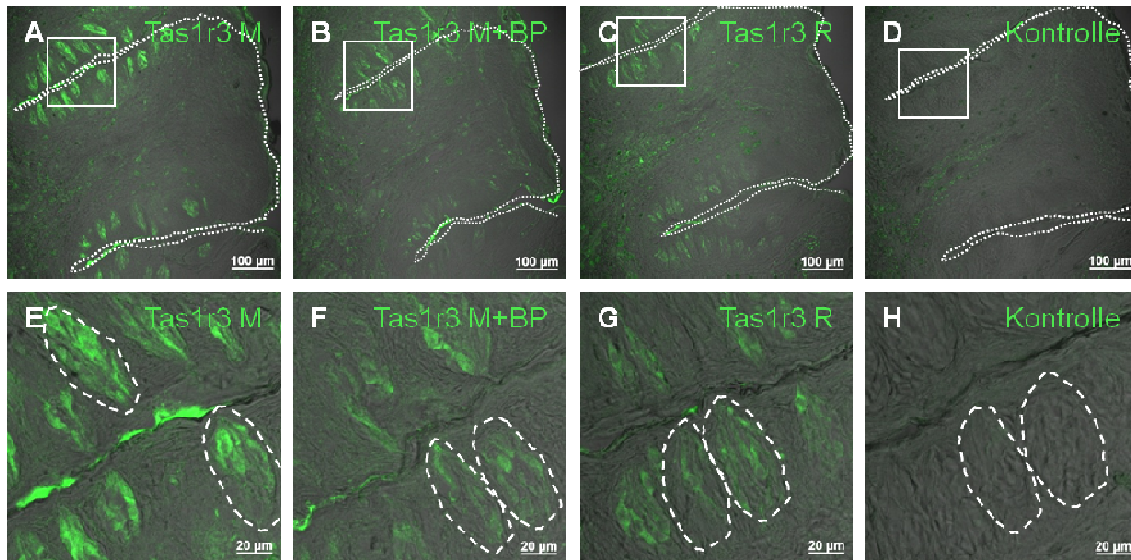


Abbildung 4.38: Immunhistochemische Analyse der Tas1r3 Expression im Geschmacksgewebe der Ratte.

Gefrierschnitte der Wallpapille einer Ratte wurden mit zwei verschiedenen anti-Tas1r3 Antiseren [*Tas1r3 M*, *Tas1r3 R*] inkubiert und die Antikörperbindung dann durch ein FITC-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:750; grün) nachgewiesen.

Beide Tas1r3-spezifischen Antiseren führen zu einer Immunmarkierung der Geschmacksknospen der Wallpapille [A, C]. In den vergrößerten Ausschnitten [E, G] wird deutlich, dass diese Immunreaktivität auf einzelne Geschmackssinneszellen konzentriert ist. Eine Vorinkubation des Tas1r3 M IgG mit dem immunogenen Peptid führt zu einer verminderten Immunmarkierung [B, F; *Tas1r3 M + BP*]. Kontrollansätze, in denen kein Primärantikörper eingesetzt wurde, zeigen keine Reaktivität mit dem Sekundärantikörper [D, H; *Kontrolle*].

Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. Die verwendeten Erstantikörper sind im Bild oben rechts angegeben.

Um die Expression des Tas1r3 im Keimdrüsengewebe der Ratte zu prüfen, wurden die beiden Antiseren anschließend in immunhistochemischen Analysen an Gefrierschnitten des Rattenhodens eingesetzt. In diesen Ansätzen war sowohl unter Verwendung des Tas1r3 M als auch des Tas1r3 R Antiserums eine vergleichbare Immunfärbung zu registrieren (Abbildung 4.39): Die Inkubation mit den Antiseren resultierte in einer starken grünen Markierung der angeschnittenen Tubuli ([A] und [C]). Die Immunreaktivität war dabei nicht diffus im Gewebe verteilt, sondern in länglichen, sichelförmigen Strukturen der späten Keimzellschichten konzentriert, die wahrscheinlich Akrosomen von elongierten Spermatozoen darstellten (Abbildung 4.39 [E] und [G]). Eine Blockierung der Antigen-Bindestellen des Tas1r3 M Antiserums mit dem Peptid, gegen

das es generiert wurde, führte zu einer deutlichen Reduktion der Immunreaktivität (Abbildung 4.39 [B und F]). Diese Verminderung der Immunfärbung war ähnlich stark ausgeprägt wie in der Wallpapille, in der ebenfalls keine komplette Blockierung des Signals registriert wurde.

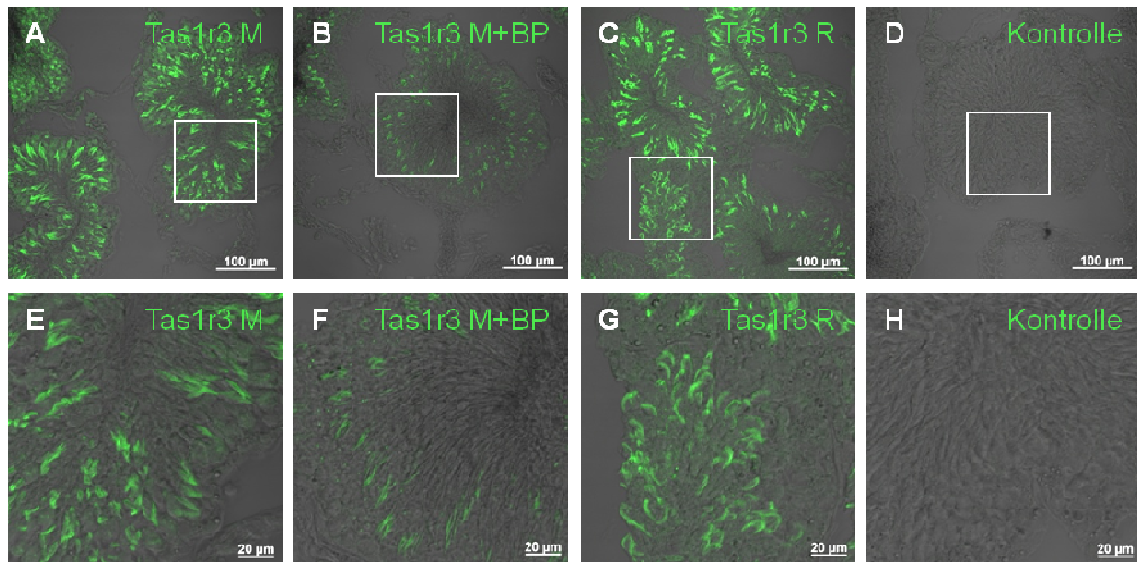


Abbildung 4.39: Immunhistochemischer Nachweis des Tas1r3 Proteins im Rattenhoden.

Vorfixierte Gefrierschnitte des Rattenhodens wurden mit zwei unterschiedlichen Tas1r3 Antiseren [*Tas1r3 M*, *Tas1r3 R*] bzw. mit dem Primärantikörper und dem entsprechenden Blockierungspeptid [*Tas1r3 M+BP*] immunhistochemisch analysiert.

Nach Inkubation mit den Tas1r3-spezifischen IgG zeigen die Hodenschnitte eine deutliche grüne Markierung der Hodentubuli [A, C]. Die Immunreaktivität des Tas1r3 M Antiserums ist in büschelartigen Strukturen konzentriert [E, *Tas1r3 M*]. Der Tas1r3 R Antikörper zeigt außerdem eine sichelförmige Markierung innerhalb der Tubuli [G, *Tas1r3 R*]. In Blockierungsexperimenten kann die Immunreaktivität des Tas1r3 M Antiserums leicht, aber nicht vollständig vermindert werden [B, F; *Tas1r3 M+BP*]. Kontrollpräparate [Kontrolle] zeigen keine Immunmarkierung durch den Sekundärantikörper.

Gezeigt sind Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme. Die Boxen in den oberen Bildern [A-D] markieren den Ausschnitt, der im jeweiligen unteren Bild vergrößert dargestellt ist [E-H]. In Kontrollansätzen wurde kein Primärantikörper eingesetzt [B, F, und D, H; Kontrolle].

Im Folgenden sollten Hinweise auf eine Expression und Lokalisation des Tas1r3 in reifen Rattenspermien gesammelt werden. Wie Abbildung 4.40 verdeutlicht, führte die Inkubation von isolierten Spermien der Ratte mit den zuvor beschriebenen Antiseren zu einer Immunfärbung ([E] und [G], Pfeilspitze) des hakenförmigen Spermienkopfes (zur Übersicht über die Spermienmorphologie der Ratte siehe Abbildung 4.7 [B]). Mit dem Tas1r3 M Antiserum war zudem eine schwache Färbung des Flagellums zu detektieren ([A], Pfeile). Durch eine Co-Färbung mit einem TRITC-gekoppelten PNA ([PNA], rot) konnte anhand des gelben Überlagerungssignals ([K]) bestätigt werden, dass die schmale Immunmarkierung des Spermienkopfes ([E]) mit dem Akrosom ([J]) übereinstimmte. In Kontrollansätzen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, konnte neben der Kernmarkierung durch Propidiumiodid ([PI]) bzw. der PNA-Färbung des Akrosoms [L] keine Immunreaktivität registriert werden (Abbildung 4.32). Die Inkubation reifer Spermien mit dem Tas1r3 M Antiserum und seinem immunogenen Peptid führte, wie auch in den immunhistochemischen Analysen der CV und des

Hodens, nur zu einer leichten Verminderung der grünen Immunfärbung (Abbildung 4.40 [B und F]).

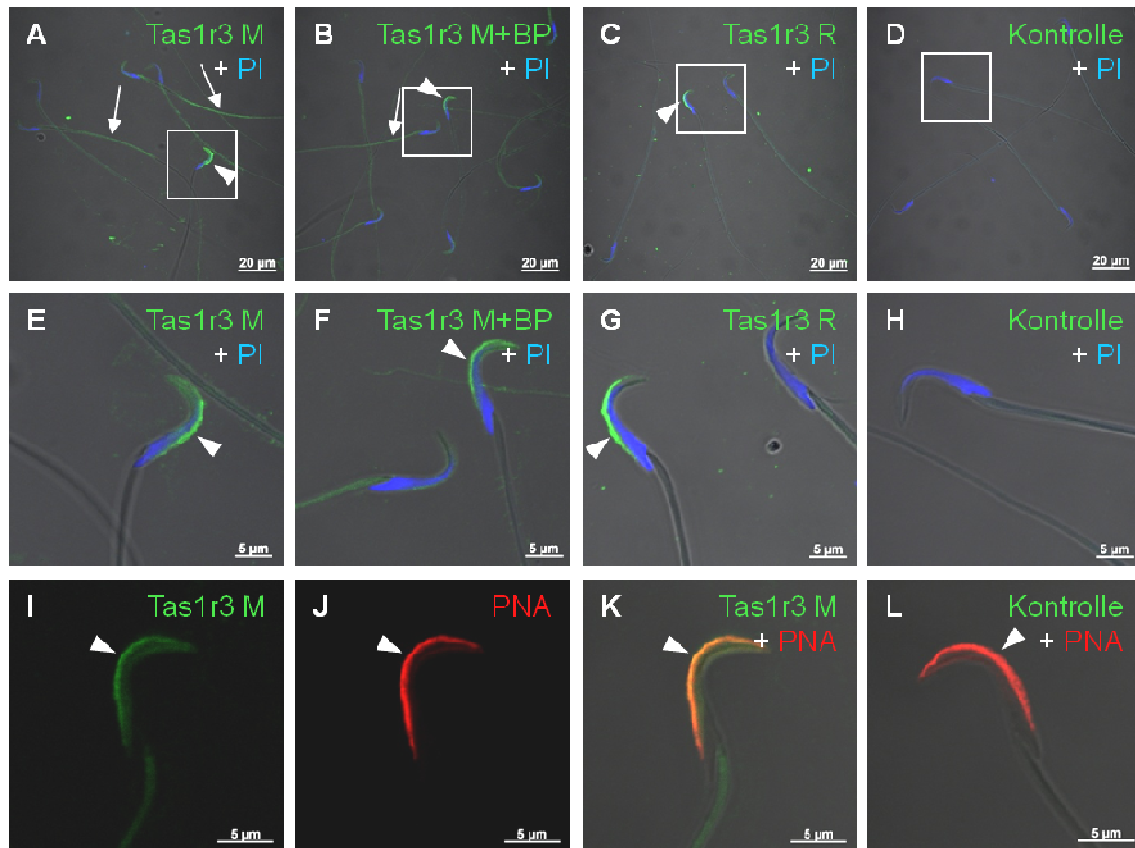


Abbildung 4.40: Analyse der Tas1r3 Expression und Lokalisation in Spermien der Ratte.

Methanol-fixierte Rattenspermien wurden mit einem der Tas1r3 spezifischen Antiseren inkubiert [*Tas1r3 M*; *Tas1r3 R*] (1:500 verdünnt) bzw. mit einem Antikörper und dem entsprechenden Blockierungspeptid [*Tas1r3 M + BP*] inkubiert. Der Nachweis der Immunreaktivität erfolgte durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (grün), Kontrollansätze wurden nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde dieser 15 Minuten mit Propidiumiodid ([PI], blau dargestellt) gefärbt [A - H]. Bei Co-Färbungen mit PNA erfolgte nach der Antikörperinkubation eine Behandlung der Präparate mit dem TRITC-gekoppeltem Lektin (rot dargestellt) [I - L].

Die Inkubation mit beiden Tas1r3-spezifischen Antikörpern resultiert in einer Immunfärbung der akrosomalen Sichel [A, E und C, G; Pfeilspitze]. Mit dem Tas1r3 M IgG ist außerdem eine Immunreaktivität im Flagellum des Rattenspermiums feststellbar [A, *Tas1r3 M*; Pfeil]. Durch eine Vorinkubation des Antikörpers mit seinem Blockierungspeptid [*Tas1r3 M + BP*] ist die Immunfärbung reduziert, es bleibt jedoch eine schwache Markierung des Flagellums [B; Pfeil] sowie des Akrosoms [B, F; Pfeilspitze] erhalten. Die sichelförmige Markierung des Spermienkopfes durch das Tas1r3 M IgG ([I], grün) zeigt eine starke Co-Lokalisation ([K], gelb-orange Farbe) mit dem Akrosomenmarker PNA ([J] rot). In den Kontrollansätzen [D, H, L, *Kontrolle*] ist keine Immunreaktivität feststellbar.

Dargestellt sind Überlagerungen der Phasenkontrastaufnahme und der Fluoreszenzkanäle ([A - H], grün: FITC; blau: Propidiumiodid) bzw. ([I-L] grün: FITC, rot: PNA) und Einzelfluoreszenzaufnahmen [I, J].

Die in den mittleren Bildern [D - F] vergrößert dargestellten Bereiche sind in den oberen Bildern [A - D] durch weiße Boxen gekennzeichnet. Der jeweils verwendete Primärantikörper und die entsprechende Co-Färbung (PI: Zellkern; PNA: Akrosom) sind im Bild angegeben.

4.4.4 Analyse der Expression von Geschmacksrezeptoren der Tas1r-Familie in humanen Spermien

Um der Frage nachzugehen, ob die in Nagerspermien identifizierten Geschmacksrezeptoren der Tas1-Familie auch in Keimzellen des Menschen exprimiert werden und dort möglicherweise eine physiologische Funktion für eine erfolgreiche Reproduktion erfüllen könnten, wurde immunocytochemisch analysiert, ob auch in humanen Spermien Tas1-Rezeptoren nachzuweisen sind.

Im Gegensatz zu der stark eingeschränkten Verfügbarkeit von funktionellen Antiseren zur Erkennung der Tas1-Rezeptoren von Nagern, stand für diese Analysen eine größere Auswahl verschiedener Subtyp-spezifischer Antiseren zur Detektion der Tas1r-Proteine des Menschen zur Verfügung. Um festzustellen, welche der vorliegenden Antiseren tatsächlich geeignet waren, humane Geschmacksrezeptoren spezifisch zu binden und nachzuweisen, wurden zunächst experimentelle Ansätze zur Validierung dieser Antikörper durchgeführt. Da für diese Untersuchungen kein humanes Geschmacksgewebe zur Verfügung stand, wurde die Antikörperqualität an heterolog exprimierten humanen Tas1-Rezeptorproteinen geprüft. Zur Gewinnung dieser Proteine wurden HEK293-Zellen mit Tas1r-Konstrukten transfiziert, die zum besseren immunologischen Nachweis an eine kurze Peptidsequenz (*tag*) gekoppelt waren. Die stabil transfizierten Zellen und Plasmide der Tas1-Rezeptoren wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof (DIfE, Potsdam) zur Verfügung gestellt. Zur heterologen Expression des Tas1r2 wurde ein Flag-gekoppeltes Tas1r2-Rezeptorkonstrukt verwendet, das transient in HEK293-Zellen transfiziert wurde und mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Die humanen Tas1r1 und Tas1r3-Rezeptoren, die jeweils an eine Herpes-simplex-Virus-Peptidsequenz (*HSV-tag*) fusioniert waren, waren stabil in HEK293-Zellen transfiziert. Die Expression dieser HSV-gekoppelten Rezeptoren wurde durch Zugabe von Tetrazyklin ins Zellkulturmedium induziert (siehe Abschnitt 3.3.1).

In Einstiegsexperimenten wurde zunächst die heterologe Expression der Rezeptoren in immunocytochemischen (Daten nicht gezeigt) und Western Blot Analysen der Zelllinien verifiziert. Dazu wurden Proben nativer und transient transfizierter Zellen (Tas1r2) bzw. nicht-induzierter und Tetrazyklin-induzierter Zellen (Tas1r1, Tas1r3) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der erfolgreichen Proteinexpression erfolgte anschließend mit spezifischen Antikörpern, die gegen das jeweilige Protein-*tag* gerichtet waren (Tas1r2: anti-Flag; Tas1r1, Tas1r3: anti-HSV); die Bindung der Primärantikörper wurde mit Hilfe des ECL-Verfahrens visualisiert. Um festzustellen, ob die Subtyp-spezifischen Tas1r-Antiseren die exprimierten Rezeptorproteine erkennen, wurde parallel geprüft, ob eine Inkubation mit den anti-Tas1r Antiseren im gleichen Bandenmuster resultierte, das auch mit den *tag*-Antikörpern registriert wurde.

In Abbildung 4.41 sind die Befunde dieser Untersuchungen zur Antikörper-Validierung exemplarisch zusammengefasst. Bei den Analysen konnte in den Zellen, in denen die

Tas1r1 Expression durch Tetrazyklin induziert ([+]) worden war, eine einzelne starke Bande mit einer Größe von ca. 90 kDa detektiert werden (Abbildung 4.41 [A], linker Blot [HSV]). Da das HSV-tag aufgrund seiner geringen Masse von ca. 1,3 kDa nur einen geringen Anteil an der Gesamtgröße des Fusionsproteins hat, stimmte diese beobachtete molekulare Masse sehr gut mit der berechneten Proteingröße des Tas1r1 (93 kDa) überein. In HEK293-Zellen ohne Induktion der Rezeptorexpression ([−]) war keinerlei Reaktivität erkennbar (Abbildung 4.41 [A], linker Blot [HSV]), was auf eine hochspezifische Erkennung des Tas1r1-HSV Proteins durch den anti-HSV-Antikörper hindeutet.

Erfreulicherweise ergab sich bei Verwendung eines Antiserums der Firma Acris, das gegen eine Peptidsequenz des humanen Tas1r1 gerichtet war und im Folgenden als Tas1r1 hA (human Acris) bezeichnet wird, ein fast identisches Bandenmuster: Während in den Zellen ohne Rezeptorexpression ([−]) keine Banden zu registrieren waren, war in den induzierten Tas1r1-exprimierenden Zellen ([+]) eine einzelne immunreaktive Bande mit der erwarteten Größe von ca. 90 kDa zu detektieren (Abbildung 4.41 [A], rechter Blot [Tas1r1]). Diese Übereinstimmung im Bandenmuster zwischen dem Antikörper gegen das Protein-tag (anti-HSV) und dem Subtyp-spezifischen Antiserum (Tas1r1 hA) zeigte eine sehr spezifische Bindung des Geschmacksrezeptors durch das Tas1r1 Antiserum an.

In den Zellen, die transient mit einem Tas1r2-Flag-Konstrukt transfiziert wurden, wurde die Effizienz der heterologen Rezeptorexpression mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers untersucht (Abbildung 4.41 [B], linker Blot [Flag]). Die Immunoblot-Ansätze der transfizierten Zellen ([+]) zeigten zwei deutliche Proteinbanden mit einer Größe von ca. 60 kDa und 90 kDa sowie einige weitere schwache Banden. In den nativen Zellen ([−]) war dagegen nur eine schwach immunreaktive Bande von ca. 60 kDa Größe zu registrieren (Abbildung 4.41 [B], linker Blot [Flag]), so dass von einer erfolgreichen Expression des Tas1r2-Flag Proteins in den transfizierten HEK293-Zellen ausgegangen wurde. Das exprimierte Rezeptorprotein wurde auch durch das Tas1r2 Antiserum (Tas1r2 hA, Acris) markiert (Abbildung 4.41 [B], rechter Blot [Tas1r2 hA]). Allerdings war mit diesem Antiserum auch eine intensive Bande einer Größe von ca. 130 kDa zu detektieren, die nicht nur in den transfizierten Zellen sondern auch in nativen HEK293-Zellen zu beobachten war, so dass neben dem Tas1r2-Rezeptor möglicherweise auch noch andere Proteine durch das Tas1r2 hA Antiserum erkannt wurden.

Vergleichbar zum Tas1r1 wurde auch beim HSV-gekoppelten Tas1r3 Rezeptor eine starke induzierte Proteinexpression beobachtet (Abbildung 4.41 [C und D], linke Blots [HSV]): In den Tetrazyklin-behandelten Zell-Proben ([+]) konnte nach Inkubation mit dem anti-HSV Antikörper eine einzelne intensive Bande von ca. 100 kDa registriert werden, während in den nicht-induzierten Zellen ([−]) keine immunreaktiven Banden zu detektieren waren.

Eine Erkennung des Tas1r3-Rezeptors durch einen Subtyp-spezifischen humanen Tas1r3 Antikörper konnte in Immunoblots mit einem anti-Tas1r3 Antiserum der Firma

Acris (Tas1r3 hA) belegt werden (Abbildung 4.41 [C], rechter Blot [*Tas1r3 hA*]): Die Immunreaktivität des Tas1r3 hA Antiserums zeigte eine starke Übereinstimmung mit dem Markierungsmuster des HSV-Antikörpers, der zum Nachweis des Tas1r3-HSV Proteins eingesetzt wurde.

Neben dem kommerziell erhältlichen Tas1r3 hA Antikörper wurde ein weiteres Tas1r3 Antiserum erfolgreich zum Nachweis des Tas1r3 Proteins eingesetzt. Dieses Antiserum (Tas1r3 hM), das gegen die Aminosäuren 829 – 843 des humanen Rezeptors gerichtet war [Max et al., 2001], wurde freundlicherweise von R. Margolskee (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt. Die Anwendung dieses Antiserums im Immunoblot-Verfahren resultierte ebenfalls in einer intensiven Bande von ca. 100 kDa (Abbildung 4.41 [D], rechter Blot [*Tas1r3 hM*]), die der Größe des exprimierten Tas1r3-HVS Proteins ([+]) entsprach. Allerdings waren zusätzlich zu dieser stark immunreaktiven Bande auch weitere, deutlich schwächere Banden auszumachen, die auch in den Zellen ohne Expression des Tas1r3-Rezeptors ([-]) detektiert werden konnten (Abbildung 4.41 [D], rechter Blot [*Tas1r3 hM*]), so dass neben der spezifischen Erkennung des Tas1r3 auch eine schwache Kreuzreaktivität dieses Antiserums mit anderen Proteinen vorlag.

In weiteren Western Blot Analysen mit Antiseren der Firmen Genetex und Abnova (siehe Abschnitt 2.4.1), die ebenfalls gegen humane Tas1-Rezeptoren gerichtet waren, konnte im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Antiseren keine Bindung an die heterolog exprimierten Tas1-Rezeptoren detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Demzufolge konnten diese Antiseren nicht für den Nachweis von Tas1-Rezeptoren in humanen Spermien verwendet werden.

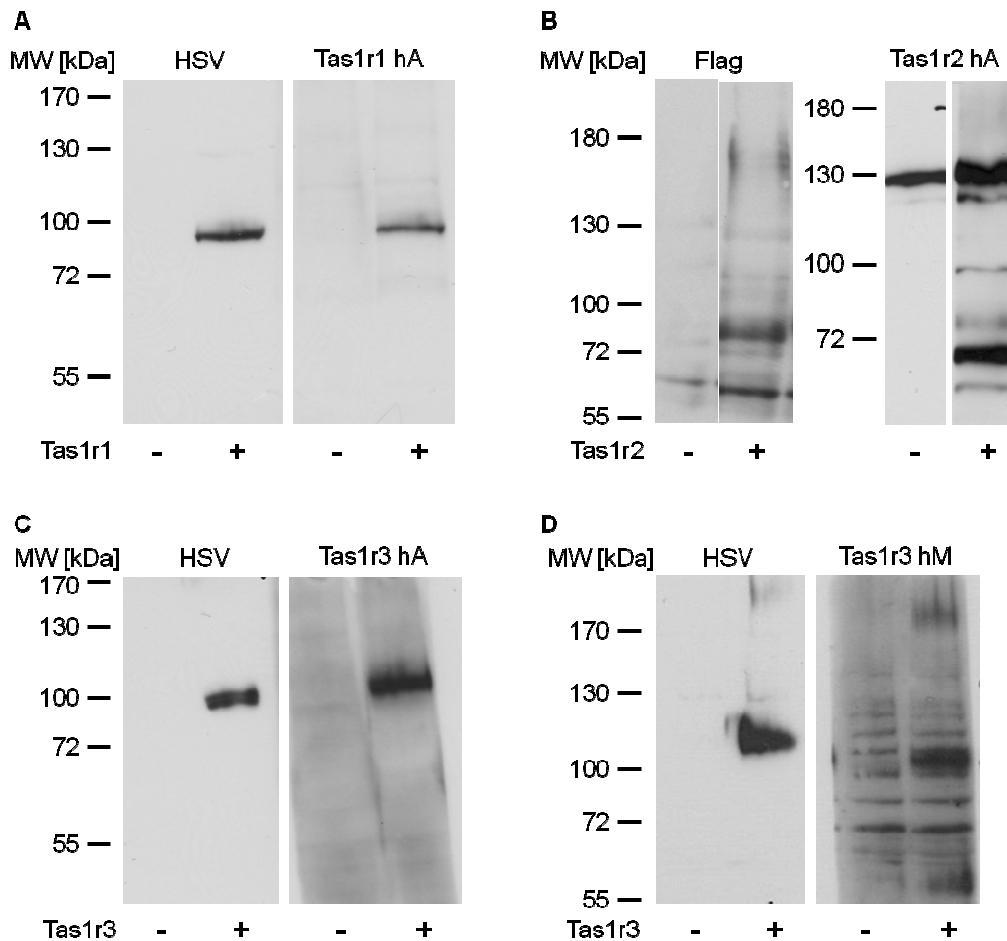


Abbildung 4.41: Kontrolle der Spezifität von humanen Tas1r Antikörpern im Western Blot.

In stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde durch Behandlung mit Tetracyclin die Expression von HSV-tag gekoppelten Tas1r1 bzw. Tas1r3 Proteinen induziert. Zur Validierung des Tas1r2 Antikörpers wurden native HEK293-Zellen [-] transient mit einem Flag-markierten Tas1r2 Konstrukt transfiziert [+]. Die Zellen wurden in 2 x Probenpuffer lysiert und anschließend auf einem 7%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit den angegebenen Antikörpern inkubiert.

[A] Nicht-induzierte Zellen [-] zeigen keine Immunreaktivität gegen das anti-HSV IgG [HSV] oder das Tas1r1 hA IgG [Tas1r1 hA]. Nach der Induktion der Rezeptorexpression [+] zeigt sich mit dem HSV-Antikörper eine einzelne Bande der erwarteten Größe von ca. 90 kDa. Diese einzelne immunreaktive Bande ist auch mit dem Tas1r1 hA IgG zu detektieren.

[B] In den nativen HEK293-Zellen [-] ist keine Immunreaktivität gegen das anti-Flag IgG zu erkennen [Flag]. Nach Transfektion mit dem Tas1r2 Konstrukt [+] treten immunreaktive Banden mit einer Größe von ca. 90 kDa und 60 kDa auf. Der anti-Tas1r2 hA Antikörper markiert in den nativen HEK293-Zellen eine Bande von ca. 130 kDa. In den transfizierten Zellen sind zusätzlich zu dieser immunreaktiven Bande noch weitere bei ca. 100 kDa, 70 kDa und 60 kDa Größe zu erkennen [Tas1r2 hA].

[C] Die nicht-exprimierenden HEK293-Zellen [-] zeigen keine Immunmarkierung mit dem anti-HSV- und dem Tas1r3 hA Antikörpern [HSV; Tas1r3 hA]. In induzierten Zellen [+], die das Tas1r3-HSV Protein exprimieren, ist mit beiden Antikörpern eine einzelne immunreaktive Bande von ca. 100 kDa nachzuweisen.

[D] Während der HSV-Antikörper nur in den Tas1r3-exprimierenden Zellen [+] eine einzelne Bande mit einer Masse von ca. 100 kDa detektiert [HSV], zeigt das anti-Tas1r3 hM IgG in beiden Proben ein schwaches, leiterartiges Bandenmuster [Tas1r3 hM]. Zusätzlich erscheint bei den induzierten Zellen [+] eine deutliche immunreaktive Bande, die im gleichen Größenbereich wie die HSV-positive Bande liegt.

Um zu klären, welche der Tas1-Rezeptoren in männlichen Keimzellen des Menschen exprimiert werden, wurden die validierten Antiseren anschließend in immuncytochemischen und Western Blot Analysen an humanen Spermien eingesetzt. Dazu wurden

Spermien durch ein „Swim-up“ Verfahren (Abschnitt 3.2.4.1) aus menschlichem Ejakulat gewonnen, auf Objektträger ausgestrichen, mit einer eiskalten Methanol/Aceton-Mischung (1 : 1) fixiert und anschließend mit dem Tas1r1 hA Antiserum inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) nachgewiesen und die Zellkerne durch eine Färbung mit Propidiumiodid visualisiert (in blau dargestellt).

Interessanterweise resultierte die Inkubation mit dem Tas1r1 Antiserum in den isolierten humanen Spermien sowohl in einer Markierung des Flagellums als auch des Spermienkopfes (Abbildung 4.42 [A-B]). In Abbildung 4.42 sind zwei exemplarische Beispiele dieser Tas1r1-Immunfärbung dokumentiert: Während der distale Teil des Spermenschwanzes nur eine schwache Färbung zeigte, war im Mittelstück und der Halsregion eine starke Markierung des Flagellums auszumachen (Abbildung 4.42 [A und B], Pfeil). Die intensive Immunreaktivität des Flagellums im Halsbereich ging im Spermienkopf in die postakrosomalen Region über und reichte bis an das Äquatorialsegment heran (Abbildung 4.42 [F], Pfeil). In Blockierungsexperimenten, in denen das Antiserum mit seinem immunogenen Peptid zusammen inkubiert wurde, war keine Immunreaktivität mehr nachweisbar (Abbildung 4.42 [C und G]), wodurch die Spezifität der Erkennung des Tas1r1 in humanen Spermien belegt werden konnte.

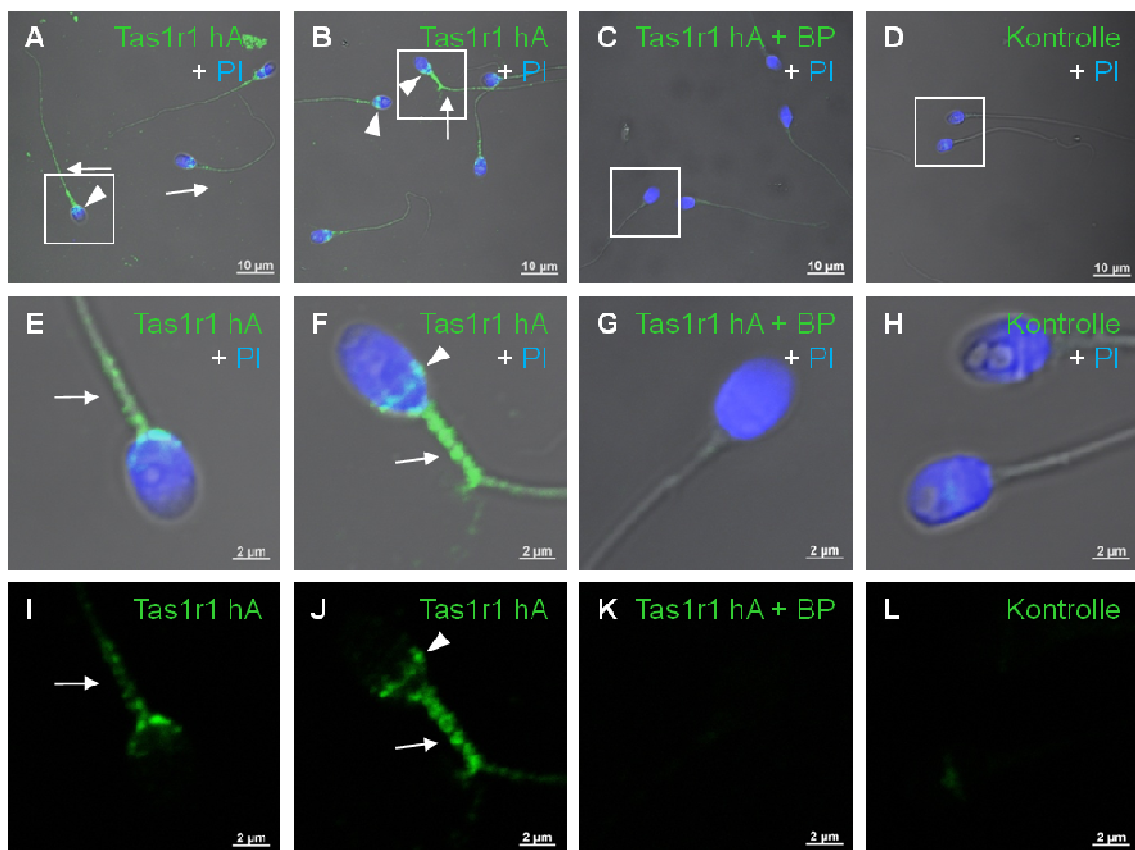


Abbildung 4.42: Immuncytochemische Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Tas1r1 Rezeptors in humanen Spermien.

Fixierte humane Spermien wurden mit dem Tas1r1 hA Antiserum (1:100) [*Tas1r1 hA*] bzw. mit dem Antiserum und dem entsprechenden Blockierungspeptid (fünffach konzentriert) [*Tas1r3 hA + BP*] inkubiert.

Die Bindung des Primärantikörpers wurde durch FITC-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1 : 750, grün) nachgewiesen. Im Anschluss wurde der Zellkern durch eine kurze Inkubation (15 sec) mit Propidiumiodid ([PI], blau) gefärbt. Bei Inkubation mit dem anti-Tas1r1 Antiserum zeigt sich eine deutliche Markierung des Flagellums, die im Hals- und Mittelstück am stärksten ausgeprägt ist [A, B, E, F; Pfeil]. Im Bereich des Spermienkopfes ist die Tas1r1 Immunreaktivität im Äquatorialssegment und im postakrosomalen Bereich lokalisiert [F, Pfeilspitze]. Durch Vorinkubation des Antikörpers mit seinem immunogenen Peptid [Tas1r1 hA + BP] lässt sich die Immunreaktivität komplett aufheben [C, G]. Im Kontrollansatz [Kontrolle], der nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde, ist keine Immunreaktivität erkennbar. Dargestellt sind Überlagerungen der Fluoreszenzkanäle (grün: FITC; blau: PI) mit einer Phasenkontrastaufnahme [A - H], sowie eine einzelne Aufnahme des grünen Fluoreszenzsignals [I - L]. Der markierte Bereich der oberen Bilderreihe ist in den unteren zwei Reihen vergrößert gezeigt.

Da das Verfahren des Western Blottings es erlaubt, durch die Bestimmung der molekularen Größe eines Proteins Rückschlüsse auf dessen Identität zu ziehen, wurde diese Technik eingesetzt, um den immuncytochemischen Nachweis des Tas1r1 Proteins in humanen Spermien zu verifizieren.

Um eine ausreichende Menge des Geschmackrezeptorproteins einzusetzen, wurden für diese Untersuchungen grobe Membranfraktionen (P₂-Fraktionen) aus homogenisierten Spermien verwendet (Abbildung 4.43 [A]), die sich durch eine Anreicherung von membranständigen Proteinen auszeichnen. In Parallelansätzen wurde zudem das heterolog exprimierte Tas1r1-HSV Protein aufgetrennt und analysiert, um die Spezifität der Antikörperreaktion sicherzustellen (Abbildung 4.43 [B]).

In den Immunoblots mit Proteinpräparationen der humanen Spermien [Sp] war, wie auch in den Ansätzen mit Tas1r1-exprimierenden Zellen [HEK RI], eine einzelne immunreaktive Bande zu detektieren (Abbildung 4.43). Beim Vergleich der molekularen Größe der detektierten Proteine fiel jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Spermienpräparationen und den heterolog exprimierenden Zellen auf: Während in den Tas1r1-positiven Zellen eine Bande mit der für den Tas1r1 erwarteten Größe von 90 kDa markiert wurde (Abbildung 4.43 [B], [AK]), war das in den Spermienproben detektierte Protein mit ca. 55 kDa deutlich kleiner (Abbildung 4.43 [A], [AK]). In experimentellen Ansätzen, in denen das Antiserum mit seinem korrespondierenden Peptid vorinkubiert wurde, konnte die Immunreaktivität in beiden Zell-Präparationen allerdings vollständig blockiert werden [AK + BP], was auf eine spezifische Erkennung des Antigens in beiden Proben hindeutet (Abbildung 4.43).

Interessanterweise finden sich in der NCBI-Datenbank neben der „klassischen“ langen Tas1r1-Sequenz (ca. 90 kDa) auch kürzere Tas1r1-Isoformen: So konnte bereits eine Isoform bestätigt werden, die nur 65 kDa groß ist (Isoform c, *Accession Nummer* NP_803884.1). Eine weitere Isoform mit einer Größe von 52 kDa wurde ebenfalls zwischenzeitlich beschrieben (NM_177539.1), diese konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden. Bei dem deutlich kleineren Protein in den Spermienpräparationen könnte es sich demnach um eine verkürzte, eventuell Keimzell-spezifische Isoform des Tas1r1 handeln.

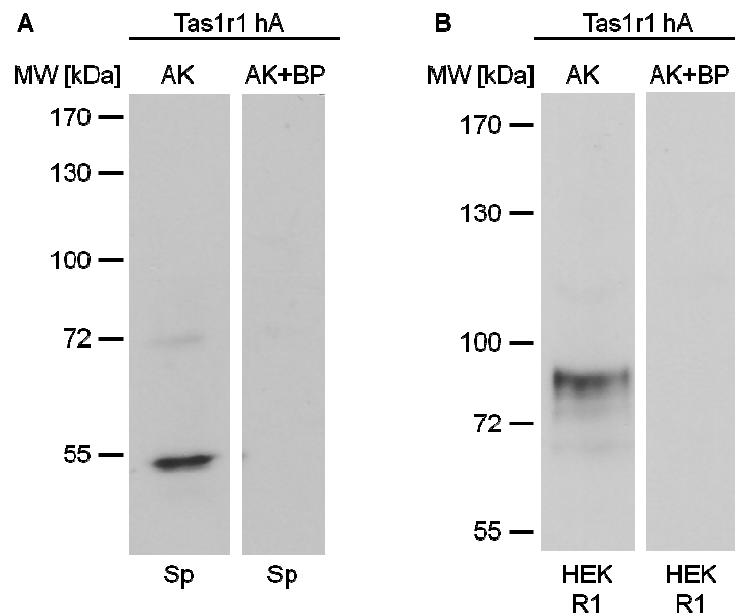


Abbildung 4.43: Western Blot Analyse der Tas1r1 Expression in humanen Spermien und transfizierten HEK293-Zellen.

Es wurden Membranpräparationen (P_2 -Fraktionen) von humanen Spermien [Sp] und Totalfraktionen von stabil transfizierten HEK293 Zellen [HEK R1] mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, welche anschließend mit dem anti-Tas1r1 hA Antikörper [AK] bzw. mit dem Antikörper und dem korrespondierenden Blockierungspeptid [AK + BP] inkubiert wurde.

[A] Das Tas1r1 Antiserum markiert in der Spermienpräparation [Sp] eine deutliche Bande von ca. 55 kDa Größe; zudem wird eine sehr schwache Bande bei ca. 70 kDa detektiert [AK]. Die Immunreaktivität wird durch Prä-Inkubation des Antiserums mit dem immunogenen Peptid komplett blockiert [AK+BP].

[B] In Proben von Tas1r1-exprimierenden Zellen [HEK R1] wird durch das anti-Tas1r1 A Antiserum ebenfalls eine einzelne Bande erkannt, deren Größe bei ca. 90 kDa liegt [AK]. Durch Vorinkubation des Antikörpers mit seinem immunogenen Peptid wird die Immunmarkierung vollständig unterdrückt [AK + BP].

In immunocytochemischen Analysen mit dem Tas1r2 hA Antiserum an humanen Spermien konnte im Gegensatz zu den Befunden mit dem Tas1r1-spezifischen Antikörper keine Immunreaktivität detektiert werden. Humane Spermien, die mit dem Tas1r2 Antiserum inkubiert wurden (Abbildung 4.44 [A und D]), zeigten, wie auch die parallel durchgeführten Blockierungsansätze ([B und E]) und Kontrollpräparate ohne Primärantikörper [C und F] keinerlei grüne Immunfluoreszenz. In den Ansätzen war lediglich die DNA-Färbung des Kerns durch Propidiumiodid ([PI], blau dargestellt) zu registrieren (Abbildung 4.44 [A und D]), so dass eine Expression dieses Rezeptors in menschlichen Spermien unwahrscheinlich erscheint.

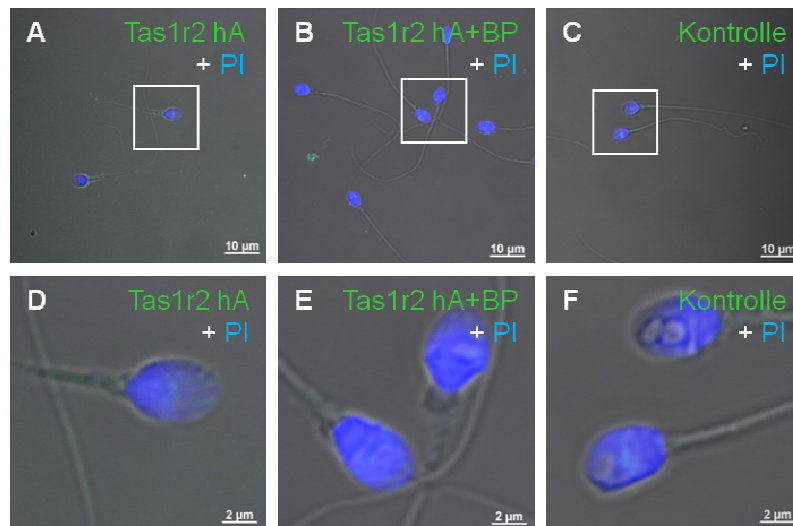


Abbildung 4.44: Expressionsanalyse des Tas1r2 in humanen Spermien.

Methanol/Aceton-fixierte humane Spermien wurden mit einem Tas1r2 Antiserum (1:100) [*Tas1r2 hA*] inkubiert und die Antikörperbindung mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (1 : 750, grün) visualisiert. Im Anschluss wurde der Zellkern mit Propidiumiodid (10 µg/ml; 15 sec) ([*PI*], blau) gefärbt. Der Tas1r2 Antikörper zeigt keine Immunreaktivität in humanen Spermien, es ist nur die blaue Färbung des Zellkerns zu erkennen [A, D; *Tas1r2 hA*]. Auch bei Vorinkubation des Antikörpers mit dem korrespondierenden Peptid [B, E; *Tas1r2 hA + BP*] und im Kontrollansatz ohne Primärantikörper [C, F; *Kontrolle*] ist keine Immunmarkierung zu erkennen.

Dargestellt sind Überlagerungen der Fluoreszenzkanäle (grün: FITC; blau: PI) mit einer Phasenkontrastaufnahme. Der markierte Bereich der oberen Bilderreihe ist in den unteren zwei Reihen vergrößert gezeigt.

Im Anschluss wurde die Proteinexpression des Tas1r3, der in Geschmackssinneszellen als essentieller Dimerisierungspartner der beiden zuvor beschriebenen Rezeptoren an der Detektion von Geschmacksstoffen beteiligt ist, in humanen Spermien untersucht.

Abbildung 4.45 fasst die Befunde dieser immuncytochemischen Analysen mit den validierten Tas1r3 hA und dem Tas1r3 hM Antiseren zusammen. Nach Inkubation isolierter humaner Spermien mit dem Tas1r3 hA Antiserum war in einigen Zellen eine Immunreaktivität des Äquatorialsegments zu registrieren (Abbildung 4.45 [E], Pfeilspitze). Es waren aber einzelne Zellen vorhanden, die keine Immunmarkierung aufwiesen (Abbildung 4.45 [A], Pfeil). Nach einer Prä-Inkubation des Antiserums mit seinem antigenen Peptid war die Immunreaktivität im Äquatorialsegment zwar nicht gänzlich verschwunden, aber deutlich gemindert (Abbildung 4.45 [F], Pfeilspitze).

Unter Verwendung des Tas1r3 hM Antiserums ist eine etwas stärker ausgeprägte Immunreaktivität in den Keimzellen zu detektieren: Die Antikörper-Inkubation resultierte in einer Immunfärbung der akrosomalen Kappe der Spermien (Abbildung 4.45 [C, G, K], Pfeilspitze). Außerdem war eine Markierung des Übergangsstücks am Ansatz des Flagellums sowie des gesamten Spermischwanzes zu registrieren (Abbildung 4.45 [C und D], Pfeile). Die Immunreaktivität des Tas1r3 hM Antiserums ließ sich durch Vorinkubation mit dem korrespondierenden Peptid ebenfalls reduzieren, jedoch nicht vollständig blockieren (Abbildung 4.45 [D, H, L]): Vor allem die Immunfärbung im Akrosom war in den Blockierungsexperimenten deutlich vermindert,

während das Flagellum nur eine leichte Abschwächung seines Immunsignals zeigte (Abbildung 4.45 [D], Pfeil).

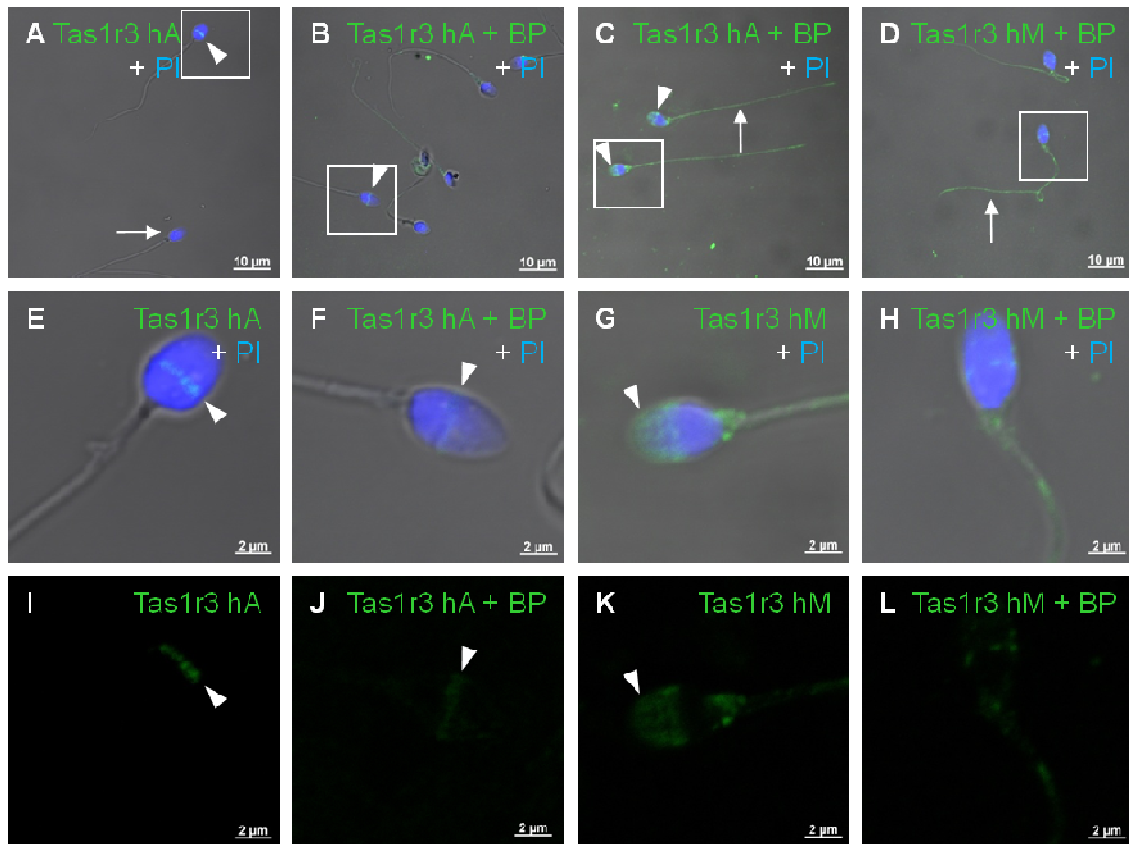


Abbildung 4.45: Immuncytochemische Analyse der Tas1r3 Expression in humanen Spermien.

Humane Spermien wurden mit zwei verschiedenen Tas1r3-spezifischen Antisera ([*Tas1r3 hA*] und [*Tas1r3 hM*]) immunhistochemisch untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität wurde der Tas1r3 hA Antikörper in Blockierungsexperimenten mit seinem korrespondierenden Peptid vorinkubiert. Der Kontrollansatz [*Kontrolle*] wurde nur mit dem Sekundärantikörper behandelt.

Bei Inkubation mit dem anti-Tas1r3 hA IgG [*Tas1r3 hA*] war eine grüne Markierung des Äquatorial-segments im Kopf auszumachen [A, E, I; Pfeil]. Einzelne Spermien wiesen hingegen keine Immunreaktivität auf [A, Pfeil]. Die Immunmarkierung des Tas1r3 hA lässt sich durch eine Peptid-Präinkubation blockieren [B, F, J; *Tas1r3 hA + BP*; Pfeil]. Das Tas1r3 hM Antiserum [*Tas1r3 hM*] zeigt eine etwas stärkere Immunreaktivität und färbt das gesamte Akrosom [A, G, K; Pfeilspitze], das Übergangsstück sowie das Flagellum [A, G, K; Pfeil]. Die Immunreaktivität im Kopfbereich lässt sich durch Vorinkubation des Antikörpers mit dem immunogenen Peptid [*Tas1r3 hM + BP*] blockieren [H, L], während die Immunmarkierung des Flagellums nur leicht reduziert wird [D; Pfeil].

Dargestellt sind Überlagerungen der Fluoreszenzkanäle (grün: FITC; blau: PI) mit einer Phasenkontrastaufnahme [A - H] sowie eine einzelne Aufnahme des grünen Fluoreszenzsignals [I - L]. Die verwendeten Antikörper sind in jedem Bild angegeben.

Um die Größe des immunreaktiven Proteins zu bestimmen, das durch das Tas1r3 hA Antiserum erkannt wird, wurden anschließend Immunoblot-Analysen mit P₂-Proteinfraktionen humaner Spermien durchgeführt. In diesen experimentellen Ansätzen war in den Spermien-Präparationen eine einzelne Bande mit einer Größe von ca. 140 kDa zu registrieren (Abbildung 4.46 [A], [AK]), die nach einer Co-Inkubation mit dem antigenen Peptid vollständig verschwunden war (Abbildung 4.46 [A], [AK+ BP]). Im Vergleich mit dem heterolog exprimierten Tas1r3-HSV Protein (Abbildung 4.46 [B],

[AK]), welches eine molekulare Masse von ca. 110 kDa aufwies, wird jedoch auch in diesen Western Blot Analysen eine Abweichung der Masse des Rezeptorproteins in Keimzellen zur erwarteten Größe offensichtlich. Da die Peptidblockierbarkeit beider Western Blot Banden auf eine spezifische Erkennung des antigenen Peptids hindeutet und keine Hinweise für eine unspezifische Kreuzreaktivität vorlagen, könnte diese größere Proteinmasse möglicherweise durch alternatives Splicing des Tas1r3 [Max et al., 2001; Kiuchi et al., 2006], posttranslationale Modifikationen oder auch einen unlöslichen Komplex mit einem anderen Protein bedingt sein.

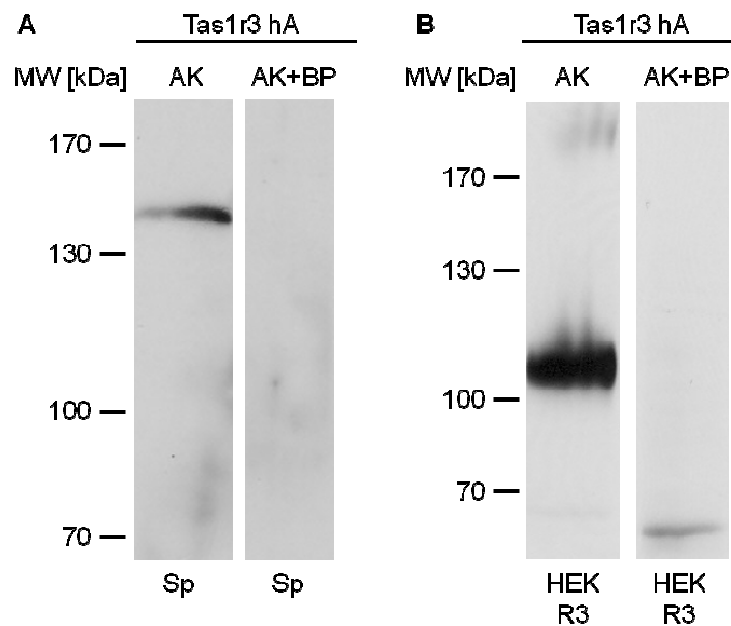


Abbildung 4.46: Nachweis des Tas1r3 Proteins in Membranpräparationen humaner Spermien.

Es wurden Membranpräparationen (P_2 -Fraktionen) von humanen Spermien [Sp] und Totalfraktionen von stabil transfizierten HEK293-Zellen [HEK R3] mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und anschließend mit dem anti-Tas1r3 hA Antikörper [AK] bzw. mit dem Antikörper und dem korrespondierenden Blockierungspeptid [AK + BP] inkubiert.

[A] Das Tas1r3 hA Antiserum detektiert in der Spermienprobe [Sp] eine einzelne Bande von ca. 140 kDa Größe [AK]. Die Immunreaktivität wird durch Vorinkubation mit dem korrespondierenden Peptid komplett unterbunden [AK + BP].

[B] In Präparationen von HEK293-Zellen, die das Tas1r3 Protein exprimieren [HEK R3], wird durch das anti-Tas1r3 hA Antiserum eine einzelne Bande der erwarteten Größe von ca. 110 kDa erkannt. Durch Vorinkubation des Antikörpers mit seinem immunogenen Peptid wird diese Immunmarkierung ebenfalls vollständig eliminiert [AK + BP].

Durch die Befunde der vorangehend beschriebenen experimentellen Ansätze konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der Tas1-Familie von Geschmacksrezeptoren im männlichen Keimdrüsengewebe und in isolierten Spermien von Nagern und des Menschen exprimiert werden. Während der Tas1r2 Rezeptor, der auf der Zunge zusammen mit dem Tas1r3 an der Detektion süßer Geschmacksstoffe beteiligt ist, in diesen Analysen weder auf RNA-Ebene noch als Protein im männlichen Reproduktionsgewebe nachweisbar war, konnte eine Expression der beiden Rezeptoren, die auf der Zunge den Umami-Rezeptor formen, im Hoden der Maus sowie in murinen und humanen

Spermien belegt werden. Die subzelluläre Lokalisation des Tas1r1 und des Tas1r3 im Akrosom und Äquatoralsegment des Spermienkopfes könnte auf eine Beteiligung am Prozess der akrosomalen Exocytose oder der Fusion mit der Eizelle hindeuten. Gleichzeitig waren die Rezeptoren aber auch im Spermienflagellum lokalisiert, so dass sie möglicherweise auch in die erfolgreiche Wegfindung des Spermiums zur Eizelle involviert sein könnten. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte deshalb geklärt werden, welche physiologische Funktion Tas1-Rezeptoren in Spermien erfüllen.

4.5 Reproduktionsbiologische Charakterisierung eines Tas1r1-defizienten Mausmodells

Um der Frage nachzugehen, an welchen physiologischen Prozessen die in Spermien identifizierten Mitglieder des Umami-Rezeptors, Tas1r1 und Tas1r3, beteiligt sein könnten, wurden die Auswirkungen eines Fehlens des Tas1r1 Rezeptors auf das männliche Reproduktionssystem anhand eines genetisch modifizierten Mausmodells *in vivo* untersucht. Dabei wurde eine Tas1r1 mCherry Reportermauslinie verwendet, die analog zur vorangehend beschriebenen Tas2r131 GFP Mauslinie (Abschnitt 4.3.3) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Meyerhof ([DIfE], Potsdam) generiert wurde. Die genetische Veränderung dieser Mauslinie resultiert im Verlust des Tas1r1 Proteins; stattdessen wird das rote Fluoreszenzprotein mCherry unter Kontrolle des Tas1r1-Promotors exprimiert (siehe Abschnitt 3.6.2). Damit ergibt sich, wie in der Tas2r131 GFP Mauslinie, zum einen die Möglichkeit, die Expression des Tas1r1 Rezeptors unabhängig von der Verfügbarkeit funktioneller Antikörper zu analysieren. Zum anderen kann in diesem Modell der Effekt der Rezeptordefizienz direkt untersucht werden, um Rückschlüsse auf die physiologische Rezeptorfunktion in Spermien ziehen zu können.

4.5.1 Analyse der Tas1r1 Expression unter Verwendung einer Tas1r1 mCherry Reportermaus

Da aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers die Expression des Tas1r1 Rezeptors in murinem Gewebe zuvor nur in RT-PCR Analysen mit cDNA aus Hodengewebe nachgewiesen werden konnte, sollte die Tas1r1 mCherry Mauslinie vor Beginn der funktionellen Analysen zunächst genutzt werden, um die Befunde der PCR-Analysen zu verifizieren und gleichzeitig die Lokalisation der Tas1r1-Expression im Hoden festzustellen.

Um sicherzustellen, dass genug Fluoreszenzprotein translatiert wird, um dieses bei einer spezifischen Anregung mit einem Laser (543 nm) detektieren zu können, wurden in Einstiegsexperimenten zunächst Geschmackspapillen homozygoter Tas1r1 mCherry Mäuse (Tas1r1 mCherry Ki) auf ein rotes Fluoreszenzsignal hin untersucht. Abbildung 4.47 zeigt exemplarisch die Befunde dieser Analysen an Gefrierschnitten einer Pilz-

papille. In zwei Zellen der dargestellten Geschmacksknospe war nach Laseranregung eine spindelförmige rote Fluoreszenzmarkierung zu registrieren (Abbildung 4.47 [A und E], Pfeil); das umgebende Bindegewebe zeigte hingegen kein mCherry-Signal (Abbildung 4.47 [A]). Um zu prüfen, ob es sich bei den mCherry-positiven Zellen tatsächlich um Geschmackssinneszellen handelte, wurden Co-Färbungen mit Antiseren durchgeführt, die gegen das gustatorische G Protein α -Gustducin bzw. den Tas1r3 Rezeptor gerichtet waren, der zusammen mit dem Tas1r1 den Umami-Rezeptor formt. Die Inkubation mit dem anti-Tas1r3 Antiserum resultierte in einer Färbung einzelner Sinneszellen der angeschnittenen Papille (Abbildung 4.47 [B und F], Pfeilspitze). Eine Überlagerung der mCherry- und FITC-Fluoreszenzaufnahmen mit der entsprechenden Phasenkontrastaufnahme (Abbildung 4.47 [C und G]) machte deutlich, dass die registrierten roten und grünen Fluoreszenzsignale denselben Zellen zuzuordnen waren. Diese Co-Expression des mCherry Proteins mit dem Tas1r1-Dimerisierungspartner Tas1r3 belegt, dass das Reporterprotein spezifisch in den Zellen nachzuweisen ist, in denen im Wildtyp der Umami-Rezeptor exprimiert wird. Beim Vergleich der subzellulären Verteilung der Fluoreszenzsignale war aber auch erkennbar, dass die Fluoreszenz des überwiegend cytosolischen mCherry Proteins nicht mit der membranständigen Immunreaktivität des Tas1r3 übereinstimmte, sondern von dieser umschlossen wurde (Abbildung 4.47 [G]). Aufgrund der Diskrepanz zwischen der subzellulären Verteilung des Reporterproteins (mCherry) und der physiologischen Lokalisation des ersetzten Geschmacksrezeptors (Tas1r1), die auch in der Tas2r131 GFP Mauslinie beobachtet wurde, konnte deshalb in der verwendeten Reportermauslinie nur das zelluläre Expressionsmuster des Tas1r1 im Gewebe, nicht aber die subzelluläre Verteilung des Rezeptors untersucht werden.

Durch immunhistochemische Co-Färbungen der Pilzpapille einer Tas1r1 mCherry Ki Maus mit einem anti-Gustducin Antiserum konnte zudem gezeigt werden, dass Zellen, die sich durch eine mCherry-Fluoreszenz auszeichneten, wie erwartet auch eine Gustducin-Immunmarkierung aufwiesen (Abbildung 4.47 [D und H], gelbes Überlagerungssignal). Somit konnte bestätigt werden, dass das Tas1r1-Reporterprotein mCherry tatsächlich spezifisch in Geschmackssinneszellen exprimiert wurde und in Gewebeschnitten erfolgreich fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden konnte.

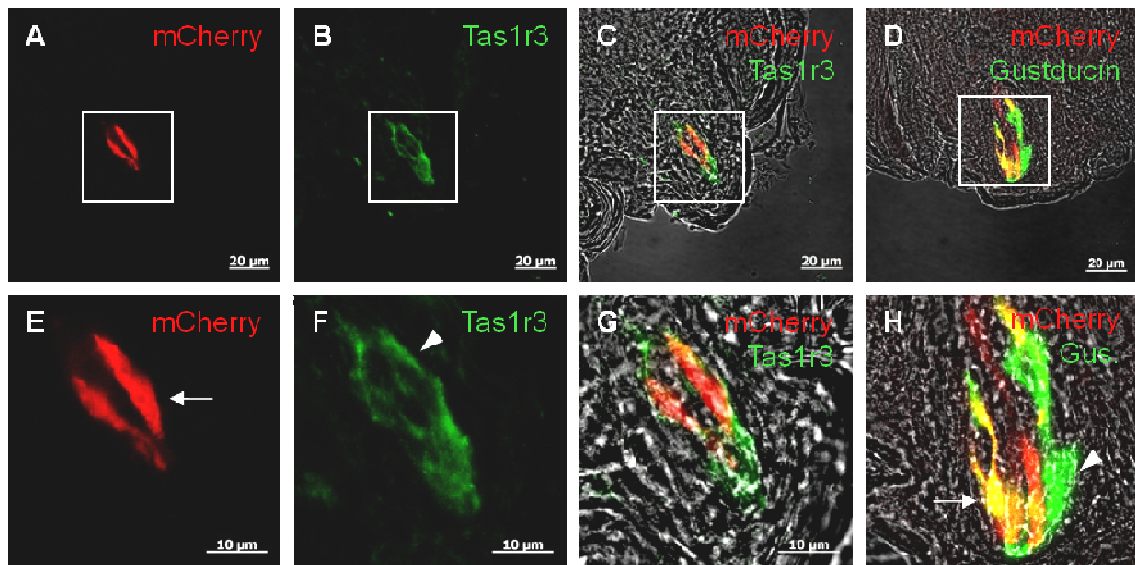


Abbildung 4.47: Nachweis des Tas1r1 Reporterproteins mCherry und des Tas1r3 Rezeptorproteins in Pilzpapillen.

Gefrierschnitte von fungiformen Papillen einer Tas1r1 mCherry *Knockin*-Maus wurden mit einem anti-Tas1r3 A IgG (1 : 200) bzw. einem anti-Gustducin Antiserum (1 : 500) inkubiert und anschließend wurde die Antikörperbindung mit Hilfe FITC-gekoppelter anti-Kaninchen IgG (1 : 750, grün) nachgewiesen. Das mCherry Protein wurde durch Anregung mit einem Laser (543 nm) visualisiert.

In einzelnen Sinneszellen der Geschmacksknospe ist eine mCherry-Fluoreszenz ([mCherry], rot) zu detektieren [A, E]. Dieselben Zellen zeigen auch eine Immunreaktivität gegen das Tas1r3 Antiserum [B, F; Tas1r3]. Die Immunmarkierung des Tas1r3 Membranproteins umschließt die eher zentral gelegene mCherry-Fluoreszenz, so dass kaum eine direkte Co-Lokalisation (gelb) zu erkennen ist [C, G; mCherry + Tas1r3]. Die Co-Färbung mit α -Gustducin zeigt eine starke Übereinstimmung mit der mCherry-Fluoreszenz ([D, mCherry + Gustducin], gelb, Pfeil). Es sind auch einzelne Gustducin-positive Zellen zu erkennen, die kein mCherry exprimieren ([H], grün, Pfeilspitze). Dargestellt sind einzelne Fluoreszenzsignale (mCherry: [A, E], FITC: [B, F]) bzw. Überlagerungen der Fluoreszenz- mit den jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen [C, D, G, H]. Die Boxen in [A - D] sind in [E - H] vergrößert gezeigt.

Um die Befunde einer testikulären Tas1r1 Expression (siehe Abbildung 4.32) zu verifizieren und gleichzeitig zu prüfen, in welchen Zellstadien der Rezeptor im Keimdrüsengewebe exprimiert wird, wurde anschließend die mCherry-Fluoreszenz in Gefrierschnitten des Hodens einer homozygoten Tas1r1 mCherry Maus untersucht.

In den Hodenschnitten der Tas1r1 mCherry Ki Maus war nach Anregung der mCherry-Fluoreszenz in allen angeschnittenen Tubuli ein rotes Fluoreszenzsignal zu registrieren (Abbildung 4.48 [A-C]). Bei Betrachtung des in [D - F] vergrößert dargestellten Hodenkanälchens wurde deutlich, dass das mCherry Signal nicht gleichmäßig im Keimepithel verteilt war, sondern dass das Protein erst im Verlauf der Keimzellreifung exprimiert wurde. Während in den basalen spermatogonialen Zellschichten keine rote Fluoreszenz auszumachen war, zeigten Spermatocyten ein schwaches Fluoreszenzsignal. In den späten Stadien der Spermatogenese wurde dann eine intensive rote Fluoreszenz des mCherry Proteins in Spermatiden sichtbar (Abbildung 4.48 [E-G]), was auf eine starke Aktivität des Tas1r1 Promotors und damit eine Expression des Rezeptors im Hoden von Wildtyp-Tieren hindeutet.

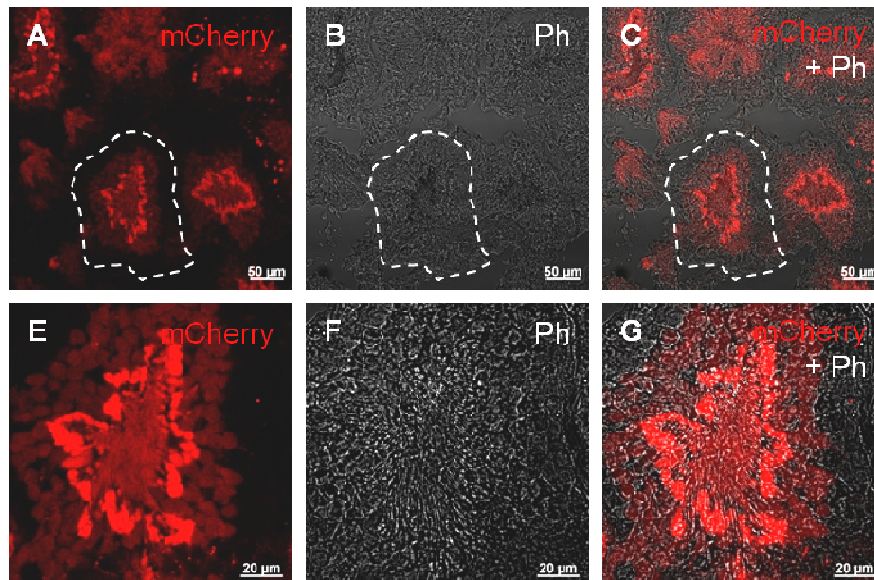


Abbildung 4.48: Analyse der mCherry-Fluoreszenz im Hoden der Tas1r1 mCherry Maus.

Hodengewebe einer Tas1r1 mCherry $[-/-]$ Maus wurde zunächst fixiert, anschließend wurden Gefrierschnitte hergestellt, die mikroskopisch auf ihre mCherry-Fluoreszenz (rot) untersucht wurden.

In allen Tubuli der untersuchten Hoden ist eine rote mCherry-Fluoreszenz, die eine Tas1r1 Promotoraktivität nachweist, zu registrieren [A, E; mCherry]. Das mCherry Protein tritt in den basalen Keimzellschichten kaum auf; die Expression beginnt erst in den Tubuli-Bereichen, in denen späte Spermatocyten reifen, und ist in den luminal gelegenen Spermatiden [C, G; mCherry + Ph] am intensivsten ausgeprägt.

Gezeigt sind jeweils eine Aufnahme der mCherry-Fluoreszenz [A, E, mCherry], eine Phasenkontrastaufnahme [B, F; Ph] und eine Überlagerung der beiden Aufnahmen [C, G; mCherry + Ph]. Der exemplarisch umrandete Tubulus in [A - C] ist in [E - G] vergrößert dargestellt.

Diese starke Expression in späten Keimzellschichten ist besonders interessant, da Spermien transkriptionell und translationell kaum aktiv sind [Vogt, 2004]. Das bedeutet, dass funktionell aktive Proteine – im Gegensatz zu anderen Geweben – nicht kontinuierlich von Spermienzellen synthetisiert werden, sondern schon im Verlauf der Spermatogenese gebildet werden. Somit ist selbst bei Proteinen, die eine essentielle Funktion in Spermien erfüllen, keine Promotoraktivität in reifen Spermien zu erwarten, da die Proteinbiosynthese bereits während der Keimzellreifung stattgefunden hat. Das verwendete Tas1r1 mCherry Mausmodell, das auf dem Nachweis genau dieser Promotoraktivität beruht, ist demnach nicht geeignet, um direkt zu untersuchen, ob das Rezeptorprotein auch in reifen Spermien exprimiert wird. Da es sich beim mCherry Protein und dem Geschmacksrezeptor außerdem um zwei völlig unabhängige Proteine handelt, die sich in ihrer Lokalisation, Größe und Funktion gänzlich unterscheiden, kann die mCherry-Fluoreszenz in Spermien ebenfalls keine Auskunft darüber geben, ob und wo das Tas1r1 Rezeptorprotein in den reifen Keimzellen vorkommt. Die intensive Fluoreszenz des mCherry Proteins in den späten Stadien der Spermatogenese, während der die Proteinausstattung der reifen Spermien festgelegt wird, belegt jedoch, dass der Tas1r1 in diesen Phasen stark exprimiert wird, was auf ein Vorhandensein des Rezeptors auch in reifen Spermien hindeutet.

Da der Tas1r1 Rezeptor im Geschmackssystem als Dimer mit dem Tas1r3 funktionell aktiv ist, wurde in weiteren experimentellen Ansätzen geprüft, ob die beiden Proteine

des Glutamat-Rezeptors der Zunge auch im Keimdrüsengewebe gemeinsam exprimiert werden. Um das Expressionsmuster beider Rezeptoren im Hoden vergleichen zu können, wurden testikuläre Gefrierschnitte einer Tas1r1 mCherry Ki Maus mit einem Tas1r3 Antiserum inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte anschließend durch FITC-gekoppelte anti-Kaninchen IgG, das mCherry Protein wurde durch Laser-Anregung mit einer Wellenlänge von 543 nm visualisiert.

In Kontrollansätzen, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden, war nur eine rote mCherry-Fluoreszenz in den Tubuli zu registrieren (Abbildung 4.49 [B]). Die Behandlung mit dem Tas1r3 M Antiserum resultierte, vergleichbar zu Abbildung 4.34, in einer grünen Immunfärbung des Keimepithels der angeschnittenen *Tubuli seminiferi* (Abbildung 4.49 [A]). Beim Vergleich der roten und grünen Fluoreszenzsignale in den vergrößert gezeigten Tubuli wurde deutlich, dass das Tas1r3 Protein in den Keimzellstadien zu finden war, die auch eine mCherry-Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 4.49 [C-E]). Wie bereits im Zungengewebe beschrieben (Abbildung 4.49 [C]), fiel aber auch in diesen Analysen auf, dass die zwei unterschiedlichen Fluoreszenzsignale zwar in den gleichen Zellen zu registrieren waren, aber keine subzelluläre Überlappung zeigten: Während die Tas1r3 Immunreaktivität überwiegend membranständig bzw. in den sich entwickelnden sichelförmigen Akrosomen (Pfeilspitzen) konzentriert war, war das mCherry Protein relativ gleichmäßig im Cytoplasma der Keimzellen verteilt (Abbildung 4.49 [C-E]).

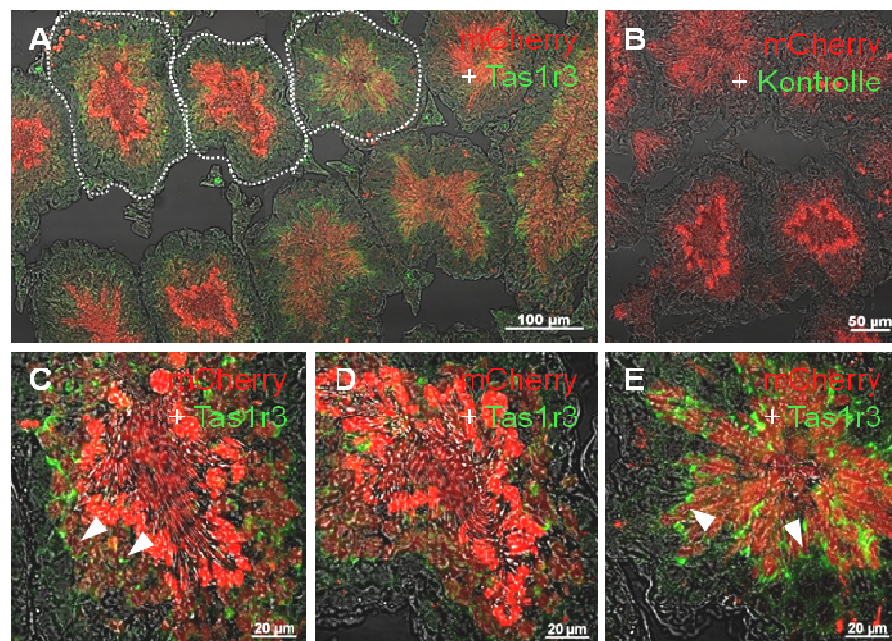


Abbildung 4.49: Co-Färbung von Tas1r3 und mCherry im Hoden Tas1r1-defizienter Tiere.

Gefrierschnitte des Hodens einer Tas1r1 mCherry Reportermaus wurden mit dem Tas1r3 M Antiserum [*Tas1r3*] inkubiert und anschließend wurde der Primärantikörper durch ein FITC-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (rot) visualisiert.

Die rote Fluoreszenz des mCherry Proteins ist in allen angeschnittenen Tubuli auszumachen und in den luminalen, reifen Spermiovorläuferzellen (Spermatiden) stark angereichert, während in den basalen Keimzellschichten keine Fluoreszenz zu detektieren ist. Die Tas1r3 Immunreaktivität ist ebenfalls in allen Tubuli nachzuweisen und in den gleichen Entwicklungsstadien lokalisiert, wie das Tas1r1 Reporterprotein

mCherry [*mCherry + Tas1r3*]. Die Tas1r3 Immunmarkierung umschließt die mCherry-Fluoreszenz [**C - E**] und ist in einzelnen Tubuli in sichelförmigen Strukturen konzentriert [**C, E**; Pfeilspitzen]. In Kontrollansätzen, in denen kein Primäntikörper eingesetzt wurde [**B**], ist keine Tas1r3 Immunreaktivität detektierbar.

Die gezeigten Bilder wurden durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (rot: mCherry; grün: Tas1r3 Immunreaktivität) mit einer Phasenkontrastaufnahme erzeugt. Die in [**A**] umrandeten Tubuli sind in [**C - E**] von links nach rechts vergrößert dargestellt.

Da für die Tas2r131 GFP Mauslinie bereits beobachtet wurde, dass das funktionslose cytoplasmatische Reporterprotein GFP während der Passage durch den Nebenhoden aus den Spermien ausgeschleust wurde, wurde im Folgenden untersucht, ob eine solche Auslagerung des unphysiologischen Markerproteins auch in Spermien der Tas1r1 mCherry Reportermauslinie stattfindet. Abbildung 4.50 zeigt Gefrierschnitte des Caputs und des caudalen Teils des Nebenhodens einer homozygoten Tas1r1 mCherry Maus, die zur Visualisierung der Zellkerne mit dem DNA-Marker TO-PRO-3 gegengefärbt wurden. Um die Sensitivität der mCherry Detektion zusätzlich zu erhöhen, wurde das Protein durch einen DsRed-Antikörper markiert und mit einem Fluoreszenzgekoppelten Sekundäntikörper nachgewiesen.

Im Lumen der gezeigten Nebenhodenabschnitte waren dichtgedrängte Spermien zu erkennen. In den Gewebsschnitten war das rote mCherry Signal überwiegend auf dieses Tubuluslumen beschränkt; im Gangepithel war keine rote Fluoreszenz zu detektieren (Abbildung 4.50 [**A**] und [**E**]). Die mCherry Immunreaktivität im Lumen war interessanterweise nicht gleichmäßig in den Spermien verteilt. Es fielen vielmehr, wie auch in den Nebenhodenschnitten homozygoter Tas2r131 GFP Mäuse (siehe auch Abbildung 4.21), große Agglomerate des Reporterproteins auf (Abbildung 4.50 [**D** und **H**]). Die Ansammlungen des Fluoreszenzproteins könnten *Cytoplasmic Droplets*, in denen Cytoplasma und nicht-benötigte cytoplasmatische Proteine aus den reifenden Spermien ausgeschleust werden [Cooper, 2005], repräsentieren.

Diese Akkumulation und Auslagerung des mCherry Proteins aus den Spermien führte zu der Frage, ob das Markerprotein vollständig aus den Zellen entfernt wird, oder ob Reste des Fluoreszenzproteins in Spermien zurückbleiben. Um zu prüfen, ob in reifen männlichen Keimzellen der Reportermauslinie noch mCherry Protein zu registrieren ist, wurde deshalb die rote Fluoreszenz von Spermien homozygoter Tas1r1 mCherry Männchen nach Anregung mit einem Laser (543 nm) mit der von Wildtyp-Tieren verglichen. Um gleichzeitig die Morphologie der isolierten Spermien vergleichen zu können, wurde eine Co-Färbung der Zellen mit dem Akrosomenmarker PNA durchgeführt.

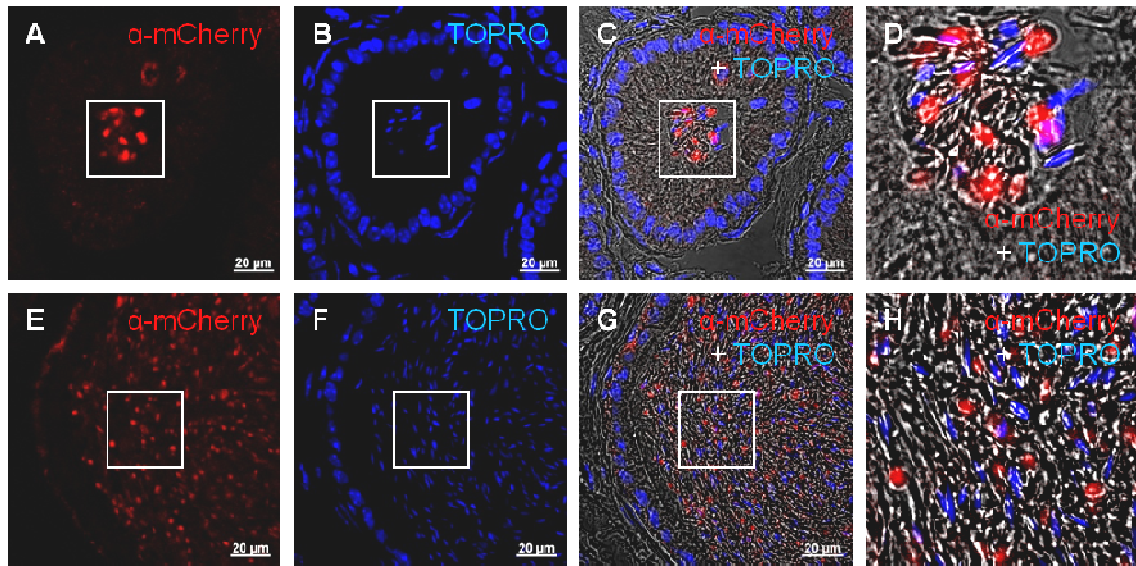


Abbildung 4.50: Analyse der mCherry Lokalisation während der Spermienreifung im Nebenhoden.

Gefrierschnitte des Nebenhodens einer adulten *Tas1r1* mCherry Reportermaus wurden mit einem anti-mCherry Antiserum (DsRed) [α -mCherry] inkubiert und die Antikörperbindung anschließend mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (1 : 750, rot) nachgewiesen. Der DNA-interkalierende Farbstoff TO-PRO-3 [TOPRO, blau] wurde zur Visualisierung des Kerns eingesetzt.

Die mCherry Immunreaktivität ist im Caput [A - D] und in der Cauda [E - H] des Nebenhodens auf das Lumen der angeschnittenen Gänge beschränkt [A, E; α -mCherry]. Die Fluoreszenz ist innerhalb des Ganges auf einzelne, vesikuläre Strukturen konzentriert, die nicht mit dem Zellkern [B, F; TOPRO] co-lokalisiert sind [C, D, G, H; α -mCherry + TOPRO].

Dargestellt ist eine Fluoreszenzaufnahme der mCherry Immunreaktivität [A, E; α -mCherry, rot], eine Aufnahme der Zellkernfärbung [B, F; TOPRO, blau] sowie eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle mit der jeweiligen Phasenkontrastaufnahme [C, D, G, H; α -mCherry + TOPRO]. Die markierten Bereiche in [A - C] und [E - G] sind in [D] bzw. [H] vergrößert dargestellt.

Wie Abbildung 4.51 deutlich macht, wiesen *Tas1r1*-defiziente Spermien (*Tas1r1* [-/-]) keine offensichtlichen morphologischen Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Spermien (*Tas1r1* [+/+]) auf. Die Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Lektin resultierte in einer sichelförmigen grünen Markierung des akrosomalen Vesikels, die keine Unterschiede zur PNA-Färbung parallel untersuchter Wildtyp-Spermien erkennen ließ (Abbildung 4.51 [A und B], [PNA]). Bei Anregung des mCherry Proteins war jedoch keine rote Fluoreszenz in den Spermien *Tas1r1* homozygoter Tiere zu registrieren (Abbildung 4.51 [B und D]). Auch mit einem anti-mCherry Antikörper, der zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit eingesetzt wurde, konnte keine mCherry Immunreaktivität detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

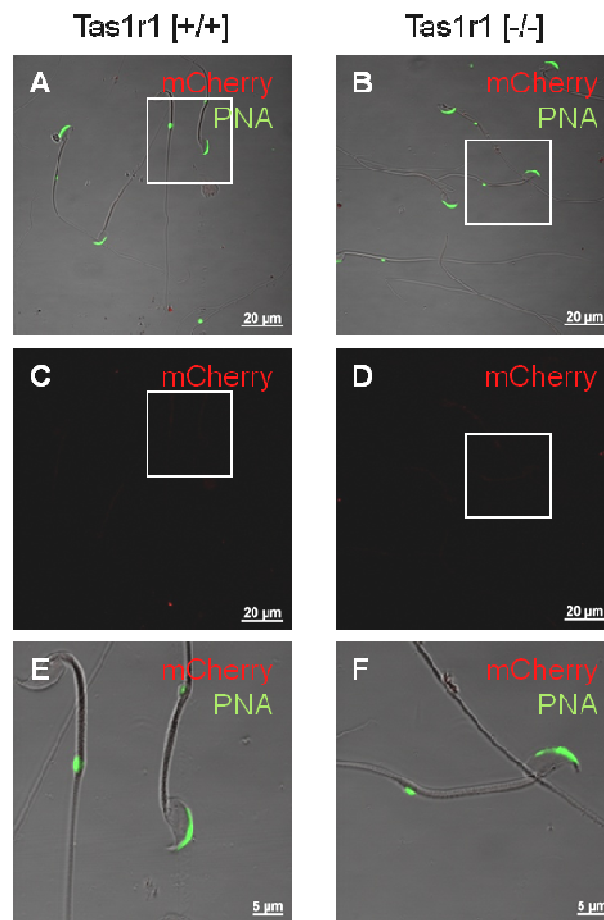


Abbildung 4.51: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Spermien der *Tas1r1* mCherry Reporter-mauslinie.

Aus dem caudalen Teil des Nebenhodens von Wildtyp- [*Tas1r1* *+/+*] und *Tas1r1* mCherry *Knockin*- [*Tas1r1* *-/-*] Mäusen wurden Spermien isoliert, mit Methanol fixiert und anschließend mit einem FITC-gekoppelten PNA ([PNA], grün) inkubiert.

In *Tas1r1*-defizienten Spermien ist nach Laser-Anregung (545 nm) ebenso wie in Wildtyp-Spermien keine rote mCherry-Fluoreszenz [C, D; mCherry] zu detektieren. Die Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Lektin führt in beiden Genotypen zu einer vergleichbaren sichelförmigen Markierung des Akrosoms [A, B, E, F; mCherry + PNA].

Gezeigt sind Aufnahmen der mCherry-Fluoreszenz [C, D, rot] und Überlagerungen der zwei Fluoreszenzkanäle (rot: mCherry; grün: FITC-PNA) mit der jeweiligen Phasenkontrastaufnahme. Die Boxen in [A, C] und [B, D] sind in [E] bzw. [F] vergrößert dargestellt.

Wie bereits zuvor beschrieben, kann das mCherry Protein in Spermien keine Informationen über das Vorhandensein des *Tas1r1* liefern, da in den Zellen keine Neusynthese stattfindet und damit auch keine Promotoraktivität zu erwarten ist. Ferner sind die beiden Proteine *Tas1r1* und mCherry nach Abschluss der Proteinbiosynthese innerhalb der Zelle völlig unabhängig voneinander, so dass die Auslagerung des Markerproteins keinerlei Hinweise auf das zelluläre „Schicksal“ des Geschmacksrezeptors liefert.

Andererseits bedeutet das Ausbleiben einer mCherry-Fluoreszenz in Spermien, dass wahrscheinlich kaum noch Reste des artifiziell exprimierten Proteins in den reifen Keimzellen vorhanden sind. Physiologische Einschränkungen der Zellfunktion durch große Mengen des „überflüssigen“ Fluoreszenzproteins konnten demnach weitgehend

ausgeschlossen werden. Die *Tas1r1* mCherry Mauslinie sollte also sehr gut geeignet sein, um die Auswirkungen einer *Tas1r1*-Defizienz auf die Spermienfunktion zu untersuchen, um so die physiologische Rolle des Rezeptors in Spermien besser verstehen zu können.

4.5.2 Reproduktionsbiologische Charakterisierung der *Tas1r1* mCherry Mauslinie

4.5.2.1 Analyse der Fertilität von *Tas1r1*-defizienten Mäusen

Um die Auswirkungen einer *Tas1r1*-Defizienz auf die Fertilität *in vivo* zu untersuchen, wurde zunächst der Reproduktionserfolg von *Tas1r1*-defizienten Zuchtpaaren mit dem von heterozygoten und Wildtyp-Tieren anhand standardisierter Parameter (siehe auch Abschnitt 4.2.1.2 und Abschnitt 4.3.4.2) verglichen. In monogamen Verpaarungen war dabei weder in der Zeit bis zum ersten Wurf, der Zeit zwischen den Würfen noch zwischen der Wurfgröße ein signifikanter Unterschied zwischen Elterntieren der drei *Tas1r1* Genotypen feststellbar (Tabelle 4.5). Auch die Geschlechterverteilung der Nachkommen von heterozygoten und homozygoten *Tas1r1* mCherry Zuchttieren ([*-/-*] x [*-/-*] und [*+/-*] x [*+/-*]) zeigt keine Abweichungen im Vergleich zu den Wildtyp-Zuchtpaaren ([*+/+*] x [*+/+*]) (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Analyse der Fertilität von *Tas1r1*-defizienten Mäusen

In einem kontinuierlichen monogamen Zuchtsystem wurden C57BL/6, *Tas1r1* heterozygote (Stammhintergrund N2 und N3) und *Tas1r1* homozygote (Stammhintergrund N1) Tiere verpaart und die unten aufgeführten Fertilitätsparameter bestimmt. Die Anzahl der jeweils analysierten Zuchtpaare bzw. der Nachkommen (bei der Geschlechtsverteilung) ist in Klammern (*n* = *x*) angegeben.

Fertilitätsparameter	<i>Tas1r1</i> Genotyp		
	[<i>+/+</i>] x [<i>+/+</i>]	[<i>+/-</i>] x [<i>+/-</i>]	[<i>-/-</i>] x [<i>-/-</i>]
Zeit zwischen den Würfen [d]	31,5 ± 1,7 (<i>n</i> = 49)	27,2 ± 1,1 (<i>n</i> = 80)	29,5 ± 1,8 (<i>n</i> = 36)
Zeit bis zum ersten Wurf [d]	26,1 ± 2,1 (<i>n</i> = 16)	26,2 ± 1,9 (<i>n</i> = 21)	32,9 ± 5,1 (<i>n</i> = 9)
Anzahl Nachkommen / Wurf	6,2 ± 0,5 (<i>n</i> = 52)	6,8 ± 0,3 (<i>n</i> = 79)	5,9 ± 0,4 (<i>n</i> = 36)
Geschlecht der Nachkommen m / f [%]	53 / 47 (<i>n</i> = 334)	50 / 50 (<i>n</i> = 659)	49 / 51 (<i>n</i> = 266)

Beim Vergleich des Genotyps der Jungtiere von heterozygoten Eltern konnte keine Verschiebung des Genotyps registriert werden (Tabelle 4.6). Der Anteil heterozygoter Nachkommen zeigte mit 47 % bzw. 52 % bei den Zuchtpaaren mit einem heterozygoten Elternteil unabhängig vom Geschlecht des heterozygoten Partners keine signifikanten Unterschiede zur Mendelschen Verteilung (50 %). Auch bei Zuchtpaaren, in denen

beide Elternteile heterozygot waren ([+/-] x [+/-]), war keine Abweichung von der erwarteten Verteilung ([+/+] : [+/-] : [-/-]; 1 : 2 : 1) auszumachen.

Tabelle 4.6: Genotyp-Verteilung der Nachkommen von Tas1r1-heterozygoten Zuchttieren

Der Genotyp ([+/+], [+/-], [-/-]) der Nachkommen von Zuchtpaaren mit heterozygoten Eltern wurde mittels Genotypisierung bestimmt. Daraus wurde der Anteil des jeweiligen Genotyps an der Gesamtzahl der Nachkommen ermittelt [*Ermittelt*] und mit einer Verteilung nach Mendel [*Erwartet*] verglichen. Zur statistischen Analyse der erwarteten und registrierten Werte wurde der χ^2 -Test angewendet; der ermittelte jeweilige p-Wert ist in der rechten Spalte aufgeführt. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Nachkommen und der prozentuale Anteil (in Klammern) des jeweiligen Genotyps.

<i>F x M Verpaarung</i>	<i>Anzahl der Nachkommen</i>		<i>Chi²-Test</i>
<i>Genotyp der Nachkommen</i>	<i>Ermittelt</i>	<i>Erwartet</i>	
<i>[+/-] x [+/-]</i>			
[+/+]	139 (26,6 %)	131 (25 %)	<i>p</i> = 0,651
[+/-]	256 (48,9 %)	261 (50 %)	
[-/-]	137 (26,2 %)	131 (25 %)	
<i>[+/+] x [+/-]</i>			
[+/+]	46 (47 %)	49 (50 %)	<i>p</i> = 0,544
[+/-]	52 (53%)	49 (50 %)	
<i>[+/-] x [+/+]</i>			
[+/+]	82 (52 %)	78 (50 %)	<i>p</i> = 0,576
[+/-]	75 (48 %)	79 (50 %)	

Um zu klären, ob die Tas1r1-Defizienz möglicherweise Veränderungen der männlichen Geschlechtsorgane oder eine Einschränkung der Funktion reifer Spermien nach sich zieht, die durch die Verpaarungsexperimente nicht detektiert werden konnte, erfolgte im Folgenden eine morphologische und funktionelle Charakterisierung des Hodens und isolierter Spermien von homozygoten Tas1r1 mCherry Mäusen.

4.5.2.2 Histologische Analyse des Hodens Tas1r1-defizienter Mäuse

Um zu prüfen, ob die Keimzellbildung im Hoden durch die Rezeptordefizienz beeinflusst sein könnte, wurde in Einstiegsexperimenten zunächst die Hodenmorphologie Tas1r1-defizienter Tiere untersucht. Dazu wurden Paraffinschnitte von Bouin-fixiertem Gewebe von Wildtyp- und homozygoten Tas1r1 mCherry Geschwister-tieren angefertigt und einer HE-Färbungen unterzogen, um die Gewebsstruktur darzustellen. In den anschließenden lichtmikroskopischen Analysen wurde deutlich, dass der Aufbau des Hodens Tas1r1-defizienter Tiere aus einzelnen Tubuli mit Keim-epithel keine gravierenden Unterschiede zum Gewebe von Wildtyp-Männchen aufwies (Abbildung 4.52).

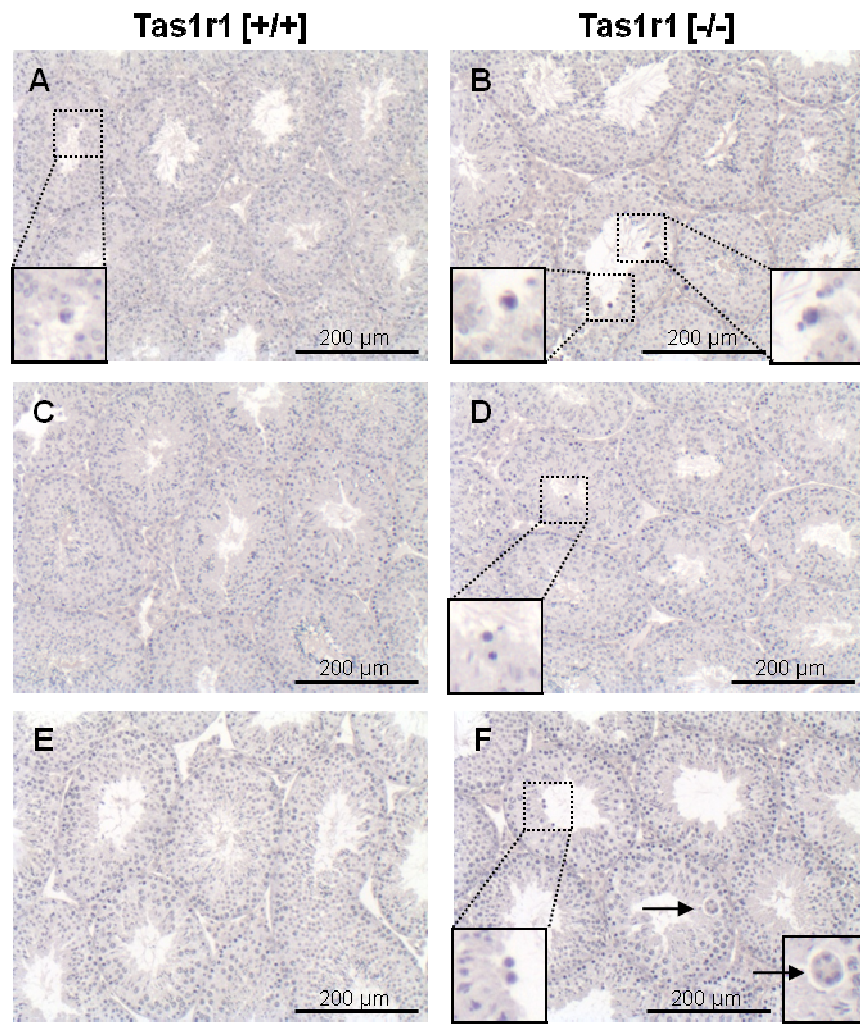


Abbildung 4.52: Histologische Analyse der Hodenmorphologie von Tas1r1-defizienten Mäusen.

Paraffinschnitte von Bouin-fixierten Hoden von Wildtyp (*Tas1r1* *+/+*) und homozygoten Tas1r1 mCherry (*Tas1r1* *-/-*) Tieren wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

Der Aufbau des Hodens zeigt im Überblick keine gravierenden Unterschiede zwischen Tas1r1-defizienten Mäusen [B, D, F] und Tas1r1 Wildtyp-Tieren [A, C, D]. Bei Betrachtung der einzelnen Tubuli fallen jedoch bei Tas1r1 *Knockin*-Tieren vermehrt mislokalisierte Spermatozyten auf, die sich im luminalen Tubulusbereich befinden [B, D, F; vergrößerte Ausschnitte] und nur selten bei Wildtyp-Hoden auftreten [A]. Vereinzelt sind in den Tas1r1-defizienten Hoden auch multinukleäre Riesenzellen [F, Pfeil und vergrößerter Ausschnitt rechts] zu beobachten.

Gezeigt sind Präparate von drei Geschwisterpaaren, links dargestellt ist jeweils das Gewebe des Wildtyp- und rechts des Tas1r1-defizienten Tieres.

Bei genauer Betrachtung des Keimepithels innerhalb der Samenkanälchen waren bei den Rezeptor-defizienten Tieren jedoch leichte Störungen im Aufbau der einzelnen Keimzellschichten zu registrieren: So waren in den Hodenschnitten der homozygoten Tas1r1 mCherry Tiere vermehrt mislokalisierte Spermatozyten im Lumen der Samenkanälchen zu finden (Abbildung 4.52 [B, D, F], vergrößerte Ausschnitte), die eigentlich auf die basalen Zellschichten der Tubuli beschränkt sein sollten und im Hoden von Wildtyp-Tieren nur sehr vereinzelt luminal zu detektieren waren (Abbildung 4.52 [A], vergrößerter Ausschnitt). Im Hoden einzelner Tas1r1-defizienter Tiere wurden

zudem einzelne multinukleäre Riesenzellen gefunden (Abbildung 4.52 [E], Pfeil), die wahrscheinlich auf unvollständige Zellteilungen während der Spermatogenese zurückzuführen sind [Holstein und Eckmann, 1986]. Da die Keimzellreifung innerhalb der Samenkanälchen streng hierarchisch organisiert ist, könnten diese leichten morphologischen Veränderungen des Hodens und die Fehllokalisation einzelner Keimzellstadien auf Störungen im Ablauf der Spermatogenese in den *Tas1r1*-defizienten Tieren hindeuten. Während der Spermatogenese wird die erfolgreiche Bildung von Spermien in verschiedenen Reifungsstadien durch eine strenge Kontrolle der sequentiellen mitotischen und meiotischen Teilungen der Keimzellen reguliert. Um die Qualität der entstehenden Spermatozoen sicherzustellen, ist es dabei von essentieller Bedeutung, defekte und auch überzählige Keimzellen, die nicht optimal von den Sertoli-Zellen versorgt werden können, aus dem Zellverband zu entfernen [Blanco-Rodriguez und Martinez-Garcia, 1996]. Diese Aussortierung genetisch defekter oder nicht-funktioneller Keimzellen erfolgt im Hoden durch den Prozess des programmierten Zelltods [Kerr et al., 1972], der Apoptose. Während der Spermatogenese ergibt sich so eine dynamische Balance zwischen Zell-Proliferation und Apoptose [Williams et al., 1992; Shaha, 2007; Shaha et al., 2011], durch die beim Menschen bis zu 75 % der produzierten Spermatogonien absterben [Dunkel et al., 1997].

Um der Vermutung nachzugehen, dass die Spermatogenese von *Tas1r1*-defizienten Tieren gestört sein könnte, sollte deshalb das Ausmaß der Apoptose im Hoden dieser Tiere ermittelt und mit Wildtyp-Geschwistertieren verglichen werden. Dazu wurde die TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*)-Methode eingesetzt [Darzynkiewicz et al., 2008], bei der während der Apoptose entstehende kurze DNA-Bruchstücke durch eine terminale Transferase mit Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden markiert wurden (*TRITC In situ Cell Death Detection Kit*). Anschließend konnten die apoptotischen Zellen in allen Entwicklungsstadien der Keimzellreifung unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer roten TRITC-Fluoreszenz identifiziert und ausgezählt werden.

Abbildung 4.53 zeigt beispielhaft die Resultate dieser Apoptosefärbungen an Bouin-fixierten Hodenschnitten, die zur Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt wurden. Im Hodengewebe von Wildtyp-Tieren waren innerhalb der *Tubuli seminiferi* vereinzelte rot markierte apoptotische Keimzellen zu registrieren, die überwiegend in den basalen Zellschichten des Keimepithels zu finden waren (Abbildung 4.53, [A und C], weiße Kästchen). Eine vergleichbare Markierung konnte auch im Keimdrüsengewebe homozygoter *Tas1r1* mCherry Geschwistertiere detektiert werden; allerdings waren in diesen Schnitten insgesamt mehr apoptotische Zellen zu finden (Abbildung 4.53 [B und D]).

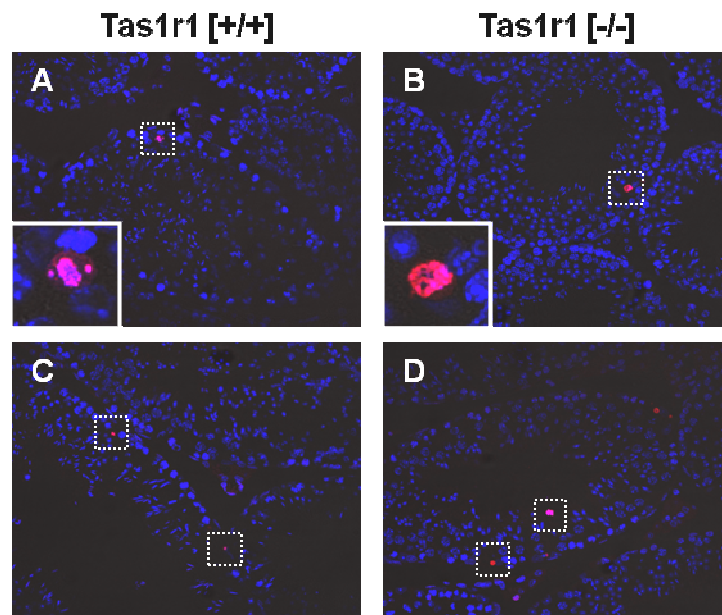


Abbildung 4.53: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis apoptotischer Zellen im Maushoden mit Hilfe der TUNEL-Färbung.

Aus Bouin-fixiertem Hodengewebe von Tieren mit verschiedenem *Tas1r1* Genotyp wurden Paraffinschnitte angefertigt. Zur Visualisierung apoptotischer Zellen wurde eine Fluoreszenz-basierte TUNEL-Färbung (rot) durchgeführt, Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (blau) markiert.

Die TUNEL-positiven Zellen (rot) sind sowohl in Wildtyp-Hoden [*Tas1r1* [+/+]] als auch bei *Tas1r1*-defizientem Gewebe [*Tas1r1* [-/-]] vereinzelt in basalen Keimzellschichten zu finden und weisen eine ähnliche Morphologie auf [A, B]. In *Tas1r1* Knockin-Tieren [D] treten etwas mehr apoptotische Zellen auf als bei Wildtyp-Tieren [C].

Dargestellt ist eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle. TUNEL-positive Zellen sind durch ein gestricheltes Kästchen markiert und in [A und B] exemplarisch vergrößert.

Um den Eindruck einer erhöhten Zahl apoptotischer Zellen zu verifizieren, erfolgte eine quantitative Auswertung der TUNEL-Färbungen der Hodenschnitte von *Tas1r1*-defizienten und Wildtyp-Tieren. Zu diesem Zweck wurde die Zahl apoptotischer Zellen im mikroskopischen Blickfeld und die Zahl der Tubuli pro Feld (ca. 25 - 30 pro Blickfeld) ausgezählt und daraus die Anzahl apoptotischer Zellen pro Blickfeld bzw. pro Tubulus ermittelt.

In der grafischen Auswertung dieser Quantifizierung wird deutlich, dass homozygote *Tas1r1* mCherry Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren tatsächlich eine signifikant höhere Apoptoserate aufwiesen (Abbildung 4.54): Während die durchschnittliche Zahl apoptotischer Zellen im Blickfeld bei Wildtyp-Tieren bei $8,7 \pm 0,8$ Zellen lag, waren bei homozygoten Männchen $13,4 \pm 1,7$ apoptotische Zellen zu registrieren. Heterozygote Tiere zeigten mit durchschnittlich $9,9 \pm 1,4$ rot fluoreszierenden Zellen pro Blickfeld eine mittlere Apoptoserate im Hoden, die signifikant niedriger war als bei den homozygoten Geschwistertieren. Auch bei der Berechnung der TUNEL-positiven Zellen pro Tubulus wiesen *Tas1r1* mCherry [-/-] Mäuse mit $0,45 \pm 0,04$ eine signifikant ($p = 0,004$) höhere testikuläre Apoptoserate als die jeweiligen Wildtyp-Männchen auf ($0,33 \pm 0,02$ apoptotische Zellen pro Tubulus).

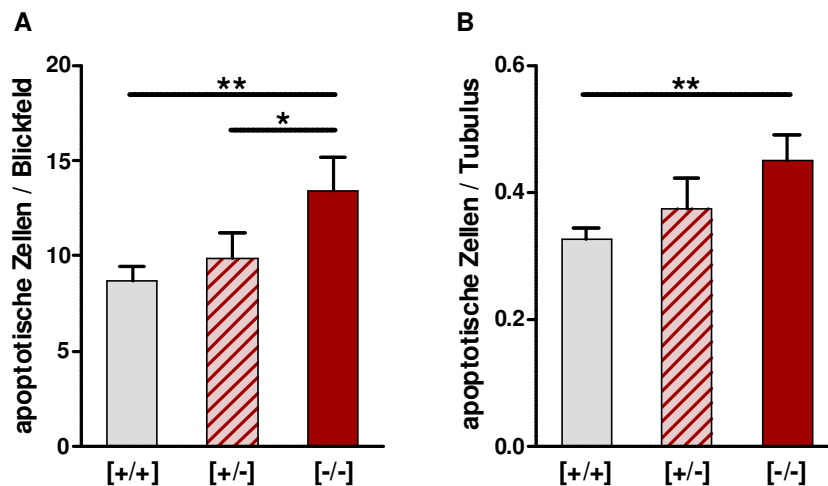


Abbildung 4.54: Quantitativer Vergleich der Apoptose im Hoden von Mäusen mit unterschiedlichem Tas1r1 Genotyp.

Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde in Paraffinschnitten von Bouin-fixiertem Gewebe fluoreszenzmikroskopisch erfasst und als apoptotische Zellen pro analysiertem Blickfeld **[A]** und als durchschnittliche Anzahl der Apoptose-positiven Zellen pro Tubulus **[B]** ausgewertet. Tas1r1-defiziente Tiere [-/-] zeigen eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zum Wildtyp; diese steigt von $8,7 \pm 0,8$ Zellen/Blickfeld [+/+] auf $13,5 \pm 1,7$ [-/-] **[A]**. Die Apoptoserate pro Blickfeld liegt bei heterozygoten Tieren [+/-] zwischen den anderen Genotypen ($9,8 \pm 1,4$) und ist signifikant niedriger als bei homozygoten Tieren. Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei der Apoptoserate pro Tubulus **[B]**; auch in dieser Auswertung ist die Zahl apoptotischer Zellen bei Tas1r1-defizienten Tieren signifikant erhöht.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Analyse von 5 Geschwistertieren pro Genotyp. Pro Tier wurden 3 - 4 Hodenschnitte untersucht, dabei wurden pro Schnitt 3 - 4 Blickfelder mit jeweils 25 - 30 Tubuli ausgezählt. Die Untersuchung wurde in Duplikaten durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurde ein gepaarter studentischer t-Test durchgeführt (*: $p \leq 0,05$; **: $p < 0,01$).

Die in Tas1r1-defizienten Tieren registrierte Erhöhung der Apoptoserate männlicher Keimzellen führte zu der Überlegung, ob der vermehrte programmierte Zelltod zu einer Verringerung der Keimzellzahl und damit einer Abnahme des Hodengewichts und eventuell einer geringeren Anzahl an Spermatozoen führen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das Körpergewicht, Hodengewicht und die Zahl der Spermien im caudalen Teil des Nebenhodens von heterozygoten, homozygoten und Tas1r1 mCherry Wildtyp-Tieren mit gleichem Stammhintergrund ermittelt.

Die Befunde dieser Analysen, die in Tabelle 4.7 zusammengefasst sind, belegen, dass die Tas1r1-Defizienz weder Auswirkungen auf das Körpergewicht noch auf das absolute Hodengewicht hatte. Somit wies auch der Anteil des Hodengewichts am Gesamtkörpergewicht [*relatives Hodengewicht*] bei Tieren aller drei Tas1r1 Genotypen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Zahl reifer Spermien in den Tas1r1-defizienten Tieren war, trotz der erhöhten Zahl apoptotischer Zellen, ebenfalls unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Männchen (Tabelle 4.7 [*Spermienzahl*]).

Da die Bildung und Apoptose von Keimzellen während der Spermatogenese maßgeblich durch das männliche Sexualhormon Testosteron reguliert werden [Troiano et al., 1994; Henriksen et al., 1995; Cheng und Mruk, 2010; Kicman, 2010; Walker, 2010], wurde zusätzlich die Konzentration dieses Hormons im Serum von Geschwistertieren der drei Tas1r1 Genotypen bestimmt. Der Vergleich der Serumkonzentrationen von

Testosteron in heterozygoten, homozygoten und Wildtyp *Tas1r1* mCherry Tieren zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4.7), so dass die registrierte Erhöhung der testikulären Apoptoserate sehr wahrscheinlich nicht durch Veränderungen im Testosteron-Level bedingt war.

Tabelle 4.7: Effekt des *Tas1r1* Genotyps auf die männlichen Reproduktionsorgane der Maus

Nach zervikaler Dislokation wurden adulte männliche Mäuse der drei *Tas1r1* Genotypen ([+/+], [+/-], [-/-]) gewogen, der Hoden entnommen und gewogen, das relative Hodengewicht als Quotient des Hodengewichts zum Körpergewicht berechnet und die Spermienzahl im caudalen Teil des Nebenhodens bestimmt. Die Testosteron-Konzentration im Serum wurde mit Hilfe eines *EIA kits* ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Messergebnisse von mindestens 17 - 46 Tieren mit identischem Stammhintergrund (N2 und N3) (Reproduktionsorgane) bzw. drei Geschwisterpaaren (Testosteron). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) festgestellt.

<i>Reproduktionsorgane</i>	<i>Tas1r1</i> Genotyp		
	[+/+]	[+/-]	[-/-]
Körpergewicht [g]	28,0 \pm 0,7	28,2 \pm 0,4	27,2 \pm 0,5
Hodengewicht [mg]	210 \pm 7	202 \pm 5	198 \pm 7
Relatives Hodengewicht [%]	0,75 \pm 0,03	0,72 \pm 0,02	0,73 \pm 0,03
Spermienzahl [$\times 10^6$]	31,2 \pm 2,3	32,7 \pm 1,9	33,6 \pm 2,2
Serum-Testosteron [pg/ml]	645 \pm 125	548 \pm 50	584 \pm 41

Die Beobachtung, dass *Tas1r1*-defiziente Tiere leichte morphologische Veränderungen und eine erhöhte Apoptoserate im Hoden aufweisen, die auf Störungen der Spermatogenese hindeuten, warf die Frage auf, ob die Keimzell-Entwicklungsstörungen möglicherweise auch Auswirkungen auf die Morphologie und Funktion der entstehenden Spermien haben könnten.

Um die Morphologie von *Tas1r1*-defizienten Spermien näher zu untersuchen, wurden deshalb isolierte caudale Spermien mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch analysiert. Wie Abbildung 4.55 [A und B] verdeutlicht, waren beim Vergleich der Keimzellmorphologie von homozygoten *Tas1r1* mCherry Mäusen (*Tas1r1* [-/-]) mit Spermien von Wildtyp-Tieren (*Tas1r1* [+/+]) keine offensichtlichen Unterschiede im Zellaufbau zu registrieren: Sowohl das Spermienflagellum als auch der Kopf mit dem tiefblau gefärbten Akrosom waren normal geformt. Dieser Eindruck konnte in weiterführenden morphometrischen Analysen bestätigt werden, in denen die Kopfform näher untersucht wurde: In keinem der bestimmten Längen- und Flächenparametern (Abbildung 4.55 [D]) war eine signifikante Abweichung von den Werten der Wildtyp-Zellen zu registrieren (Abbildung 4.55 [D], [I - IV]).

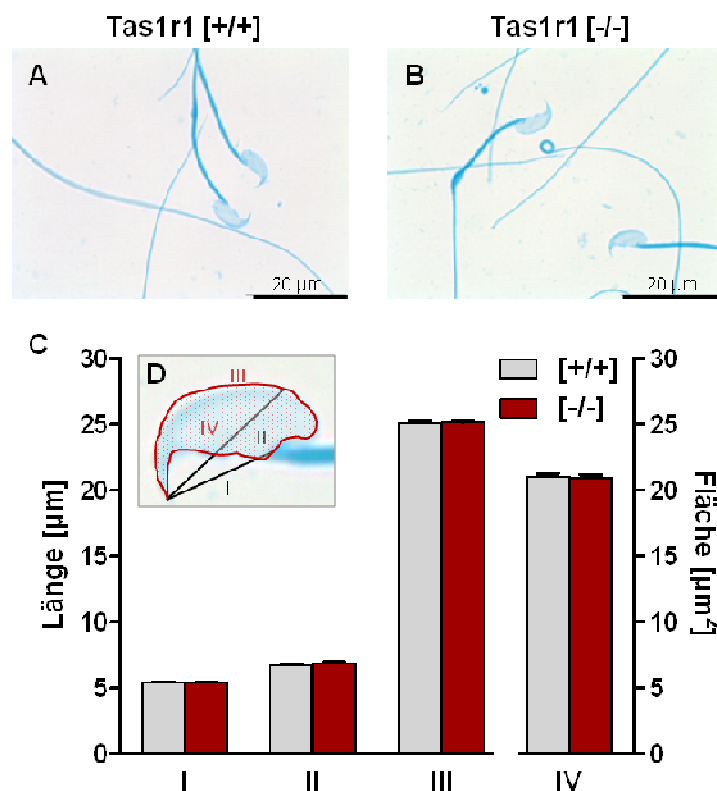


Abbildung 4.55: Morphometrischer Vergleich von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Spermien.

Isolierte epidymale Spermien von Wildtyp- (C57BL/6) und Tas1r1 *Knockin*-Mäusen (N1) wurden fixiert und anschließend mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt, um die Spermienmorphologie und das Akrosom darzustellen. Im Anschluss wurde der Abstand von der Kopfspitze zum Flagellumansatz [I] und zum Ende des Akrosoms [II] sowie Umfang [III] und Fläche [IV] des Spermienkopfes von Zellen beider Genotypen bestimmt. Abbildung [D] gibt einen Überblick über diese Parameter.

[A, B] Flagellum, Kopf und Akrosom Tas1r1-defizienter Spermien ([B], Tas1r1 [-/-]) sind normal ausgebildet. Die Zellen zeigen keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede zu Wildtypspermien ([A], Tas1r1 [+/+]).

[C, D] Bei der morphometrischen Analyse der Spermienzellen ist kein Unterschied in der Größe oder Form des Kopfes feststellbar. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf Tieren pro Genotyp bei denen jeweils 8 - 15 Spermien analysiert wurden. Es sind keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) feststellbar.

4.5.3 Analyse der Spermienfunktion von Tas1r1-defizienten Tieren

Durch die bislang gesammelten Befunde konnte sichergestellt werden, dass Tas1r1-defiziente Mäuse eine normale Anzahl von morphologisch intakten Spermien bilden. Die unbeeinträchtigte Fertilität der Tas1r1 mCherry Mäuse (siehe Tabelle 4.5) deutet zusätzlich darauf hin, dass der Umami-Rezeptor nicht essentiell für die erfolgreiche Befruchtung einer Eizelle ist; dennoch könnten leichte Funktionseinschränkungen, die in der freien Natur entscheidend für den reproduktiven Erfolg wären, durch optimale Zuchtbedingungen oder die Expression anderer Rezeptorproteine kompensiert werden.

Um einen solchen, möglicherweise milden Phänotyp von Spermien Tas1r1-defizienter Männchen identifizieren zu können, wurde deshalb im Folgenden untersucht, ob sich Spermien Tas1r1-defizienter Tiere in einzelnen zellphysiologischen Funktionen, wie

ihrer Motilität, Kapazitierung oder Akrosomreaktion, von Wildtyp-Spermien unterscheiden.

4.5.3.1 Vergleich der Motilität von Spermien mit unterschiedlichem Tas1r1 Genotyp

Da in immunocytochemischen Analysen an isolierten murinen und humanen Spermien sowohl der Tas1r1 als auch sein gustatorischer Dimerisierungspartner Tas1r3 im Flagellum nachgewiesen werden konnten (Abbildung 4.36 und Abbildung 4.42), stellte sich die Frage, ob diese Rezeptoren an der Regulation der Spermienmotilität und der Wegfindung zur Eizelle funktionell beteiligt sein könnten. Um Hinweise auf eine mögliche physiologische Rolle des Tas1r1 an der Bewegungssteuerung im Spermien-schwanz zu sammeln, wurde deshalb zunächst untersucht, ob das Fehlen des Geschmacksrezeptors Auswirkungen auf die Motilität von Spermien hatte. Die Quantifizierung des Anteils motiler Zellen und die Erfassung ihres Bewegungsmusters erfolgte, wie zuvor beschrieben, mit Hilfe eines automatisierten CASA-Systems (siehe Abschnitte 4.3.4.3 und 3.4.2). Dabei wurden die Spermien von Wurfgeschwistertieren untersucht und miteinander verglichen. Eine Zusammenfassung der ermittelten Motilitätswerte von drei Tieren pro Genotyp ist in Tabelle 4.8 gezeigt.

Tabelle 4.8: CASA-Analyse der Motilität von Tas1r1-defizienten Spermien

Zur Untersuchung des Effekts einer Tas1r1 Deletion auf die Spermienmotilität, wurden isolierte caudale Spermien von Wildtyp [$+/+$], heterozygoten [$+/-$] und homozygoten [$-/-$] Tas1r1-Geschwistertieren (Stammhintergrund N2, N3) in einem CASA-System analysiert. Zur Erklärung der einzelnen Abkürzungen siehe Text. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler [$MW \pm STAF$] der Motilitätsbestimmung von drei Geschwisterpaaren; für jedes Tier wurden mindestens 2000 Zellen gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines gepaarten studentischen t-Tests im Vergleich zum Wildtyp-Tier; die dabei jeweils ermittelten p -Werte im Vergleich sind angegeben [p -Wert].

Motilitäts- parameter	[$+/+$]		p -Wert	[$-/-$]	
	$MW \pm STAF$	$MW \pm STAF$		$MW \pm STAF$	p -Wert
Mot [%]	75.6 ± 1.6	76.2 ± 3.9	0.82	74.3 ± 5.4	0.79
Prog [%]	37.4 ± 11.0	37.8 ± 11.6	0.94	36.0 ± 11.3	0.63
VAP [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	137.5 ± 18.2	137.1 ± 14.4	0.96	135.3 ± 18.5	0.82
VSL [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	90.2 ± 17.1	89.2 ± 14.0	0.89	88.5 ± 16.1	0.82
VCL [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	286.7 ± 24.1	281.2 ± 22.6	0.64	276.3 ± 26.5	0.55
ALH [μm]	14.4 ± 0.3	14.7 ± 0.1	0.56	14.6 ± 0.7	0.75
BCF [Hz]	33.1 ± 4.1	33.7 ± 3.4	0.80	33.6 ± 3.7	0.56
STR [%]	62.5 ± 4.4	62.0 ± 4.5	0.75	62.6 ± 3.9	0.83
LIN [%]	31.8 ± 3.2	32.0 ± 2.6	0.85	32.6 ± 2.8	0.23

In dieser Darstellung wird deutlich, dass in den Spermienpräparationen, unabhängig vom Genotyp, ca. $\frac{3}{4}$ aller Zellen motil waren (Tabelle 4.8 [Mot]). Der Anteil progressiv motiler Zellen (Tabelle 4.8 [$Prog$]) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede

zwischen Tas1r1 mCherry Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Männchen. Eine Übereinstimmung zwischen den Genotypen war auch beim Vergleich des Bewegungsmusters anhand verschiedener Geschwindigkeitsparameter wie der Pfadgeschwindigkeit [VAP], der Progressivgeschwindigkeit [VSL] und der Spurgeschwindigkeit [VCL] oder anderer Motilitätsparametern wie der seitlichen Kopfauslenkung [ALH], der Schlagfrequenz [BCF] oder der Linearität ([LIN] und [STR]) zu beobachten. In diesen Analysen konnte somit keine Beeinträchtigung der Spermienmotilität als Folge der Tas1r1-Defizienz detektiert werden.

Ein wichtiger Faktor zur erfolgreichen Befruchtung ist neben einer normalen Motilität der Spermien aber auch die Fähigkeit der zielgerichteten Bewegung zur Eizelle mittels Thermotaxis und Chemotaxis. Aufgrund des hydrophilen Ligandenspektrums und der Lokalisation im Flagellum könnte ein Dimer aus Tas1r3 und Tas1r1 auch einen interessanten Kandidaten für die Detektion potentieller wasserlöslicher Lockstoffe der Eizelle bzw. des weiblichen Genitaltraktes zur chemotaktischen Wegfindung repräsentieren.

Solche chemotaktischen Prozesse sind experimentell relativ schwer von Vorgängen wie Chemokinese oder *Sperm trapping* zu unterscheiden [Eisenbach und Tur-Kaspa, 1999; Eisenbach und Giojalas, 2006], so dass sie einen großen technischen Aufwand und sehr viel Erfahrung erfordern. Im Gegensatz zur Chemotaxis selbst lässt sich jedoch einer der Schlüsselregulatoren dieser zielgerichteten Bewegung von Spermien [Spehr et al., 2003; Publicover et al., 2008; Teves et al., 2009; Yoshida und Yoshida, 2011], die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, mit Hilfe standardisierter Messverfahren zuverlässig quantifizieren und damit analysieren.

Um erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Tas1r1 Proteins an der chemotaktischen Wegfindung oder anderen elementaren Ca^{2+} -abhängigen Prozessen wie der Kapazitierung, Hyperaktivität und Akrosomreaktion [Arnoult et al., 1996b; Kirkman-Brown et al., 2002; Carlson et al., 2003; Publicover et al., 2007; Costello et al., 2009; Veitinger et al., 2011] zu sammeln, wurde deshalb in experimentellen Ansätzen geprüft, ob eine Stimulation des Tas1r1 mit bekannten gustatorischen Liganden zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Spermien führt. Für diese Analysen wurden kapazitierte Mausspermien mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2-AM beladen und anschließend mit Mononatriumglutamat stimuliert. Glutamat bewirkt in Geschmackszellen der Zunge eine Aktivierung des Tas1r1/Tas1r3 Dimers, welches dann in eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert [Hayashi et al., 1996; Zhao et al., 2003]. Die Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration der Spermien wurden in einem 96-Loch Fluoreszenzspektrometer [Solinski et al., 2010] bzw. in einem *Calcium-Imaging setup* [Dietrich et al., 2007] anhand der Fura-2-Ratio ([F340 / F380]: Emission bei Anregung mit 340 nm / Emission bei Anregung mit 380 nm) bestimmt (siehe Abschnitt 3.5.1).

Abbildung 4.56 fasst die Befunde dieser Glutamat-Stimulationen an Spermien von Tas1r1 mCherry homozygoten und Wildtyp-Tieren in einem Fluoreszenzspektrometer exemplarisch zusammen. Da in der 96-Lochplatte des Spektrometers die Fura-2-Ratio einer Spermiesuspension (ca. $5\text{-}10 \times 10^5$ Zellen pro Loch) registriert wird, erlaubt dieses Verfahren, die Ca^{2+} -Signale einer ganzen Spermienpopulation zu erfassen. Dabei können alle Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden, unabhängig davon, in welchem Zellkompartiment sie auftreten. In den dargestellten experimentellen Ansätzen wurden jeweils 90 μl Spermiesuspension vorgelegt. Nach zehn Sekunden erfolgte dann die automatisierte Injektion von 10 μl Stimulationssubstanz. Um die Höhe des maximal induzierbaren Ca^{2+} -Signals festzustellen, wurde das Calcium-Ionophor Ionomycin (5 μM) als Positivkontrolle eingesetzt [Liu und Hermann, 1978]. Die Stimulation mit diesem Ionophor führte zu einem sehr starken Anstieg der Fura-2-Ratio [F340/F380] in Wildtyp-Spermien (Abbildung 4.56 [A], *Ionomycin*) und Tas1r1-defizienten Spermien (Abbildung 4.56 [B], *Ionomycin*), so dass eine vergleichbare Beladung und Viabilität der Spermienpopulationen beider Genotypen sichergestellt werden konnte.

Nach der Injektion von 1 mM, 10 mM bzw. 50 mM Mononatriumglutamat (angegeben ist jeweils die Endkonzentration in der Spermiesuspension) zeigten Spermien von Männchen beider Genotypen hingegen keinen Anstieg ihrer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 4.56, [A und B], [*Glu*]), obwohl die verwendeten Glutamatkonzentrationen in Geschmackszellen der Zunge zu einer robusten Ca^{2+} -Antwort führen [Hayashi et al., 1996; Zhao et al., 2003]. Selbst bei der Stimulation mit der sehr hohen Glutamatkonzentration von 50 mM war kein Unterschied im Verlauf der Fura-2-Ratio im Vergleich zu einer Kontrollstimulation mit Puffer [*HS*] zu registrieren.

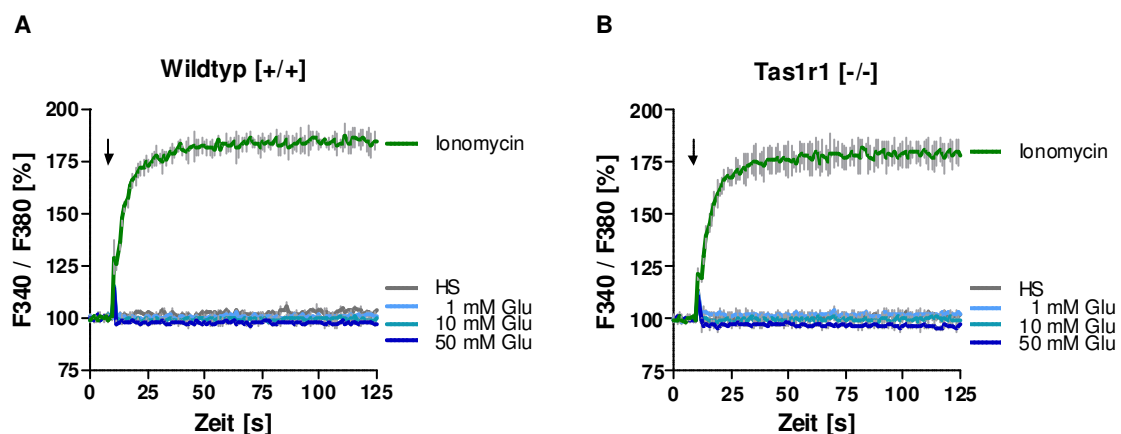


Abbildung 4.56: Fluorimetrische Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Spermien nach Stimulation mit Glutamat.

Isolierte, kapazitierte Spermien von Wildtyp- [Wildtyp $+/+$] und Tas1r1-defizienten Mäusen [Tas1r1 $-/-$] wurden mit Fura-2/AM beladen und in einer 96-Lochplatte mit verschiedenen Glutamat-Konzentrationen [*Glu*] bzw. dem Calcium-Ionophor Ionomycin [*Ionomycin*] stimuliert. Zur Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde der Verlauf der Fura-2-Ratio [F340/F380] aufgezeichnet, auf den Basalwert (100 %) normiert und gegen die Zeit aufgetragen.

Spermien von Wildtyp- [A] und von Tas1r1-defizienten Mäusen [B] zeigen weder nach Stimulation mit Puffer [*HS*] noch mit verschiedenen Glutamat-Konzentrationen (1 mM, 10 mM, 50 mM) eine Änderung der

Fura-2-Ratio. Nach Injektion von 5 μ M Ionomycin [*ionomycin*] ist hingegen ein deutlicher Anstieg des F340/F380 Quotienten auf ca. 180 % des Basalwertes zu detektieren.

Repräsentativ dargestellt ist eine von drei unabhängigen Messungen pro Genotyp. Stimulationen wurden in Duplikaten durchgeführt; gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler (graue Balken). Der Zeitpunkt der automatischen Stimulus-Injektion ist mit einem Pfeil markiert.

Nachdem in Einstiegsexperimenten zunächst keine Aktivierbarkeit von Spermien durch den Tas1r1-Liganden Glutamat registriert werden konnte, wurden ergänzende Ca^{2+} -Messungen an einem Mikroskop-basierten *Calcium Imaging* System durchgeführt. Mit diesem System wurden mikroskopische Einzelzellmessungen durchgeführt, die eine sensitivere Detektion von Ca^{2+} -Signalen ermöglichen. Dabei konnte für jede einzelne analysierte Zelle durch eine Kontrollstimulation mit Ionomycin gegen Ende der Messung festgestellt werden, ob die Zelle vital war, so dass nur lebende Spermien in der Auswertung berücksichtigt wurden. Ein Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass jeweils nur sehr wenige Zellen gleichzeitig untersucht werden können. Da die Spermien zur Messung auf einem Deckgläschen immobilisiert werden müssen, war zudem nur eine Analyse der Fura-2-Ratio im Spermienkopf, der ans Deckgläschen angeheftet war, möglich; die Ca^{2+} -Konzentration im beweglichen Flagellum konnte hingegen nicht erfasst werden. Auch in diesen Einzelzellmessungen wurde, unabhängig vom Tas1r1 Genotyp der Spermien, keine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von 10 mM Glutamat registriert (Abbildung 4.57, [*Glu*], dunkelblaue Kurve). Parallel zu diesen Messungen wurden auch Co-Stimulation der Zellen mit Glutamat und IMP, einem Verstärker des Umami-Geschmacks, durchgeführt. Dieser Umami *Enhancer* wirkt am Tas1r1/Tas1r3 Dimer der Zunge sowohl indem die Antwort auf Glutamat verstärkt wird, als auch indem die Detektionsschwelle für Glutamat gesenkt wird; IMP allein hat bei den eingesetzten Konzentrationen hingegen keine Effekte auf Geschmacksrezeptoren der Zunge [Brand, 2000; Yamaguchi und Ninomiya, 2000; Li et al., 2002; Nelson et al., 2002; Beauchamp, 2009]. Interessanterweise wurde bei der Co-Stimulation von Wildtyp-Spermien mit 10 mM Glutamat und 1 mM IMP tatsächlich eine starke, schnell einsetzende transiente Ca^{2+} -Antwort registriert, die nach ca. 100 Sekunden wieder beendet war (Abbildung 4.57 [A], [*Glu/IMP*], grüne Kurve). Allerdings trat diese Antwort in vergleichbarer Höhe auch in Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren auf (Abbildung 4.57 [B], [*Glu/IMP*]), so dass sie nicht auf den Tas1r1 Rezeptor zurückgeführt werden konnte. Diese Vermutung konnte durch Kontrollexperimente bestätigt werden, in denen Spermien nur mit 1 mM IMP, ohne jegliche Zugabe von Glutamat, stimuliert wurden: Die Inkubation mit IMP allein resultierte in Spermien beider Genotypen zu einem transienten Ca^{2+} -Signal ([*IMP*], hellblaue Kurve), das sogar noch höher ausfiel als bei der kombinierten Gabe von Glutamat und IMP (Abbildung 4.57, [*Glu/IMP*]).

Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ging demnach nicht auf eine Wirkung von Glutamat zurück, sondern wurde durch IMP verursacht. Da die IMP-induzierte Ca^{2+} -Antwort von Spermien keine Unterschiede zwischen den Zellen von homozygoten Tas1r1 mCherry und Wildtyp- Mäusen zeigte, konnte eine Beteiligung des Geschmacksrezeptors an der Detektion von IMP weitestgehend ausgeschlossen

werden. Dieser überraschende Befund konnte demnach nicht direkt zum Verständnis der Tas1r1 Rezeptorfunktion in Spermien beitragen und sollte deshalb, unabhängig von der vorgestellten Arbeit, in weiterführenden Studien näher untersucht werden.

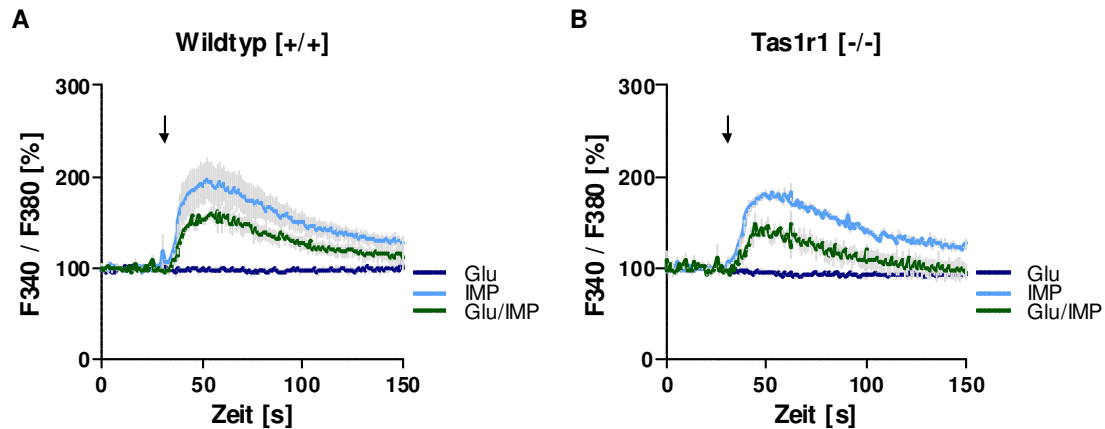


Abbildung 4.57: Einzelzellmessung des Ca^{2+} -Signals in Spermien nach einer Stimulation mit Glutamat und dem Umami Enhancer IMP.

Mit Fura-2 beladene, kapazitierte Mausspermien wurden auf einem Deckglas immobilisiert. Anschließend wurde die Fura-2-Ratio $[F340/F380]$ in den Spermienköpfen in einem *Calcium Imaging Setup* bestimmt und auf den Basalwert vor der Stimulation (100 %) normiert. Nach 30 Sekunden wurden die Zellen mit 10 mM Glutamat, 1 mM IMP oder einer Kombination der beiden Stoffe stimuliert.

Während die Zugabe von 10 mM Glutamat $[Glu]$ keine Veränderung der Fura-2-Ratio von Wildtyp- **[A]** und Tas1r1-defizienten **[B]** Spermien bewirkt, steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation mit IMP $[IMP]$ stark an und kehrt nach 60 - 90 Sekunden fast vollständig auf den Ausgangswert zurück. Ein ähnlicher transienter Anstieg der Fura-2-Ratio ist in beiden Genotypen auch nach Zugabe der Stimuluskombination Glutamat/IMP $[Glu/IMP]$ zu beobachten; dieser ist jedoch weniger stark ausgeprägt als bei der alleinigen Gabe von IMP.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der durchschnittlichen Ca^{2+} -Antwort der Spermien von 3 - 4 Tieren pro Genotyp. Pro Tier wurden 18 - 47 Zellen analysiert. Der Zeitpunkt der manuellen Stimulusgabe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Eine direkte Aktivierung von Spermien durch Glutamat war anhand der vorangehend beschriebenen Ca^{2+} -Messungen zwar nicht feststellbar; dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass der Tas1r1 Rezeptor keine funktionelle Rolle in Spermien haben kann, da bei einer Stimulation mit Glutamat auch sehr kleine, lokale Ca^{2+} -Signale im Flagellum entstehen könnten, die mit den eingesetzten Techniken nicht registriert werden konnten.

4.5.3.2 Analyse der Akrosomreaktion von Tas1r1-defizienten Tieren

Die in murinen und humanen Spermien identifizierten Geschmacksrezeptoren der Tas1r-Familie konnten nicht nur im Flagellum, sondern auch im Spermienkopf nachgewiesen werden. Aufgrund der Lokalisation des Tas1r1 und Tas1r3 im Akrosom und dem Äquatorialsegment von Spermien erschien eine funktionelle Beteiligung dieser Rezeptoren an der Akrosomreaktion ebenfalls als eine interessante Möglichkeit. Um dieser Hypothese nachzugehen, konzentrierten sich die funktionellen Untersuchungen deshalb im Folgenden auf eine Charakterisierung der Akrosomreaktion von Spermien Tas1r1-defizienter Mäuse. Dabei sollte u. a. geprüft werden, ob die Tas1r1 Defizienz

Auswirkungen auf den elementaren Prozess der akrosomalen Exocytose hat, um damit klären zu können, ob der Tas1r1 Rezeptor eventuell als Kandidat für die Erkennung der *Zona pellucida* in Frage kommen oder in die präzise Regulation der Akrosomreaktion involviert sein könnte.

Eine der Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Exocytose des akrosomalen Vesikels von Spermien stellt die Kapazitierung dar. Erst durch diesen sekundären Reifungsprozess, den Spermien *in vivo* im weiblichen Genitaltrakt am Beginn des Eileiters durchlaufen, erlangen die Zellen die Fähigkeit, nach Bindung der *Zona pellucida* die Akrosomreaktion zu durchlaufen [Austin, 1952; Witte und Schafer-Somi, 2007; Florman et al., 2008; Abou-Haila und Tulsiani, 2009]. Um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede in der akrosomalen Exocytose nicht auf eine Veränderung der Kapazitierung von Tas1r1-defizienten Spermien zurückzuführen sind, wurde deshalb zunächst geprüft, ob dieser sekundäre Reifungsprozess in Spermien von homozygoten Tas1r1 mCherry Tiere ungestört abläuft.

Da die Auslagerung von Cholesterol aus der Spermienmembran eine essentielle Bedeutung für die Kapazitierung von Spermien hat [Witte und Schafer-Somi, 2007; Gadella et al., 2008; Abou-Haila und Tulsiani, 2009; Sheriff und Ali, 2010], wurde der Verlauf und Umfang der Kapazitierung von Wildtyp- und transgenen Spermien anhand der Auslagerung von Cholesterol aus der Plasmamembran verglichen. Dazu wurden Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren isoliert und in Kapazitierungspuffer bei 37 °C *in vitro* kapazitiert. Im Abstand von 30 Minuten wurden Proben entnommen und der Cholesterol-Gehalt im Überstand bestimmt, um so die Menge des aus der Spermienmembran ausgelagerten Cholesterols zu quantifizieren [Fukami et al., 2001; Butler et al., 2002].

In Abbildung 4.32 sind die Ergebnisse dieser experimentellen Ansätze gezeigt. Zur Ermittlung der Cholesterol-Auslagerung wurde die Cholesterolmenge im Überstand zu Beginn der Inkubation (WT: $t_0 = 42,3 \pm 3,4$; Tas1r1 $[-/-]$: $t_0 = 36,6 \pm 1,7$ ng Cholesterol/ 10^6 Spermien) von allen anderen Werten subtrahiert. In der Abbildung wird deutlich, dass die Menge des ausgelagerten Cholesterols während der Inkubation in Kapazitierungsmedium bei Spermien beider Genotypen kontinuierlich anstieg. Weder im zeitlichen Verlauf noch in der Menge des ausgeschleusten Cholesterols waren signifikante Unterschiede in der Cholesterolauslagerung zwischen Zellen von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Tieren zu registrieren (Abbildung 4.58), so dass von einer vergleichbaren Kapazitierung der Spermien beider Genotypen ausgegangen wurde.

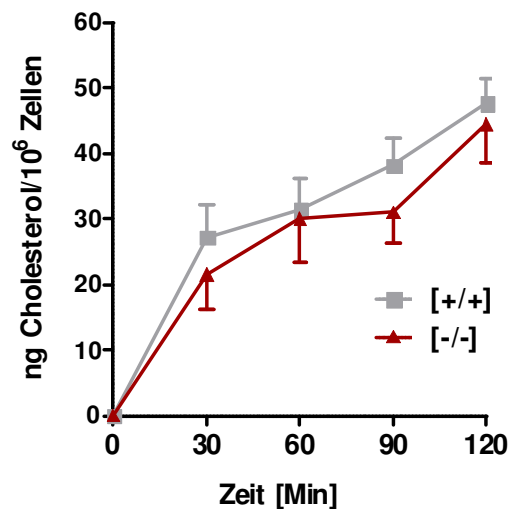


Abbildung 4.58: Verlauf der Cholesterol-Auslagerung während der Kapazitierung von Spermien mit unterschiedlichem Tas1r1 Genotyp.

Isolierte epididymale Spermien wurden in Kapazitierungsbuffer inkubiert und im Abstand von 30 Minuten wurde die Menge an Cholesterol im Überstand bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Gezeigt ist die im Verlauf der Kapazitierung ausgelagerte Cholesterolmenge, abzüglich des Cholesterols zum Startzeitpunkt ($t_0 = 0$ ng).

Sowohl Wildtyp-Spermien (C57BL/6) [+/+, grau] als auch Tas1r1-defiziente Spermien (N1) [-/-, rot] zeigen eine kontinuierlich ansteigende Menge von Cholesterol im Überstand. Die Menge an ausgelagertem Cholesterol liegt bei den Wildtyp-Tieren [+/+] etwas, jedoch nicht signifikant höher als bei den *Knockin*-Tieren [-/-].

Grafisch aufgetragen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von neun unabhängigen Spermienpräparationen gegen die Zeit in Minuten [Min].

Nachdem keine Unterschiede in der Kapazitierung von Tas1r1-defizienten Spermien festgestellt werden konnten, wurde die akrosomale Exocytose der kapazitierten Zellen näher untersucht.

Um zunächst zu prüfen, ob die Fusionsmaschinerie des akrosomalen Vesikels durch das Fehlen des Tas1r1 Rezeptors beeinträchtigt sein könnte, wurde zunächst die maximal induzierbare Akrosomreaktionsrate nach einer direkten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration untersucht [Talbot et al., 1976; Kirkman-Brown et al., 2002]. Dazu wurden Spermien von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Mäusen für 90 Minuten kapazitiert und anschließend 30 Minuten lang mit dem Calcium-Ionophor A23187 (10 μM) inkubiert, fixiert und zur Darstellung des Akrosoms mit einer Coomassie-Lösung gefärbt. In parallel durchgeführten Kontrollansätzen, in denen die Zellen nur mit dem Puffer inkubiert wurden, in dem auch das A23187 gelöst war (0,1 % DMSO), wurde die Rate der Akrosomreaktionsrate bestimmt, die spontan während des Versuches ohne eine künstliche Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte [DasGupta et al., 1994].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an 15 Tieren pro Genotyp sind in Abbildung 4.59 [A] dargestellt. In der Zusammenfassung der experimentellen Ansätze wird deutlich, dass die Inkubation mit dem Calcium-Ionophor [A23187] in den Spermien beider Genotypen zu einer signifikanten Erhöhung der Akrosomreaktionsrate im Ver-

gleich zur DMSO-Kontrolle [*DMSO*] führte. Dabei waren keine Unterschiede im Umfang der durch A23187 absolut erreichten Akrosomreaktionsrate zwischen homozygoten *Tas1r1* mCherry Mäusen (*Tas1r1* [-/-], rote Säulen) und Wildtyp-Tieren (*Tas1r1* [+/+], graue Säulen) feststellbar, so dass eine Störung der Exocytose-maschinerie durch die *Tas1r1*-Defizienz ausgeschlossen werden konnte.

Interessanterweise zeigte sich allerdings in Kontrollansätzen, die nur mit dem DMSO-Puffer [*DMSO*] inkubiert wurden, ein signifikanter Unterschied zwischen den Spermien beider Genotypen (Abbildung 4.59 [A]): Während die spontane Akrosomreaktionsrate der Wildtyp-Zellen in diesen Ansätzen bei 28 ± 2 % lag, verloren ohne Ionophor-Behandlung durchschnittlich 35 ± 3 % der *Tas1r1*-defizienten Spermien ihr Akrosom.

Dieser Unterschied in der spontanen Exocytoserate war auch in weiteren experimentellen Ansätzen zu registrieren, in denen Spermien mit dem physiologischen Auslöser der Akrosomreaktion, der *Zona pellucida*, inkubiert wurden. In diesen Versuchen sollte der Frage nachgegangen werden, ob der *Tas1r1* möglicherweise an der Erkennung der Glykoprotein-reichen Eizellhülle beteiligt sein könnte und *Tas1r1*-defiziente Tiere somit Einschränkungen in der physiologisch-induzierten Akrosomreaktion zeigen. Die für diese Analysen benötigten *Zonae pellucidae* wurden durch eine Percoll-Gradienten-Zentrifugation aus homogenisierten Ovarien von 6 - 10 Wochen alten Mäusen isoliert und dann solubilisiert (siehe Abschnitt 3.4.6). Mit dem erhaltenen Zona-Solubilisat wurden anschließend kapazitierte Spermien von *Tas1r1*-defizienten und Wildtyp-Tieren mit identischem Stammhintergrund für 30 Minuten stimuliert und der akrosomale Status der Zellen mikroskopisch ermittelt. Wie Abbildung 4.59 [B] verdeutlicht, konnte in diesen Stimulationen mit dem physiologischen Auslöser der Akrosomreaktion kein signifikanter Unterschied in den absoluten akrosomalen Exocytoseraten zwischen Spermien der beiden analysierten Genotypen registriert werden.

Die Befunde der zuvor beschriebenen Analysen der Akrosomreaktion deuten darauf hin, dass die Detektion der *Zona pellucida* und die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionskaskaden [Abou-Haila und Tulsiani, 2009] sowie die Exocytosereaktion des akrosomalen Vesikels nicht durch die *Tas1r1*-Defizienz beeinflusst wurden. Die vergleichbare Induzierbarkeit der Akrosomreaktion in beiden Genotypen belegt zudem, dass die Kapazitierung *Tas1r1*-defizienter Tiere vergleichbar war und untermauerte so die Befunde der experimentellen Ansätze zum Umfang der Cholesterolauslagerung (Abbildung 4.58). Allerdings deuten die erhöhten Akrosomreaktionsraten der *Tas1r1*-defizienten Tiere in unstimulierten Proben (Abbildung 4.59 [A], [*DMSO*]) darauf hin, dass der Rezeptorverlust möglicherweise Auswirkungen auf die Verhinderung eines spontanen Verlusts des Akrosoms haben könnte.

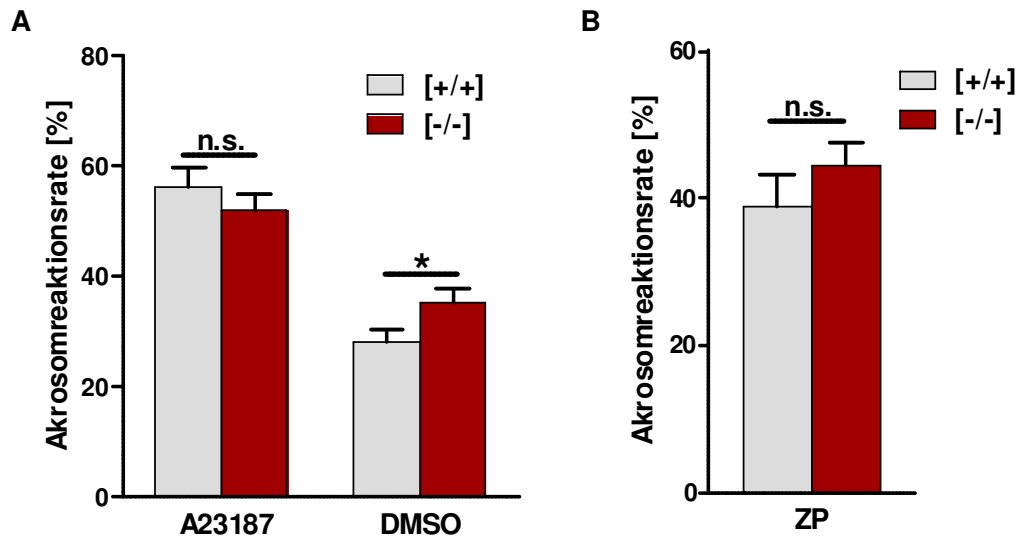


Abbildung 4.59: Analyse der Akrosomreaktion von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Tieren nach Stimulation mit A23187 und Zona pellucida.

Spermien wurden aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert, kapazitiert und anschließend mit dem Calcium-Ionophor A23187 [A] bzw. mit solubilisierter *Zona pellucida* [B] stimuliert. Nach der Fixierung wurde der akrosomale Status mit Hilfe einer Coomassie-Färbung bestimmt.

[A] Nach der Stimulation mit dem Calcium-Ionophor [A23187] zeigen Wildtyp- ([+/+], grau) und Tas1r1-defiziente Spermien ([-/ -], rot) einen signifikanten Anstieg der akrosomalen Exocytose im Vergleich zur Pufferkontrolle [DMSO]. Zwischen den beiden Genotypen besteht kein signifikanter Unterschied [n. s.] in den durch A23187 induzierten Akrosomreaktionsraten; allerdings ist der Wert der DMSO-Kontrolle bei Tas1r1-defizienten Tieren signifikant höher als bei Wildtyp-Männchen. [B] Nach Inkubation der Spermien mit *Zona pellucida* [ZP] ist ein signifikanter Anstieg der akrosomalen Sekretion zu registrieren, der jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Tas1r1 *Knockin*-Spermien aufweist.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 15 (A23187) bzw. sieben (ZP) unabhängigen Experimenten an Spermien von Tieren mit identischem Stammhintergrund (N2, N3). Zur statistischen Analyse wurde ein studentischer t-Test durchgeführt (*: $p \leq 0,05$).

Um zu prüfen, ob der Tas1r1 Rezeptor möglicherweise an Prozessen beteiligt sein könnte, die die Akrosomreaktion regulieren und einen vorzeitigen, abortiven Verlust des akrosomalen Vesikels verhindern, wurde die Spontanrate der Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren mit der von Wildtyp-Männchen verglichen [DasGupta et al., 1994; Yanagimachi, 1994]. Dazu wurden reife Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert und entweder sofort fixiert, um die Akrosomreaktionsrate in unkapazitierten Zellen zu ermitteln, oder 90 Minuten lang in Kapazitierungsmedium inkubiert, bevor der akrosomale Status bestimmt wurde.

Abbildung 4.60 zeigt die Ergebnisse dieser Quantifizierung der spontanen Akrosomreaktionsrate von Spermien Tas1r1-defizienter und von Wildtyp-Tieren. Bei Spermien der Mäuse beider Genotypen stieg die Spontanrate nach der Kapazitierung (rechtes Säulenpaar, [kapazitiert]) im Vergleich zu unkapazitierten Spermien (linkes Säulenpaar, [unkapazitiert]) deutlich an, was darauf zurückzuführen war, dass die Zellen erst während der Kapazitierung ihre vollständige Fähigkeit zur Akrosomreaktion ausbildeten und somit die Wahrscheinlichkeit eines spontanen Verlusts des Akrosoms im Verlauf der Kapazitierung anstieg. Vergleicht man jedoch die Akrosomreaktionsrate der beiden Genotypen, so fällt auf, dass die Exocytoserate der Tas1r1-defizienten Spermien (rote Säulen) unabhängig vom Kapazitierungszustand signifikant höher war

als bei Zellen von Wildtyp-Tieren (graue Säulen) mit gleichem Stammhintergrund (Abbildung 4.60). Diese Befunde stützen somit die Vermutung, dass der Tas1r1 Rezeptor an der Kontrolle der akrosomalen Exocytose beteiligt sein könnte.

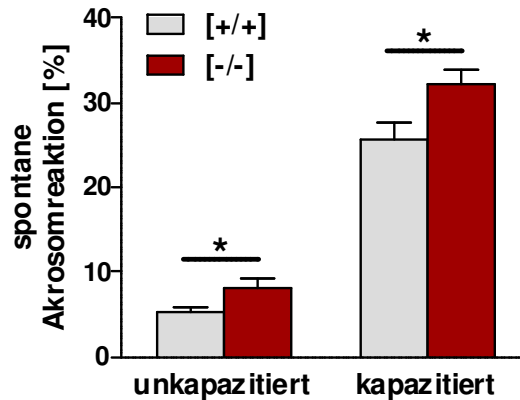


Abbildung 4.60: Vergleich der spontanen Akrosomreaktionsrate in Spermien von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Mäusen.

Aus der Cauda des Nebenhodens von Wildtyp [+/+] und Tas1r1-defizienten [-/-] Tieren wurden Spermien isoliert und entweder direkt [unkapazitiert] oder nach 90minütiger Kapazitierung [kapazitiert] fixiert und gefärbt. Im Anschluss wurde der akrosomale Status lichtmikroskopisch bestimmt.

Die Tas1r1 *Knockin*-Spermien [-/-], rot) zeigen sowohl unkapazitiert als auch kapazitiert eine signifikant höhere Rate an spontaner Akrosomreaktion als Wildtyp-Spermien [+/+], grau). Die Spontanrate ist bei kapazitierten Spermien [kapazitiert] in beiden Genotypen signifikant höher als in unkapazitierten Zellen [unkapazitiert].

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 15 unabhängigen Experimenten an Tieren mit gleichem genetischen Hintergrund (N2, N3). Zur statistischen Analyse wurde ein studentischer t-Test durchgeführt (*: $p \leq 0,05$).

Um der Hypothese einer funktionellen Rolle des Umami-Rezeptors für die Regulation der Akrosomreaktion nachzugehen, sollte im Folgenden geklärt werden, ob eine Aktivierung des Rezeptors Auswirkungen auf die akrosomale Exocytose von Spermien hat. Dazu wurden Spermien von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Tieren mit Glutamat und dem Umami *Enhancer* IMP inkubiert und die akrosomale Sekretionsrate bestimmt, um so eine mögliche Induktion oder Inhibition der akrosomalen Sekretion durch die Rezeptorstimulation feststellen zu können.

In diesen Ansätzen konnten in Wildtyp-Spermien keine signifikanten Effekte auf die Akrosomreaktionsrate durch Glutamat (10 mM), IMP (1 mM) oder eine Kombination der beiden Geschmacksstoffe im Vergleich zu einer Inkubation mit Puffer registriert werden (Abbildung 4.61, graue Säulen). Auch die Zugabe von 10 mM Natriumchlorid, das eingesetzt wurde, um eventuelle osmotische Einflüsse der Stimulationssubstanzen zu kontrollieren, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die akrosomale Exocytose (Abbildung 4.61, [NaCl]). Vergleichbare Resultate wurden auch mit Tas1r1-defizienten Spermien erzielt: Bei keinem der verwendeten Geschmacksstoffe war eine signifikante Änderung des Anteils Akrosom-reagierter Zellen im Vergleich zur basalen Akrosomreaktionsrate zu registrieren (Abbildung 4.61, rote Säulen). Allerdings konnte auch in diesen Versuchen beobachtet werden, dass der Anteil der Tas1r1-defizienten Zellen ohne Akrosom bei jedem Stimulus höher war als bei Spermien von Wildtyp-Tieren

(Abbildung 4.61), was durch die höhere Rate an spontaner Akrosomreaktion von Tas1r1-defizienten Spermien (Abbildung 4.60) bedingt war.

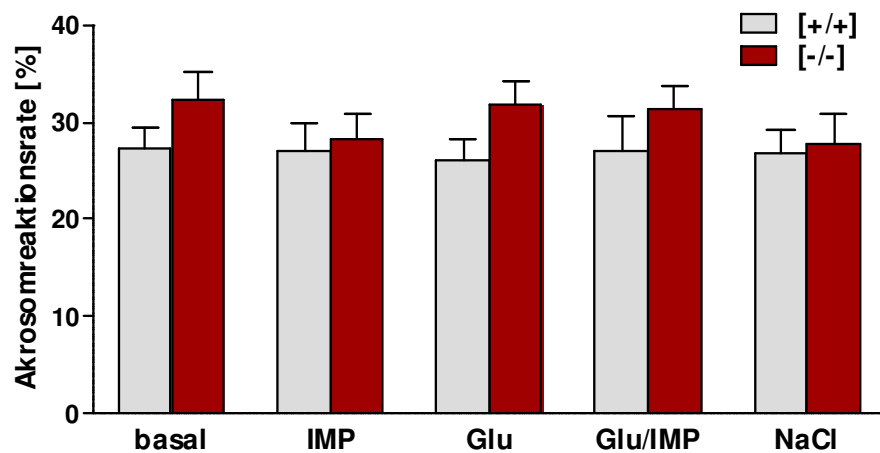


Abbildung 4.61: Untersuchung der Wirkung von Glutamat auf die Akrosomreaktion in Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Spermien.

Kapazitierte Spermien von Tas1r1-defizienten $[-/-]$ und Wildtyp-Tieren $[+/+]$ wurden für 30 Minuten mit 10 mM Natriumglutamat $[Glu]$, 1 mM IMP $[IMP]$, einer Kombination beider Substanzen $[Glu/IMP]$, mit 10 mM NaCl $[NaCl]$ oder nur mit Puffer $[basal]$ inkubiert, anschließend fixiert, gefärbt und auf ihren akrosomalen Status hin geprüft.

Die Akrosomreaktion von Wildtyp- und Tas1r1 *Knockin*-Spermien lässt sich weder durch Glutamat allein noch durch Glutamat in Kombination mit IMP induzieren. Auch IMP oder NaCl haben keinen signifikanten Effekt auf die akrosomale Exocytose beider Genotypen. Unabhängig von der Stimulationssubstanz zeigen Tas1r1-defiziente Tiere in den Ansätzen eine leicht erhöhte Spontanrate.

Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben unabhängigen Experimenten pro Genotyp; es wurden Geschwistertiere und Tiere mit gleichem genetischen Hintergrund (N2, N3) analysiert.

Neben dem Tas1r1, für dessen funktionelle Beteiligung an der Akrosomreaktion bereits Hinweise durch die genetisch modifizierte Tas1r1 mCherry Reportermauslinie gesammelt werden konnten, wurde in immunocytochemischen Ansätzen auch das Tas1r3 Protein im Akrosom von Spermien nachgewiesen. Dieser Rezeptor ist im Geschmackssystem nicht nur für die Detektion von Umami-Stimuli verantwortlich (als Dimer mit dem Tas1r1), sondern bildet zusammen mit dem Tas1r2 auch das Rezeptordimer zur Erkennung süßer Geschmacksstoffe. Aufgrund dieses breiteren Ligandenspektrums des Tas1r3 stellte sich die Frage, ob der Rezeptor in Spermien möglicherweise auch unabhängig vom Tas1r1 durch süße Geschmacksstoffe aktiviert werden könnte. Um die Versuche zur Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch Liganden der Tas1r-Rezeptorfamilie zu komplettieren, wurde deshalb auch der Effekt von süß schmeckenden Substanzen auf die akrosomale Exocytose geprüft.

Im Rahmen dieser Experimente wurden kapazitierte caudale Spermien von Wildtyp-Tieren mit verschiedenen gustatorischen Liganden des Tas1r2/Tas1r3 Dimers stimuliert und dann der akrosomale Status bestimmt. Die Befunde dieses experimentellen Ansatzes, die in Abbildung 4.62 gezeigt sind, belegen, dass weder der verwendete Zucker $[Glucose]$, noch die eingesetzten Süßstoffe ($[Saccharin]$, $[Acesulfam K]$) noch das süße Protein Thaumatin in der Lage waren, den Anteil Akrosom-reagierter Zellen im Vergleich zum Basalwert zu erhöhen.

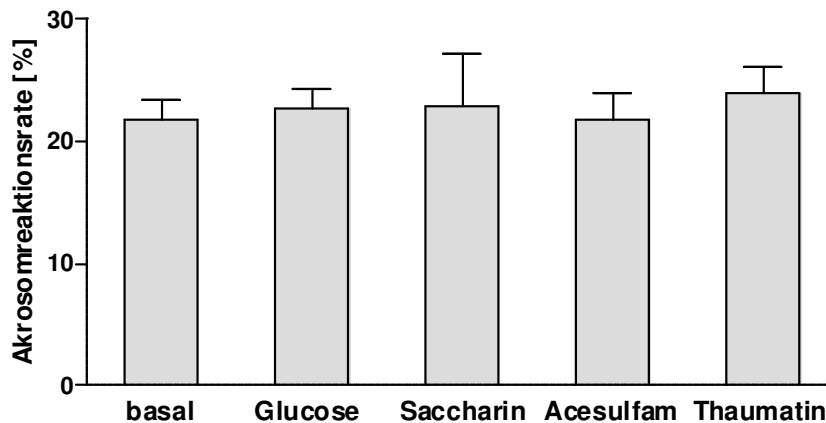


Abbildung 4.62: Effekt von Süßsubstanzen auf die Akrosomreaktion.

Spermien wurden aus dem caudalen Teil des Nebenhodens von Wildtyp-Mäusen (Balb/c) isoliert, 60 Minuten kapazitiert und anschließend für 30 Minuten mit verschiedenen süßen Geschmacksstoffen inkubiert. Nach der Fixierung wurde der Anteil der Akrosom-reagierten Spermien mit Hilfe einer Coomassie-Färbung bestimmt.

Die Inkubation mit 100 mM Glucose [*Glucose*], 1 mM Saccharin [*Saccharin*], 100 mM Acesulfam K [*Acesulfam*] bzw. mit 100 μ M Thaumatin [*Thaumatin*] führt nicht zu einer Induktion der Akrosomreaktion.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 - 7 unabhängigen Stimulationen. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied zur Pufferkontrolle feststellbar (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

4.5.3.3 Quantifizierung der Konzentrationen der *second messenger* Ca^{2+} und cAMP in isolierten Spermien der Tas1r1 mCherry Reportermauslinie

Die bislang gesammelten Befunde, die eine erhöhte Spontanrate von Tas1r1-defizienten Spermien belegen, legen eine funktionelle Beteiligung des Tas1r1 Rezeptors an der Akrosomreaktion nahe. Trotz des Phänotyps einer vermehrten spontanen akrosomalen Exocytose haben jedoch Stimulationen der Zellen mit Glutamat keine Auswirkungen auf die Akrosomreaktionsrate von Wildtyp- oder Tas1r1-defizienten Spermien erkennen lassen. Die erhöhte Akrosomreaktionsrate könnte somit möglicherweise auf eine Basalaktivität des Rezeptors zurückzuführen sein, die an der Kontrolle der Akrosomreaktion beteiligt ist. Dieses Modell erscheint besonders interessant, da eine solche konstitutive Aktivität mehrfach bei GPCRs beobachtet wurde [Seifert und Wenzel-Seifert, 2002] und auch für den Dimerisierungspartner des Tas1r1, den Tas1r3, bereits beschrieben wurde [Galindo-Cuspinera et al., 2006]. Außerdem erfolgt die Signaltransduktion von Tas1-Rezeptoren im Geschmackssystem über die beiden *second messenger* Ca^{2+} und cAMP [Kinnamon und Vandenbeuch, 2009], die beide elementare Regulatoren der Akrosomreaktion darstellen [Breitbart, 2002b; Mayorga et al., 2007; Abou-Haila und Tulsiani, 2009].

Um zu prüfen, ob der Tas1r1 Rezeptor tatsächlich an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} - und cAMP-Level in Spermien beteiligt sein könnte, wurden Versuche durchgeführt, in denen die basalen Konzentrationen dieser *second messenger* in Spermien von Tas1r1-defizienten und von Wildtyp-Tieren verglichen wurden.

Zur Ermittlung der basalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Spermien wurde in *Calcium Imaging* Experimenten die Fluoreszenz des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Fura-2 im Spermienkopf bestimmt. Nach einer Kalibrierung des Messsystems mit Ca^{2+} -freien

bzw. stark Ca^{2+} -haltigen Puffern (Abschnitt 3.5.1), konnte die freie Ca^{2+} -Konzentration nach der Formel von Grynkiewicz [Grynkiewicz et al., 1985] aus den gemessenen Fura-2-Ratios berechnet werden. Um sicherzustellen, dass bei diesen Analysen nur lebende Zellen berücksichtigt wurden, wurden nur Zellen in die Auswertung aufgenommen, die nach einer Stimulation mit Ionomycin ($5\ \mu\text{M}$) gegen Ende der Messung einen starken Anstieg ihrer Fura-2-Ratio zeigten.

Abbildung 4.63 zeigt eine Übersicht der Resultate dieser experimentellen Untersuchungen an unkapazitierten Spermien von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Tieren mit gleichem Stammhintergrund (N2, N3). Im *Scatter Plot* in [A] sind die berechneten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen der Spermien von jeweils 5 Tieren pro Genotyp dargestellt; dabei entspricht jedes Kästchen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einer einzelnen Zelle. In dieser Darstellung wird deutlich, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration individueller Spermien eines Tieres stark schwankten. Die für die einzelnen Tiere aus diesen Werten berechneten mittleren Konzentrationen des Calcium-Ions (blaue Striche) wiesen hingegen deutlich geringere Unterschiede auf und waren mit 80 - 100 nM vergleichbar zu bereits publizierten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Mauspermien [Wennemuth et al., 2003; Schuh et al., 2004]. Beim Vergleich der für jedes Tier bestimmten mittleren Fura-2-Ratio und der daraus berechneten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 4.63 [B]) fiel auf, dass unkapazitierte Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren trotz der individuellen Schwankungen zwischen einzelnen Tieren (Abbildung 4.63 [A]) tatsächlich eine signifikant höhere basale Ca^{2+} -Konzentration aufwiesen als die Zellen von Wildtyp-Tieren.

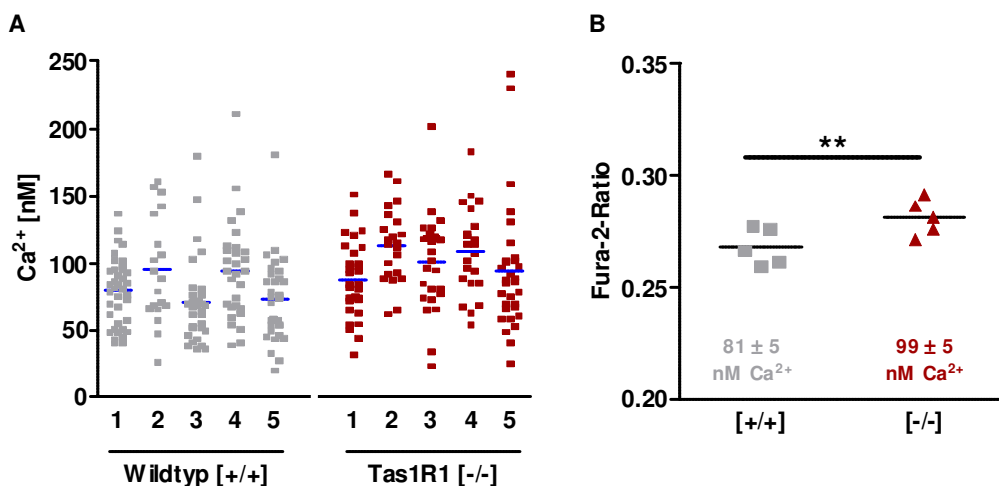


Abbildung 4.63: Vergleich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in unkapazitierten Spermien von Wildtyp- und Tas1r1 *Knockin*-Tieren.

Aus dem caudalen Teil des Nebenhodens von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren wurden Spermien in HS Puffer isoliert und mit Fura-2-AM beladen. Anschließend wurde die Fura-2-Ratio in den unbehandelten Zellen gemessen und die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede einzelne Zelle nach [Grynkiewicz et al., 1985] berechnet.

[A] Die Abbildung zeigt einen *Scatter Plot* der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (kleine Quadrate) der Spermien von fünf Wildtyp- (grau) und fünf Tas1r1-defizienten (rot) Tieren. Die mittlere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der Zellen einer Maus ist durch einen blauen Balken gekennzeichnet.

[B] stellt einen *Scatter Plot* der durchschnittlichen Fura-2-Ratios von unkapazitierten Spermien Tas1r1-defizienter und Wildtyp-Mäuse dar. Der Mittelwert der Fura-2-Ratios (schwarzer Balken) und die daraus

berechneten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen liegen in Tas1r1-defizienten Spermien ($99 \pm 5 \text{ nM}$) ($[-/-]$, rot) signifikant höher als in Wildtyp-Zellen ($81 \pm 5 \text{ nM}$) ($[+/+]$, grau). Dargestellt sind die berechneten freien Ca^{2+} -Konzentrationen [A] bzw. die Fura-2-Ratios [B] der Spermien von fünf Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren aus dem gleichen Wurf bzw. mit identischem Stammhintergrund. Zur statistischen Analyse wurde ein gepaarter studentischer t-Test durchgeführt (**: $p \leq 0,01$).

Wie bereits in der Literatur beschrieben, war in Spermien beider Genotypen nach der Inkubation in einem Bicarbonat und BSA-haltigem Kapazitierungsbuffer eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu beobachten [Breitbart, 2002a; Wennemuth et al., 2003; Schuh et al., 2004]. Beim Vergleich der Ca^{2+} -Konzentration kapazitierten Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren mit den entsprechenden Wildtyp-Männchen war, wie auch in unkapazitierten Zellen, eine Tendenz der Tas1r1-defizienten Spermien zu einer erhöhten basalen intrazellulären Menge des Kations zu registrieren (Abbildung 4.64); allerdings war der Unterschied in den kapazitierten Spermien nicht signifikant ($p = 0,2$).

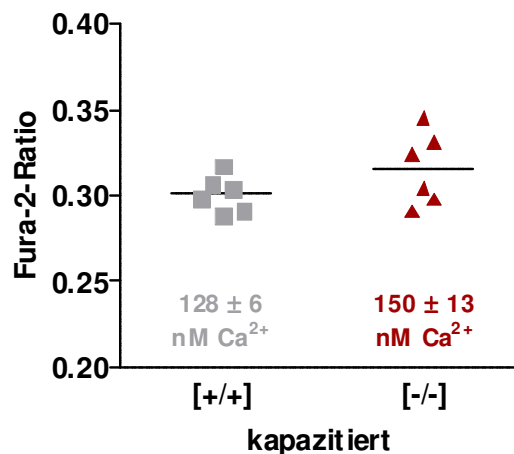


Abbildung 4.64: Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen in Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren nach der Kapazitierung.

Isolierte caudale Spermien von Tieren verschiedener Tas1r1 Genotypen wurden 60 Minuten lang kapazitiert und anschließend mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2-AM beladen. Danach wurde die Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators im Kopf der Spermien in einem *Calcium Imaging* System bestimmt. Gezeigt ist ein *Scatter Plot* der durchschnittlichen Fura-2-Ratios (F340/F380) der Spermien von jeweils sechs Wildtyp- ($[+/+]$, graue Quadrate) und Tas1r1-defizienten Tieren ($[-/-]$, rote Dreiecke). Die Lage der durchschnittlichen Fura-2-Ratio ist für beide Genotypen in Form eines schwarzen Balkens eingezeichnet. Die mittlere freie Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen beider Genotypen, die aus den jeweiligen Fura-2-Ratios berechnet wurde, ist unten in der Grafik angegeben. Beim Vergleich der Fura-2-Ratios und der daraus berechneten Ca^{2+} -Konzentrationen fällt auf, dass kapazitierte Tas1r1-defiziente Spermien eine leicht höhere, jedoch nicht signifikant veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aufweisen.

Analysiert wurden Tierpaare mit identischem genetischen Hintergrund; pro Tier wurde die Fura-2-Ratio von mindestens 14 Spermien bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde ein gepaarter studentischer t-Test angewandt.

Eine Zusammenfassung der Befunde der Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmungen von unkapazitierten und kapazitierten Spermien verschiedener Tas1r1 Genotypen ist in Abbildung 4.65 gezeigt. In dieser Übersicht wird nochmals deutlich, dass Tas1r1-defiziente Spermien, unabhängig vom analysierten Kapazitierungsstatus, eine höhere basale Ca^{2+} -Konzentration aufwiesen als entsprechende Zellen von Wildtyp-Tieren. Der Unterschied in der freien Ca^{2+} -Konzentration war jedoch nur in den unkapazitierten

Zellen signifikant (Abbildung 4.65), möglicherweise bedingt durch starke Schwankungen der Ca^{2+} -Konzentration, die bei kapazitierten Spermien zwischen einzelnen Tieren eines Genotyps registriert wurden (Abbildung 4.65 [-/-]).

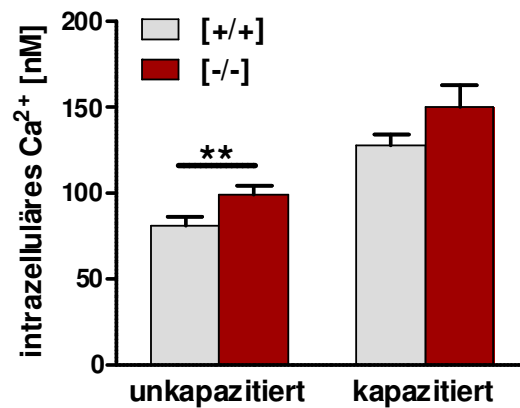


Abbildung 4.65: Übersicht über basale Ca^{2+} -Konzentrationen in Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren.

Dargestellt ist die durchschnittliche intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in unkapazitierten und kapazitierten Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren. Unabhängig vom Kapazitierungsstatus ist die mittlere Ca^{2+} -Konzentration in unstimulierten Spermien bei Tas1r1-defizienten Tieren höher als bei Wildtyp-Tieren. Dieser Unterschied ist jedoch nur in unkapazitierten Zellen signifikant.

Dargestellt sind die berechneten freien Ca^{2+} -Konzentrationen der Spermien von fünf (unkapazitiert) bzw. sechs (kapazitiert) Wildtyp- und Tas1r1 [-/-] Tieren aus dem gleichen Wurf bzw. mit identischem Stammhintergrund (N2, N3).

Zur statistischen Analyse wurde ein gepaarter studentischer t-Test durchgeführt (**: $p \leq 0,01$).

Um zu prüfen, ob sich die Tas1r1-Defizienz nicht nur auf die basale Ca^{2+} -Konzentration von Spermien auswirkt, sondern möglicherweise auch den cAMP-Gehalt der Keimzellen beeinflussen könnte, wurde die cAMP-Konzentration in Spermien von Tas1r1 [-/-] und Wildtyp-Tieren vor und nach der Kapazitierung bestimmt. Für diese cAMP-Messungen wurden Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert und entweder direkt verwendet (unkapazitiert) oder für 60 Minuten in Kapazitierungspuffer inkubiert (kapazitiert). Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für fünf Minuten bei 37 °C mit Puffer allein (zur Bestimmung des Basalwertes) oder mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren. Zur Extraktion des cAMP wurden die Proben mit Perchlorsäure versetzt und mit einer Chloroform/Trioctylamin-Mischung neutralisiert (siehe Abschnitt 3.5.2); im Anschluss daran wurde der cAMP-Gehalt der Proben mit Hilfe eines cAMP-Enzym-Immunassays (GE Healthcare) quantifiziert.

In Abbildung 4.66 sind die Ergebnisse der cAMP-Basalwertbestimmung der isolierten epididymalen Spermien von 11 - 15 Tieren pro Genotyp dargestellt. Im gezeigten *Scatter Plot* entspricht jedes Quadrat bzw. Dreieck dem Messwert eines einzelnen Tieres; die Werte von Geschwistertieren bzw. Tieren mit gleichem Stammhintergrund, die parallel präpariert und analysiert wurden, sind durch einen Strich verbunden. Beim Vergleich der basalen cAMP Konzentration in unkapazitierten Zellen fielen sowohl bei

Wildtyp- als auch bei *Tas1r1*-defizienten Tieren starke Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren auf: So reichte die cAMP-Menge in einer Million unkapazitierten Wildtyp-Zellen von 49 - 519 fmol, in *Tas1r1*-defizienten Zellen von 74 - 628 fmol. Trotz dieser starken individuellen Schwankungen war beim Vergleich der cAMP-Konzentration in Spermien von korrespondierenden *Tas1r1*-defizienten und Wildtyp-Tieren, die parallel präpariert und analysiert wurden, jedoch ein eindeutiger Trend zu einem höherem cAMP-Gehalt in den Zellen *Tas1r1*-defizienter Tiere zu beobachten: In 13 von 15 Tierpaaren war die cAMP-Konzentration der unkapazitierten Zellen beim *Tas1r1*-defizienten Tier höher als beim entsprechenden Wildtyp-Tier (Abbildung 4.66 [A]). Nur in zwei Paaren wurde eine niedrigere cAMP-Menge in den Spermien des *Tas1r1* [-/-] Männchens registriert (Abbildung 4.66 [A], Rauten).

Nach der Kapazitierung waren die registrierten cAMP-Konzentrationen in Spermien beider Genotypen deutlich höher als in unkapazitierten Zellen (Abbildung 4.66 [B]). Dieser Anstieg der cAMP-Konzentration ist typisch für die Kapazitierung und durch die Stimulation der löslichen Adenylylcyclase u. a. durch Bicarbonat im Kapazitierungspuffer zu erwarten [Buck et al., 1999; Chen et al., 2000]. Im Gegensatz zu unkapazitierten Spermien war beim Vergleich des basalen cAMP-Gehaltes der kapazitierten Zellen hingegen keine Tendenz zu höheren cAMP-Konzentrationen in *Tas1r1*-defizienten Spermien mehr feststellbar.

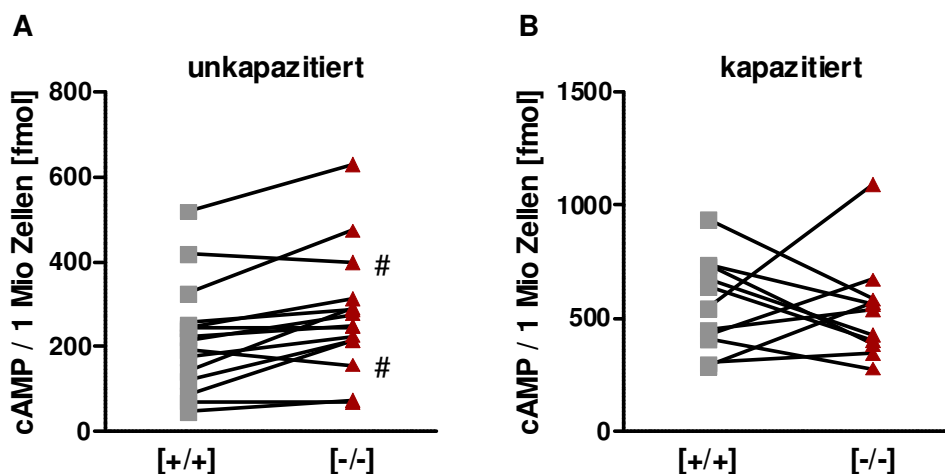


Abbildung 4.66: Basale cAMP-Konzentration in Wildtyp- und *Tas1r1*-defizienten Spermien in Abhängigkeit vom Kapazitzierungszustand.

Epididymale Spermien von *Tas1r1*-defizienten ($[-/-]$, rot) und Wildtyp-Mäusen ($[+/+]$, grau) wurden entweder unkapazitiert [unkapazitiert] [A] oder nach 60minütiger Inkubation [kapazitiert] [B] für fünf Minuten mit Puffer inkubiert, und anschließend wurde der cAMP Gehalt pro 1 Mio Zellen bestimmt. Der Scatter Plot zeigt die cAMP-Menge der Spermien jedes untersuchten Tieres in Abhängigkeit vom Genotyp. Die Werte für Tiere, die in einem parallelen Ansatz untersucht wurden, sind durch einen Strich verbunden. [A] Unkapazitierte Spermien von *Tas1r1*-defizienten Tieren (rote Dreiecke) weisen in fast allen untersuchten Paaren einen höheren Gehalt an cAMP auf als die Zellen der dazugehörigen Wildtyp-Tiere (graue Quadrate); nur in zwei der untersuchten 15 Tierpaare war in den *Tas1r1*-defizienten Spermien eine niedrigere cAMP-Konzentration zu registrieren (Rauten).

[B] Beim Vergleich kapazitierter Zellen ist keine klare Tendenz in den cAMP-Konzentrationen der Zellen aus verschiedener *Tas1r1* Genotypen zu beobachten. Dargestellt sind die in basalen cAMP-Konzentrationen isolierter Spermien von 11 - 15 Geschwistertieren bzw. Tieren mit identischem Stammhintergrund (N2, N3).

Diese Beobachtung konnte in der statistischen Analyse der basalen cAMP-Konzentrationen unkapazitierten und kapazitierten Spermien der beiden untersuchten Tas1r1 Genotypen bestätigt werden: Die durchschnittliche cAMP-Konzentration in unkapazitierten Tas1r1-defizienten Spermien war signifikant höher als in Spermien entsprechender Wildtyp-Tiere (Abbildung 4.66 [A], linkes Säulenpaar), während bei kapazitierten Spermien kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen mehr festzustellen war (Abbildung 4.66 [A], rechtes Säulenpaar). Um die Basalwerte unabhängig von individuellen Schwankungen in der cAMP-Konzentration einzelner Tierpaare vergleichen zu können, wurden die gemessenen cAMP-Konzentrationen auf den Basalwert der unkapazitierten Spermien des jeweiligen Wildtyp-Tieres normiert. In dieser Auswertung wurde deutlich, dass die basale cAMP-Konzentration von unkapazitierten Tas1r1-defizienten Tieren durchschnittlich 35 % höher war als bei Zellen der Wildtyp-Tiere (Abbildung 4.66 [B]). In kapazitierten Spermien, deren cAMP-Konzentration mit ca. 300 % des Basalwertes wie erwartet deutlich höher war, als die von unkapazitierten Zellen, war hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen zu registrieren.

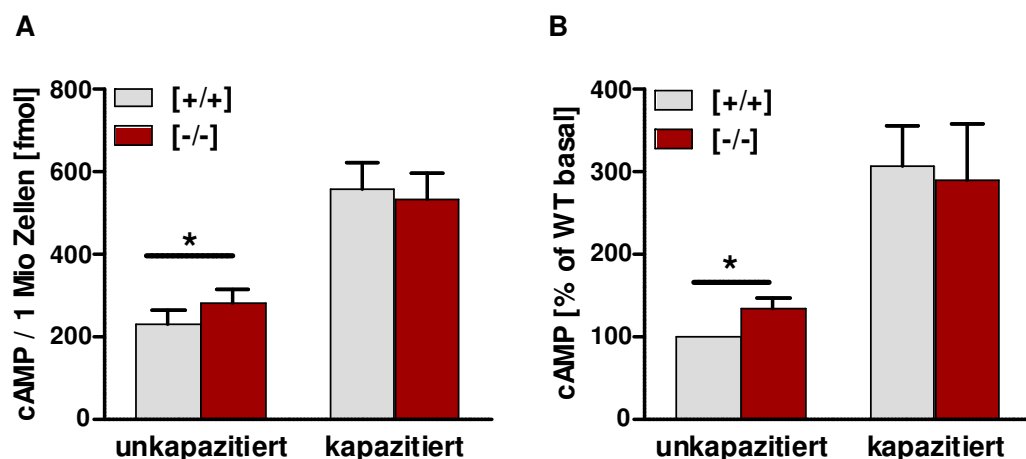


Abbildung 4.67: Vergleich der basalen cAMP Konzentration in Spermien verschiedener Tas1r1 Genotypen.

Die cAMP-Konzentration von isolierten unkapazitierten und kapazitierten Spermien von Wildtyp- ([+/+], grau) und Tas1r1-defizienten ([-/ -], rot) Tieren wurde bestimmt. In [A] sind die absolut gemessenen cAMP-Konzentrationen dargestellt, in [B] wurden die Konzentrationen auf den Basalwert unkapazitierten Spermien des jeweiligen Wildtyp-Tieres normiert.

[A] Der gemessene cAMP-Gehalt in unkapazitierten Spermien ist signifikant niedriger als in kapazitierten Spermien (linkes Säulenpaar). Nach der Kapazitierung zeigen beide Genotypen eine signifikant höhere cAMP-Konzentration; ein Unterschied zwischen den Genotypen ist jedoch nicht mehr feststellbar (rechtes Säulenpaar). [B] In der Zusammenfassung der normierten Daten wird deutlich, dass die cAMP-Konzentration unkapazitierten Tas1r1-defizienter Zellen ca. 35 % höher ist als in den korrespondierenden Wildtyp-Zellen. Bei kapazitierten Zellen ist hingegen kein Unterschied zwischen den Spermien der beiden Genotypen zu registrieren.

Grafisch dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 11 - 13 unabhängigen Versuchen an Zellen von Tieren mit identischem genetischen Hintergrund (N2, N3). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines gepaarten t-Tests (*: $p \leq 0,05$).

Die Beobachtung einer erhöhten basalen cAMP-Konzentration in unkapazitierten Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren führte zu der Frage, ob diese Erhöhung durch

eine vermehrte Bildung von cAMP oder durch einen verminderten Abbau des *second messengers* bedingt sein könnte. Diese Frage erscheint insbesondere interessant, da eine Stimulation von Geschmacksrezeptoren in Sinneszellen der Zunge über Gustducin zu einer Aktivierung von Phosphodiesterasen (PDE) führt und die Hydrolyse von zyklischen Nukleotiden fördert [Clapp et al., 2008].

Um zu untersuchen, ob eine verminderte cAMP-Hydrolyse der erhöhten basalen cAMP-Konzentration in Spermien homozygoter *Tas1r1* mCherry Tiere zu Grunde liegt, wurde der cAMP-Gehalt von Spermien bestimmt, die mit IBMX, einem unspezifischen Blocker der Phosphodiesterase-Aktivität [Corbin und Francis, 2002] behandelt wurden. Nach Inhibition des cAMP-Abbaus durch IBMX war in Spermien von *Tas1r1*-defizienten und Wildtyp-Tieren eine deutliche Akkumulation von cAMP im Vergleich zu unstimulierten Proben zu registrieren (Abbildung 4.68). Dabei zeigten kapazitierte Spermien beider Genotypen aufgrund der verstärkten Bildung von cAMP durch Aktivierung der löslichen Adenylylcyclase eine signifikant höhere cAMP-Konzentration als unkapazitierte Zellen. Interessanterweise wurde beim Vergleich der cAMP-Menge in unkapazitierten Spermien der beiden Genotypen deutlich, dass nach der Blockierung des cAMP-Abbaus durch IBMX keine Unterschiede mehr in der cAMP-Konzentration zwischen Spermien von *Tas1r1*-defizienten (513 ± 61 fmol/1 Mio Zellen) und Wildtyp-Tieren (495 ± 82 fmol/1 Mio Zellen) feststellbar waren (Abbildung 4.68). Diese Angleichung in der cAMP-Konzentration nach Inhibition der PDE-Aktivität deutet darauf hin, dass die Erhöhung der basalen cAMP-Menge in *Tas1r1*-defizienten Tieren auf Unterschiede in der cAMP-Hydrolyse durch eine veränderte Phosphodiesteraseaktivität zurückzuführen sein könnte.

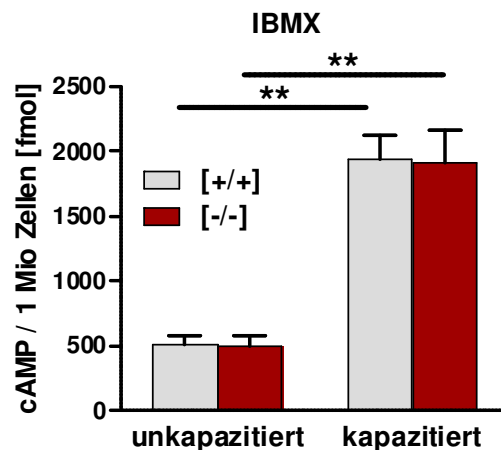


Abbildung 4.68: Vergleich der nach PDE-Inhibition durch IBMX akkumulierten cAMP-Menge in Spermien verschiedener *Tas1r1* Genotypen.

Isolierte Spermien von *Tas1r1*-defizienten ([-/-], rot) und Wildtyp-Mäusen ([+/+], grau) wurden entweder unkapazitiert [unkapazitiert] oder nach 60minütiger Inkubation [kapazitiert] fünf Minuten lang mit 0,5 mM IBMX stimuliert und anschließend wurde der cAMP Gehalt pro 1 Mio Zellen bestimmt.

Im Verlauf der Kapazitierung nimmt der cAMP-Gehalt in beiden Genotypen signifikant zu ([kapazitiert], rechtes Säulenpaar). Zwischen den beiden Genotypen ist jedoch bei beiden Kapazitierungszuständen kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Grafisch dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 9 - 11 unabhängigen Versuchen an Zellen von Tieren mit identischem genetischen Hintergrund (N2, N3). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines gepaarten studentischen t-Tests (**: $p < 0,01$).

Diese Befunde warfen im Folgenden die Frage auf, ob eine Stimulation von Spermien mit Glutamat, dem typischen gustatorischen Liganden des Tas1r1 Rezeptors, möglicherweise ebenfalls zu einer Tas1r1-vermittelten Phosphodiesterase-Aktivierung in Keimzellen führen könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Spermien wie oben beschrieben isoliert, mit 10 mM Mononatriumglutamat inkubiert, und anschließend wurde die cAMP-Konzentration in den Zellen bestimmt. Abbildung 4.69 gibt einen Überblick über die Resultate dieser Glutamat-Stimulationen. Wie bereits in den zuvor gezeigten experimentellen Ansätzen, wurde auch in diesen Versuchen wieder eine signifikant erhöhte basale cAMP-Konzentration in unkapazitierten Tas1r1-defizienten Spermien im Vergleich zu Wildtyp-Zellen detektiert.

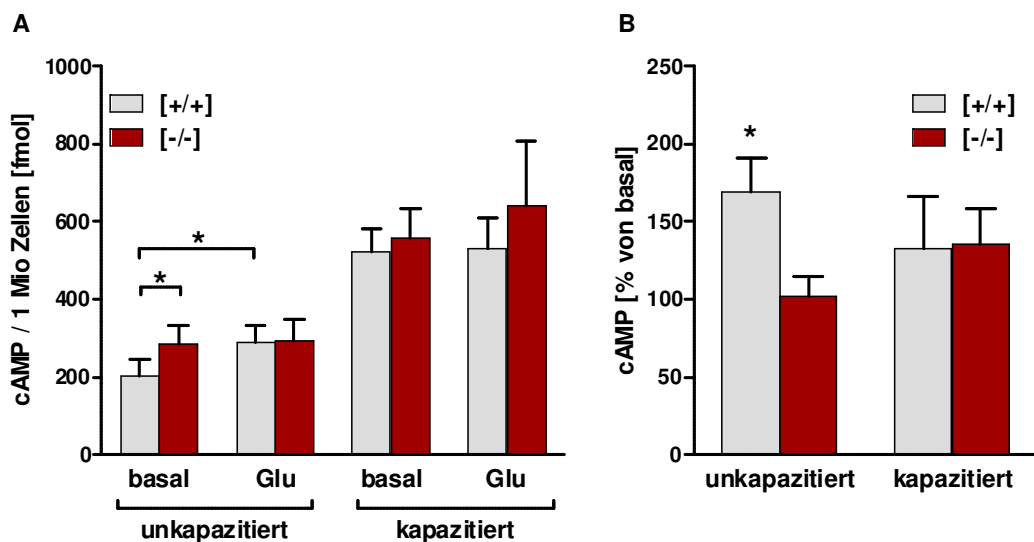


Abbildung 4.69: Effekt von Mononatriumglutamat auf die cAMP-Konzentration in Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Spermien.

Spermien wurden aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert und entweder direkt [unkapazitiert] oder nach 60minütiger Kapazitierung [kapazitiert] für 5 Minuten mit 10 mM Natriumglutamat [Glu] bzw. Puffer allein [basal] inkubiert.

[A] zeigt die absolute cAMP-Menge, die in unkapazitierten und kapazitierten Spermien von Wildtyp ([+/+], grau) und Tas1r1 *Knockin*-Tieren ([-/], rot) nach der Stimulation detektiert wurde. Der basale cAMP-Gehalt von unkapazitierten Wildtyp-Spermien ist signifikant niedriger als bei Tas1r1-defizienten Spermien. Die cAMP-Menge in unkapazitierten Tas1r1 [-/] Spermien bleibt bei einer Stimulation unverändert, während der cAMP-Gehalt in Wildtyp-Spermien signifikant ansteigt und dadurch das gleiche Niveau erreicht wie bei Tas1r1-defizienten Tieren. In kapazitierten Spermien wurden keine signifikanten Effekte des Glutamats registriert [A, kapazitiert].

In [B] ist die cAMP-Konzentration der stimulierten Proben auf den jeweiligen Basalwert (nur mit Puffer inkubiert) normiert gezeigt. In dieser Darstellung wird deutlich, dass Glutamat die cAMP-Konzentration in unkapazitierten Wildtyp-Spermien signifikant auf ca. 170 % des Basalwertes steigert, während es unabhängig vom Kapazitätszustand keinen Effekt auf Tas1r1-defiziente Spermien hat.

Es wurden Mittelwerte \pm Standardfehler von neun unabhängigen Spermienpräparationen pro Genotyp ermittelt, verwendet wurden Tiere mit gleichem Stammbaumhintergrund (N2, N3). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen gepaarten studentischen t-Test, als statistisch signifikant wurde ein p -Wert $\leq 0,05$ (*) angenommen.

Nach der Inkubation mit Glutamat war in unkapazitierten Wildtyp-Spermien überraschenderweise keine Abnahme sondern eine signifikante Zunahme der cAMP-Konzentration zu registrieren (Abbildung 4.69 [A], unkapazitiert, graue Säulen). Im Vergleich zum Basalwert wurde die cAMP-Menge in den unkapazitierten Wildtyp-Zellen durch die Glutamat-Inkubation um ca. 70 % erhöht (Abbildung 4.69 [B], linke Säulen). In unkapazitierten, *Tas1r1*-defizienten Spermien war indessen kein Effekt durch Glutamat zu beobachten; die stimulierten Proben zeigten keine Veränderungen im Vergleich zur Pufferkontrolle (Abbildung 4.69 [A], unkapazitiert, rote Säulen). Die Zunahme der cAMP-Menge in unkapazitierten Wildtyp-Spermien führte somit dazu, dass die cAMP-Konzentrationen der Glutamat-stimulierten Spermien beider Genotypen vergleichbar waren. Nach der Kapazitierung war kein Effekt durch Glutamat mehr zu detektieren, da weder in Wildtyp-Zellen noch in *Tas1r1*-defizienten Zellen eine signifikante Veränderung der cAMP-Konzentration im Vergleich zu den unstimulierten Proben feststellbar war (Abbildung 4.69 [A und B]).

5 Diskussion

5.1 Expression von gustatorischen Sensormolekülen im männlichen Reproduktionssystem

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass männliche Keimzellen verschiedene Rezeptormoleküle exprimieren, die in Geschmackssinneszellen der Zunge für die Vermittlung ganz unterschiedlicher Geschmacksempfindungen verantwortlich sind (Abbildung 5.1). So erbrachten die durchgeführten Untersuchungen zum einen Hinweise darauf, dass das PKD2L1 Protein (Abbildung 5.1, [sauer]), ein potentielles Sensormolekül für Protonen (siehe Abschnitt 1.2.4.2), im Hoden und im Flagellum von reifen Spermien der Maus exprimiert wird (Abbildung 4.2, Abbildung 4.5). Zum anderen konnten durch den Einsatz verschiedener Nachweismethoden umfangreiche Belege für die Expression von GPCRs der Tas1-Familie (süß, umami) und Tas2-Familie (bitter) (Abbildung 5.1) sowie der mit ihnen assoziierten G Protein α -Untereinheit Gustducin in männlichen Reproduktionsorganen und reifen Spermien gesammelt werden.

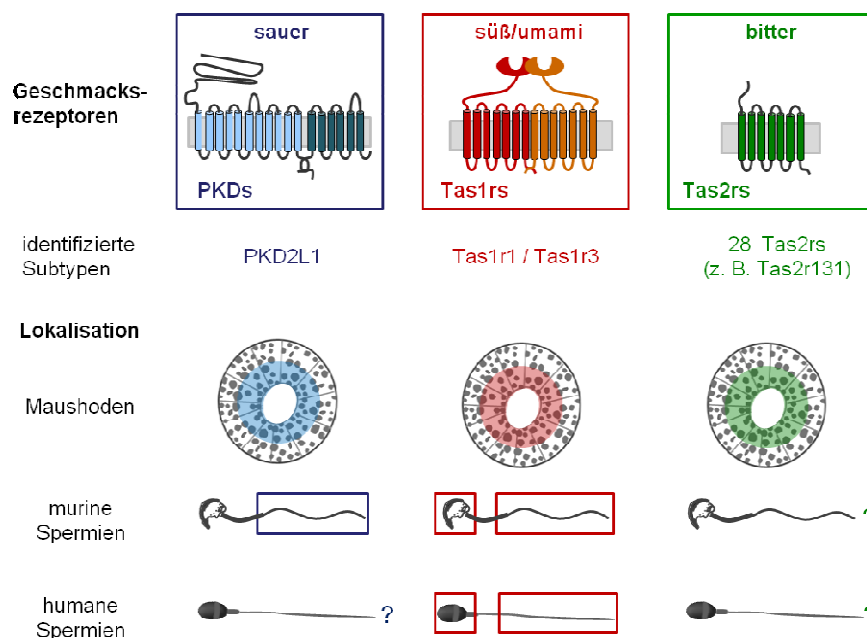


Abbildung 5.1: Übersicht über den Expressionsnachweis verschiedener gustatorischer Rezeptormoleküle im männlichen Reproduktionssystem.

Gezeigt ist eine topographische Darstellung von Sensormolekülen für *sauer* (PKD2L1), *süß/umami* (Tas1rs) und *bitter* (Tas2rs), die im männlichen Reproduktionsgewebe nachgewiesen wurden. Die identifizierten Subtypen sowie ihre Lokalisation im Hoden der Maus und in isolierten murinen und humanen Spermien sind jeweils im unteren Teil dargestellt (farbige Markierung). Die Expression von Bitterrezeptoren im Hoden ist exemplarisch für den Tas2r131 dargestellt. Da keine spezifischen Antikörper

gegen murine Tas2-Rezeptoren bzw. das humane PKD2L1 Protein zur Verfügung standen, konnte die subzelluläre Lokalisation dieser Rezeptorproteine bislang nicht geklärt werden (durch [?] gekennzeichnet).

In RT-PCR Analysen mit cDNA aus Hodengewebe der Maus wurden dabei für die große Familie der Bitterrezeptoren erstmals Hinweise auf die Expression einer Mehrzahl der Tas2r-Subtypen gesammelt (Tabelle 4.3). Aus der Familie der Tas1-Rezeptoren konnte das Umami-Rezeptordimer (Tas1r1/Tas1r3) aus testikulärer cDNA amplifiziert werden (Abbildung 4.32), wodurch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls Tas1r3 Transkripte in Hodengewebe nachweisen konnten [Max et al., 2001; Kiuchi et al., 2006], bestätigt wurden. Im Gegensatz zu kürzlich publizierten Befunden [Iwatsuki et al., 2010] wurden hingegen keine Hinweise auf eine Expression der Süß-Rezeptoruntereinheit Tas1r2 im Maushoden gefunden (Abbildung 4.32), was auf eine extrem geringe Expressionsrate dieses Rezeptors hindeuten könnte. Die Expression von Mitgliedern der Tas1r- und Tas2r-Familie in männlichen Keimzellen konnte zudem mithilfe zweier genetisch modifizierter Reportermauslinien, der Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} Linie, bestätigt werden. Diese Mauslinien weisen eine intensive Fluoreszenzintensität im luminalen Bereich der Hodentubuli auf (Abbildung 5.1), was auf eine starke Expression des Tas1r1 und Tas2r131 in späten Keimzellstadien des Hodens hinweist und indirekt auch auf eine Rezeptorexpression in reifen Spermien hindeuten könnte (Abbildung 4.48 bzw. Abbildung 4.20). Eine solche Expression in isolierten Spermien konnte in Studien mit Subtyp-spezifischen Antikörpern gegen die Umami-Rezeptoruntereinheiten Tas1r1 und Tas1r3 bestätigt werden (Abbildung 5.1, [süß/umami]). Bei diesen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Rezeptorproteine sowohl im Akrosom als auch im Flagellum von murinen und humanen Spermien lokalisiert sind (Abbildung 4.37, Abbildung 4.42, Abbildung 4.45).

5.2 Physiologische Rolle von Rezeptormolekülen des Geschmackssystems in Spermien

Dieser Nachweis von gustatorischen Sensormolekülen, die auf der Zunge durch ein breites Spektrum chemisch sehr diverser Liganden aktiviert werden können, führte zu der Frage, ob Spermien dieses Repertoire verschiedener Rezeptormoleküle nutzen, um unterschiedliche Liganden im Milieu des weiblichen Genitaltrakts zu detektieren und so die verschiedenen Aufgaben bis zur Verschmelzung mit der Eizelle erfolgreich bewältigen (Abschnitt 1.1.2).

Da reife Spermien nahezu keine Proteinbiosynthese mehr betreiben [Vogt, 2004], sind sie genetischen Manipulationen, wie z. B. der siRNA-Technik [Fire et al., 1998; Shoji et al., 2005] oder Überexpressionsstudien zur Analyse einzelner Proteinfunktionen nicht zugänglich [Carreau et al., 2007; Publicover et al., 2007]. Zudem stehen kaum spezifische Blocker, die eine direkte Inhibition bzw. Modulation der Rezeptorfunktion erlauben würden, für die identifizierten Sensormoleküle zur Verfügung. Die physiologische Funktion der in Spermien identifizierten Geschmacksrezeptoren wurde deshalb

vor allem mit Hilfe der bereits erwähnten Tas1r1 mCherry und Tas2r131 GFP *Knockin*-Mauslinien exemplarisch für jeweils einen Vertreter der beiden gustatorischen GPCR-Familien untersucht. Dabei wurden zum einen die Auswirkungen einer Tas1r1 bzw. Tas2r131 Gen-Defizienz auf die Fertilität der betroffenen Tiere analysiert, die anhand der Anzahl von Nachkommen pro Wurf und der zeitlichen Abstände zwischen zwei erfolgreichen Trächtigkeiten quantifiziert wurde. Zum anderen wurde geprüft, welchen Einfluss die Gen-Deletion auf die Spermatogenese und einzelne Funktionen von isolierten Spermien, wie z. B. die Akrosomreaktion und die Motilität, hat. Außerdem wurden, falls bekannt, spezifische Agonisten der identifizierten Rezeptoren in Stimulationsexperimenten eingesetzt, um zu prüfen, ob diese Agonisten auch aktivierende Liganden für Spermien repräsentieren und welche funktionellen Auswirkungen eine solche Rezeptoraktivierung hat. Um Aufschluss über die in Spermien nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden der nachgewiesenen Rezeptorproteine zu erhalten, wurden zudem die cytosolischen Konzentrationen von sekundären Botenstoffen wie cAMP und Ca^{2+} vor und nach einer Stimulation mit Geschmacksstoffen untersucht.

Die dabei gesammelten Befunde werden im Folgenden im Hinblick auf die sich daraus ergebende potentielle physiologische Rolle der identifizierten Geschmacksrezeptoren in männlichen Keimzellen aber auch hinsichtlich einer möglichen Funktion dieser Rezeptormoleküle und ihrer Signaltransduktionsmechanismen in anderen chemosensorischen Zellen diskutiert.

5.2.1 Physiologische Funktion von Tas1-Rezeptoren in Spermien

5.2.1.1 Funktionelle Rolle des Tas1r1 für die Verhinderung einer spontanen Akrosomreaktion

Bei der Untersuchung des Reproduktionsphänotyps Tas1r1-defizienter Mäuse, deren Ergebnisse in Abbildung 5.2 zusammengefasst dargestellt sind, konnten keine Einschränkungen der Fertilität festgestellt werden (Tabelle 4.5). Bei der Analyse isolierter Tas1r1-defizienter Spermien wurden hingegen signifikante Veränderungen registriert, die Hinweise auf die funktionelle Rolle des Rezeptors in männlichen Keimzellen ergeben. So zeichnen sich Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Tieren sowohl vor als auch nach der Kapazitierung durch eine signifikant erhöhte Rate an spontaner Akrosomreaktion aus (Abbildung 4.60). Bei der Analyse der *Zona pellucida*- und der Ionophor-induzierten Akrosomreaktion war hingegen kein Effekt der Tas1r1-Deletion feststellbar (Abbildung 4.59), was darauf hindeutet, dass der Rezeptor nicht an der Erkennung der *Zona pellucida* beteiligt ist, sondern vielmehr eine physiologische Rolle bei der Verhinderung einer frühzeitigen akrosomalen Exocytose spielt.

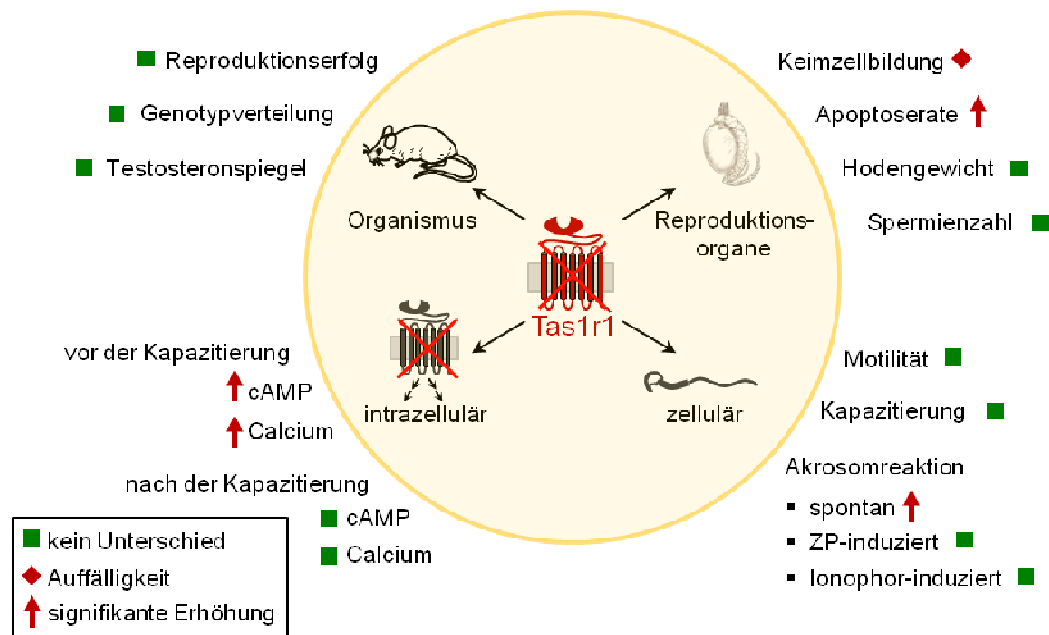


Abbildung 5.2: Übersicht über den Reproduktionsphänotyp *Tas1r1*-defizienter Mäuse.

Dargestellt ist ein Überblick über die Befunde der reproduktionsbiologischen Charakterisierung *Tas1r1*-defizienter Mäuse auf der Ebene des Gesamtorganismus [*Organismus*], der männlichen Reproduktionsorgane [*Reproduktionsorgane*], von isolierten epididymalen Spermien [*zellulär*] sowie auf der Ebene intrazellulärer Botenstoffe [*intrazellulär*]. Die untersuchten Parameter sind mit einem grünen Quadrat markiert, wenn kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Tieren zu registrieren war. Eine rote Markierung kennzeichnet signifikante Veränderungen; dabei repräsentieren die roten Pfeile eine Erhöhung des analysierten Parameters in *Tas1r1*-defizienten Tieren. ZP: *Zona pellucida*.

Die Vermeidung einer solchen spontanen Akrosomreaktion ist *in vivo* von großer Bedeutung für ein Spermium um seine Befruchtungskompetenz zu bewahren. Physiologisch findet die Exocytose des akrosomalen Vesikels beim Kontakt des Spermiums mit der *Zona pellucida* statt (Abschnitt 1.1.2.4). Dabei entstehen synchron Hunderte von Fusionsporen zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran [Barros et al., 1967; Michaut et al., 2000], durch die der gesamte akrosomale Inhalt ausgeschüttet und die *Zona pellucida* in der Folge verdaut wird [Wassarman und Litscher, 2008b]. Hat das Spermium sein Akrosom bereits vor dem Kontakt mit der Eizellhülle spontan verloren, kann keine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle mehr erfolgen [Schill, 1974; Takahashi et al., 1992; Fraser, 2010].

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass die Akrosomreaktion einer sehr präzisen Kontrolle unterliegen muss, um eine hohe Effizienz der Vesikel-Exocytose zu gewährleisten und gleichzeitig einen vorzeitigen, irreversiblen Verlust des Akrosoms zuverlässig zu verhindern. Wie eine solche Feinsteuerung der akrosomalen Exocytose auf molekularer Ebene erfolgt, ist bislang jedoch nur teilweise verstanden. So werden zum einen regulatorische Mechanismen diskutiert, bei denen u. a. das *Scaffolding*-Protein MUPP1 und die Aktivität der Calcium-Calmodulin-Kinase II an einer zeitlichen und räumlichen Koordination der Fusionsporenbildung zwischen äußerer akrosomaler Membran und der Plasmamembran beteiligt sind [Ackermann et al., 2009]. Eine unbeabsichtigte akrosomale Exocytose wird zudem dadurch verhindert, dass der

SNARE-Komplex, der die Membranfusion vermittelt [Tomes et al., 2002], unter basalen Bedingungen durch Complexin arretiert wird [Zhao et al., 2007]. Erst wenn es durch die Bindung an die *Zona pellucida* zu einer starken Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt, wird das Complexin von der Fusionsmaschinerie verdrängt, so dass die Vesikelexocytose nur stattfindet, wenn es zu einem starken Einstrom von Ca^{2+} ins Cytoplasma kommt [Zhao et al., 2007; Zhao et al., 2008].

Da die Membranfusion durch Erhöhungen der cytosolischen Ca^{2+} - und cAMP-Konzentrationen ausgelöst wird [Branham et al., 2006; Mayorga et al., 2007] sind aber auch Regulationsmechanismen denkbar, die eine zufällige Akrosomreaktion verhindern, indem sie die intrazellulären Konzentrationen dieser *second messenger* reduzieren. Da die Signaltransduktion des Tas1r1 im Geschmackssystem genau über diese beiden Botenstoffe verläuft (Abschnitt 1.2.4.4), könnte eine solche Kontrolle der cAMP- und Ca^{2+} -Spiegel in Spermien eine Erklärung für die regulatorische Funktion des Tas1r1 bei der spontanen Akrosomreaktion liefern.

Diese Hypothese konnte durch experimentelle Studien bestätigt werden, in denen gezeigt wurde, dass sich unkapazitierte Spermien von Tas1r1-defizienten Tieren tatsächlich durch signifikant erhöhte intrazelluläre cAMP- und Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Tieren auszeichnen (Abbildung 4.67, Abbildung 4.65). Diese Veränderungen waren bereits in unstimulierten Spermien, die ohne potentielle Liganden inkubiert wurden, zu registrieren, was darauf hindeutet, dass dieser Tas1r1-Effekt auf eine Basalaktivität des Rezeptors zurückgehen könnte.

Ein ganz ähnlicher zellulärer Phänotyp wurde interessanterweise vor kurzem in Geschmackszellen von Gustducin-defizienten Mäusen beschrieben: So zeichnen sich die gustatorischen Sinneszellen von Gustducin-KO Mäusen ebenfalls durch eine deutlich erhöhte basale Konzentration von cAMP aus, die auf den Wegfall einer tonischen Gustducin-Aktivierung und damit eine verminderte Hydrolyse von cAMP durch PDE in Gustducin-defizienten Zellen zurückgeht [Clapp et al., 2008].

Analog zum Geschmackssystem [Clapp et al., 2008], könnte eine tonische Aktivität des Tas1r1 demnach auch in Spermien zu einer konstitutiven Aktivierung von Gustducin führen. Gustducin würde dann PDEs aktivieren, von denen ein Großteil der bekannten elf Familien bereits in Säugerspermien nachgewiesen wurde [Harayama und Kato, 2002; Baxendale und Fraser, 2005; Wayman et al., 2005], und so zu einer kontinuierlichen Hydrolyse von cAMP führen, die wiederum die Wahrscheinlichkeit einer spontanen akrosomalen Exocytose verringern würde.

Nach der Kapazitierung scheint diese Tas1r1-Aktivität hingegen keine wichtige Rolle mehr zu spielen, da in kapazitierten Zellen kein Unterschied mehr in den cAMP- und Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Spermien zu detektieren ist (Abbildung 4.67, Abbildung 4.65). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass der inhibitorische Effekt des Tas1r1 während der Kapazitierung durch die massive Produktion von cAMP durch Bicarbonat-aktivierte sAC [Chen et al., 2000]

verdeckt wird und so eine physiologische ZP-induzierte Akrosomreaktion im Anschluss an die Kapazitierung unbeeinträchtigt ablaufen kann.

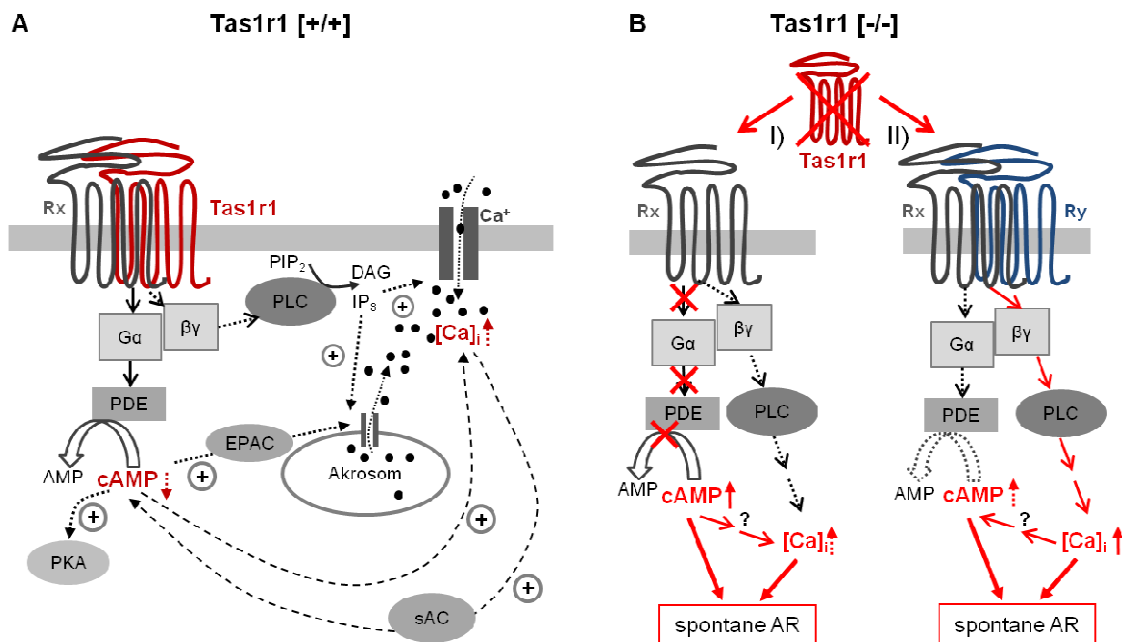


Abbildung 5.3: Hypothetisches Modell der Signaltransduktion von Tas1-Rezeptoren in Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren.

[A] Putative Signaltransduktion des Tas1r1 in Wildtyp-Spermien.

Durch eine (basale oder Liganden-abhängige) Aktivierung von Tas1-Rezeptordimeren [*Tas1r1* und *Rx*], wird ein assoziiertes G Protein aktiviert, welches in seine α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Die aktivierte α -Untereinheit [$G\alpha$], beispielsweise α -Gustducin, bewirkt dann eine Aktivierung von Phosphodiesterasen [*PDE*], die cAMP zu AMP hydrolysieren und somit die cytosolische cAMP-Konzentration senken. Der $\beta\gamma$ -Komplex könnte zeitlich parallel K⁺-Kanäle in der Plasmamembran modulieren (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt) und/oder über die Aktivierung von PLC die Produktion von IP₃ und DAG induzieren. Diese beiden Botenstoffe lösen dann durch Öffnung von IP₃-Rezeptoren in der akrosomalen Membran bzw. von Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aus. Beide Signalwege können sich über PKA-vermittelte Rückkopplungsmechanismen, wie eine Aktivierung des EPAC-Signalweges oder die Ca²⁺-abhängige Modulation der Aktivität der löslichen Adenylcyclase [*sAC*] beeinflussen.

[B] Hypothetisches Modell der zellulären Effekte der Deletion des Tas1r1 in Spermien.

I) Durch den Wegfall der basalen Tas1r1-Aktivität entfällt die kontinuierliche PDE-Aktivierung, so dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration ansteigt. Durch die in [A] dargestellten Rückkopplungsmechanismen könnte es dann sekundär zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommen. **II)** Alternativ ist auch eine kompensatorische Überexpression [*Ry*] z. B. des Tas1r3 denkbar, die durch den $\beta\gamma$ -Komplex vermittelt, PLC aktiviert und so eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt. In diesem Modell könnte die cAMP-Konzentration durch eine sAC-Aktivierung erhöht werden. Der Konzentrationsanstieg der *second messenger* induziert in beiden Modellen eine Erhöhung der spontanen Akrosomreaktionsrate [*spontane AR*].

In diesem Modell würde der inhibitorische Effekt des Tas1r1 in unkapazitierten Spermien Gen-defizienter Tiere entfallen, so dass ihre basale cAMP-Konzentration ansteige und das Risiko einer spontanen Akrosomreaktion deutlich erhöht würde (Abbildung 5.3 [B], I). Diese Hypothese konnte in experimentellen Ansätzen untermauert werden, in denen Zellen mit dem PDE-Inhibitor IBMX inkubiert wurden und in denen keine Unterschiede mehr zwischen unkapazitierten Spermien verschiedener Tas1r1 Genotypen festzustellen waren (Abbildung 4.68). Die Erhöhung

der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Tas1r1-defizienten Spermien könnte in diesem Modell durch eine cAMP-induzierte Aktivierung von PKA und des EPAC-Signalwegs (Abbildung 5.3 [A]) erklärt werden, die Ca^{2+} -Kanäle in der akrosomalen und in der Plasmamembran beeinflussen können und so einen Einstrom von Ca^{2+} ins Cytoplasma bewirken [Wojcikiewicz und Luo, 1998; Giovannucci et al., 2000; Dyer et al., 2003; Tovey et al., 2010].

Alternativ zu diesem Modell könnte man allerdings auch spekulieren, dass der beobachtete Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration zumindest teilweise durch die kompensatorische Expression eines anderen Rezeptorproteins verursacht wird. Als möglicher Kandidat für einen solchen Effekt kommt z. B. der gustatorische Dimerisierungspartner des Tas1r1, der Tas1r3, in Frage. Dieser im Akrosom von Spermien exprimierte Rezeptor zeichnet sich ebenfalls durch eine Basalaktivität aus, die bei einer Expression des Tas1r3 in heterologen Zellsystemen zu einer Erhöhung der basalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt [Galindo-Cuspinera et al., 2006]. Der Tas1r3 könnte dementsprechend auch in Spermien PLC-abhängige Prozesse aktivieren, die über die Generierung von IP_3 und der Öffnung von IP_3 -Rezeptor-Ionenkanälen und/oder Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen (Abbildung 5.3 [B], II). Eine solche Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung könnte in der Folge die lösliche Adenylylcyclase [sAC] in Spermien aktivieren [Jaiswal und Conti, 2003; Litvin et al., 2003], und so indirekt eine Erhöhung der cytosolischen cAMP-Konzentration bewirken.

Da die Entwicklung von männlichen Keimzellen u. a. durch cAMP-aktivierte PKA und cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren reguliert wird [Hogeveen und Sassone-Corsi, 2006; Burton und McKnight, 2007], könnte eine Veränderung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen in männlichen Keimzellen auch die Ursache für die in Tas1r1-defizienten Tieren registrierte Beeinträchtigung der Hodenmorphologie (Abbildung 4.52) und die erhöhte Apoptoserate während der Spermatogenese (Abbildung 4.54) sein. Dabei könnte ein erhöhter cAMP-Spiegel die Zellhomöostase in Tas1r1-defizienten Keimzellen so beeinträchtigen, dass es zu Störungen der Keimzellreifung kommt, was wiederum die beobachtete erhöhte Apoptoserate erklären würde [Shaha et al., 2011]. Um zu klären, ob die Änderungen des basalen cAMP-Spiegels tatsächlich für die beobachteten Störungen der Spermatogenese verantwortlich sind und diese nicht auf eine fehlende Detektion von Tas1r-Liganden im Hoden oder gar auf die Expression des für Keimzellen artifizialen mCherry-Protein zurückgehen, sollte deshalb in weiterführenden Studien untersucht werden, ob sich Tas1r1-defiziente Keimzellen des Hodens ebenso wie isolierte Spermien durch einen erhöhten cAMP-Gehalt auszeichnen.

5.2.1.2 Mögliche Liganden-Detektion durch Tas1-Rezeptoren in Spermien

Angeichts der Vielfalt von hydrophilen Substanzen, wie Aminosäuren, Zuckern und Proteinen, die im Milieu des weiblichen Genitaltrakt vorkommen (Abbildung 1.4) und die im Geschmackssystem durch Tas1-Rezeptoren detektiert werden können

(Abbildung 1.6), stellte sich die Frage, ob die physiologische Funktion von Tas1-Rezeptoren in Spermien nur auf eine basale Aktivität beschränkt ist oder ob die identifizierten Rezeptoren nicht auch durch Moleküle in der extrazellulären Umgebung des Spermiums aktiviert werden können, was eine gezielte Regulation einzelner Spermienfunktionen durch das jeweilige extrazelluläre Milieu in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts erlauben würde.

Diese Überlegung erscheint auch deshalb interessant, weil sich die Verteilung von Glutamat, dem einzigen Liganden des humanen Umami-Dimers [Li et al., 2002], im weiblichen Genitaltrakt deutlich von der Verteilung anderer Aminosäuren unterscheidet: So ist die Glutamat-Konzentration im Uterus am höchsten und nimmt im Eileiter bis hin zur befruchtungsfähigen Eizelle ab (Abbildung 5.5 [B], gelbe Markierung); die Konzentrationen anderer Aminosäuren wie z. B. Alanin, Lysin oder Tyrosin steigen dagegen im Eileiter im Vergleich zum Uterus deutlich an (Abbildung 5.5 [B], violette Markierung) [Harris et al., 2005].

Bei der reproduktionsbiologischen Charakterisierung Tas1r1-defizienter Mäuse konnten allerdings keine Einschränkungen bei Liganden-gesteuerten Prozessen wie der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion oder der Motilität registriert werden. Angesichts der unbeeinträchtigten Fertilität der Gen-defizienten Männchen (Tabelle 4.5) scheint auch die Wegfindung Tas1r1-defizienter Spermien nicht gravierend gestört zu sein. Dieser unauffällige Phänotyp schließt aber nicht aus, dass der Tas1r1 eine wichtige Rolle für die Detektion von Liganden haben kann, da in anderen *Knockout*-Mausmodellen gerade bei am Prozess der Reproduktion beteiligten Proteinen häufig kompensatorische Effekte auftreten [Muro und Okabe, 2011]. Solche kompensatorischen Mechanismen wurden bereits für verschiedene GPCRs beobachtet, wie z. B. dem β 2-adrenergen Rezeptor [Chruscinski et al., 1999], Opioidrezeptoren [Mogil et al., 2000] und muscarinischen Acetylcholinrezeptoren [Zhang, 2006]. Dabei wird die Funktion eines deletierten Proteins häufig durch ein Protein kompensiert, das am gleichen physiologischen Prozess beteiligt ist (funktionelle Redundanz) und/oder dessen Expression durch das Fehlen des deletierten Proteins erst induziert wird (kompensatorische Expression) [Muller, 1999; Dietrich et al., 2005; Zhang, 2006]. Da der Ausfall eines Proteins häufig durch ein aus der gleichen Proteinfamilie stammendes Protein kompensiert wird [Muller, 1999], könnte die Funktion des Tas1r1 in Gen-defizienten Mäusen beispielsweise durch seinen gustatorischen Dimerisierungspartner Tas1r3 oder andere in Spermien exprimierte Aminosäurerezeptoren der Klasse C GPCRs übernommen werden [Brauner-Osborne et al., 2007; Wellendorph und Brauner-Osborne, 2009] (siehe auch Abbildung 5.4 [B]), was den unauffälligen Reproduktionsphänotyp der Tas1r1-defizienten Mäuse erklären würde.

Um eine funktionelle Rolle von Tas1-Proteinen bei der Erkennung von Liganden identifizieren zu können, wurde deshalb der Effekt einer Stimulation von Spermien mit dem Tas1r1/Tas1r3-Liganden Glutamat auf die Konzentration der intrazellulären

Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP untersucht. In diesen Stimulierungsexperimenten war in Wildtyp-Zellen nach einer Glutamat-Stimulation ein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zu beobachten, der in Tas1r1-defizienten Spermien nicht zu detektieren war (Abbildung 4.69). Aufgrund der bereits basal erhöhten cAMP-Konzentration in Tas1r1-defizienten Spermien, die einen Glutamat-Effekt möglicherweise überdecken könnte, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der registrierte Anstieg der cAMP-Konzentration in Wildtyp-Spermien gar nicht Tas1r1-spezifisch ist, sondern auf andere Glutamatrezeptoren [Hu et al., 2004] oder promiskuitive Aminosäurerezeptoren [Wellendorph et al., 2009] im Spermium zurückgeht. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei den Stimulationsexperimenten von murinen Spermien mit Glutamat keine Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu registrieren waren (Abbildung 4.56), die in Geschmackssinneszellen bei einer Aktivierung des Tas1r-assoziierten $\beta\gamma$ -Komplexes erfolgt. Außerdem zeigten Stimulationen mit Glutamat allein oder in Kombination mit IMP, dem allosterischen Modulator des Tas1r1/Tas1r3 Dimers auf der Zunge [Li et al., 2002], keine Effekte auf die Akrosomreaktion (Abbildung 4.61), die angesichts der physiologischen Funktion des Tas1r1 bei der spontanen Akrosomreaktion bei einer Rezeptor-Aktivierung zu erwarten gewesen wären.

Der Befund, dass eine Stimulation des Umami-Dimers in Spermien nicht zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt, könnte deshalb auch darauf hindeuten, dass das Tas1r1/Tas1r3-Dimer in Spermien nicht durch Glutamat aktiviert wird, sondern sich durch ein Keimzell-spezifisches Ligandenspektrum auszeichnen könnte (Abbildung 5.5 [D]). So ein Reproduktions-spezifisches Ligandenspektrum könnte auf der Rezeptorebene z. B. durch spezielle Splice- oder Sequenzvarianten der Rezeptorproteine in männlichen Keimzellen entstehen. Solche Hoden-spezifischen Isoformen sind bei einer Vielzahl von Proteinen bekannt, die sowohl in somatischen als auch in Keimzellen exprimiert werden wie z. B. Lactatdehydrogenase [Goldberg, 1964] oder ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) [Howard et al., 1990].

Auch für die Tas1-Rezeptoren fanden sich bereits in früheren Studien erste Hinweise auf Hoden-spezifische Splicevarianten [Max et al., 2001; Kiuchi et al., 2006], die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Western Blot Analysen mit humanen Spermien untermauert werden konnten: So wurde für den Tas1r3 eine größere und für den Tas1r1 eine deutlich geringere molekulare Masse festgestellt (Abbildung 4.43, Abbildung 4.46), als auf der Basis der aus dem Geschmackssystem bekannten Sequenzen zu erwarten gewesen wäre. Somit könnten sich Tas1-Rezeptoren in Spermien tatsächlich durch Sequenzunterschiede zu den gustatorischen Rezeptorproteinen auszeichnen, was sich dann möglicherweise in einem veränderten Ligandenspektrum widerspiegeln würde.

Es wäre aber auch denkbar, dass der Tas1r1 und/oder der Tas1r3 in Spermien mit anderen heptahelikalen Rezeptoren dimerisieren als im Geschmackssystem. Die so gebildeten Heterodimere könnten andere pharmakologische Eigenschaften aufweisen

als das Umami-Dimer [Bai, 2004; Milligan, 2009; Kniazeff et al., 2011], so dass ganz neue, bislang unbekannte funktionelle Rezeptoreinheiten entstehen, die sich nicht nur durch ein spezielles Ligandenspektrum auszeichnen, sondern vielleicht auch durch spezifische allosterische Moleküle moduliert werden könnten [Bai, 2004; Haid et al., 2011].

Als Dimerisierungspartner könnten dabei z. B. strukturell verwandte Rezeptoren der Klasse C GPCRs in Betracht kommen [Pin et al., 2004; Gurevich und Gurevich, 2008] (Abbildung 5.4 [A]). Aufgrund ihrer besonders großen Homologie zu den Tas1-Proteinen und ihrer analogen physiologischen Funktion als Aminosäurerezeptoren [Brauner-Osborne et al., 2007; Wellendorph und Brauner-Osborne, 2009], könnten dabei vor allem der CaSR (*Calcium Sensing Receptor*) [Bai et al., 1996] und der GPRC6A (*G protein-coupled receptor family C, group 6, subtype A*) [Kuang et al., 2005] vielversprechende Kandidaten für solche Interaktionspartner repräsentieren (Abbildung 5.4 [B]).

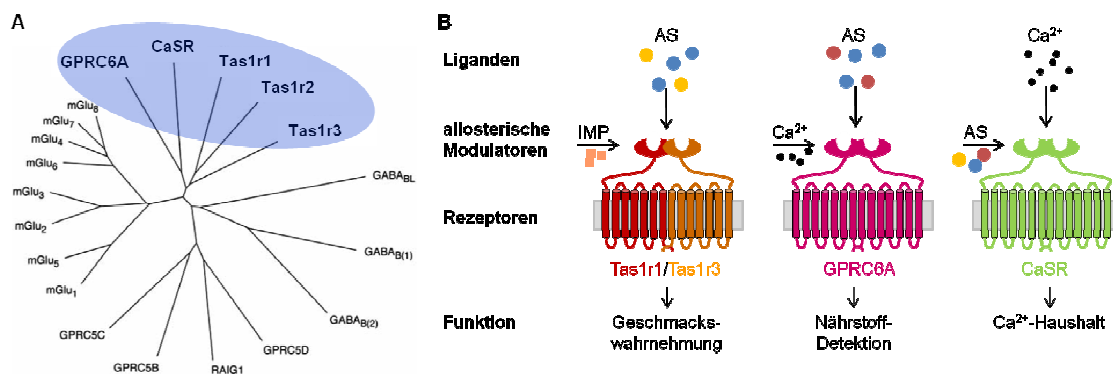


Abbildung 5.4: Schematische Übersicht über promiskuitive Aminosäurerezeptoren der Klasse C GPCRs.

[A] Gezeigt ist eine phylogenetische Analyse der bekannten Mitglieder der Klasse C GPCRs, die aus [Brauner-Osborne et al., 2007] entnommen wurde. Die Unterfamilie der promiskuitiven Aminosäurerezeptoren ist blau unterlegt.

In [B] ist eine schematische Übersicht über Charakteristika der Unterfamilie promiskuitiver Aminosäurerezeptoren dargestellt. Es sind aktivierende Liganden, allosterische Modulatoren sowie bekannte physiologische Funktionen dieser Rezeptoren aufgeführt. Zur Vereinfachung wurde auf die Darstellung aller bekannten allosterischen Modulatoren und Rezeptorfunktionen verzichtet.

Interessanterweise konnte der CaSR [Brown et al., 1993], der durch extrazelluläres Ca²⁺ aber auch durch aromatische, aliphatische und polare Aminosäuren aktiviert bzw. moduliert werden kann [Conigrave et al., 2000; Conigrave et al., 2007; Wellendorph und Brauner-Osborne, 2009], kürzlich auch in Spermien nachgewiesen werden [Mendoza et al., 2011]. Der vor allem durch basische L-Aminosäuren aber auch kleine und polare Aminosäuren aktivierte GPRC6A [Wellendorph et al., 2005; Christiansen et al., 2007] wird ebenfalls in Geschmackssinneszellen der Zunge [Wellendorph et al., 2007] und in männlichen Keimzellen [Pi et al., 2008] exprimiert.

Bislang konnte zwar nur eine Homodimerisierung des CaSR bzw. GPRC6A gezeigt werden; die Bildung von Heterodimeren wird aber z. B. im Magen zur Nährstoffdetektion (GPRC6A/CaSR) [Haid et al., 2011] bzw. in Sinneszellen der Zunge zur

Wahrnehmung des Geschmacks von Ca^{2+} und Mg^{2+} (Tas1r3/CaSR) [Tordoff et al., 2008] intensiv diskutiert.

Auch wenn bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob die im Milieu des weiblichen Genitaltrakts vorkommenden Aminosäuregradienten tatsächlich einzelne Spermienfunktionen steuern, erscheint es doch verlockend zu spekulieren, dass Spermien die zuvor beschriebenen Aminosäurerezeptoren zur „Kommunikation“ mit ihrer Umgebung nutzen. Die Co-Expression und Heterodimerisierung (Abbildung 5.5 [C]) dieser verschiedenen Rezeptorproteine könnte dabei die Wahrnehmung von Konzentrationsgradienten ganz unterschiedlicher Aminosäuren [Harris et al., 2005] aber auch von Reproduktions-spezifischen Liganden, wie z. B. hydrophilen Lockstoffen oder auch Glykoproteinen der *Zona pellucida* erlauben (Abbildung 5.5 [B]).

Interessant erscheint dieses Modell auch deshalb, weil die Liganden-abhängige Aktivierung dieser Rezeptoren durch ganz verschiedene allosterische Moleküle moduliert werden kann [Quinn et al., 1997; Quinn et al., 1998; Quinn et al., 2004; Zhang et al., 2008; Servant et al., 2010]. Folglich könnte die Funktion dieser Rezeptoren durch allosterische Modulatoren im weiblichen Genitaltrakt (Abbildung 5.5 [E]) wie z. B. den pH-Wert, die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, spezielle Reproduktions-spezifische Moleküle aber auch Bestandteile des Ejakulats wie z. B. Spermin, das bei der Ejakulation in den weiblichen Genitaltrakt gelangt, zusätzlich reguliert werden.

Die Kombination der verschiedenen Rezeptoreinheiten könnte damit die Diversität des Ligandenspektrums, die durch allosterische Modulatoren zusätzlich potenziert wird, deutlich erhöhen und damit eine präzise Detektion der komplexen Substanzgemische in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts erlauben. Damit könnte die Aktivität des Spermiums exakt an die jeweils erforderlichen Aufgaben angepasst werden, um so elementare Prozesse wie die Kapazitierung, Wegfindung und/oder die Interaktion mit der *Zona pellucida* optimal zu regulieren (Abbildung 5.5 [D]).

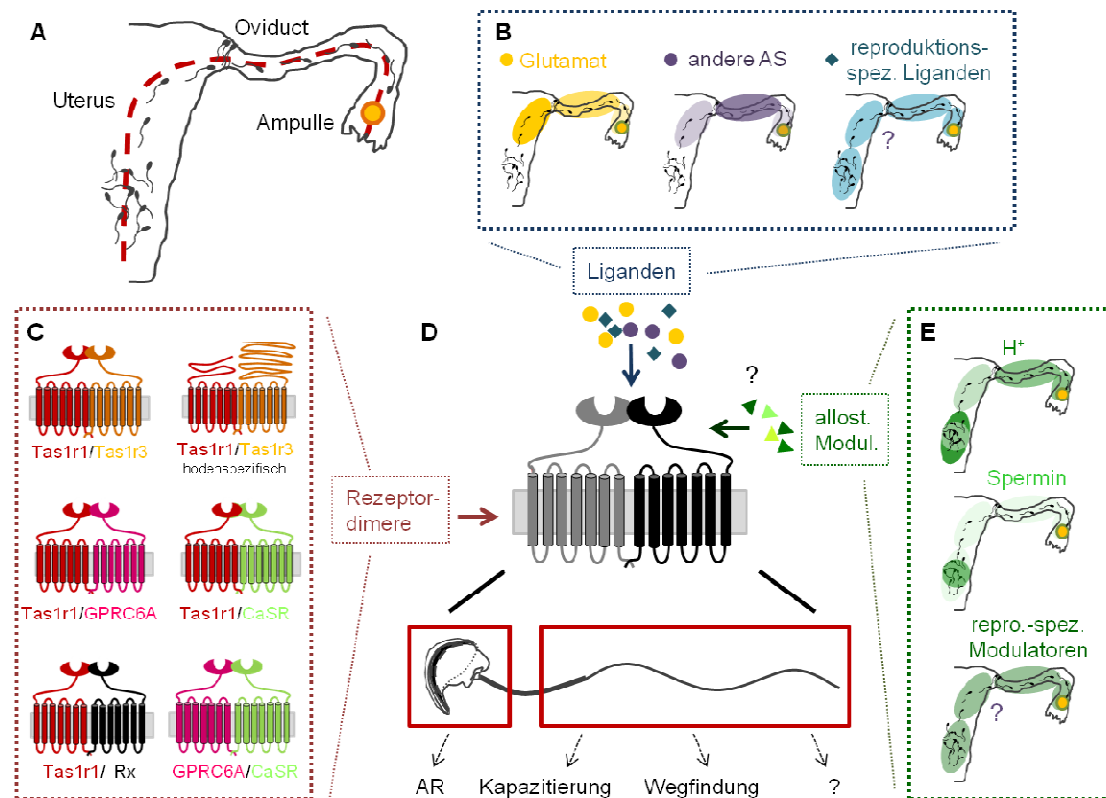


Abbildung 5.5: Schematische Übersicht über potentielle Funktionen von Tas1-Rezeptoren in männlichen Keimzellen im weiblichen Genitaltrakt.

In [A] ist der Weg dargestellt, den Spermien im weiblichen Genitaltrakt bis zur erfolgreichen Befruchtung einer Eizelle in der Ampulle des Eileiters zurücklegen (rote gestrichelte Linie). [B] Auf diesem Weg kommen die männlichen Keimzellen mit einer Vielzahl potentieller Liganden von Tas1-Rezeptoren in Kontakt. Die Konzentrationsgradienten von Glutamat (gelb) und anderen Aminosäuren ([andere AS], lila) im weiblichen Reproduktionssystem sind im Schema durch unterschiedliche Farbtintensitäten dargestellt. Tas1-Rezeptoren könnten aber auch durch Reproduktions-spezifische Liganden aktiviert werden (türkis). In [C] sind exemplarisch einige putative Rezeptordimere gezeigt, welche durch Heterodimerisierung aus verschiedenen Aminosäurerezeptoren der Klasse C GPCRs entstehen und an der Detektion von Liganden beteiligt sein könnten. [D] zeigt die Lokalisation von Tas1-Rezeptoren im Spermium (rote Kästen) und gibt einen Überblick darüber, welche Spermienfunktionen durch eine Rezeptoraktivierung beeinflusst werden könnten (AR: Akrosomreaktion). [E] Die Aktivierbarkeit der promiskuitiven Aminosäurerezeptoren könnte zusätzlich durch allosterische Moleküle moduliert werden. Die Verteilung von potentiellen Reproduktions-spezifischen Modulatoren sowie von Modulatoren des CaSR (pH, Spermin) im weiblichen Genitaltrakt ist exemplarisch dargestellt.

Um die Frage zu klären, ob heterodimere Klasse C GPCRs tatsächlich an der Detektion von Aminosäuren oder auch anderen Liganden des weiblichen Genitaltrakts beteiligt sind, soll in weiterführenden Studien zum einen die Co-Expression der verschiedenen promiskuitiven Aminosäurerezeptoren der Klasse C und ihre mögliche Interaktion mit Tas1-Rezeptoren im männlichen Keimdrüsengewebe und in reifen Spermien untersucht werden. Dazu sollten zum einen immunocytochemische Verfahren und auch Co-Immunpräzipitationstechniken eingesetzt werden, um eine Co-Lokalisation bzw. eine physikalische Interaktion der Rezeptorproteine zu prüfen. Zum anderen könnte in heterologen Expressionssystemen geprüft werden, wie sich eine Co-Expression von Tas1-Rezeptorproteinen mit dem GPRC6A bzw. mit dem CaSR auf die Aktivierbarkeit der Rezeptoren durch ihre bekannten Liganden, aber auch durch Komponenten des weiblichen Genital-

trakts wie follikulärer Flüssigkeit oder solubilisierter *Zona pellucida*, auswirkt. Um zu klären, ob sich die in männlichen Keimzellen exprimierten Tas1-Rezeptoren tatsächlich durch ein Isoform-spezifisches Ligandenspektrum auszeichnen, sollten diese Rezeptoren außerdem aus cDNA des Hodens kloniert und anschließend in einem heterologen Expressionssystem im Vergleich zum gustatorischen umami-Dimer funktionell untersucht werden.

Mögliche kompensatorische Effekte durch andere Aminosäurerezeptoren in Tas1r1-defizienten Tieren könnten zudem durch eine Bestimmung der Expression dieser Rezeptoren in Wildtyp- und Tas1r1-*Knockout*-Gewebe mittels quantitativer PCR und mit Hilfe immunologischer Nachweisverfahren identifiziert und in zukünftigen Studien durch die Verwendung entsprechender Doppel- oder Triple-*Knockout*-Mäuse ausgeschlossen werden.

Bei der Interpretation der physiologischen Bedeutung eines milden oder unauffälligen Reproduktionsphänotyps sollten dabei auch die „artifiziellen“ Lebens- und vor allem Zuchtbedingungen einer modernen Labortierhaltung berücksichtigt werden. So ist bei der promiskuitiven Spezies Maus [Barber und Dioguardi, 1972; Rolland et al., 2003] in freier Wildbahn zum einen eine Selektion des Paarungspartners durch das Weibchen möglich [Rolland et al., 2003]. Zum anderen konkurrieren nach multiplen Kopulationen eines Weibchens mit verschiedenen Männchen die Spermien dieser Tiere direkt um die erfolgreiche Befruchtung der vorhandenen Eizellen und damit um die Weitergabe ihres individuellen genetischen Materials [Dean et al., 2006; Firman und Simmons, 2008; Firman und Simmons, 2011]. Im Labor hingegen kann keine Auswahl des Paarungspartners erfolgen und eine Konkurrenz zwischen verschiedenen Spermienpopulationen ist in monogamen Verpaarungen ebenfalls ausgeschlossen. Diese gravierenden Unterschiede in den Reproduktionsbedingungen können zur Folge haben, dass die Deletion eines Proteins, das in der Natur eine bedeutende regulatorische Rolle spielt, unter optimierten Zuchtbedingungen eines Labortierstalls keine registrierbaren negativen Auswirkungen hat.

Ein solcher Effekt wurde kürzlich in einer Mauslinie beschrieben, die Gen-defizient für PKDREJ (*polycystic kidney disease receptor for egg jelly*) ist. Die Fertilität dieser PKDREJ-defizienten Tiere zeigt in klassischen monogamen Verpaarungsansätzen keinen Unterschied zu Wildtyp-Tieren. Konkurrieren jedoch Spermien von PKDREJ-defizienten Tieren mit den Spermatozoen von Wildtyp-Tieren um die Befruchtung von Eizellen, z. B. durch kontrollierte konsekutive Verpaarungen oder die artifizielle Inseminationen von gemischten Spermienpopulationen, so sind Wildtyp-Spermien deutlich erfolgreicher in der Zeugung von Nachkommen als PKDREJ-defiziente Spermien [Sutton et al., 2008]. Ein solcher Unterschied im Befruchtungserfolg bedeutet in der freien Wildbahn einen entscheidenden Selektionsnachteil, während er im standardisierten Laborumfeld keine Konsequenzen hat.

Bei der Bewertung von experimentellen Befunden, die an isolierten Spermien gewonnen werden, sollte zudem berücksichtigt werden, dass sich auch die

Bedingungen, denen männliche Keimzellen *in vitro* und *in vivo* ausgesetzt sind, gravierend unterscheiden: So wurden die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Mausspermien durch Ausschwimmen aus dem Nebenhoden und nicht durch Ejakulation gewonnen. Diese epididymalen Spermien wurden anschließend *in vitro* in einem standardisierten Kapazitierungspuffer (siehe Abschnitt 2.7) inkubiert und kamen demnach, im Gegensatz zur physiologischen Situation im weiblichen Genitaltrakt, weder mit Bestandteilen des Ejakulats noch mit den komplex zusammengesetzten luminalen Flüssigkeiten der verschiedenen Abschnitte des weiblichen Genitaltrakts in Kontakt [Harris et al., 2005; Hugentobler et al., 2008; Aviles et al., 2010]; auch eine Interaktion der Spermien mit dem Epithel des Oviductes [Suarez, 2008b; Talevi und Gualtieri, 2010], durch die eine Kapazitierung *in vivo* reguliert wird [Rodriguez-Martinez, 2007], fand unter diesen experimentellen Bedingungen nicht statt. Zwar sind auch *in vitro* kapazitierte Spermien in der Lage, erfolgreich eine Eizelle zu befruchten; dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich ihre Eigenschaften durch das Fehlen von spezifischen Liganden und/oder allosterischen Modulatoren aus dem Ejakulat oder dem Milieu des weiblichen Genitaltrakts deutlich von ihren Merkmalen *in vivo* unterscheiden könnten. Dies könnte beispielsweise dazu führen, dass physiologische Liganden bei einer Stimulation *in vitro* keine Effekte auf isolierte Spermien haben, obwohl sie *in vivo* sehr wohl einzelne Spermienfunktionen beeinflussen; eine Hypothese, durch die möglicherweise erklärt werden könnte, warum bei Stimulationen von isolierten epididymalen Mausspermien mit Glutamat keine Aktivierung des Umami-Dimers feststellbar war.

Um diese Problematik zumindest teilweise zu umgehen und möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten, sollten im Rahmen der durchgeführten Arbeit auch ejakulierte Mausspermien funktionell untersucht werden. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Hildebrandt am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung in Berlin versucht, murines Ejakulat mittels transrektaler Elektrostimulation zu gewinnen; eine Technik, die z. B. in der Reproduktionsmedizin bei Patienten mit Querschnittslähmung zur Gewinnung von Ejakulaten durchgeführt wird [Kafetsoulis et al., 2006], die aber auch schon bei verschiedenen anderen Säugetieren erfolgreich eingesetzt wurde [Hermes et al., 2001]. Es stellte sich während der initialen Experimente jedoch leider heraus, dass bei Mäusen aufgrund ihrer geringen Größe und Besonderheiten ihrer Anatomie, die bei der Elektrostimulation zu einer retrograden Ejakulation in die Harnblase führten, eine Gewinnung von ejakulierten Spermien kaum möglich ist.

Da ejakulierte humane Spermien im Gegensatz zu Mausspermien relativ einfach und nicht invasiv gewonnen werden können, soll die Funktion von ejakulierten Spermien deshalb in weiterführenden Studien an menschlichen Spermien untersucht werden. Zwar gibt es bei humanen Spermien kaum die Möglichkeit, die Auswirkungen einer speziellen Gen-Deletion isoliert zu untersuchen oder die Zellen mit humaner *Zona pellucida* zu stimulieren; dafür steht mit Lactisol aber ein Inhibitor der humanen Tas1-

Rezeptoren zur Verfügung [Xu et al., 2004], mit dem diese Rezeptorproteine bei Stimulierungsexperimenten mit Geschmacksstoffen blockiert und so die funktionelle Rolle dieser Proteine gezielt untersucht werden könnte.

5.2.2 Potentielle Funktion von Bitterrezeptoren im männlichen Reproduktionssystem

Bei der Analyse der Expression von Bitterrezeptoren in männlichem Keimdrüsen-gewebe konnten in RT-PCR-Experimenten mit cDNA aus murinem Hoden Transkripte von 28 der 35 Mitglieder der Tas2-Rezeptorfamilie amplifiziert werden (Abbildung 5.6 [A]) (Tabelle 4.3). Obwohl diese Analysen nicht direkt eine Schlussfolgerung auf die Expressionsrate der einzelnen Bitterrezeptoren zulassen, war auffällig, dass bei einem direkten qualitativen Vergleich der Intensität der Tas2r-Amplifikationsprodukte deutliche Unterschiede auszumachen waren (Abbildung 4.15, Abbildung 4.16), die unabhängig vom Verwandtschaftsgrad der Bitterrezeptoren auftraten (Abbildung 4.17). Dieser Nachweis einer Expression vieler, jedoch nicht aller, Bitterrezeptorsubtypen mit möglicherweise ganz unterschiedlichen Expressionsraten im Reproduktionsgewebe wirft zum einen die Überlegung auf, welche physiologische Funktion Tas2-Rezeptoren in männlichen Keimzellen generell erfüllen könnten. Es stellt sich aber auch die Frage, warum überhaupt so viele verschiedene Bitterrezeptoren, die sich im humanen System durch stark überlappende Ligandenspektren auszeichnen [Meyerhof et al., 2010], im Hoden exprimiert werden und warum trotz dieser Vielzahl von Bitterrezeptoren in Spermien mit potentiell redundanter Funktion [Meyerhof et al., 2010], die Deletion eines einzelnen Bitterrezeptors (Tas2r131) zu einem deutlich registrierbaren Reproduktionsphänotyp führt.

Bevor diese Überlegungen im Weiteren diskutiert werden, soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass auf Grund des Fehlens Subtyp-spezifischer Antikörper momentan nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die verschiedenen testikulären Tas2-Rezeptor-Transkripte alle in ein funktionelles Rezeptorprotein translatiert werden oder ob manche Rezeptor-Transkripte möglicherweise durch eine promiskuitive transkriptionelle Aktivität im Keimepithel des Hodens entstehen [Schmidt, 1996].

Bezüglich der funktionellen Rolle der Tas2-Rezeptoren in männlichen Keimzellen erscheint die Frage, ob die vielen verschiedenen Bitterrezeptoren im Hoden alle gemeinsam in einer Keimzelle vorkommen (Abbildung 5.6 [B] und [C], rechte Seite), oder ob verschiedene Keimzellpopulationen existieren, die ein unterschiedliches Bitterrezeptor-Repertoire aufweisen, besonders interessant. Während sich bei einer gleichzeitigen Expression aller Rezeptoren pro Zelle eine einheitliche Spermienpopulation ergeben würde (Abbildung 5.6 [B] und [C], rechte Seite), könnte die Co-Expression ausgewählter Rezeptoren (Abbildung 5.6 [B], linke Seite) oder die Expression nur eines einzelnen Rezeptors in bestimmten Spermien ganz verschiedene Spermienpopulationen entstehen lassen (Abbildung 5.6 [C], linke Seite). Dabei könnten bei der Expression von

nur einem Rezeptorsubtyp pro Zelle rein rechnerisch 28 verschiedene Spermien-gruppierungen entstehen; bei der Co-Expression zweier Rezeptoren würden sich 784 (28^2) und bei der Co-Expression von drei Rezeptoren schon ca. 20000 (28^3) und bei vier Rezeptoren über 600000 (28^4) etc. verschiedene Kombinationsmöglichkeiten ergeben. Bei der Co-Expression weiterer Rezeptoren könnte sich so z. B. eine ähnlich große zelluläre Diversität ergeben wie in B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immun-systems, deren Immunglobuline ebenfalls eine enorme Variabilität aufweisen [Janeway et al., 2005]. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Rezeptorausstattung könnten sich solche diversen Spermienpopulationen z. B. durch spezifische Ligandenspektren und damit einhergehend möglicherweise auch durch unterschiedliche Eigenschaften aus-zeichnen.

Da der Frage der Tas2r-Proteinexpression und einer möglichen Entstehung verschiedener Keimzellpopulationen hinsichtlich der physiologischen Funktion von Bitterrezeptoren in Spermien eine übergeordnete Bedeutung zukommt, ist es in zukünftigen Studien essentiell, mit Hilfe von Subtyp-spezifischen Antikörpern zum einen die tatsächliche Translation der nachgewiesenen Bitterrezeptor-Transkripte zu überprüfen. Zum anderen sollte dabei festgestellt werden, ob nur Spermien mit identischer Bitterrezeptorexpression existieren, oder ob eine selektive Co-Expression von Tas2-Rezeptoren festzustellen ist, die zur Bildung verschiedener Spermien-gruppierungen führt (Abbildung 5.6 [C], linke Seite).

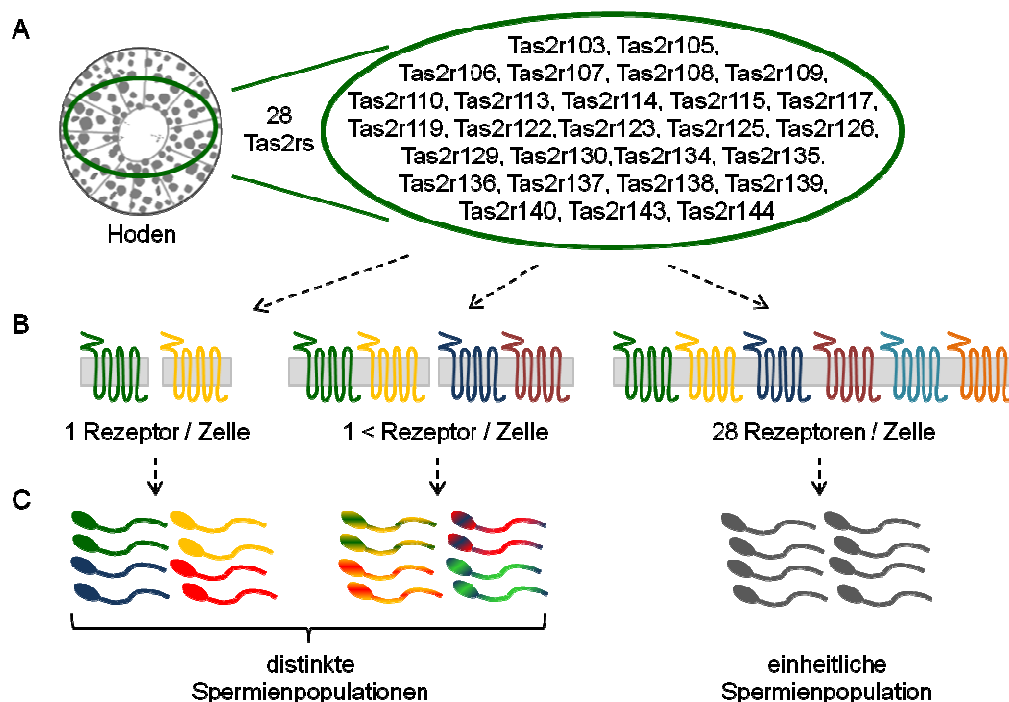


Abbildung 5.6: Hypothetisches Modell der Expression von Bitterrezeptoren in männlichen Keimzellen und daraus resultierende putative Spermienpopulationen.

[A] Übersicht über die 28 Bitterrezeptoren, deren Transkripte in cDNA des Hodens nachgewiesen werden konnten. [B] Diese Rezeptoren könnten einzeln, in bestimmten Kombinationen oder alle gemeinsam in

männlichen Keimzellen exprimiert werden. [C] zeigt exemplarisch die möglichen Spermienpopulationen, die sich aus diesen verschiedenen Expressionsmustern ergeben würden.

Der Einsatz Subtyp-spezifischer Antikörper könnte aber noch eine weitere wesentliche Bedeutung zur Klärung der funktionellen Rolle von Bitterrezeptoren in Spermien haben. Aufgrund der starken strukturellen und funktionellen subzellulären Kompartimentierung reifer Spermien [Zitranski et al., 2010] könnte die Analyse des subzellulären Expressionsmusters einzelner Bitterrezeptoren erste Anhaltspunkte für eine Funktion der Rezeptoren in Spermien, z. B. bezüglich von Wegfindungsprozessen (Flagellum) oder der Akrosomreaktion (Kopf) ergeben. Da gegenwärtig jedoch keine geeigneten Antikörper gegen murine Bitterrezeptor kommerziell zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 4.18), sind diese experimentellen Ansätze zur Sammlung von Hinweisen bezüglich der physiologischen Funktion von Bitterrezeptoren in Spermien zurzeit nicht verfolgbare. Weiterhin erschwerend kommt in diesem Zusammenhang hinzu, dass bislang nur für zwei murine Tas2-Rezeptoren (Tas105, Tas2r108) spezifische aktivierende Liganden beschrieben wurden [Chandrashekar et al., 2000], so dass eine gezielte Stimulation einzelner oder auch mehrerer Rezeptoren gleichzeitig (bei überlappendem Ligandenspektrum) und eine nachfolgende Erfassung möglicher physiologischer Veränderungen in männlichen Keimzellen (z. B. Akrosomreaktionsrate, Motilität, intrazelluläre Botenstoff-Konzentrationen) gegenwärtig kaum möglich ist.

Um die Expression und Funktion von Bitterrezeptoren in männlichen Keimzellen genauer analysieren zu können, wurde daher eine Tas2r131-defiziente Mauslinie analysiert, die GFP als Reporterprotein unter Kontrolle des Tas2r131 Promotors exprimiert. Anhand des Fluoreszenzmusters dieses Reporterproteins konnte gezeigt werden, dass der Tas2r131 in späten Keimzellstadien des Hodens exprimiert wird (Abbildung 4.20 [D]). Dabei war die GFP-Markierung, und damit die Tas2r131 Expression, in allen Spermatiden erkennbar und nicht etwa auf einzelne Zellen beschränkt (Abbildung 4.20 [J]). Diese Befunde lassen eine „ein Rezeptor pro Zelle“-Expression (Abbildung 5.6 [B], links) unwahrscheinlich erscheinen. Allerdings können sie nicht klären, ob alle Spermien durch eine einheitliche Rezeptorexpression gekennzeichnet sind, oder ob der Tas2r131 möglicherweise als Co-Expressionspartner verschiedener Rezeptoren fungiert und so durch die Kombination mit anderen Rezeptoren unterschiedliche Spermienpopulationen entstehen.

Bei der reproduktionsbiologischen Charakterisierung der Tas2r131-defizienten Tiere fiel eine signifikant erhöhte Zahl epididymaler Spermien auf (Abbildung 4.26). Die spontane Akrosomreaktionsrate dieser Tas2r131-defizienten Spermien war leicht, aber nicht signifikant niedriger als die von Wildtyp-Spermien (Abbildung 4.31). Außerdem wurde in Verpaarungsexperimenten mit heterozygoten Tieren beobachtet, dass Tas2r131 heterozygote Männchen bei Verpaarungen mit Wildtyp-Weibchen ihr Tas2r131 [-] Allel signifikant häufiger an ihre Nachkommen weitergaben als ihr Tas2r131 [+] Allel (Abbildung 4.28 [B]), während bei den Nachkommen von hetero-

zygoten Weibchen eine gleichmäßige Verteilung des Genotyps zu registrieren war (Abbildung 4.28 [C]).

Diese Genotyp-Verschiebung könnte ursächlich auf eine erhöhte Zahl Tas2r131-defizienter Spermien im Ejakulat Tas2r131 heterozygoter Tiere zurückgehen oder aber darauf hindeuten, dass Tas2r131-Gen-defiziente Spermien von heterozygoten Männchen sich trotz bestehender Cytoplasmabrücken zwischen postmeiotischen Keimzellen (Abbildung 4.27) phänotypisch von Tas2r131-positiven Spermien unterscheiden und eine höhere Befruchtungskompetenz aufweisen. Momentan kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die nur bei heterozygoten Zuchtmännchen registrierte Genotyp-Verschiebung ganz unabhängig von der Spermienfunktion ist und beispielsweise auf eine gestörte Embryonalentwicklung z. B. aufgrund von *genomic imprinting* zurückzuführen ist [Reik und Walter, 2001].

Bei der Bewertung dieses auffälligen Phänotyps von Tas2r131 GFP Tieren sollte zudem berücksichtigt werden, dass die beschriebenen signifikanten Veränderungen bei Tas2r131-defizienten Tieren, die bereits in der zehnten Generation (N10) auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt waren und in einem anderen Tierstall gezüchtet wurden (Tierzuchtanlage des DIfE) (Daten nicht gezeigt), die erst gegen Ende dieser Dissertation untersucht werden konnten, nicht zu detektieren waren. Die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps der Tas2r131 GFP Mauslinie, könnte z. B. in verschiedenen Haltungsbedingungen in den Tierstallanlagen an der LMU bzw. am DIfE begründet liegen. Sie könnte aber auch auf die unterschiedlichen Stammhintergründe beider Zuchten zurückgehen. So zeichneten sich die in dieser Arbeit untersuchten Tiere durch einen gemischten 129SV-C57BL/6-Hintergrund aus, dessen C57BL/6-Anteil 75 - 98 % betrug (N2 - N6) (Abschnitt 3.6.2). Bei den Tieren des DIfE lag der C57BL/6-Anteil dagegen bei 99 %. Solche unterschiedlichen genetischen Hintergründe könnten beispielsweise in einer unterschiedlichen funktionellen Kompensation des Tas2r131-Verlustes resultieren, ein Phänomen, das aus Verhaltensexperimenten mit Gen-defizienten Mäusen mit unterschiedlichen Stammhintergründen bekannt ist [Gingrich und Hen, 2000; Barbaric et al., 2007]. Es kann momentan aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass nicht die Tas2r131-Deletion an sich, sondern andere, Tas2r131-assoziierte, Stamm-spezifische Gene für den registrierten ungewöhnlichen Phänotyp verantwortlich sind [Gerlai, 1996]. Zwar ist der genetische Anteil des 129SV-Stamms, aus dem die embryonalen Stammzellen zur Generierung der Tas2r131 GFP Mauslinie stammen, prozentual gering und durch homologe Rekombination zum Großteil relativ zufällig über das gesamte Genom verteilt. Allerdings werden Gene, die große chromosomale Nähe zum Tas2r131 aufweisen, mit großer Wahrscheinlichkeit zusammen mit dem Rezeptor bzw. der kodierenden GFP-Sequenz vererbt [Gerlai, 2001]. So wird die Tas2r131-Sequenz in Wildtyp-Tieren vermehrt von C57BL/6-spezifischen Genen umgeben, während die GFP-Sequenz von Genen flankiert wird, die aus den 129SV-Stammzellen stammen. Sollten also in der unmittelbaren Umgebung des

Tas2r131-Locus Proteine kodiert sein, die das männliche Reproduktionssystem beeinflussen und die Stamm-spezifische Unterschiede aufweisen, so könnten diese Proteine in Tieren, die nicht vollständig zurückgekreuzt sind, ebenfalls zum Phänotyp der Tas2r131-Deletion beitragen [Gerlai, 2001; Crusio, 2004; Eisener-Dorman et al., 2009].

Die Frage, welche der registrierten Reproduktionsphänotypen tatsächlich durch die Tas2r131-Deletion ausgelöst wurden und welche möglicherweise auf den gemischten Stammhintergrund der *Knockin*-Mauslinie zurück zu führen sind, soll deshalb in zukünftigen vergleichenden Studien an Tieren mit gemischtem sowie einheitlichem C57BL/6 Hintergrund, die in beiden Tierställen parallel gehalten werden, weiter untersucht werden.

Davon ausgehend, dass der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Tas2r131-Phänotyp spezifisch ist, können daraus potentielle Funktionen des Bitterrezeptors auf unterschiedlichen Ebenen der Reproduktion abgeleitet werden (Abbildung 5.7): So könnte der Tas2r131 im Gehirn, wo eine funktionelle Expression einzelner Bitterrezeptoren bereits nachgewiesen werden konnte [Singh et al., 2011], beispielsweise durch eine Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse an der hormonellen Kontrolle der Keimzellbildung durch GnRH (*Gonadotropin releasing hormone*), FSH (*Follikel-stimulierendes Hormon*), LH (*Luteinisierendes Hormon*) und Testosteron [Shacham et al., 2001; Krsmanovic et al., 2009; Walker, 2010] involviert sein. Eine solche physiologische Funktion soll in weiterführenden Studien durch die Bestimmung der Serum-Konzentrationen der entsprechenden Hormone geprüft werden.

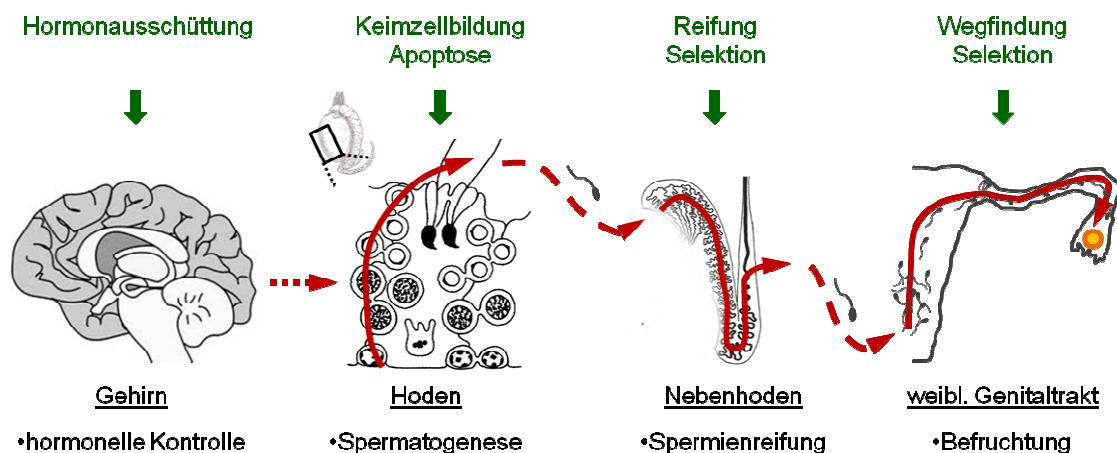


Abbildung 5.7: Mögliche physiologische Rolle von Bitterrezeptoren für die Bildung und Funktion männlicher Keimzellen.

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die verschiedenen Organe, in denen Tas2-Rezeptoren eine physiologische Rolle für die Bildung, Reifung und Funktion von männlichen Keimzellen haben könnten. Die rote Linie zeichnet den Weg männlicher Keimzellen bis zur erfolgreichen Befruchtung einer Eizelle nach. In grün sind potentielle Funktionen des Tas2r131 angegeben, die dem Phänotyp Tas2r131-defizienter Tiere zu Grunde liegen könnten.

Die erhöhte Zahl reifer Spermien könnte aber auch auf eine physiologische Funktion des Tas2r131 im Hoden hindeuten, wo er in späten Stadien der Spermatogenese

exprimiert wird (Abbildung 4.20). Dabei könnte der Rezeptor, vergleichbar zum Tas1r1 (siehe Abschnitt 5.2.1), durch eine basale Aktivität die intrazelluläre cAMP-Konzentration regulieren und damit apoptotische Prozesse während der Spermatogenese beeinflussen. Denkbar wäre allerdings auch eine Liganden-abhängige Aktivierung des Tas2r131 im Keimepithel, ein Modell, das bereits für einen anderen testikulär-exprimierten Bitterrezeptor, den Tas2r105, diskutiert wird [Li und Zhou, 2012]. Ob und welche der häufig toxischen Bitterstoffe im Keimepithel präsent sein könnten, ist bislang aber völlig unklar; insbesondere, da Spermienvorläuferzellen während der postmeiotischen Stadien, in denen der Tas2r131 exprimiert wird (Abbildung 4.20), durch die Blut-Hoden-Schranke sehr effektiv vor schädlichen Einflüssen abgeschirmt werden [Cheng et al., 2010; Cheng und Mruk, 2012].

Interessanterweise wird für die den Bitterrezeptoren strukturell verwandten olfaktorischen Rezeptoren neben einer klassischen Funktion als Detektionsmoleküle im Riechepithel auch eine funktionelle Rolle bei der Interaktion verschiedener olfaktorischer Neurone bei der Axon-Wegfindung im *Bulbus olfactorius* vermutet [Mombaerts, 2006]. Dabei soll durch eine direkte Rezeptor-Rezeptor-Interaktion zwischen Axonen verschiedener Geruchsrezeptor-exprimierender Neurone eine Erkennung von Zellen, die den gleichen olfaktorischen Rezeptor exprimieren, im Gewebeverband realisiert werden, was eine gemeinsame Wegfindung dieser Axone in denselben Glomerulus ermöglicht [Feinstein et al., 2004; Feinstein und Mombaerts, 2004]. Analog zu diesem Modell könnte man deshalb auch spekulieren, dass die im Hoden nachgewiesenen Bitterrezeptoren keine Liganden detektieren, sondern primär an der Interaktion von Keimzellen untereinander bzw. mit Sertoli-Zellen beteiligt sind und dadurch das Überleben bzw. die Apoptose verschiedener Zelltypen regulieren.

Der Tas2r131 könnte aber auch an Selektionsprozessen zur Auswahl und „Ausortierung“ bestimmter Spermiengruppen eines Gesamtejakulates beteiligt sein, die seit längerem vermutet werden [Ziegler et al., 2005] und die sowohl die registrierte erhöhte Spermienzahl als auch die Genotyp-Verschiebung zugunsten des Tas2r131 [-] Allels erklären könnten. Derartige Auswahlprozesse, durch die z. B. sichergestellt werden soll, dass Nachkommen mit optimalen genetischen Eigenschaften und damit bestmöglichen Überlebenschancen geboren werden [Birkhead und Pizzari, 2002], werden in Zusammenhang mit der Expression anderer chemosensorischer Proteine wie den olfaktorischen Rezeptoren in Spermien bzw. Pheromonrezeptoren der V2r-Familie [Leinders-Zufall et al., 2004] diskutiert. Dabei sollen MHC-assoziierte Geruchsrezeptoren eine Erkennung von MHC-Haplotypen ermöglichen und die Zeugung von Nachkommen mit optimaler MHC-Diversität ermöglichen [Nowak et al., 1992; Ziegler et al., 2010].

Entsprechende Selektionsprozesse können bereits im männlichen Reproduktionssystem stattfinden, wo Spermien mit bestimmten genetischen Merkmalen während der Keimzellreifung bzw. der Passage durch den Nebenhoden, z. B. durch Apoptose, aussortiert werden (*Sperm Receptor Selection*) [Ziegler et al., 2002; Ziegler et al., 2005].

Die Auswahl kann aber auch im weiblichen Genitaltrakt erfolgen (*postcopulatory selection*) [Birkhead und Pizzari, 2002], wo ganz verschiedene Selektionsmechanismen zum Tragen kommen könnten. Dabei könnten zum einen Spermienpopulationen mit einer distinkten Rezeptorausstattung z. B. durch eine verfrühte Tas2r-abhängige Akrosomreaktion, eliminiert werden (Abbildung 4.31). Zum anderen könnte ein spezielles Tas2-Rezeptorrepertoire die Befruchtungschancen einer Spermengruppe auch erhöhen, indem z. B. das Auffinden der Eizelle im Eileiter begünstigt wird. Eine solche positive Beeinflussung könnte z. B. durch spezifische Lockstoffe, die nur von Spermien mit einer bestimmten Rezeptorkombination detektiert werden, realisiert werden. Bei verschiedenen Nagerspezies, u. a. der Hausmaus, wurde zudem beobachtet, dass ihre Spermien Aggregate bilden können [Immler et al., 2007], sogenannte *sperm trains*, die sich durch eine deutlich erhöhte Schwimmgeschwindigkeit auszeichnen als einzelne Spermien [Moore et al., 2002]. Da sich in Spermengemischen bevorzugt die Spermien des gleichen Männchens in einzelnen dieser *trains* zusammenfinden [Fisher und Hoekstra, 2010], kann dabei offensichtlich sogar eine Erkennung genetisch verwandter Zellen erfolgen, deren Mechanismus bislang nicht geklärt ist. Man könnte deshalb spekulieren, dass Spermien mit gemeinsamen genetischen Eigenschaften sich möglicherweise anhand ihres Bitterrezeptor-Expressionsmusters zusammenfinden könnten, z. B. durch die zuvor diskutierte direkte Interaktion von Rezeptorproteinen (siehe oben), und ihr genetisches Material durch eine solche Kooperation mit größerem Erfolg weitergeben können [Moore et al., 2002; Fisher und Hoekstra, 2010]. Welchen physiologischen Nutzen solche potentiellen, auf Tas2-Rezeptoren basierenden Selektionsmechanismen haben könnten und warum der Verlust eines speziellen Rezeptors einen Selektionsvorteil bedeutet, ist momentan allerdings unklar.

Da der Tas2r131 einheitlich in allen Keimzellen eines Reifungsstadiums exprimiert wird (Abbildung 4.20), kann man auch spekulieren, dass Spermien über ein einheitliches Bitterrezeptor-Repertoire verfügen (Abbildung 5.7, rechte Seite), welches ganz unabhängig von Selektionsmechanismen an der Interaktion des Spermiums mit seiner extrazellulären Umgebung beteiligt sein könnte.

Generell können Bitterrezeptoren durch eine Vielzahl chemisch sehr diverser Stoffe aktiviert werden, welche sich häufig durch eher lipophile Eigenschaften auszeichnen, (Abbildung 1.6). Bislang gibt es allerdings keine Berichte darüber, dass bekannte gustatorische Bitterstoffe im Milieu des weiblichen Genitaltrakts präsent sind. Deshalb könnten eventuell auch andere lipophile Moleküle im weiblichen Genitaltrakt, wie z. B. Progesteron oder Östradiol, oder auch bislang nicht identifizierte Lockstoffe der Eizelle [Sun et al., 2005] als potentielle Liganden des Tas2r131 in Betracht kommen, die chemotaktische Prozesse vermitteln oder auch die akrosomale Exocytose regulieren könnten. Die Beobachtung, dass der Verlust des Tas2r131 trotz der vielfältigen funktionellen Redundanz dieser Rezeptoren, die im humanen System gezeigt werden konnte [Meyerhof et al., 2010], in Spermien nicht kompensiert werden kann, könnte dabei

möglicherweise einen Hinweis darauf geben, dass der Tas2r131 einen spezifischen Liganden erkennt, der keinen der anderen exprimierten Bitterrezeptoren aktiviert.

Um solche potentiellen spezifischen Liganden zu identifizieren, sollte in zukünftigen Studien die Aktivierbarkeit heterolog exprimierter Tas2-Rezeptoren durch bekannte Bitterstoffe, aber auch durch verschiedene lipophile Liganden des weiblichen Genitaltrakts, wie beispielsweise weibliche Hormone, in funktionellen Stimulierungsexperimenten untersucht werden. Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass sowohl Progesteron als auch verschiedenste andere lipophile Moleküle zu einer Aktivierung des CatSper-Kanals im Spermienflagellum führen können [Brenker et al., 2012], sollten diese Versuche zudem durch Kontrollexperimente mit CatSper-Blockern wie z. B. NNC 55-0396 und Mibefradil [Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011] ergänzt werden. Werden bei einem solchen *Liganden-Screening* spezifische Agonisten einzelner Tas2-Rezeptoren und besonders des Tas2r131 gefunden, so könnten diese anschließend dazu genutzt werden, isolierte Spermien in funktionellen Analysen gezielt zu stimulieren und so die physiologische Rolle der aktivierten Bitterrezeptoren bei einzelnen Keimzellfunktionen wie der Motilität, Wegfindung und Akrosomreaktion zu verstehen.

Zusätzlich sollten weitere Bitterrezeptor-defiziente Tiere hinsichtlich ihres Reproduktionserfolgs und ihrer Spermienfunktion charakterisiert werden. Dabei könnte der Vergleich der Phänotypen verschiedener Tas2r-defizienter Mauslinien möglicherweise auch Aufschluss darüber geben, ob die identifizierten Bitterrezeptoren eine gemeinsame Aufgabe erfüllen, oder ob diese verschiedenen Rezeptoren unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen und z. B. durch die Detektion distinkter Signalstoffe für den Befruchtungserfolg einzelner Spermien entscheidend sind.

5.2.3 Physiologische Funktion des potentiellen Sauerdetektors PKD2L1 in männlichen Keimzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PKD2L1 Protein, ein potentielles Sensormolekül für saure Geschmacksstoffe [Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006], im Hauptstück des Flagellums von Mausspermien exprimiert wird (Abbildung 4.5). Welche physiologische Rolle dieses Protein in männlichen Keimzellen erfüllt, konnte bislang experimentell nicht aufgeklärt werden, da bei Veränderungen des pH-Wertes auch die Funktion anderer Spermienproteine wie z. B. des CatSper beeinflusst wird [Kirichok et al., 2006] und derzeit keine PKD2L1-spezifischen Blocker zur Unterscheidung von PKD2L1-abhängigen und PKD2L1-unabhängigen Effekten zur Verfügung stehen. Im Folgenden wird deshalb die potentielle physiologische Funktion dieses Proteins in Spermien anhand bekannter Eigenschaften des PKD2L1 und anderer PKD-Proteine im Hinblick auf die Vielfalt von pH-abhängigen Prozessen im Spermium und den verschiedenen extrazellulären pH-Werten im weiblichen Genitaltrakt diskutiert. In anderen Organen, wie z. B. der Niere, sind die Mitglieder der Familie der PKD-Proteine funktionell als Heteromere aktiv [Delmas et al., 2004]. Dabei bilden die Ionenkanalproteine der PKD2- bzw. PKD2-like Subfamilie mit Vertretern der PKD1-

bzw. PKD1-like Proteine funktionelle Rezeptor-Kanal-Komplexe, die als zelluläre Sensoren, z. B. für mechanische Stimuli an Cilien oder auch osmotischen Stress fungieren und u. a. einen Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle vermitteln, aber auch heterotrimere G Proteine binden und aktivieren [Parnell et al., 1998; Delmas et al., 2004; Delmas, 2005].

Als möglicher Interaktionspartner des PKD2L1 Proteins zur Bildung eines solchen Rezeptor-Kanal-Komplexes in Spermien könnte das PKD1-like Protein PKD1L3 in Betracht kommen, für das in Geschmackssinneszellen und auch im heterologen Expressionssystem gezeigt werden konnte, dass es zusammen mit dem PKD2L1 Heteromere bildet, die durch extrazelluläre Protonen aktiviert werden [Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006] und dessen mRNA-Transkripte bereits im Hoden der Maus nachgewiesen wurden [Ishimaru et al., 2006; LopezJimenez et al., 2006]. Wie in Co-Immunpräzipitationsstudien mit heterolog exprimierten Proteinen gezeigt werden konnte, kann der PKD2L1 aber auch mit dem PKDREJ Protein heteromerisieren [Sutton et al., 2006], welches ebenfalls in Mausspermien exprimiert wird [Butscheid et al., 2006], wo es an der Regulation der Kapazitation beteiligt ist [Sutton et al., 2008]. Zusammen mit diesen zwei potentiellen Heteromerisierungspartnern, PKD1L3 und PKDREJ, könnte der PKD2L1 (Abbildung 5.8 [A]), für den eine Funktion als genereller Protonensensor in ganz verschiedenen Zellsystemen vermutet wird [Huang et al., 2006], somit auch in Spermien an der Detektion verschiedener pH-Werte funktionell beteiligt sein.

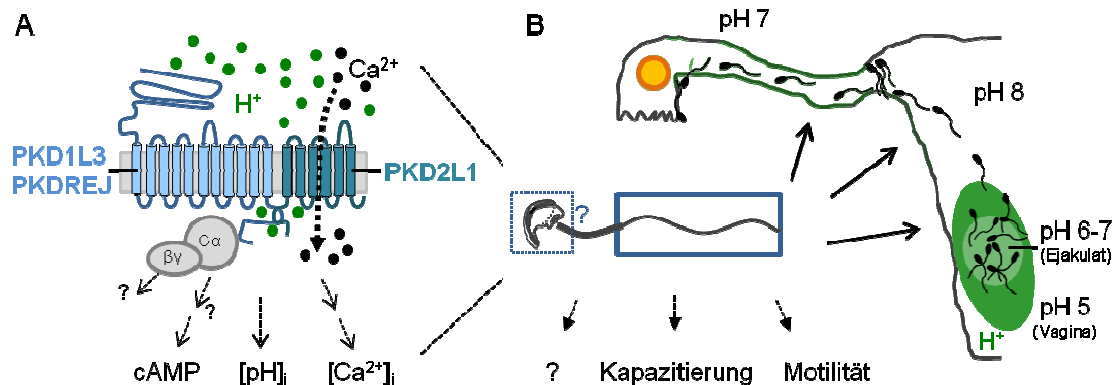


Abbildung 5.8: Hypothetisches Modell der PKD2L1-Funktion in Spermien.

[A] Das PKD2L1 Protein könnte als Heteromer mit einem Vertreter der PKD1-Familie, z. B. dem PKD1L3 oder dem PKDREJ, als zellulärer Protonensensor fungieren. Die Aktivierung des PKD2L1 könnte dann zu einem Einstrom von Ca²⁺ durch dieses Kanalprotein führen. Ebenfalls möglich wäre eine nachfolgende Aktivierung heterotrimerer G Proteine sowie eine Regulation des intrazellulären pH-Wertes. In [B] ist eine Übersicht über die verschiedenen extrazellulären pH-Werte gezeigt, denen ein Spermium im weiblichen Genitaltrakt ausgesetzt ist. Zusätzlich sind die subzelluläre Lokalisation des PKD2L1 in Mausspermien (blaue Rechtecke) sowie pH-abhängige Spermienfunktionen angegeben, die durch eine Aktivierung des PKD2L1 beeinflusst werden könnten. Die Intensität der grünen Farbe repräsentiert die Protonenkonzentration.

Dabei erscheint die Registrierung extrazellulärer Protonenkonzentrationen gerade im Hinblick auf die sich ständig ändernden pH-Werte im extrazellulären Milieu von

Spermien interessant [Maas et al., 1977; Qi et al., 2007] (Abbildung 5.8 [B]), durch die elementare Spermienfunktionen wie z. B. die Motilität und die Hyperaktivierung reguliert werden [Hamamah und Gatti, 1998]. Die Aktivierung eines PKD2L1/PKD1L3 bzw. eines PKD2L1/PKDREJ Heteromers in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts könnte dabei zu einem Einstrom von Ca^{2+} führen, aber möglicherweise auch G Protein-abhängige Signaltransduktionskaskaden aktivieren, die z. B. zur Generierung intrazellulärer Botenstoffe wie cAMP führen könnten (Abbildung 5.8 [A]). Angesichts des Phänotyps PKDREJ-defizienter Spermien, die eine verzögerte Veränderung ihres intrazellulären pH-Wertes während der Kapazitierung zeigen (H. Florman, persönliche Kommunikation) könnte man zudem spekulieren, dass die PKD-Proteine an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes von Spermien beteiligt sind. Dabei könnte eine Detektion extra- oder intrazellulärer Protonenkonzentrationen durch die PKDs z. B. über cAMP-induzierte Phosphorylierungen [Decoursey, 2003; Musset et al., 2010] zu einer Beeinflussung Protonen-leitender Proteine wie dem Hv1-Kanal [Lishko et al., 2012] oder Na/H-Austauschern wie dem sNHE (*sperm* Na^+/H^+ *exchanger*) [Garcia und Meizel, 1999; Wang et al., 2003; Quill et al., 2006] führen und damit eine Regulation des intrazellulären pH-Wert von Spermien im Verlauf der Kapazitierung oder während der Akrosomreaktion ermöglichen [Carr und Acott, 1989; Parrish et al., 1989; Yanagimachi, 1994].

In weiterführenden Studien an PKD2L1-defizienten Tieren sollte deshalb untersucht werden, welche Effekte eine Deletion des PKD2L1 auf den intrazellulären pH-Wert von Spermien hat, z. B. während der Kapazitierung, beim Kontakt mit verschiedenen extrazellulären pH-Werten und bei der Bindung an die *Zona pellucida*. Um zu klären, ob dieses Kanalprotein in Spermien an der Regulation elementarer pH-abhängiger Funktionen beteiligt ist und damit eine Übersetzung der unterschiedlichen pH-Werte in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltrakts in eine Aktivitätsänderung des Spermiums ermöglichen könnte, sollte außerdem geprüft werden, ob PKD2L1-defiziente Spermien sich durch Veränderungen in ihrer Motilität, Hyperaktivierung, Kapazitierung und Akrosomreaktion (zur Übersicht siehe [Florman et al., 2010]) von Wildtyp-Spermien unterscheiden.

5.2.4 Die gustatorische G Protein Untereinheit α -Gustducin in Spermien

Neben den verschiedenen Rezeptormolekülen für Geschmacksstoffe wurden in der vorliegenden Arbeit auch Hinweise auf die Expression der gustatorischen G Protein Untereinheit α -Gustducin in Spermien gefunden (Abbildung 4.7). Da im männlichen Reproduktionsgewebe von Gustducin-defizienten Mäusen jedoch die gleiche Gustducin-Immunreaktivität zu registrieren war wie in Wildtyp-Tieren (Abbildung 4.10, Abbildung 4.11), konnte die Spezifität dieses Nachweises nicht geklärt werden. Daher ist auf dem gegenwärtigen Stand nicht auszuschließen, dass die detektierte Immunmarkierung auf eine unspezifische Kreuzreaktivität [Herkenham et al., 2011] der

beiden verwendeten Gustducin-Antisera, die gegen das gleiche Epitop gerichtet waren, zurückgeht.

Da im Hoden aber häufig Keimzell-spezifische Sequenzvarianten von Proteinen auftreten, die sich durch eine andere Intron-Exon-Struktur auszeichnen als in somatischen Zellen und die durch Hoden-spezifische Promotoren reguliert werden [Oppi et al., 1987; Howard et al., 1990], könnte die registrierte Immunreaktivität auch auf eine Hoden-spezifische Isoform des Gustducins zurückgehen. Eine testikuläre α -Gustducin-Isoform, die unabhängig vom ersten Exon exprimiert wird, wäre bei Gustducin-defizienten Tieren, bei denen genau dieses Exon deletiert wurde, nicht von der genetischen Manipulation betroffen. Eine solche Keimzell-spezifische Isoform ohne Exon 1 könnte somit die identische Immunreaktivität im Hoden von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Tieren erklären und gleichzeitig auch die Ursache der abweichenden molekularen Masse von Gustducin im Keimdrüsengewebe im Vergleich zum gustatorischen Gustducin sein (Abbildung 4.12).

Die Hypothese, dass Gustducin in Spermien funktionell exprimiert wird und die detektierte Immunreaktivität nicht auf eine unspezifische Antikörper-Reaktivität zurückzuführen ist, erscheint auch deshalb interessant, weil Gustducin in Sinneszellen der Zunge durch eine Aktivierung von PDE zu einer Reduzierung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt [Clapp et al., 2008]. Diese G Protein Untereinheit könnte somit auch in Spermien einen idealen Kandidaten für die Umsetzung einer basalen Geschmacksrezeptoraktivität in eine verminderte basale cAMP-Konzentration, die in *Tas1r1*-defizienten Tieren beobachtet wurde (siehe Abschnitt 5.2.1.1), repräsentieren.

Um zu klären, ob in männlichen Keimzellen eine Reproduktions-spezifische Gustducin-Isoform exprimiert wird, sollte diese G Protein Untereinheit deshalb in weiterführenden Studien aus cDNA des Hodens kloniert und mit der gustatorischen Gustducin-Variante verglichen werden. Durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen andere Epitope gerichtet sind als die in dieser Arbeit verwendeten Antisera, könnte außerdem die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Kreuzreaktivität reduziert werden. Ein indirekter Nachweis der Gustducin-Expression könnte zudem gelingen, wenn in Spermien von Gustducin-defizienten Mäusen, wie bei *Tas1r1*-defizienten Tieren, eine basale Erhöhung der cytosolischen cAMP-Konzentration zu detektieren sein sollte. Wird in Spermien allerdings, wie vermutet, eine Keimzell-spezifische Isoform exprimiert, die unabhängig von der Deletion des ersten Exons ist, so wäre ein solcher Unterschied zwischen den Spermien von Gustducin-Wildtyp und *-Knockout*-Tieren mit dieser Deletion nicht zu erwarten.

5.3 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gesammelten Befunde machen deutlich, dass Sensormoleküle des Geschmackssystems am komplexen und hochgradig regulierten Prozess der Reproduktion beteiligt sind. Diese Erkenntnisse können zu einem besseren

Verständnis einzelner Spermienfunktionen und deren Regulation durch die Interaktion des Spermiums mit seiner extrazellulären Umgebung im weiblichen Genitaltrakt beitragen, aber möglicherweise ebenfalls Hinweise auf die Funktion dieser Rezeptorproteine in anderen sensorischen Zellsystemen ergeben.

5.3.1 Mögliche physiologische Funktionen von Geschmacksrezeptoren in Sinneszellen der Zunge und in extra-oralen Systemen

Tas1- und Tas2-Rezeptoren wurden ursprünglich als Detektionsmoleküle des Geschmackssystems entdeckt [Hoon et al., 1999; Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Nelson et al., 2001; Nelson et al., 2002]. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass diese GPCRs vielfältige physiologische Funktionen bei der Wahrnehmung von Nahrungsbestandteilen erfüllen und z. B. auch an der Wahrnehmung von Nähr- und Bitterstoffen im Magen-Darm-Trakt beteiligt sind [Kokrashvili et al., 2009a; Kokrashvili et al., 2009b; Breer et al., 2012] und so die Ausschüttung von Verdauungsregulierenden Hormonen wie z. B. dem *glucagon-like peptide-1* induzieren [Jang et al., 2007; Kokrashvili et al., 2009b]. Zusammen mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, dass diese Rezeptoren z. B. auch durch Irritanzen in den Atemwegen aktiviert werden können [Tizzano et al., 2010], machen die in dieser Arbeit gesammelten Befunde einer funktionellen Rolle von Tas1- und Tas2-Rezeptoren in männlichen Keimzellen deutlich, dass diese „Geschmacksrezeptoren“ generelle chemosensorische Erkennungsmoleküle repräsentieren, die abhängig vom Zelltyp in dem sie exprimiert werden, ganz unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen können [Finger und Kinnamon, 2011].

Interessanterweise konnten in der vorliegenden Arbeit zudem erstmals Hinweise darauf gesammelt werden, dass diese Rezeptoren neben ihrer Funktion als Detektionsmoleküle auch eine funktionelle Rolle bei der Kontrolle der basalen Konzentration sekundärer Botenstoffe, wie z. B. cAMP und Ca^{2+} , spielen können und somit z. B. eine spontane Akrosomreaktion in Spermien verhindern.

Da für die Tas1r- und Tas2r-assoziierte G Protein α -Untereinheit Gustducin in gustatorischem Gewebe eine vergleichbare Funktion bei der Kontrolle der basalen intrazellulären cAMP-Konzentration beschrieben wurde [Clapp et al., 2008], stellt sich angesichts der Ähnlichkeit des zellulären Phänotyps von Tas1r1-defizienten Spermien und von Gustducin-defizienten Geschmackszellen, die sich jeweils durch eine erhöhte basale intrazelluläre cAMP-Konzentration auszeichnen, die Frage, ob dieser Effekt möglicherweise auf ein generelles Funktionsprinzip dieser chemosensorischen Proteine hindeuten könnte. Dabei könnte eine kontinuierliche Reduzierung von cAMP in ganz verschiedenen chemosensorischen Zelltypen daran beteiligt sein, einer Inhibition von PLC und des IP_3 -Rezeptor durch cAMP-aktivierte PKA vorzubeugen, um so die Aktivierbarkeit dieser Zellen zu regulieren und z. B. ein optimales Ca^{2+} -Signal bei einer Agonisten-Stimulation zu gewährleisten [Clapp et al., 2008].

Um zu prüfen, ob Geschmacksrezeptoren neben ihrer Funktion als Detektionsmoleküle auch eine physiologische Funktion bei der Regulation intrazellulärer Botenstoffe erfüllen, soll deshalb in weiterführenden Studien untersucht werden, ob sich auch Geschmackssinneszellen sowie isolierte chemosensorische Zellen des Darmes und der Atemwege von *Tas1r1*-defizienten Tieren durch einen erhöhten cAMP-Spiegel auszeichnen. Außerdem sollte geprüft werden, ob die Veränderungen des basalen cAMP-Gehaltes, die im Geschmacksgewebe von *Gustducin*-defizienten Tieren registriert wurden [Clapp et al., 2008], auch in Spermien sowie in anderen chemosensorischen Zellen von *Gustducin-Knockout* Tieren zu beobachten sind.

5.3.2 Potentielle medizinische Relevanz von Geschmacksrezeptoren in Spermien

Die Identifizierung von Geschmacksrezeptoren und assoziierter Signaltransduktionskaskaden in Spermien sowie die Aufklärung ihrer physiologischen Funktion in männlichen Keimzellen sind aber auch aus reproduktionsmedizinischer Perspektive sehr interessant. Die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der Spermienphysiologie wird besonders deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass in Industrienationen ca. 15 % aller Paare ungewollt kinderlos sind [Gnoth et al., 2005], aber bei etwa der Hälfte der von Fertilitätsproblemen betroffenen Männer keine organische Ursache für ihre eingeschränkte oder totale Infertilität gefunden werden kann (idiopathische Sterilität) [Santen und Swerdloff, 1986; Schlegel, 2009; McLachlan und O'Bryan, 2010; Krausz, 2011]. Deshalb könnten neue Erkenntnisse über die Regulation elementarer Spermienfunktionen dazu beitragen, Fehlfunktionen von Spermien besser zu verstehen und damit neuartige Diagnose- und Therapie-Ansätze bei männlicher Infertilität ermöglichen.

Dabei könnten spezifische Liganden, die einzelne Spermienfunktionen beeinflussen, in funktionellen Stimulationsexperimenten, wie z. B. Akrosomreaktionstests oder Motilitätsanalysen, eingesetzt werden, um Dysfunktionen von Spermien subfertiler Patienten zu identifizieren. Zum anderen könnten diese Substanzen möglicherweise Ausgangssubstanzen für Wirkstoffe zur positiven Beeinflussung einzelner Spermienfunktionen darstellen, um so z. B. die Erfolgchancen einer erfolgreichen Befruchtung bei assistierten Reproduktionsverfahren ([ART], *assisted reproductive technology*) zu erhöhen. Andererseits könnten spezifische Inhibitoren der identifizierten Rezeptorproteine, wie z. B. Lactisol [Xu et al., 2004] oder Bitterrezeptorantagonisten [Brockhoff et al., 2011], vielleicht verwendet werden, um einzelne oder mehrere Spermienfunktionen gezielt zu blockieren und so langfristig Grundlagen für die Entwicklung neuartiger, nicht-hormoneller Verhütungsmittel für den Mann zu schaffen [Tulsiani und Abou-Haila, 2008].

6 Zusammenfassung

Ein bislang nur wenig verstandenes chemosensorisches Zellsystem stellen Spermien dar, die im weiblichen Genitaltrakt komplexe Gemische ganz verschiedener Liganden wahrnehmen müssen, um ihre für eine erfolgreiche Befruchtung essentiellen Aufgaben erfüllen zu können. Dazu gehören u. a. ein sekundärer Reifungsprozess (Kapazitierung), die Wegfindung zur Eizelle im Eileiter und die Akrosomreaktion zur enzymatischen Auflösung der Glykoproteinmatrix (*Zona pellucida*) der Oocyte. Die Sensormoleküle auf der Oberfläche des Spermiums, die eine Erkennung bestehender Konzentrationsgradienten von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Hormonen, von verschiedensten Ionen und Protonen im luminalen Milieu des weiblichen Genitaltrakts sowie der Kohlenhydrat-reichen *Zona pellucida* ermöglichen, sind jedoch trotz ihrer Bedeutung für eine erfolgreiche Fertilisation weitgehend unbekannt.

Geschmacksrezeptoren repräsentieren spezialisierte Erkennungsmoleküle, die in Sinneszellen der Zunge die präzise Detektion eines breiten Spektrums chemisch sehr diverser Geschmacksstoffe ermöglichen, welche auffällige Ähnlichkeiten mit den potentiellen Liganden in der wässrigen Umgebung von Spermien im weiblichen Genitaltrakt aufweisen. Interessanterweise werden diese Rezeptorproteine aber nicht nur in Geschmackssinneszellen, sondern auch in chemosensorischen Zellen einer Vielzahl extra-oraler Gewebe exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mit Hilfe biochemischer, molekular- und zellbiologischer Techniken sowie mit reproduktionsbiologischen Methoden und unter Verwendung Geschmacksrezeptor-defizienter Mäuse der Frage nachgegangen, ob Rezeptormoleküle des Geschmackssystems als Kandidaten für chemische Sensormoleküle von Spermien in Betracht kommen.

Dabei wurde ein Detektionsmolekül für saure Geschmacksstoffe, der PKD2L1, immunocytochemisch im Hoden der Maus und in reifen murinen Spermien nachgewiesen. Funktionell könnte dieser im Flagellum von Spermien exprimierte Ionenkanal an der Registrierung der verschiedenen Protonenkonzentrationen im Milieu des weiblichen Genitaltrakts beteiligt sein.

Weiterhin konnte eine Expression von gustatorischen GPCRs der Tas1r-Familie (süß/umami) und Tas2r-Familie (bitter), in männlichen Reproduktionsorganen und in reifen Spermien gezeigt werden. Zudem wurden Hinweise auf die Expression der gustatorischen G Protein α -Untereinheit Gustducin, die in Geschmackssinneszellen an der Signaltransduktion dieser beiden Rezeptorfamilien beteiligt ist, im männlichen Reproduktionssystem erbracht.

Im Einzelnen konnten mit der RT-PCR-Technik Transkripte von 28 der insgesamt 35 Mitglieder der großen Familie der murinen Bitterrezeptoren (Tas2rs) aus Hodengewebe amplifiziert werden. Die Bedeutung der Expression von Bitterrezeptoren für die

Reproduktion wurde exemplarisch anhand einer Gen-defizienten Maus für den Tas2r131 untersucht. Bei dieser *Knockin*-Mauslinie war die kodierende Rezeptorsequenz durch eine GFP-Expressionskassette ersetzt worden, so dass das Mausmodell gleichzeitig auch eine Bestätigung der Expression des Tas2r131 in späten Keimzellstadien der Spermatogenese ermöglichte. Bei der Fertilitätsanalyse Tas2r131-defizienter Tiere waren unter Labor-Zuchtbedingungen keine Veränderungen in der Anzahl der Nachkommen pro Wurf oder der Zeitspanne zwischen den Würfen feststellbar. Allerdings wiesen Tas2r131-defiziente Männchen signifikant mehr epididymale Spermien auf als Wildtyp-Tiere. Darüber hinaus war bei Verpaarungsstudien mit heterozygoten Männchen eine Genotyp-Verschiebung zugunsten des Tas2r131 [-] Allels zu registrieren. Dieser Phänotyp könnte darauf hindeuten, dass der Tas2r131 eine funktionelle Rolle bei Tas2r-abhängigen Auswahlprozessen verschiedener Spermienpopulationen spielt, bei denen sich z. B. durch eine Regulation der Apoptose im Verlauf der Keimzellbildung (Spermatogenese) oder auch durch eine Beeinflussung z. B. der Wegfindung im weiblichen Genitaltrakt ein Selektionsvorteil für Tas2r131-defiziente Spermien ergeben könnte.

Aus der Familie der Tas1-Rezeptoren, deren drei Mitglieder als Heterodimere für die Erkennung von süßen Stimuli und dem Geschmack von Mononatriumglutamat („umami“) verantwortlich sind, konnten in RT-PCR-Experimenten die beiden Unter-einheiten des Umami-Rezeptors, der Tas1r1 und Tas1r3, aus Hodengewebe der Maus amplifiziert werden. Mit Hilfe Subtyp- und Spezies-spezifischer Antikörper konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptorproteine im Akrosom und in distinkten Abschnitten des Flagellums von murinen und humanen Spermien exprimiert werden. Die funktionelle Rolle des Umami-Rezeptors wurde mit Hilfe einer Tas1r1-defizienten mCherry Reportermauslinie untersucht, die unter optimalen Zuchtbedingungen ebenfalls keine Fertilitätseinschränkungen erkennen ließ. Im Hoden dieser Tas1r1-defizienten Tiere waren jedoch morphologische Veränderungen des Keimepithels und eine signifikant erhöhte Apoptoserate zu registrieren, die allerdings keine verminderte Anzahl reifer Spermien oder Störungen der Morphologie oder Motilität dieser Zellen zur Folge hatte. Stimulierungsexperimente mit isolierter *Zona pellucida*, dem physiologischen Auslöser der Akrosomreaktion, haben zudem gezeigt, dass keine Einschränkungen bei Spermien Tas1r1-defizienter Tiere festzustellen waren. Allerdings wiesen Tas1r1-defiziente Spermien eine signifikant höhere Rate an spontaner Akrosomreaktion auf, die in unkapazitierten Zellen mit signifikant erhöhten basalen Konzentrationen der *second messenger* cAMP und Ca^{2+} einherging.

Durch eine Reduzierung der intrazellulären Konzentrationen dieser Botenstoffe, die elementare Aufgaben des Spermiums im Verlauf des sequentiellen Prozesses der Fertilisation regulieren, könnten Tas1-Rezeptoren somit durch eine basale Rezeptoraktivität oder durch eine Liganden-induzierte Rezeptorstimulation sicherstellen, dass Spermien im weiblichen Genitaltrakt in einem Ruhezustand erhalten werden, bevor sie in Kontakt mit der Eizelle kommen können.

Insgesamt kann dieser Nachweis einer funktionellen Expression von Geschmacksrezeptoren in Spermien zu einem besseren Verständnis der Regulationsmechanismen zentraler Spermienfunktionen beitragen und langfristig möglicherweise auch reproduktionsmedizinische Perspektiven zur gezielten positiven bzw. negativen Manipulation von Spermien und damit zur Behandlung männlicher Infertilität bzw. zur Entwicklung nicht-hormoneller Verhütungsmittel für den Mann eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

- ABAFFY, T., TRUBEY, K. R. & CHAUDHARI, N. (2003). Adenylyl cyclase expression and modulation of cAMP in rat taste cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C1420-8.
- ABOU-HAILA, A. & TULSIANI, D. R. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys*.
- ACKERMANN, F., ZITRANSKI, N., BORTH, H., BUECH, T., GUDERMANN, T. & BOEKHOFF, I. (2009). CaMKII α interacts with multi-PDZ domain protein MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis. *J Cell Sci*, 122, 4547-57.
- ACOTT, T. S. & CARR, D. W. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod*, 30, 926-35.
- ADHAM, I. M., NAYERNIA, K. & ENGEL, W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev*, 46, 370-6.
- ADLER, E., HOON, M. A., MUELLER, K. L., CHANDRASHEKAR, J., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 100, 693-702.
- AITKEN, R. J., BUCKINGHAM, D. W. & FANG, H. G. (1993). Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl*, 14, 132-41.
- AL-ANZI, B. & CHANDLER, D. E. (1998). A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Dev Biol*, 198, 366-75.
- ALAM, R., STAFFORD, S., FORSYTHE, P., HARRISON, R., FAUBION, D., LETT-BROWN, M. A. & GRANT, J. A. (1993). RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol*, 150, 3442-8.
- ARNOULT, C., CARDULLO, R. A., LEMOS, J. R. & FLORMAN, H. M. (1996a). Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13004-9.
- ARNOULT, C., KAZAM, I. G., VISCONTI, P. E., KOPF, G. S., VILLAZ, M. & FLORMAN, H. M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6757-62.
- ARNOULT, C., ZENG, Y. & FLORMAN, H. M. (1996b). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol*, 134, 637-45.
- ASANO, M., FURUKAWA, K., KIDO, M., MATSUMOTO, S., UMESAKI, Y., KOCHIBE, N. & IWAKURA, Y. (1997). Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *Embo J*, 16, 1850-7.
- AUSTIN, C. R. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B*, 4, 581-96.
- AUSTIN, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326.
- AVENARIUS, M. R., HILDEBRAND, M. S., ZHANG, Y., MEYER, N. C., SMITH, L. L., KAHRIZI, K., NAJMABADI, H. & SMITH, R. J. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet*, 84, 505-10.
- AVIDAN, N., TAMARY, H., DGANY, O., CATTAN, D., PARIENTE, A., THULLIEZ, M., BOROT, N., MOATI, L., BARTHELME, A., SHALMON, L., KRASNOV, T., BEN-ASHER, E., OLENDER, T., KHEN, M., YANIV, I., ZAIZOV, R., SHALEV, H., DELAUNAY, J., FELLOUS, M., LANCET, D. & BECKMANN, J. S. (2003). CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet*, 11, 497-502.
- AVILES, M., CASTELLS, M. T., MARTINEZ-MENARGUEZ, J. A., ABASCAL, I. & BALLESTA, J. (1997). Localization of penultimate carbohydrate residues in zona pellucida and acrosomes by means of lectin cytochemistry and enzymatic treatments. *Histochem J*, 29, 583-92.
- AVILES, M., GUTIERREZ-ADAN, A. & COY, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod*, 16, 896-906.

- BABCOCK, D. F. (2003). Development. Smelling the roses? *Science*, 299, 1993-4.
- BABCOCK, D. F. & PFEIFFER, D. R. (1987). Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J Biol Chem*, 262, 15041-7.
- BAHAT, A. & EISENBACH, M. (2010). Human sperm thermotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} channel. *Biol Reprod*, 82, 606-16.
- BAHAT, A., EISENBACH, M. & TUR-KASPA, I. (2005). Perioovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Hum Reprod*, 20, 2118-21.
- BAHAT, A., TUR-KASPA, I., GAKAMSKY, A., GIOJALAS, L. C., BREITBART, H. & EISENBACH, M. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med*, 9, 149-50.
- BAI, M. (2004). Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal*, 16, 175-86.
- BAI, M., QUINN, S., TRIVEDI, S., KIFOR, O., PEARCE, S. H., POLLAK, M. R., KRAPCHO, K., HEBERT, S. C. & BROWN, E. M. (1996). Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca^{2+} -sensing receptor. *J Biol Chem*, 271, 19537-45.
- BAIBAKOV, B., GAUTHIER, L., TALBOT, P., RANKIN, T. L. & DEAN, J. (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development*, 134, 933-43.
- BAILLIE, H. S., PACEY, A. A., WARREN, M. A., SCUDAMORE, I. W. & BARRATT, C. L. (1997). Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod*, 12, 1985-92.
- BALDI, E., CASANO, R., FALSETTI, C., KRAUSZ, C., MAGGI, M. & FORTI, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl*, 12, 323-30.
- BARBARIC, I., MILLER, G. & DEAR, T. N. (2007). Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 6, 91-103.
- BARBER, B. R. & DIOGUARDI, P. (1972). Improved production from polygamous groups of mice. *Lab Anim*, 6, 19-21.
- BARRATT-FORNELL, A. & DREWNOWSKI, A. (2002). The Taste of Health: Nature's Bitter Gifts. *Nutr Today*, 37, 144-150.
- BARROS, C., BEDFORD, J. M., FRANKLIN, L. E. & AUSTIN, C. R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol*, 34, C1-5.
- BARROS, C., VIGIL, P., HERRERA, E., ARGUELLO, B. & WALKER, R. (1984). Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. *Arch Androl*, 12 Suppl, 95-107.
- BAXENDALE, R. W. & FRASER, L. R. (2003). Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 66, 181-9.
- BAXENDALE, R. W. & FRASER, L. R. (2005). Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Mol Reprod Dev*, 71, 495-508.
- BEAUCHAMP, G. K. (2009). Sensory and receptor responses to umami: an overview of pioneering work. *Am J Clin Nutr*, 90, 723S-727S.
- BEHRENS, M., FOERSTER, S., STAEHLER, F., RAGUSE, J. D. & MEYERHOF, W. (2007). Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J Neurosci*, 27, 12630-40.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. (2010). Oral and extraoral bitter taste receptors. *Results Probl Cell Differ*, 52, 87-99.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. (2011). Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav*.
- BEHRENS, M., MEYERHOF, W., HELLFRITSCH, C. & HOFMANN, T. (2011). Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 2220-42.
- BERGMANN, M. (2005). [Spermatogenesis--physiology and pathophysiology]. *Urologe A*, 44, 1131-2, 1134-8.
- BEZENCON, C., LE COUTRE, J. & DAMAK, S. (2007). Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses*, 32, 41-9.

- BIARNES, X., MARCHIORI, A., GIORGETTI, A., LANZARA, C., GASPARINI, P., CARLONI, P., BORN, S., BROCKHOFF, A., BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. (2010). Insights into the binding of Phenyltiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. *PLoS One*, 5, e12394.
- BIRKHEAD, T. R. & PIZZARI, T. (2002). Postcopulatory sexual selection. *Nat Rev Genet*, 3, 262-73.
- BLANCO-RODRIGUEZ, J. & MARTINEZ-GARCIA, C. (1996). Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif*, 29, 13-31.
- BLEIL, J. D. & WASSARMAN, P. M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol*, 76, 185-202.
- BLEIL, J. D. & 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, 317-24.
- BORLAND, R. M., BIGGERS, J. D., LECHENE, C. P. & TAYMOR, M. L. (1980). Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J Reprod Fertil*, 58, 479-82.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAND, J. G. (2000). Receptor and transduction processes for umami taste. *J Nutr*, 130, 942S-5S.
- BRANHAM, M. T., MAYORGA, L. S. & TOMES, C. N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem*, 281, 8656-66.
- BRAUNER-OSBORNE, H., WELLENDORPH, P. & JENSEN, A. A. (2007). Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. *Curr Drug Targets*, 8, 169-84.
- BREER, H., EBERLE, J., FRICK, C., HAID, D. & WIDMAYER, P. (2012). Gastrointestinal chemosensation: chemosensory cells in the alimentary tract. *Histochem Cell Biol*.
- BREITBART, H. (2002a). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol*, 187, 139-44.
- BREITBART, H. (2002b). Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J Reprod Immunol*, 53, 151-9.
- BREITBART, H. (2003). Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 49, 321-7.
- BREITBART, H. & SPUNGIN, B. (1997). The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*, 3, 195-202.
- BRENKER, C., GOODWIN, N., WEYAND, I., KASHIKAR, N. D., NARUSE, M., KRAHLING, M., MULLER, A., KAUPP, U. B. & STRUNKER, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J*.
- BRENNAN, P. A. (2010). Pheromones and Mammalian Behavior.
- BRENNER, B. M., BALLERMANN, B. J., GUNNING, M. E. & ZEIDEL, M. L. (1990). Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev*, 70, 665-99.
- BREUCKER, H., SCHAFER, E. & HOLSTEIN, A. F. (1985). Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res*, 240, 303-9.
- BREWIS, I. A. & WONG, C. H. (1999). Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev Reprod*, 4, 135-42.
- BROCKHOFF, A., BEHRENS, M., NIV, M. Y. & MEYERHOF, W. (2010). Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11110-5.
- BROCKHOFF, A., BEHRENS, M., ROUDNITZKY, N., APPENDINO, G., AVONTO, C. & MEYERHOF, W. (2011). Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds. *J Neurosci*, 31, 14775-82.
- BROWN, E. M., GAMBA, G., RICCARDI, D., LOMBARDI, M., BUTTERS, R., KIFOR, O., SUN, A., HEDIGER, M. A., LYTTON, J. & HEBERT, S. C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366, 575-80.
- BUCK, J., SINCLAIR, M. L., SCHAPAL, L., CANN, M. J. & LEVIN, L. R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 79-84.
- BUELL, G. N., WICKENS, M. P., PAYVAR, F. & SCHIMKE, R. T. (1978). Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J Biol Chem*, 253, 2471-82.

- BUFE, B., BRESLIN, P. A., KUHN, C., REED, D. R., THARP, C. D., SLACK, J. P., KIM, U. K., DRAYNA, D. & MEYERHOF, W. (2005). The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol*, 15, 322-7.
- BUFE, B., HOFMANN, T., KRAUTWURST, D., RAGUSE, J. D. & MEYERHOF, W. (2002). The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet*, 32, 397-401.
- BURTON, K. A. & MCKNIGHT, G. S. (2007). PKA, germ cells, and fertility. *Physiology (Bethesda)*, 22, 40-6.
- BUTLER, A., HE, X., GORDON, R. E., WU, H. S., GATT, S. & SCHUCHMAN, E. H. (2002). Reproductive pathology and sperm physiology in acid sphingomyelinase-deficient mice. *Am J Pathol*, 161, 1061-75.
- BUTSCHEID, Y., CHUBANOV, V., STEGER, K., MEYER, D., DIETRICH, A. & GUDERMANN, T. (2006). Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly is a plasma membrane protein of mouse sperm head. *Mol Reprod Dev*, 73, 350-60.
- CAICEDO, A., PEREIRA, E., MARGOLSKEE, R. F. & ROPER, S. D. (2003). Role of the G-protein subunit alpha-gustducin in taste cell responses to bitter stimuli. *J Neurosci*, 23, 9947-52.
- CALDWELL, K. A. & HANDEL, M. A. (1991). Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2407-11.
- CARLSON, A. E., BURNETT, L. A., DEL CAMINO, D., QUILL, T. A., HILLE, B., CHONG, J. A., MORAN, M. M. & 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. & BABCOCK, D. F. (2007). External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol*, 312, 183-92.
- CARLSON, A. E., QUILL, T. A., WESTENBROEK, R. E., SCHUH, S. M., HILLE, B. & BABCOCK, D. F. (2005). Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J Biol Chem*, 280, 32238-44.
- CARLSON, A. E., WESTENBROEK, R. E., QUILL, T., REN, D., CLAPHAM, D. E., HILLE, B., GARBERS, D. L. & BABCOCK, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14864-8.
- CARR, D. W. & ACOTT, T. S. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol Reprod*, 30, 913-25.
- CARR, D. W. & ACOTT, T. S. (1989). Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod*, 41, 907-20.
- CARREAU, S., LAMBARD, S., SAID, L., SAAD, A. & GALERAUD-DENIS, I. (2007). RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa. *Biochem Soc Trans*, 35, 634-6.
- CHANDRASHEKAR, J., HOON, M. A., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444, 288-94.
- CHANDRASHEKAR, J., KUHN, C., OKA, Y., YARMOLINSKY, D. A., HUMMLER, E., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, 464, 297-301.
- CHANDRASHEKAR, J., MUELLER, K. L., HOON, M. A., ADLER, E., FENG, L., GUO, W., ZUKER, C. S. & RYBA, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100, 703-11.
- CHANG, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697-8.
- CHANG, R. B., WATERS, H. & LIMAN, E. R. (2010). A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 22320-5.
- CHAUDHARI, N., LANDIN, A. M. & ROPER, S. D. (2000). A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci*, 3, 113-9.
- CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. (2010). The cell biology of taste. *J Cell Biol*, 190, 285-96.
- CHEN, J., LITSCHER, E. S. & WASSARMAN, P. M. (1998). Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6193-7.
- CHEN, Y., CANN, M. J., LITVIN, T. N., IOURGENKO, V., SINCLAIR, M. L., LEVIN, L. R. & BUCK, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 289, 625-8.

- CHENG, C. Y. & MRUK, D. D. (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol*, 6, 380-95.
- CHENG, C. Y. & MRUK, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev*, 64, 16-64.
- CHENG, C. Y., WONG, E. W., YAN, H. H. & MRUK, D. D. (2010). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol*, 315, 49-56.
- CHRISTIANSEN, B., HANSEN, K. B., WELLENDORPH, P. & BRAUNER-OSBORNE, H. (2007). Pharmacological characterization of mouse GPRC6A, an L-alpha-amino-acid receptor modulated by divalent cations. *Br J Pharmacol*, 150, 798-807.
- CHRUSCINSKI, A. J., ROHRER, D. K., SCHAUBLE, E., DESAI, K. H., BERNSTEIN, D. & KOBILKA, B. K. (1999). Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*, 274, 16694-700.
- CLAPHAM, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80, 259-68.
- CLAPP, T. R., MEDLER, K. F., DAMAK, S., MARGOLSKEE, R. F. & KINNAMON, S. C. (2006). Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol*, 4, 7.
- CLAPP, T. R., STONE, L. M., MARGOLSKEE, R. F. & KINNAMON, S. C. (2001). Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci*, 2, 6.
- CLAPP, T. R., TRUBEY, K. R., VANDENBEUCH, A., STONE, L. M., MARGOLSKEE, R. F., CHAUDHARI, N. & KINNAMON, S. C. (2008). Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsivity. *FEBS Lett*, 582, 3783-7.
- CLARK, G. F. & DELL, A. (2006). Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem*, 281, 13853-6.
- COHEN-DAYAG, A., RALT, D., TUR-KASPA, I., MANOR, M., MAKLER, A., DOR, J., MASHIACH, S. & EISENBACH, M. (1994). Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol Reprod*, 50, 786-90.
- COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S. & 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, 11039-43.
- CONIGRAVE, A. D., MUN, H. C. & BRENNAN, S. C. (2007). Physiological significance of L-amino acid sensing by extracellular Ca(2+)-sensing receptors. *Biochem Soc Trans*, 35, 1195-8.
- CONIGRAVE, A. D., QUINN, S. J. & BROWN, E. M. (2000). L-amino acid sensing by the extracellular Ca2+-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4814-9.
- CONTE, C., EBELING, M., MARCUZ, A., NEF, P. & ANDRES-BARQUIN, P. J. (2003). Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human. *Physiol Genomics*, 14, 73-82.
- COOPER, T. G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod*, 20, 9-11.
- COOPER, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*, 13, 130-8.
- CORBIN, J. D. & FRANCIS, S. H. (2002). Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int J Clin Pract*, 56, 453-9.
- CORNWALL, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*, 15, 213-27.
- CORNWALL, G. A., TULSIANI, D. R. & ORGEBIN-CRIST, M. C. (1991). Inhibition of the mouse sperm surface alpha-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod*, 44, 913-21.
- CORREIA, J. N., CONNER, S. J. & KIRKMAN-BROWN, J. C. (2007). Non-genomic steroid actions in human spermatozoa. "Persistent tickling from a laden environment". *Semin Reprod Med*, 25, 208-19.
- COSTELLO, S., MICHELANGELI, F., NASH, K., LEFIEVRE, L., MORRIS, J., MACHADO-OLIVEIRA, G., BARRATT, C., KIRKMAN-BROWN, J. & PUBLICOVER, S. (2009). Ca2+-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*, 138, 425-37.

- CROSS, N. L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59, 7-11.
- CRUSIO, W. E. (2004). Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice. *Biol Psychiatry*, 56, 381-5.
- CUI, M., JIANG, P., MAILLET, E., MAX, M., MARGOLSKEE, R. F. & OSMAN, R. (2006). The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Curr Pharm Des*, 12, 4591-600.
- DALTON, R. G., LASHAM, A. & SAVIDGE, G. F. (1988). A new rapid semi-dry blotting technique for multimeric sizing of von Willebrand factor. *Thromb Res*, 50, 345-9.
- DAMAK, S., RONG, M., YASUMATSU, K., KOKRASHVILI, Z., VARADARAJAN, V., ZOU, S., JIANG, P., NINOMIYA, Y. & MARGOLSKEE, R. F. (2003). Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, 301, 850-3.
- DARSZON, A., BELTRAN, C., FELIX, R., NISHIGAKI, T. & TREVINO, C. L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol*, 240, 1-14.
- DARSZON, A., NISHIGAKI, T., BELTRAN, C. & TREVIÑO, C. L. (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91, 1305-1355.
- DARSZON, A., SANCHEZ-CARDENAS, C., ORTA, G., SANCHEZ-TUSIE, A. A., BELTRAN, C., LOPEZ-GONZALEZ, I., GRANADOS-GONZALEZ, G. & TREVINO, C. L. (2012). Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res*.
- DARZYNKIEWICZ, Z., GALKOWSKI, D. & ZHAO, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44, 250-4.
- DASGUPTA, S., MILLS, C. L. & FRASER, L. R. (1993). Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil*, 99, 135-43.
- DASGUPTA, S., MILLS, C. L. & FRASER, L. R. (1994). A possible role for Ca(2+)-ATPase in human sperm capacitation. *J Reprod Fertil*, 102, 107-16.
- DE BLAS, G., MICHAUT, M., TREVINO, C. L., TOMES, C. N., YUNES, R., DARSZON, A. & MAYORGA, L. S. (2002). The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem*, 277, 49326-31.
- DE JONGE, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*, 11, 205-14.
- DE LAMIRANDE, E., LECLERC, P. & GAGNON, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 3, 175-94.
- DEAN, J. (2004). Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays*, 26, 29-38.
- DEAN, M. D., ARDLIE, K. G. & NACHMAN, M. W. (2006). The frequency of multiple paternity suggests that sperm competition is common in house mice (*Mus domesticus*). *Mol Ecol*, 15, 4141-51.
- DECOURSEY, T. E. (2003). Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol Rev*, 83, 475-579.
- DELMAS, P. (2005). Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. *Pflugers Arch*, 451, 264-76.
- DELMAS, P., PADILLA, F., OSORIO, N., COSTE, B., RAOUX, M. & CREST, M. (2004). Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 322, 1374-83.
- DEMARCO, I. A., ESPINOSA, F., EDWARDS, J., SOSNIK, J., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., HOCKENSMITH, J. W., KOPF, G. S., DARSZON, A. & VISCONTI, P. E. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*, 278, 7001-9.
- DEMOTT, R. P. & SUAREZ, S. S. (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod*, 46, 779-85.
- DESHPANDE, D. A., WANG, W. C., MCILMOYLE, E. L., ROBINETT, K. S., SCHILLINGER, R. M., AN, S. S., SHAM, J. S. & LIGGETT, S. B. (2010). Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med*, 16, 1299-304.
- DESSAUER, C. W. & GILMAN, A. G. (1996). Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 271, 16967-74.

- DESSEYN, J. L., BURTON, K. A. & MCKNIGHT, G. S. (2000). Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6433-8.
- DIETRICH, A., KALWA, H., STORCH, U., MEDEROS Y SCHNITZLER, M., SALANOVA, B., PINKENBURG, O., DUBROVSKA, G., ESSIN, K., GOLLASCH, M., BIRNBAUMER, L. & GUDERMANN, T. (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch*, 455, 465-77.
- DIETRICH, A., MEDEROS, Y. S. M., GOLLASCH, M., GROSS, V., STORCH, U., DUBROVSKA, G., OBST, M., YILDIRIM, E., SALANOVA, B., KALWA, H., ESSIN, K., PINKENBURG, O., LUFT, F. C., GUDERMANN, T. & BIRNBAUMER, L. (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*, 25, 6980-9.
- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K. & MATTICK, J. S. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 19, 4008.
- DRAYNA, D. (2005). Human taste genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 6, 217-35.
- DUNKEL, L., HIRVONEN, V. & ERKKILA, K. (1997). Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ*, 4, 171-9.
- DYER, J., SALMON, K. S., ZIBRIK, L. & SHIRAZI-BEECHEY, S. P. (2005). Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans*, 33, 302-5.
- DYER, J. L., MOBASHERI, H., LEA, E. J., DAWSON, A. P. & MICHELANGELI, F. (2003). Differential effect of PKA on the Ca²⁺ release kinetics of the type I and III InsP3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 302, 121-6.
- EISENBACH, M. (1999). Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet*, 25, 87-94.
- EISENBACH, M. & GIOJALAS, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 276-85.
- EISENBACH, M. & TUR-KASPA, I. (1999). Do human eggs attract spermatozoa? *Bioessays*, 21, 203-10.
- EISENER-DORMAN, A. F., LAWRENCE, D. A. & BOLIVAR, V. J. (2009). Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? *Brain Behav Immun*, 23, 318-24.
- EL-TALATINI, M. R., TAYLOR, A. H., ELSON, J. C., BROWN, L., DAVIDSON, A. C. & KONJE, J. C. (2009). Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One*, 4, e4579.
- ELIASSON, R. (1966). Cholesterol in human semen. *Biochem J*, 98, 242-3.
- ENDO, Y., LEE, M. A. & KOPF, G. S. (1988). Characterization of an islet-activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Dev Biol*, 129, 12-24.
- ESCALIER, D., GALLO, J. M., ALBERT, M., MEDURI, G., BERMUDEZ, D., DAVID, G. & SCHREVEL, J. (1991). Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. *Development*, 113, 779-88.
- ESCOFFIER, J., BOISSEAU, S., SERRES, C., CHEN, C. C., KIM, D., STAMBOULIAN, S., SHIN, H. S., CAMPBELL, K. P., DE WAARD, M. & ARNOULT, C. (2007). Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J Cell Physiol*, 212, 753-63.
- ESPEY, L. L. (2006). Comprehensive analysis of ovarian gene expression during ovulation using differential display. *Methods Mol Biol*, 317, 219-41.
- 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. & GOSSEN, J. A. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2993-8.
- EVANS, G. J. & MORGAN, A. (2003). Regulation of the exocytotic machinery by cAMP-dependent protein kinase: implications for presynaptic plasticity. *Biochem Soc Trans*, 31, 824-7.
- EVANS, J. P. & FLORMAN, H. M. (2002). The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol*, 4 Suppl, s57-63.

- FABIANI, R. & RONQUIST, G. (1995). Abundance of guanine, guanosine, inosine and adenosine in human seminal plasma. *Int J Clin Lab Res*, 25, 47-51.
- FABRO, G., ROVASIO, R. A., CIVALERO, S., FRENKEL, A., CAPLAN, S. R., EISENBACH, M. & GIOJALAS, L. C. (2002). Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod*, 67, 1565-71.
- FARBMAN, A. I. (1965). Fine Structure of the Taste Bud. *J Ultrastruct Res*, 12, 328-50.
- FEHR, J., MEYER, D., WIDMAYER, P., BORTH, H. C., ACKERMANN, F., WILHELM, B., GUDERMANN, T. & BOEKHOFF, I. (2007). Expression of the G-protein alpha-subunit gustducin in mammalian spermatozoa. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 193, 21-34.
- FEINSTEIN, P., BOZZA, T., RODRIGUEZ, I., VASSALLI, A. & MOMBAERTS, P. (2004). Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell*, 117, 833-46.
- FEINSTEIN, P. & MOMBAERTS, P. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*, 117, 817-31.
- FINGER, T. E., BOTTGER, B., HANSEN, A., ANDERSON, K. T., ALIMOHAMMADI, H. & SILVER, W. L. (2003). Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8981-6.
- FINGER, T. E. & KINNAMON, S. C. (2011). Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep*, 3, 20.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FIRMAN, R. C. & SIMMONS, L. W. (2008). Polyandry facilitates postcopulatory inbreeding avoidance in house mice. *Evolution*, 62, 603-11.
- FIRMAN, R. C. & SIMMONS, L. W. (2011). Experimental evolution of sperm competitiveness in a mammal. *BMC Evol Biol*, 11, 19.
- FISHER, H. S. & HOEKSTRA, H. E. (2010). Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. *Nature*, 463, 801-3.
- FLESCH, F. M., BROUWERS, J. F., NIEVELSTEIN, P. F., VERKLEIJ, A. J., VAN GOLDE, L. M., COLENBRANDER, B. & GADELLA, B. M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*, 114, 3543-55.
- FLORIANO, W. B., HALL, S., VAIDEHI, N., KIM, U., DRAYNA, D. & GODDARD, W. A., 3RD (2006). Modeling the human PTC bitter-taste receptor interactions with bitter tastants. *J Mol Model*, 12, 931-41.
- FLORMAN, H. M., ARNOULT, C., KAZAM, I. G., LI, C. & O'TOOLE, C. M. (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod*, 59, 12-6.
- FLORMAN, H. M., CORRON, M. E., KIM, T. D. & BABCOCK, D. F. (1992). Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 152, 304-14.
- FLORMAN, H. M., JUNGnickel, M. K. & SUTTON, K. A. (2008). Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol*, 52, 503-10.
- FLORMAN, H. M., JUNGnickel, M. K. & SUTTON, K. A. (2010). Shedding light on sperm pHertility. *Cell*, 140, 310-2.
- FLORMAN, H. M., TOMBES, R. M., FIRST, N. L. & BABCOCK, D. F. (1989). An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 135, 133-46.
- FLORMAN, H. M. & WASSARMAN, P. M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, 41, 313-24.
- FOX, C. A., MELDRUM, S. J. & WATSON, B. W. (1973). Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus. *J Reprod Fertil*, 33, 69-75.
- FRASER, L. R. (2010). The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev*, 77, 197-208.

- FRASER, L. R., ADEOYA-OSIGUWA, S. A. & BAXENDALE, R. W. (2003). First messenger regulation of capacitation via G protein-coupled mechanisms: a tale of serendipity and discovery. *Mol Hum Reprod*, 9, 739-48.
- FRASER, L. R., ADEOYA-OSIGUWA, S. A., BAXENDALE, R. W. & GIBBONS, R. (2006). Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci*, 11, 1636-45.
- FREDERICK, J. L., FRANCIS, M. M., MACASO, T. M., LOBO, R. A., SAUER, M. V. & PAULSON, R. J. (1991). Preovulatory follicular fluid steroid levels in stimulated and unstimulated cycles triggered with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*, 55, 44-7.
- FUKAMI, K., NAKAO, K., INOUE, T., KATAOKA, Y., KUROKAWA, M., FISSORE, R. A., NAKAMURA, K., KATSUKI, M., MIKOSHIBA, K., YOSHIDA, N. & TAKENAWA, T. (2001). Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science*, 292, 920-3.
- FUKAMI, K., YOSHIDA, M., INOUE, T., KUROKAWA, M., FISSORE, R. A., YOSHIDA, N., MIKOSHIBA, K. & TAKENAWA, T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol*, 161, 79-88.
- FUKUDA, N., YOMOGIDA, K., OKABE, M. & TOUHARA, K. (2004). Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci*, 117, 5835-45.
- GADELLA, B. M. & HARRISON, R. A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127, 2407-20.
- GADELLA, B. M. & HARRISON, R. A. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod*, 67, 340-50.
- GADELLA, B. M., TSAI, P. S., BOERKE, A. & BREWIS, I. A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*, 52, 473-80.
- GAHLAY, G., GAUTHIER, L., BAIBAKOV, B., EPIFANO, O. & DEAN, J. (2010). Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science*, 329, 216-9.
- GALANTINO-HOMER, H. L., FLORMAN, H. M., STOREY, B. T., DOBRINSKI, I. & KOPF, G. S. (2004). Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev*, 67, 487-500.
- GALINDO-CUSPINERA, V., WINNIG, M., BUFE, B., MEYERHOF, W. & BRESLIN, P. A. (2006). A TAS1R receptor-based explanation of sweet 'water-taste'. *Nature*, 441, 354-7.
- GALVEZ, T., URWYLER, S., PREZEAU, L., MOSBACHER, J., JOLY, C., MALITSCHKE, B., HEID, J., BRABET, I., FROESTL, W., BETTLER, B., KAUPMANN, K. & PIN, J. P. (2000). Ca(2+) requirement for high-affinity gamma-aminobutyric acid (GABA) binding at GABA(B) receptors: involvement of serine 269 of the GABA(B)R1 subunit. *Mol Pharmacol*, 57, 419-26.
- GAO, Z. & GARBERS, D. L. (1998). Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *J Biol Chem*, 273, 3415-21.
- GARBERS, D. L., TUBB, D. J. & HYNE, R. V. (1982). A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem*, 257, 8980-4.
- GARCIA, M. A. & MEIZEL, S. (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol Reprod Dev*, 52, 189-95.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. & BEN-SASSON, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 493-501.
- GERLAI, R. (1996). Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci*, 19, 177-81.
- GERLAI, R. (2001). Gene targeting: technical confounds and potential solutions in behavioral brain research. *Behav Brain Res*, 125, 13-21.

- GINGRICH, J. A. & HEN, R. (2000). The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 146-52.
- GIOJALAS, L. C. & ROVASIO, R. A. (1998). Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int J Androl*, 21, 201-6.
- GIOJALAS, L. C., ROVASIO, R. A., FABRO, G., GAKAMSKY, A. & EISENBACH, M. (2004). Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril*, 82, 247-9.
- GIOVANNUCCI, D. R., GROBLEWSKI, G. E., SNEYD, J. & YULE, D. I. (2000). Targeted phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized Ca^{2+} release and shapes oscillatory Ca^{2+} signals. *J Biol Chem*, 275, 33704-11.
- GNOTH, C., GODEHARDT, E., FRANK-HERRMANN, P., FRIOL, K., TIGGES, J. & FREUNDL, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod*, 20, 1144-7.
- GOHLA, A., KLEMENT, K., PIEKORZ, R. P., PEXA, K., VOM DAHL, S., SPICHER, K., DREVAL, V., HAUSSINGER, D., BIRNBAUMER, L. & NURNBERG, B. (2007). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein $\text{Gi}3$ in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3003-8.
- GOLDBERG, E. (1964). Lactate Dehydrogenases and Malate Dehydrogenases in Sperm: Studied by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Ann N Y Acad Sci*, 121, 560-70.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GREVE, J. M. & WASSARMAN, P. M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol*, 181, 253-64.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-50.
- GUIDOBALDI, H. A., TEVES, M. E., UNATES, D. R., ANASTASIA, A. & GIOJALAS, L. C. (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One*, 3, e3040.
- GULBRANSEN, B. D. & FINGER, T. E. (2005). Solitary chemoreceptor cell proliferation in adult nasal epithelium. *J Neurocytol*, 34, 117-22.
- GUPTA, S. K., BANSAL, P., GANGULY, A., BHANDARI, B. & CHAKRABARTI, K. (2009). Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J Reprod Immunol*, 83, 50-5.
- GUPTA, S. K. & BHANDARI, B. (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl*, 13, 97-105.
- GUPTA, S. K., CHAKRAVARTY, S., SURAJ, K., BANSAL, P., GANGULY, A., JAIN, M. K. & BHANDARI, B. (2007). Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 63, 203-16.
- GUR, Y. & BREITBART, H. (2006). Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, 20, 411-6.
- GUR, Y. & BREITBART, H. (2008). Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol Cell Endocrinol*, 282, 45-55.
- GUREVICH, V. V. & GUREVICH, E. V. (2008). How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci*, 29, 234-40.
- HAID, D., WIDMAYER, P. & BREER, H. (2011). Nutrient sensing receptors in gastric endocrine cells. *J Mol Histol*, 42, 355-64.
- HAMAMAH, S. & GATTI, J. L. (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod*, 13 Suppl 4, 20-30.
- HAMAMAH, S., MAGNOUX, E., ROYERE, D., BARTHELEMY, C., DACHEUX, J. L. & GATTI, J. L. (1996). Internal pH of human spermatozoa: effect of ions, human follicular fluid and progesterone. *Mol Hum Reprod*, 2, 219-24.
- HANDEL, M. A. (1987). Genetic control of spermatogenesis in mice. *Results Probl Cell Differ*, 15, 1-62.
- HANSON, F. W. & OVERSTREET, J. W. (1981). The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am J Obstet Gynecol*, 140, 173-8.

- HARAYAMA, H. & KATO, S. (2002). Relationship between bicarbonate and cyclic nucleotide in the promoting effects on head-to-head agglutination in boar spermatozoa. *Asian J Androl*, 4, 87-96.
- HARRIS, S. E., GOPICHANDRAN, N., PICTON, H. M., LEESE, H. J. & ORSI, N. M. (2005). Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*, 64, 992-1006.
- HARRISON, R. A. & MILLER, N. G. (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev*, 55, 220-8.
- HASS, N., SCHWARZENBACHER, K. & BREER, H. (2007). A cluster of gustducin-expressing cells in the mouse stomach associated with two distinct populations of enteroendocrine cells. *Histochem Cell Biol*, 128, 457-71.
- HASS, N., SCHWARZENBACHER, K. & BREER, H. (2010). T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res*, 339, 493-504.
- HAYASHI, Y., ZVIMAN, M. M., BRAND, J. G., TEETER, J. H. & RESTREPO, D. (1996). Measurement of membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in cell ensembles: application to the study of glutamate taste in mice. *Biophys J*, 71, 1057-70.
- HE, W., YASUMATSU, K., VARADARAJAN, V., YAMADA, A., LEM, J., NINOMIYA, Y., MARGOLSKEE, R. F. & DAMAK, S. (2004). Umami taste responses are mediated by alpha-transducin and alpha-gustducin. *J Neurosci*, 24, 7674-80.
- HECK, G. L., MIERSON, S. & DESIMONE, J. A. (1984). Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*, 223, 403-5.
- HENDRIKSEN, P. J. (1999). Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology*, 52, 1295-307.
- HENRIKSEN, K., HAKOVIRTA, H. & PARVINEN, M. (1995). Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology*, 136, 3285-91.
- HERKENHAM, M., RATHORE, P., BROWN, P. & LISTWAK, S. J. (2011). Cautionary notes on the use of NF-kappaB p65 and p50 antibodies for CNS studies. *J Neuroinflammation*, 8, 141.
- HERMES, R., GORITZ, F., MALTZAN, J., BLOTTNER, S., PROUDFOOT, J., FRITSCH, G., FASSBENDER, M., QUEST, M. & HILDEBRANDT, T. B. (2001). Establishment of assisted reproduction technologies in female and male African wild dogs (*Lycaon pictus*). *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 315-21.
- HERRICK, S. B., SCHWEISSINGER, D. L., KIM, S. W., BAYAN, K. R., MANN, S. & CARDULLO, R. A. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol*, 202, 663-71.
- 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., LEVIN, L. R., WILLIAMS, C. J., BUCK, J. & MOSS, S. B. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell*, 9, 249-59.
- HEYDECKE, D., MEYER, D., ACKERMANN, F., WILHELM, B., GUDERMANN, T. & BOEKHOFF, I. (2006). The multi PDZ domain protein MUPP1 as a putative scaffolding protein for organizing signaling complexes in the acrosome of mammalian spermatozoa. *J Androl*, 27, 390-404.
- HILDEBRAND, M. S., AVENARIUS, M. R., FELLOUS, M., ZHANG, Y., MEYER, N. C., AUER, J., SERRES, C., KAHIRIZI, K., NAJMABADI, H., BECKMANN, J. S. & SMITH, R. J. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet*, 18, 1178-84.
- HIROHASHI, N., KAMEI, N., KUBO, H., SAWADA, H., MATSUMOTO, M. & HOSHI, M. (2008). Egg and sperm recognition systems during fertilization. *Dev Growth Differ*, 50 Suppl 1, S221-38.
- HISATSUNE, C., YASUMATSU, K., TAKAHASHI-IWANAGA, H., OGAWA, N., KURODA, Y., YOSHIDA, R., NINOMIYA, Y. & MIKOSHIBA, K. (2007). Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 282, 37225-31.
- HO, H. C., GRANISH, K. A. & SUAREZ, S. S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca^{2+} and not cAMP. *Dev Biol*, 250, 208-17.
- HO, K., WOLFF, C. A. & SUAREZ, S. S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev*, 21, 345-50.

- HOFER, D. & DRENCKHAHN, D. (1992). Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry*, 98, 237-42.
- HOFER, D., PUSCHEL, B. & DRENCKHAHN, D. (1996). Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6631-4.
- HOFMANN, T., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T. & MONTELL, C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol*, 13, 1153-8.
- HOGVEEN, K. N. & SASSONE-CORSI, P. (2006). Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. *Hum Fertil (Camb)*, 9, 73-9.
- HOLSTEIN, A. F. & ECKMANN, C. (1986). Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia*, 18, 5-16.
- HOLT, W. V. & LLOYD, R. E. (2010). Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? *Theriogenology*, 73, 713-22.
- HOON, M. A., ADLER, E., LINDEMEIER, J., BATTEY, J. F., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, 96, 541-51.
- HORIO, N., YOSHIDA, R., YASUMATSU, K., YANAGAWA, Y., ISHIMARU, Y., MATSUNAMI, H. & NINOMIYA, Y. (2011). Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS One*, 6, e20007.
- HOWARD, T. E., SHAI, S. Y., LANGFORD, K. G., MARTIN, B. M. & BERNSTEIN, K. E. (1990). Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol*, 10, 4294-302.
- HU, J. H., YANG, N., MA, Y. H., JIANG, J., ZHANG, J. F., FEI, J. & GUO, L. H. (2004). Identification of glutamate receptors and transporters in mouse and human sperm. *J Androl*, 25, 140-6.
- HUANG, A. L., CHEN, X., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., GUO, W., TRANKNER, D., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, 442, 934-8.
- HUANG, L., MAX, M., MARGOLSKIE, R. F., SU, H., MASLAND, R. H. & EULER, T. (2003). G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol*, 455, 1-10.
- HUANG, Y. A. & ROPER, S. D. (2010). Intracellular Ca(2+) and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *J Physiol*, 588, 2343-50.
- HUANG, Y. J., MARUYAMA, Y., DVORYANCHIKOV, G., PEREIRA, E., CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6436-41.
- HUGENTOBLE, S. A., HUMPHERSON, P. G., LEESE, H. J., SREENAN, J. M. & MORRIS, D. G. (2008). Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev*, 75, 496-503.
- HUNTER, R. H. & NICHOL, R. (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil*, 77, 599-606.
- IMMLER, S., MOORE, H. D., BREED, W. G. & BIRKHEAD, T. R. (2007). By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS One*, 2, e170.
- INABA, K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci*, 20, 1043-56.
- INOUE, H., NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-8.
- ISHIMARU, Y., INADA, H., KUBOTA, M., ZHUANG, H., TOMINAGA, M. & MATSUNAMI, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12569-74.
- ISHIMARU, Y. & MATSUNAMI, H. (2009). Transient receptor potential (TRP) channels and taste sensation. *J Dent Res*, 88, 212-8.
- ISOBE, T., MINOURA, H., TANAKA, K., SHIBAHARA, T., HAYASHI, N. & TOYODA, N. (2002). The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*, 17, 1441-6.
- IWATSUKI, K., NOMURA, M., SHIBATA, A., ICHIKAWA, R., ENCISO, P. L., WANG, L., TAKAYANAGI, R., TORII, K. & UNEYAMA, H. (2010). Generation and characterization of T1R2-LacZ knock-in mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 402, 495-9.

- JAHN, R., LANG, T. & SUDHOF, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell*, 112, 519-33.
- JAISWAL, B. S. & CONTI, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10676-81.
- JANEWAY, C., TRAVERS, P. & WALPORT, M. (2005). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, New York, Garland Science.
- JANG, H. J., KOKRASHVILI, Z., THEODORAKIS, M. J., CARLSON, O. D., KIM, B. J., ZHOU, J., KIM, H. H., XU, X., CHAN, S. L., JUHASZOVA, M., BERNIER, M., MOSINGER, B., MARGOLSKEE, R. F. & EGAN, J. M. (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15069-74.
- JANSEN, R. P. (1980). Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am J Obstet Gynecol*, 136, 292-308.
- JANSSEN, S., LAERMANS, J., VERHULST, P. J., THUIJS, T., TACK, J. & DEPOORTERE, I. (2011). Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2094-9.
- JENKINS, A. D., LECHENE, C. P. & HOWARDS, S. S. (1980). Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rat testis, and epididymis. *Biol Reprod*, 23, 981-7.
- JENSEN, A. A., MADSEN, B. E., KROGSGAARD-LARSEN, P. & BRAUNER-OSBORNE, H. (2001). Pharmacological characterization of homobaclofen on wild type and mutant GABA(B)1b receptors coexpressed with the GABA(B)2 receptor. *Eur J Pharmacol*, 417, 177-80.
- JEON, T. I., ZHU, B., LARSON, J. L. & OSBORNE, T. F. (2008). SREBP-2 regulates gut peptide secretion through intestinal bitter taste receptor signaling in mice. *J Clin Invest*, 118, 3693-700.
- JIANG, P., JI, Q., LIU, Z., SNYDER, L. A., BENARD, L. M., MARGOLSKEE, R. F. & MAX, M. (2004). The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem*, 279, 45068-75.
- JONES, R., HOWES, E., DUNNE, P. D., JAMES, P., BRUCKBAUER, A. & KLENERMAN, D. (2010). Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. *Dev Biol*, 339, 398-406.
- JOZWIK, M., JOZWIK, M., TENG, C. & BATTAGLIA, F. C. (2006). Amino acid, ammonia and urea concentrations in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. *Hum Reprod*, 21, 2776-82.
- JUNGNICKEL, M. K., MARRERO, H., BIRNBAUMER, L., LEMOS, J. R. & FLORMAN, H. M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol*, 3, 499-502.
- KAFETSOUKIS, A., BRACKETT, N. L., IBRAHIM, E., ATTIA, G. R. & LYNNE, C. M. (2006). Current trends in the treatment of infertility in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*, 86, 781-9.
- KARASINSKA, J. M., GEORGE, S. R. & O'DOWD, B. F. (2003). Family 1 G protein-coupled receptor function in the CNS. Insights from gene knockout mice. *Brain Res Brain Res Rev*, 41, 125-52.
- KASKE, S., KRASTEVA, G., KONIG, P., KUMMER, W., HOFMANN, T., GUDERMANN, T. & CHUBANOV, V. (2007). TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci*, 8, 49.
- KATAOKA, S., YANG, R., ISHIMARU, Y., MATSUNAMI, H., SEVIGNY, J., KINNAMON, J. C. & FINGER, T. E. (2008). The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem Senses*, 33, 243-54.
- KATZ, D. F., MORALES, P., SAMUELS, S. J. & OVERSTREET, J. W. (1990). Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertil Steril*, 54, 513-6.
- KAUPP, U. B., KASHIKAR, N. D. & WEYAND, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol*, 70, 93-117.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KERVANCIOGLU, M. E., DJAHANBAKHCH, O. & AITKEN, R. J. (1994). Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertil Steril*, 61, 1103-8.
- KICMAN, A. T. (2010). Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens. *Handb Exp Pharmacol*, 25-64.

- KIERSZENBAUM, A. L., RIVKIN, E. & TRES, L. L. (2007). Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 33-43.
- KIM, E., YAMASHITA, M., KIMURA, M., HONDA, A., KASHIWABARA, S. & BABA, T. (2008). Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol*, 52, 677-82.
- KIM, M. R., KUSAKABE, Y., MIURA, H., SHINDO, Y., NINOMIYA, Y. & HINO, A. (2003a). Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 500-6.
- KIM, U. K., JORGENSEN, E., COON, H., LEPPERT, M., RISCH, N. & DRAYNA, D. (2003b). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 299, 1221-5.
- KINNAMON, S. C. & VANDENBEUCH, A. (2009). Receptors and transduction of umami taste stimuli. *Ann N Y Acad Sci*, 1170, 55-9.
- KIRICHOK, Y. & LISHKO, P. V. (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod*, 17, 478-99.
- KIRICHOK, Y., NAVARRO, B. & CLAPHAM, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, 439, 737-40.
- KIRKMAN-BROWN, J. C., PUNT, E. L., BARRATT, C. L. & PUBLICOVER, S. J. (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl*, 23, 306-15.
- KITAGAWA, M., KUSAKABE, Y., MIURA, H., NINOMIYA, Y. & HINO, A. (2001). Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 236-42.
- KIUCHI, S., YAMADA, T., KIYOKAWA, N., SAITO, T., FUJIMOTO, J. & YASUE, H. (2006). Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenet Genome Res*, 115, 51-61.
- KNIAZEFF, J., PREZEAU, L., RONDARD, P., PIN, J. P. & GOUDET, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol Ther*, 130, 9-25.
- KOIZUMI, A., NAKAJIMA, K., ASAKURA, T., MORITA, Y., ITO, K., SHMIZU-IBUKA, A., MISAKA, T. & ABE, K. (2007). Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 585-9.
- KOKRASHVILI, Z., MOSINGER, B. & MARGOLSKEE, R. F. (2009a). T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann N Y Acad Sci*, 1170, 91-4.
- KOKRASHVILI, Z., MOSINGER, B. & MARGOLSKEE, R. F. (2009b). Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr*, 90, 822S-825S.
- KRAUSZ, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25, 271-85.
- KRSMANOVIC, L. Z., HU, L., LEUNG, P. K., FENG, H. & CATT, K. J. (2009). The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 402-8.
- KUANG, D., YAO, Y., LAM, J., TSUSHIMA, R. G. & HAMPSON, D. R. (2005). Cloning and characterization of a family C orphan G-protein coupled receptor. *J Neurochem*, 93, 383-91.
- KUSAKABE, Y., YAMAGUCHI, E., TANEMURA, K., KAMEYAMA, K., CHIBA, N., ARAI, S., EMORI, Y. & ABE, K. (1998). Identification of two alpha-subunit species of GTP-binding proteins, Galpha15 and Galphaq, expressed in rat taste buds. *Biochim Biophys Acta*, 1403, 265-72.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-8.
- LECLERC, P., DE LAMIRANDE, E. & GAGNON, C. (1996). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod*, 55, 684-92.

- LEESE, H. J., ASTLEY, N. R. & LAMBERT, D. (1981). Glucose and fructose utilization by rat spermatozoa within the uterine lumen. *J Reprod Fertil*, 61, 435-7.
- LEFEBVRE, R. & SUAREZ, S. S. (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod*, 54, 575-82.
- LEFIEVRE, L., MACHADO-OLIVEIRA, G., FORD, C., KIRKMAN-BROWN, J., BARRATT, C. & PUBLICOVER, S. (2009). Communication between female tract and sperm: Saying NO* when you mean yes. *Commun Integr Biol*, 2, 82-5.
- LEINDERS-ZUFALL, T., BRENNAN, P., WIDMAYER, P., S, P. C., MAUL-PAVICIC, A., JAGER, M., LI, X. H., BREER, H., ZUFALL, F. & BOEHM, T. (2004). MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*, 306, 1033-7.
- LENZI, A. (1997). Computer-aided semen analysis (CASA) 10 years later: a test-bed for the European scientific andrological community. *Int J Androl*, 20, 1-2.
- LEVINE, N. & MARSH, D. J. (1971). Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J Physiol*, 213, 557-70.
- LI, F. & ZHOU, M. (2012). Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice. *Mol Hum Reprod*.
- LI, X., STASZEWSKI, L., XU, H., DURICK, K., ZOLLER, M. & ADLER, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4692-6.
- LILLIE, R. D., PIZZOLATO, P. & DONALDSON, P. T. (1976). Nuclear stains with soluble metachrome metal mordant dye lakes. The effect of chemical endgroup blocking reactions and the artificial introduction of acid groups into tissues. *Histochemistry*, 49, 23-35.
- LIN, W., BURKS, C. A., HANSEN, D. R., KINNAMON, S. C. & GILBERTSON, T. A. (2004). Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J Neurophysiol*, 92, 2909-19.
- LIN, W., FINGER, T. E., ROSSIER, B. C. & KINNAMON, S. C. (1999). Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone. *J Comp Neurol*, 405, 406-20.
- LIN, W. & KINNAMON, S. C. (1999). Physiological evidence for ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat taste cells. *J Neurophysiol*, 82, 2061-9.
- LIN, W., OGURA, T., MARGOLSKIE, R. F., FINGER, T. E. & RESTREPO, D. (2008). TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. *J Neurophysiol*, 99, 1451-60.
- LINDEMANN, B. (1996). Taste reception. *Physiol Rev*, 76, 718-66.
- LINDEMANN, B. (1997). Sodium taste. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 6, 425-9.
- LINDEMANN, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413, 219-25.
- LISHKO, P. V., BOTCHKINA, I. L., FEDORENKO, A. & KIRICHOK, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*, 140, 327-37.
- LISHKO, P. V., BOTCHKINA, I. L. & KIRICHOK, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471, 387-91.
- LISHKO, P. V., KIRICHOK, Y., REN, D., NAVARRO, B., CHUNG, J. J. & CLAPHAM, D. E. (2012). The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol*, 74, 453-75.
- LITSCHER, E. S., WILLIAMS, Z. & WASSARMAN, P. M. (2009). Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Mol Reprod Dev*, 76, 933-41.
- LITVIN, T. N., KAMENETSKY, M., ZARIFYAN, A., BUCK, J. & LEVIN, L. R. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem*, 278, 15922-6.
- LIU, C. & HERMANN, T. E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*, 253, 5892-4.
- LIU, D. & LIMAN, E. R. (2003). Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15160-5.
- LIU, D. Y. & BAKER, H. W. (1996). A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Hum Reprod*, 11, 551-7.
- LIU, L. & SIMON, S. A. (2001). Acidic stimuli activates two distinct pathways in taste receptor cells from rat fungiform papillae. *Brain Res*, 923, 58-70.

- LIU, M. & SIMON, M. I. (1996). Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature*, 382, 83-7.
- LOBLEY, A., PIERRON, V., REYNOLDS, L., ALLEN, L. & MICHALOVICH, D. (2003). Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 53.
- LOPEZ-GONZALEZ, I., OLAMENDI-PORTUGAL, T., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., VAN DER WALT, J., DYASON, K., POSSANI, L. D., FELIX, R. & DARSZON, A. (2003). Scorpion toxins that block T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 408-14.
- LOPEZJIMENEZ, N. D., CAVENAGH, M. M., SAINZ, E., CRUZ-ITHIER, M. A., BATTEY, J. F. & SULLIVAN, S. L. (2006). Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J Neurochem*, 98, 68-77.
- LU, H. Y., LU, J. C., HU, Y. A., WANG, Y. M. & HUANG, Y. F. (2002). [Detection of human sperm morphology and acrosome reaction with Coomassie brilliant blue staining]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 8, 204-6.
- LU, K., MCDANIEL, A. H., TORDOFF, M. G., LI, X., BEAUCHAMP, G. K., BACHMANOV, A. A., VANDERWEELE, D. A., CHAPMAN, C. D., DESS, N. K., HUANG, L., WANG, H. & REED, D. R. (2005). No relationship between sequence variation in protein coding regions of the Tas1r3 gene and saccharin preference in rats. *Chem Senses*, 30, 231-40.
- LYALL, V., HECK, G. L., VINNIKOVA, A. K., GHOSH, S., PHAN, T. H., ALAM, R. I., RUSSELL, O. F., MALIK, S. A., BIGBEE, J. W. & DESIMONE, J. A. (2004). The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J Physiol*, 558, 147-59.
- MA, M. (2010). Multiple Olfactory Subsystems Convey Various Sensory Signals.
- MAAS, D. H., STOREY, B. T. & MASTROIANNI, L., JR. (1977). Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril*, 28, 981-5.
- MACE, O. J., AFFLECK, J., PATEL, N. & KELLETT, G. L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol*, 582, 379-92.
- MACE, O. J., LISTER, N., MORGAN, E., SHEPHERD, E., AFFLECK, J., HELLIWELL, P., BRONK, J. R., KELLETT, G. L., MEREDITH, D., BOYD, R., PIERI, M., BAILEY, P. D., PETTCREW, R. & FOLEY, D. (2009). An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol*, 587, 195-210.
- MAHI, C. A. & YANAGIMACHI, R. (1973). The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 35, 55-66.
- MALAISSÉ, W. J. (1988). Calcium entry and activation of endocrine cells. *Ann N Y Acad Sci*, 522, 284-95.
- MANDEL, M. & HIGA, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 53, 159-62.
- MANN, T. (1964). *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*, London., Methuen.
- MARGOLSKEE, R. F., DYER, J., KOKRASHVILI, Z., SALMON, K. S., ILEGEMS, E., DALY, K., MAILLET, E. L., NINOMIYA, Y., MOSINGER, B. & SHIRAZI-BEECHEY, S. P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15075-80.
- MARTIN-DELEON, P. A., ZHANG, H., MORALES, C. R., ZHAO, Y., RULON, M., BARNOSKI, B. L., CHEN, H. & GALILEO, D. S. (2005). Spam1-associated transmission ratio distortion in mice: elucidating the mechanism. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 32.
- MARUYAMA, Y., PEREIRA, E., MARGOLSKEE, R. F., CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. (2006). Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor. *J Neurosci*, 26, 2227-34.
- MATSUNAMI, H. & AMREIN, H. (2003). Taste and pheromone perception in mammals and flies. *Genome Biol*, 4, 220.
- MATSUNAMI, H., MONTMAYEUR, J. P. & BUCK, L. B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404, 601-4.
- MATTES, R. D. (2009). Is there a fatty acid taste? *Annu Rev Nutr*, 29, 305-27.

- MAX, M., SHANKER, Y. G., HUANG, L., RONG, M., LIU, Z., CAMPAGNE, F., WEINSTEIN, H., DAMAK, S. & MARGOLSKEE, R. F. (2001). Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet*, 28, 58-63.
- MAYORGA, L. S., TOMES, C. N. & BELMONTE, S. A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life*, 59, 286-92.
- MCLACHLAN, R. I. & O'BRYAN, M. K. (2010). Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 1013-24.
- MCLAUGHLIN, S. K., MCKINNON, P. J. & MARGOLSKEE, R. F. (1992). Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, 357, 563-9.
- MENDOZA, F. J., PEREZ-MARIN, C. C., GARCIA-MARIN, L., MADUENO, J. A., HENLEY, C., AGUILERA-TEJERO, E. & RODRIGUEZ, M. (2011). Localization, Distribution and Function of the Calcium-Sensing Receptor in Sperm. *J Androl*.
- MESSING, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*, 101, 20-78.
- MEYERHOF, W. (2005). Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*.
- MEYERHOF, W., BATRAM, C., KUHN, C., BROCKHOFF, A., CHUDоба, E., BUFE, B., APPENDINO, G. & BEHRENS, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*, 35, 157-70.
- MICHAUT, M., TOMES, C. N., DE BLAS, G., YUNES, R. & MAYORGA, L. S. (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9996-10001.
- MILLIGAN, G. (2009). G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br J Pharmacol*, 158, 5-14.
- MING, D. & HELLEKANT, G. (1994). Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett*, 355, 106-8.
- MIYOSHI, M. A., ABE, K. & EMORI, Y. (2001). IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chem Senses*, 26, 259-65.
- MOGIL, J. S., YU, L. & BASBAUM, A. I. (2000). Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. *Annu Rev Neurosci*, 23, 777-811.
- MOMBAERTS, P. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 286, 707-11.
- MOMBAERTS, P. (2006). Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 713-37.
- MONROY, A. (1985). Processes controlling sperm-egg fusion. *Eur J Biochem*, 152, 51-6.
- MONTMAYEUR, J. P., LIBERLES, S. D., MATSUNAMI, H. & BUCK, L. B. (2001). A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci*, 4, 492-8.
- MONTMAYEUR, J. P. & MATSUNAMI, H. (2002). Receptors for bitter and sweet taste. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 366-71.
- MOORE, H., DVORAKOVA, K., JENKINS, N. & BREED, W. (2002). Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*, 418, 174-7.
- MORRIS, J. A. & CAGAN, R. H. (1972). Purification of monellin, the sweet principle of *Dioscoreophyllum cumminsii*. *Biochim Biophys Acta*, 261, 114-22.
- MOSS, S. B., VANSCHOY, H. & GERTON, G. L. (1997). Mapping of a haploid transcribed and translated sperm-specific gene to the mouse X chromosome. *Mamm Genome*, 8, 37-8.
- MULLER, U. (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, 82, 3-21.
- MUNOZ-GARAY, C., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., DELGADO, R., LABARCA, P., FELIX, R. & DARSZON, A. (2001). Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol*, 234, 261-74.
- MUNUCE, M. J., QUINTERO, I., CAILLE, A. M., GHERSEVICH, S. & BERTA, C. L. (2006). Comparative concentrations of steroid hormones and proteins in human peri-ovulatory peritoneal and follicular fluids. *Reprod Biomed Online*, 13, 202-7.
- MURAKAMI, M., OHBA, T., XU, F., SHIDA, S., SATOH, E., ONO, K., MIYOSHI, I., WATANABE, H., ITO, H. & IJIMA, T. (2005). Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J Biol Chem*, 280, 5626-35.

- MURATA, Y., YASUO, T., YOSHIDA, R., OBATA, K., YANAGAWA, Y., MARGOLSKEE, R. F. & NINOMIYA, Y. (2010). Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol*, 104, 896-901.
- MURO, Y. & OKABE, M. (2011). Mechanisms of fertilization--a view from the study of gene-manipulated mice. *J Androl*, 32, 218-25.
- MURRAY, S. C. & SMITH, T. T. (1997). Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril*, 68, 351-7.
- MUSSET, B., CAPASSO, M., CHERNY, V. V., MORGAN, D., BHAMRAH, M., DYER, M. J. & DECOURSEY, T. E. (2010). Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes. *J Biol Chem*, 285, 5117-21.
- NAVARRO, B., KIRICHOK, Y. & CLAPHAM, D. E. (2007). KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7688-92.
- NAZ, R. K. & RAJESH, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 75.
- NELSON, G., CHANDRASHEKAR, J., HOON, M. A., FENG, L., ZHAO, G., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416, 199-202.
- NELSON, G., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., ZHANG, Y., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106, 381-90.
- NELSON, T. M., LOPEZJIMENEZ, N. D., TESSAROLLO, L., INOUE, M., BACHMANOV, A. A. & SULLIVAN, S. L. (2010). Taste function in mice with a targeted mutation of the pkd1l3 gene. *Chem Senses*, 35, 565-77.
- NIE, Y., VIGUES, S., HOBBS, J. R., CONN, G. L. & MUNGER, S. D. (2005). Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol*, 15, 1948-52.
- NIXON, B., AITKEN, R. J. & MCLAUGHLIN, E. A. (2007). New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol Life Sci*, 64, 1805-23.
- NIXON, B., LU, Q., WASSLER, M. J., FOOTE, C. I., ENSSLIN, M. A. & SHUR, B. D. (2001). Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs*, 168, 46-57.
- NOLAN, M. A., BABCOCK, D. F., WENNEMUTH, G., BROWN, W., BURTON, K. A. & 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, 13483-8.
- NOWAK, M. A., TARCZY-HORNOCH, K. & AUSTYN, J. M. (1992). The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10896-9.
- O'TOOLE, C. M., ARNOULT, C., DARSZON, A., STEINHARDT, R. A. & FLORMAN, H. M. (2000). Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell*, 11, 1571-84.
- OHMOTO, M., MATSUMOTO, I., YASUOKA, A., YOSHIHARA, Y. & ABE, K. (2008). Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol Cell Neurosci*, 38, 505-17.
- OKABE, M. & CUMMINS, J. M. (2007). Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals. *Cell Mol Life Sci*, 64, 1945-58.
- OKAMURA, N., TAJIMA, Y., SOEJIMA, A., MASUDA, H. & SUGITA, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 260, 9699-705.
- OLDS-CLARKE, P. (1988). Genetic analysis of sperm function in fertilization. *Gamete Res*, 20, 241-64.
- OLIVEIRA, R. G., TOMASI, L., ROVASIO, R. A. & GIOJALAS, L. C. (1999). Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil*, 115, 23-7.
- OPPI, C., SHORE, S. K. & REDDY, E. P. (1987). Nucleotide sequence of testis-derived c-abl cDNAs: implications for testis-specific transcription and abl oncogene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 8200-4.
- OREN-BENAROYA, R., ORVIETO, R., GAKAMSKY, A., PINCHASOV, M. & EISENBACH, M. (2008). The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*.

- OSMAN, R. A., ANDRIA, M. L., JONES, A. D. & MEIZEL, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 828-33.
- OWMAN, C., STJERNQUIST, M., HELM, G., KANNISTO, P., SJOBERG, N. O. & SUNDLER, F. (1986). Comparative histochemical distribution of nerve fibres storing noradrenaline and neuropeptide Y (NPY) in human ovary, fallopian tube, and uterus. *Med Biol*, 64, 57-65.
- OZECK, M., BRUST, P., XU, H. & SERVANT, G. (2004). Receptors for bitter, sweet and umami taste couple to inhibitory G protein signaling pathways. *Eur J Pharmacol*, 489, 139-49.
- PACEY, A. A., DAVIES, N., WARREN, M. A., BARRATT, C. L. & COOKE, I. D. (1995a). Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod*, 10, 2603-9.
- PACEY, A. A., HILL, C. J., SCUDAMORE, I. W., WARREN, M. A., BARRATT, C. L. & COOKE, I. D. (1995b). The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Hum Reprod*, 10, 360-6.
- PARMENTIER, M., LIBERT, F., SCHURMANS, S., SCHIFFMANN, S., LEFORT, A., EGGERICKX, D., LEDENT, C., MOLLEREAU, C., GERARD, C., PERRET, J. & ET AL. (1992). Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature*, 355, 453-5.
- PARNELL, S. C., MAGENHEIMER, B. S., MASER, R. L., RANKIN, C. A., SMINE, A., OKAMOTO, T. & CALVET, J. P. (1998). The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 625-31.
- PARNOT, C. & KOBILKA, B. (2004). Toward understanding GPCR dimers. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 691-2.
- PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J. L. & FIRST, N. L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod*, 41, 683-99.
- PEREZ, C. A., HUANG, L., RONG, M., KOZAK, J. A., PREUSS, A. K., ZHANG, H., MAX, M. & MARGOLSKEE, R. F. (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci*, 5, 1169-76.
- PI, M., CHEN, L., HUANG, M. Z., ZHU, W., RINGHOFER, B., LUO, J., CHRISTENSON, L., LI, B., ZHANG, J., JACKSON, P. D., FABER, P., BRUNDEN, K. R., HARRINGTON, J. J. & QUARLES, L. D. (2008). GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One*, 3, e3858.
- PIN, J. P., GALVEZ, T. & PREZEAU, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 98, 325-54.
- PIN, J. P., KNIAZEFF, J., GOUDET, C., BESSIS, A. S., LIU, J., GALVEZ, T., ACHER, F., RONDARD, P. & PREZEAU, L. (2004). The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell*, 96, 335-42.
- PLOEGER, L. S., DULLENS, H. F., HUISMAN, A. & VAN DIEST, P. J. (2008). Fluorescent stains for quantification of DNA by confocal laser scanning microscopy in 3-D. *Biotech Histochem*, 83, 63-9.
- PRAWITT, D., MONTEILH-ZOLLER, M. K., BRIKEL, L., SPANGENBERG, C., ZABEL, B., FLEIG, A. & PENNER, R. (2003). TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15166-71.
- PRIMAKOFF, P. & MYLES, D. G. (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 296, 2183-5.
- PUBLICOVER, S., HARPER, C. V. & BARRATT, C. (2007). [Ca²⁺]_i signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nat Cell Biol*, 9, 235-42.
- PUBLICOVER, S. J., GIOJALAS, L. C., TEVES, M. E., DE OLIVEIRA, G. S., GARCIA, A. A., BARRATT, C. L. & HARPER, C. V. (2008). Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci*, 13, 5623-37.
- QI, H., MORAN, M. M., NAVARRO, B., CHONG, J. A., KRAPIVINSKY, G., KRAPIVINSKY, L., KIRICHOK, Y., RAMSEY, I. S., QUILL, T. A. & CLAPHAM, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 1219-23.
- QUILL, T. A., REN, D., CLAPHAM, D. E. & GARBERS, D. L. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12527-31.

- QUILL, T. A., SUGDEN, S. A., ROSSI, K. L., DOOLITTLE, L. K., HAMMER, R. E. & GARBERS, D. L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14869-74.
- QUILL, T. A., WANG, D. & GARBERS, D. L. (2006). Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper. *Mol Cell Endocrinol*, 250, 84-92.
- QUINN, S. J., BAI, M. & BROWN, E. M. (2004). pH Sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem*, 279, 37241-9.
- QUINN, S. J., KIFOR, O., TRIVEDI, S., DIAZ, R., VASSILEV, P. & BROWN, E. (1998). Sodium and ionic strength sensing by the calcium receptor. *J Biol Chem*, 273, 19579-86.
- QUINN, S. J., YE, C. P., DIAZ, R., KIFOR, O., BAI, M., VASSILEV, P. & BROWN, E. (1997). The Ca²⁺-sensing receptor: a target for polyamines. *Am J Physiol*, 273, C1315-23.
- RALT, D., GOLDENBERG, M., FETTEROLF, P., THOMPSON, D., DOR, J., MASHIACH, S., GARBERS, D. L. & EISENBACH, M. (1991). Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2840-4.
- 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, 774-85.
- RAMALHO-SANTOS, J., SCHATTEN, G. & MORENO, R. D. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 67, 1043-51.
- RAMOS, L. & WETZELS, A. M. (2001). Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod*, 16, 1703-7.
- RANKIN, T. L., COLEMAN, J. S., EPIFANO, O., HOODBHOY, T., TURNER, S. G., CASTLE, P. E., LEE, E., GORE-LANGTON, R. & DEAN, J. (2003). Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell*, 5, 33-43.
- REEVE, L., LEDGER, W. L. & PACEY, A. A. (2003). Does the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion sequence play a role in mediating sperm interaction with the human endosalpinx? *Hum Reprod*, 18, 1461-8.
- REIK, W. & WALTER, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2, 21-32.
- REN, D., NAVARRO, B., PEREZ, G., JACKSON, A. C., HSU, S., SHI, Q., TILLY, J. L. & CLAPHAM, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413, 603-9.
- REN, X., ZHOU, L., TERWILLIGER, R., NEWTON, S. S. & DE ARAUJO, I. E. (2009). Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci*, 3, 12.
- RICHTER, T. A., DVORYANCHIKOV, G. A., CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. (2004). Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J Neurophysiol*, 92, 1928-36.
- ROBAIRE, B., HINTON, B. T. & ORGEBIN-CRIST, M. C. (2002). *The epididymis : from molecules to clinical practice : a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymus, and the vas deferens*, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- ROCKWELL, P. L. & STOREY, B. T. (2000). Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca(2+) changes monitored by fluo-3. *Mol Reprod Dev*, 55, 335-49.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S138-46.
- ROLDAN, E. R., MURASE, T. & SHI, Q. X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*, 266, 1578-81.
- ROLDAN, E. R. & SHI, Q. X. (2007). Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci*, 12, 89-104.
- ROLLAND, C., MACDONALD, D. W., DE FRAIPONT, M. & BERDOY, M. (2003). Free Female Choice in House Mice: Leaving Best for Last *Behaviour*, 140, 1371-1388.
- ROMANOV, R. A., ROGACHEVSKAJA, O. A., BYSTROVA, M. F., JIANG, P., MARGOLSKEE, R. F. & KOLESNIKOV, S. S. (2007). Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J*, 26, 657-67.

- ROPER, S. D. (2007). Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch*, 454, 759-76.
- ROSSLER, P., BOEKHOFF, I., TAREILUS, E., BECK, S., BREER, H. & FREITAG, J. (2000). G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction. *Chem Senses*, 25, 413-21.
- ROSSLER, P., KRONER, C., FREITAG, J., NOE, J. & BREER, H. (1998). Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *Eur J Cell Biol*, 77, 253-61.
- ROZENGURT, E. (2006). Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, G171-7.
- ROZENGURT, E. & STERNINI, C. (2007). Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol*, 7, 557-62.
- ROZENGURT, N., WU, S. V., CHEN, M. C., HUANG, C., STERNINI, C. & ROZENGURT, E. (2006). Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, G792-802.
- RUIZ-AVILA, L., MCLAUGHLIN, S. K., WILDMAN, D., MCKINNON, P. J., ROBICHON, A., SPICKOFSKY, N. & MARGOLSKEE, R. F. (1995). Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature*, 376, 80-5.
- RUIZ-AVILA, L., WONG, G. T., DAMAK, S. & MARGOLSKEE, R. F. (2001). Dominant loss of responsiveness to sweet and bitter compounds caused by a single mutation in alpha-gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8868-73.
- RUIZ, C., GUTKNECHT, S., DELAY, E. & KINNAMON, S. (2006). Detection of NaCl and KCl in TRPV1 knockout mice. *Chem Senses*, 31, 813-20.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-4.
- SAINZ, E., CAVENAGH, M. M., LOPEZJIMENEZ, N. D., GUTIERREZ, J. C., BATTEY, J. F., NORTHUP, J. K. & SULLIVAN, S. L. (2007). The G-protein coupling properties of the human sweet and amino acid taste receptors. *Dev Neurobiol*, 67, 948-59.
- SALICIONI, A. M., PLATT, M. D., WERTHEIMER, E. V., ARCELAY, E., ALLAIRE, A., SOSNIK, J. & VISCONTI, P. E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 245-59.
- SAN GABRIEL, A., MAEKAWA, T., UNEYAMA, H. & TORII, K. (2009). Metabotropic glutamate receptor type 1 in taste tissue. *Am J Clin Nutr*, 90, 743S-746S.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SANTEN, R. J. & SWERDLOFF, R. S. (1986). *Male reproductive dysfunction : diagnosis and management of hypogonadism, infertility, and impotence*, New York, Dekker.
- SANTI, C. M., MARTINEZ-LOPEZ, P., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., BUTLER, A., ALISIO, A., DARSZON, A. & SALKOFF, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett*, 584, 1041-6.
- SBARBATI, A., MERIGO, F., BENATI, D., TIZZANO, M., BERNARDI, P., CRESCIMANNO, C. & OSCULATI, F. (2004). Identification and characterization of a specific sensory epithelium in the rat larynx. *J Comp Neurol*, 475, 188-201.
- SCHAEFER, M., HOFMANN, T., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. (1998). A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3008-13.
- SCHALL, T. J., BACON, K., TOY, K. J. & GOEDDEL, D. V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347, 669-71.
- SCHILL, W. B. (1974). Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 25, 703-12.
- SCHLEGEL, P. N. (2009). Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecol*, 61, 261-83.
- SCHMIDT, E. E. (1996). Transcriptional promiscuity in testes. *Curr Biol*, 6, 768-9.
- SCHNEIDER, M., FORSTER, H., BOERSMA, A., SEILER, A., WEHNES, H., SINOWATZ, F., NEUMULLER, C., DEUTSCH, M. J., WALCH, A., HRABE DE ANGELIS, M., WURST, W.,

- URSINI, F., ROVERI, A., MALESZEWSKI, M., MAIORINO, M. & CONRAD, M. (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *Faseb J*, 23, 3233-42.
- SCHREIBER, M., WEI, A., YUAN, A., GAUT, J., SAITO, M. & SALKOFF, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J Biol Chem*, 273, 3509-16.
- SCHUEL, H. & BURKMAN, L. J. (2005). A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol Reprod*, 73, 1078-86.
- SCHUETZ, A. W. & DUBIN, N. H. (1981). Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell-oocyte complexes. *Endocrinology*, 108, 457-63.
- SCHUH, K., CARTWRIGHT, E. J., JANKEVICS, E., BUNDSCHU, K., LIEBERMANN, J., WILLIAMS, J. C., ARMESILLA, A. L., EMERSON, M., OCEANDY, D., KNOBELOCH, K. P. & NEYSES, L. (2004). Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem*, 279, 28220-6.
- SCHUH, S. M., CARLSON, A. E., MCKNIGHT, G. S., CONTI, M., HILLE, B. & BABCOCK, D. F. (2006). Signaling pathways for modulation of mouse sperm motility by adenosine and catecholamine agonists. *Biol Reprod*, 74, 492-500.
- SEAMON, K. B. & DALY, J. W. (1986). Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*, 20, 1-150.
- SEIFERT, R. & WENZEL-SEIFERT, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 366, 381-416.
- SERRES, C., AUER, J., PETIT, F., PATRAT, C. & JOUANNET, P. (2008). [Molecules involved in sperm-zona pellucida interaction in mammals. Role in human fertility]. *J Soc Biol*, 202, 119-28.
- SERVANT, G., TACHDJIAN, C., TANG, X. Q., WERNER, S., ZHANG, F., LI, X., KAMDAR, P., PETROVIC, G., DITSCHUN, T., JAVA, A., BRUST, P., BRUNE, N., DUBOIS, G. E., ZOLLER, M. & KARANEWSKY, D. S. (2010). Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4746-51.
- SHACHAM, S., HARRIS, D., BEN-SHLOMO, H., COHEN, I., BONFIL, D., PRZEDECKI, F., LEWY, H., ASHKENAZI, I. E., SEGER, R. & NAOR, Z. (2001). Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm*, 63, 63-90.
- SHAHA, C. (2007). Modulators of spermatogenic cell survival. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 63, 173-86.
- SHAHA, C., TRIPATHI, R. & MISHRA, D. P. (2011). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365, 1501-15.
- SHARP, P. A., SUGDEN, B. & SAMBROOK, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, 12, 3055-63.
- SHERIFF, D. S. & ALI, E. F. (2010). Perspective on plasma membrane cholesterol efflux and spermatozoal function. *J Hum Reprod Sci*, 3, 68-75.
- SHI, P., ZHANG, J., YANG, H. & ZHANG, Y. P. (2003). Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol*, 20, 805-14.
- SHIMADA, S., UEDA, T., ISHIDA, Y., YAMAMOTO, T. & UGAWA, S. (2006). Acid-sensing ion channels in taste buds. *Arch Histol Cytol*, 69, 227-31.
- SHIMIZU-IBUKA, A., MORITA, Y., TERADA, T., ASAKURA, T., NAKAJIMA, K., IWATA, S., MISAKA, T., SORIMACHI, H., ARAI, S. & ABE, K. (2006). Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J Mol Biol*, 359, 148-58.
- SHOJI, M., CHUMA, S., YOSHIDA, K., MORITA, T. & NAKATSUJI, N. (2005). RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 282, 524-34.
- SHUM, W. W., DA SILVA, N., BROWN, D. & BRETON, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol*, 212, 1753-61.
- SINGH, N., VRONTAKIS, M., PARKINSON, F. & CHELIKANI, P. (2011). Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 406, 146-51.
- SINOWATZ, F., PLENDL, J. & KOLLE, S. (1998). Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat (Basel)*, 161, 196-205.
- SLACK, J. P., BROCKHOFF, A., BATRAM, C., MENZEL, S., SONNABEND, C., BORN, S., GALINDO, M. M., KOHL, S., THALMANN, S., OSTOPOVICI-HALIP, L., SIMONS, C. T.,

- UNGUREANU, I., DUINEVELD, K., BOLOGA, C. G., BEHRENS, M., FURRER, S., OPREA, T. I. & MEYERHOF, W. (2010). Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol*, 20, 1104-9.
- SMITH, T. T. & YANAGIMACHI, R. (1991). Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil*, 91, 567-73.
- SOBRERO, A. J. & MACLEOD, J. (1962). The immediate postcoital test. *Fertil Steril*, 13, 184-9.
- SOLINSKI, H. J., BOEKHOFF, I., BOUVIER, M., GUDERMANN, T. & BREIT, A. (2010). Sensory neuron-specific mas-related gene-X1 receptors resist agonist-promoted endocytosis. *Mol Pharmacol*.
- SPEHR, M., GISSELMANN, G., POPLAWSKI, A., RIFFELL, J. A., WETZEL, C. H., ZIMMER, R. K. & HATT, H. (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*, 299, 2054-8.
- SPEHR, M., SCHWANE, K., RIFFELL, J. A., BARBOUR, J., ZIMMER, R. K., NEUHAUS, E. M. & HATT, H. (2004). Particulate adenylyl cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J Biol Chem*, 279, 40194-203.
- SPEHR, M., SCHWANE, K., RIFFELL, J. A., ZIMMER, R. K. & HATT, H. (2006). Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Mol Cell Endocrinol*, 250, 128-36.
- STAUSS, C. R., VOTTA, T. J. & SUAREZ, S. S. (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod*, 53, 1280-5.
- STEEGBORN, C., LITVIN, T. N., LEVIN, L. R., BUCK, J. & WU, H. (2005). Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 32-7.
- STONE, L. M., BARROWS, J., FINGER, T. E. & KINNAMON, S. C. (2007). Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice. *Chem Senses*, 32, 255-62.
- STRUNKER, T., GOODWIN, N., BRENKER, C., KASHIKAR, N. D., WEYAND, I., SEIFERT, R. & KAUPP, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471, 382-6.
- SUAREZ, S. S. (2007). Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev*, 19, 103-10.
- SUAREZ, S. S. (2008a). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*.
- SUAREZ, S. S. (2008b). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol*, 52, 455-62.
- SUAREZ, S. S. & HO, H. C. (2003). Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 49, 351-6.
- SUAREZ, S. S., KATZ, D. F. & OVERSTREET, J. W. (1983). Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod*, 29, 1277-87.
- SUAREZ, S. S., KATZ, D. F., OWEN, D. H., ANDREW, J. B. & POWELL, R. L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod*, 44, 375-81.
- SUAREZ, S. S. & OSMAN, R. A. (1987). Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod*, 36, 1191-8.
- SUAREZ, S. S. & PACEY, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12, 23-37.
- SUMMERS, K. E. & 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, 3092-6.
- SUN, F., BAHAT, A., GAKAMSKY, A., GIRSH, E., KATZ, N., GIOJALAS, L. C., TUR-KASPA, I. & EISENBACH, M. (2005). Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod*, 20, 761-7.
- SUNAHARA, R. K. & TAUSSIG, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv*, 2, 168-84.
- SUNDSFJORD, J. A., FORSDAHL, F. & THIBAUT, G. (1989). Physiological levels of immunoreactive ANH-like peptides in human follicular fluid. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 121, 578-80.

- SUTHERLAND, K., YOUNG, R. L., COOPER, N. J., HOROWITZ, M. & BLACKSHAW, L. A. (2007). Phenotypic characterization of taste cells of the mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G1420-8.
- SUTTON, K. A., JUNGnickEL, M. K. & FLORMAN, H. M. (2008). A polycystin-1 controls postcopulatory reproductive selection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8661-6.
- SUTTON, K. A., JUNGnickEL, M. K., WARD, C. J., HARRIS, P. C. & FLORMAN, H. M. (2006). Functional characterization of PKDREJ, a male germ cell-restricted polycystin. *J Cell Physiol*, 209, 493-500.
- TAKAHASHI, A., CAMACHO, P., LECHLEITER, J. D. & HERMAN, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 79, 1089-125.
- TAKAHASHI, K., WETZELS, A. M., GOVERDE, H. J., BASTAANS, B. A., JANSSEN, H. J. & ROLLAND, R. (1992). The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 57, 889-94.
- TALBOT, P., SUMMERS, R. G., HYLANDER, B. L., KEOUGH, E. M. & FRANKLIN, L. E. (1976). The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool*, 198, 383-92.
- TALEVI, R. & GUALTIERI, R. (2010). Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*, 73, 796-801.
- TANUDJI, M., HEVI, S. & CHUCK, S. L. (2002). Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *J Cell Sci*, 115, 3849-57.
- TEMUSSI, P. A. (2009). Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Trends Biochem Sci*, 34, 296-302.
- TEVES, M. E., BARBANO, F., GUIDOBALDI, H. A., SANCHEZ, R., MISKA, W. & GIOJALAS, L. C. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril*, 86, 745-9.
- TEVES, M. E., GUIDOBALDI, H. A., UNATES, D. R., SANCHEZ, R., MISKA, W., PUBLICOVER, S. J., MORALES GARCIA, A. A. & GIOJALAS, L. C. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One*, 4, e8211.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-80.
- TIZZANO, M., CRISTOFOLETTI, M., SBARBATI, A. & FINGER, T. E. (2011). Expression of taste receptors in Solitary Chemosensory Cells of rodent airways. *BMC Pulm Med*, 11, 3.
- TIZZANO, M., DVORYANCHIKOV, G., BARROWS, J. K., KIM, S., CHAUDHARI, N. & FINGER, T. E. (2008). Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci*, 9, 110.
- TIZZANO, M., GULBRANSEN, B. D., VANDENBEUCH, A., CLAPP, T. R., HERMAN, J. P., SIBHATU, H. M., CHURCHILL, M. E., SILVER, W. L., KINNAMON, S. C. & FINGER, T. E. (2010). Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3210-5.
- TOMCHIK, S. M., BERG, S., KIM, J. W., CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. (2007). Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J Neurosci*, 27, 10840-8.
- TOMES, C. N., DE BLAS, G. A., MICHAUT, M. A., FARRE, E. V., CHERHITIN, O., VISCONTI, P. E. & MAYORGA, L. S. (2005). alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*, 11, 43-51.
- TOMES, C. N., MICHAUT, M., DE BLAS, G., VISCONTI, P., MATTI, U. & MAYORGA, L. S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev Biol*, 243, 326-38.
- TORDOFF, M. G., SHAO, H., ALARCON, L. K., MARGOLSKEE, R. F., MOSINGER, B., BACHMANOV, A. A., REED, D. R. & MCCAUGHEY, S. (2008). Involvement of T1R3 in calcium-magnesium taste. *Physiol Genomics*, 34, 338-48.
- TOVEY, S. C., DEDOS, S. G., RAHMAN, T., TAYLOR, E. J., PANTAZAKA, E. & TAYLOR, C. W. (2010). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP independent of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 285, 12979-89.

- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TOYONO, T., SETA, Y., KATAOKA, S., HARADA, H., MOROTOMI, T., KAWANO, S., SHIGEMOTO, R. & TOYOSHIMA, K. (2002). Expression of the metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the taste hairs of taste buds in rat gustatory papillae. *Arch Histol Cytol*, 65, 91-6.
- TRANTER, R., READ, J. A., JONES, R. & BRADY, R. L. (2000). Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm beta-acrosin. *Structure Fold Des*, 8, 1179-88.
- TREESUKOSOL, Y., LYALL, V., HECK, G. L., DESIMONE, J. A. & SPECTOR, A. C. (2007). A psychophysical and electrophysiological analysis of salt taste in Trpv1 null mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R1799-809.
- TRIER, J. S., ALLAN, C. H., MARCIAL, M. A. & MADARA, J. L. (1987). Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *Anat Rec*, 219, 69-77.
- TROIANO, L., FUSTINI, M. F., LOVATO, E., FRASOLDATI, A., MALORNI, W., CAPRI, M., GRASSILLI, E., MARRAMA, P. & FRANCESCHI, C. (1994). Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 202, 1315-21.
- TRUBEY, K. R., CULPEPPER, S., MARUYAMA, Y., KINNAMON, S. C. & CHAUDHARI, N. (2006). Tastants evoke cAMP signal in taste buds that is independent of calcium signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C237-44.
- TSIEN, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-44.
- TULSIANI, D. R. & ABOU-HAILA, A. (2008). Male contraception: an overview of the potential target events. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8, 122-31.
- TULSIANI, D. R., NAGDAS, S. K., CORNWALL, G. A. & ORGEBIN-CRIST, M. C. (1992). Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chain(s) on the mouse ZP2 and ZP3. *Biol Reprod*, 46, 93-100.
- TULSIANI, D. R., YOSHIDA-KOMIYA, H. & ARAKI, Y. (1997). Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*, 57, 487-94.
- TURNER, T. T. (1991). Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann N Y Acad Sci*, 637, 364-83.
- VAN DER WEL, H. & LOEVE, K. (1972). Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem*, 31, 221-5.
- VAN GESTEL, R. A., BREWIS, I. A., ASHTON, P. R., BROUWERS, J. F. & GADELLA, B. M. (2007). Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol Hum Reprod*, 13, 445-54.
- VANDENBEUCH, A., CLAPP, T. R. & KINNAMON, S. C. (2008). Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci*, 9, 1.
- VANDERHAEGHEN, P., SCHURMANS, S., VASSART, G. & PARMENTIER, M. (1997). Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics*, 39, 239-46.
- VEITINGER, T., RIFFELL, J. R., VEITINGER, S., NASCIMENTO, J. M., TRILLER, A., CHANDSAWANGBHUWANA, C., SCHWANE, K., GEERTS, A., WUNDER, F., BERNIS, M. W., NEUHAUS, E. M., ZIMMER, R. K., SPEHR, M. & HATT, H. (2011). Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *J Biol Chem*, 286, 17311-25.
- VERON, N., BAUER, H., WEISSE, A. Y., LUDER, G., WERBER, M. & HERRMANN, B. G. (2009). Retention of gene products in syncytial spermatids promotes non-Mendelian inheritance as revealed by the t complex responder. *Genes Dev*, 23, 2705-10.
- VILLANUEVA-DIAZ, C., VADILLO-ORTEGA, F., KABLY-AMBE, A., DIAZ-PEREZ, M. A. & KRIVITZKY, S. K. (1990). Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil Steril*, 54, 1180-2.
- VISCONTI, P. E., BAILEY, J. L., MOORE, G. D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P. & KOPF, G. S. (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121, 1129-37.

- VISCONTI, P. E., KRAPF, D., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., ACEVEDO, J. J. & DARSZON, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 13, 395-405.
- VISCONTI, P. E., MOORE, G. D., BAILEY, J. L., LECLERC, P., CONNORS, S. A., PAN, D., OLDS-CLARKE, P. & KOPF, G. S. (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121, 1139-50.
- VISCONTI, P. E., WESTBROOK, V. A., CHERTIHIN, O., DEMARCO, I., SLEIGHT, S. & DIEKMAN, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol*, 53, 133-50.
- VOGT, P. H. (2004). Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des*, 10, 471-500.
- VON BUCHHOLTZ, L., ELISCHER, A., TAREILUS, E., GOUKA, R., KAISER, C., BREER, H. & CONZELMANN, S. (2004). RGS21 is a novel regulator of G protein signalling selectively expressed in subpopulations of taste bud cells. *Eur J Neurosci*, 19, 1535-44.
- WABERSKI, D., PETROUNKINA, A., WEITZE, K. F. & TOPFER-PETERSEN, E. (1999). [In vitro assessment of semen for the prediction of fertility]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 27, 1-7.
- WALENSKY, L. D. & SNYDER, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol*, 130, 857-69.
- WALKER, W. H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365, 1557-69.
- WANDERNOTH, P. M., RAUBUCH, M., MANNOWETZ, N., BECKER, H. M., DEITMER, J. W., SLY, W. S. & WENNEMUTH, G. (2010). Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One*, 5, e15061.
- WANG, D., KING, S. M., QUILL, T. A., DOOLITTLE, L. K. & GARBERS, D. L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol*, 5, 1117-22.
- WARD, C. R., STOREY, B. T. & KOPF, G. S. (1994). Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem*, 269, 13254-8.
- WASSARMAN, P. M. (1990). Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl*, 42, 79-87.
- WASSARMAN, P. M. & LITSCHER, E. S. (2008a). Mammalian fertilization is dependent on multiple membrane fusion events. *Methods Mol Biol*, 475, 99-113.
- WASSARMAN, P. M. & LITSCHER, E. S. (2008b). Mammalian fertilization: the eggs multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol*, 52, 665-76.
- WATTEL, W. & GEUZE, J. J. (1978). The cells of the rat gastric groove and cardia. An ultrastructural and carbohydrate histochemical study, with special reference to the fibrillovacular cells. *Cell Tissue Res*, 186, 375-91.
- WAYMAN, C., PHILLIPS, S., LUNNY, C., WEBB, T., FAWCETT, L., BAXENDALE, R. & BURGESS, G. (2005). Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res*, 17, 216-23.
- WEISSGERBER, P., KRIEBS, U., TSVILOVSKYY, V., OLAUSSON, J., KRETZ, O., STOERGER, C., VENNEKENS, R., WISENBACH, U., MIDDENDORFF, R., FLOCKERZI, V. & FREICHEL, M. (2011). Male Fertility Depends on Ca²⁺ Absorption by TRPV6 in Epididymal Epithelia. *Sci. Signal.*, 4, ra27-.
- WELLENDORPH, P. & BRAUNER-OSBORNE, H. (2009). Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 156, 869-84.
- WELLENDORPH, P., BURHENNE, N., CHRISTIANSEN, B., WALTER, B., SCHMALE, H. & BRAUNER-OSBORNE, H. (2007). The rat GPRC6A: cloning and characterization. *Gene*, 396, 257-67.
- WELLENDORPH, P., HANSEN, K. B., BALSGAARD, A., GREENWOOD, J. R., EGEBJERG, J. & BRAUNER-OSBORNE, H. (2005). Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-alpha-amino acid receptor with preference for basic amino acids. *Mol Pharmacol*, 67, 589-97.

- WELLENDORPH, P., JOHANSEN, L. D. & BRAUNER-OSBORNE, H. (2009). Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Mol Pharmacol*, 76, 453-65.
- WENNEMUTH, G., CARLSON, A. E., HARPER, A. J. & BABCOCK, D. F. (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development*, 130, 1317-26.
- WESTERGAARD, L., CHRISTENSEN, I. J. & MCNATTY, K. P. (1986). Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during the normal menstrual cycle in women. *Hum Reprod*, 1, 227-32.
- WHITE, D. R. & AITKEN, R. J. (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res*, 22, 163-77.
- WIDMAYER, P., BREER, H. & HASS, N. (2011). Candidate chemosensory cells in the porcine stomach. *Histochem Cell Biol*, 136, 37-45.
- WILLIAMS, G. T., SMITH, C. A., MCCARTHY, N. J. & GRIMES, E. A. (1992). Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol*, 2, 263-7.
- WILLIAMS, M., HILL, C. J., SCUDAMORE, I., DUNPHY, B., COOKE, I. D. & BARRATT, C. L. (1993). Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod*, 8, 2019-26.
- WILLIAMS, Z., LITSCHER, E. S., JOVINE, L. & WASSARMAN, P. M. (2006). Polypeptide encoded by mouse ZP3 exon-7 is necessary and sufficient for binding of mouse sperm in vitro. *J Cell Physiol*, 207, 30-9.
- WITTE, T. S. & SCHAFER-SOMI, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 102, 181-93.
- WOJCIKIEWICZ, R. J. & LUO, S. G. (1998). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Type I, II, and III receptors are differentially susceptible to phosphorylation and are phosphorylated in intact cells. *J Biol Chem*, 273, 5670-7.
- WONG, G. T., GANNON, K. S. & MARGOLSKIE, R. F. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, 381, 796-800.
- WU, S. V., CHEN, M. C. & ROZENGURT, E. (2005). Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat. *Physiol Genomics*, 22, 139-49.
- WU, S. V., ROZENGURT, N., YANG, M., YOUNG, S. H., SINNETT-SMITH, J. & ROZENGURT, E. (2002). Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2392-7.
- XIA, J. & REN, D. (2009). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod*, 80, 1092-8.
- 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. & CONTI, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol*, 296, 353-62.
- XU, H., STASZEWSKI, L., TANG, H., ADLER, E., ZOLLER, M. & LI, X. (2004). Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14258-63.
- YAMAGUCHI, S. & NINOMIYA, K. (2000). Umami and food palatability. *J Nutr*, 130, 921S-6S.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press.
- YANAGIMACHI, R. & CHANG, M. C. (1963). Sperm Ascent through the Oviduct of the Hamster and Rabbit in Relation to the Time of Ovulation. *J Reprod Fertil*, 169, 413-20.
- YANAGIMACHI, R. & USUI, N. (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res*, 89, 161-74.
- YARMOLINSKY, D. A., ZUKER, C. S. & RYBA, N. J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139, 234-44.
- YASUMATSU, K., HORIO, N., MURATA, Y., SHIROSAKI, S., OHKURI, T., YOSHIDA, R. & NINOMIYA, Y. (2009). Multiple receptors underlie glutamate taste responses in mice. *Am J Clin Nutr*, 90, 747S-752S.

- YEUNG, C. H., COOPER, T. G., OBERPENNING, F., SCHULZE, H. & NIESCHLAG, E. (1993). Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol Reprod*, 49, 274-80.
- YOSHIDA, M. & YOSHIDA, K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca^{2+} . *Mol Hum Reprod*, 17, 457-65.
- YOUNG, A., JIANG, M., WANG, Y., AHMEDLI, N. B., RAMIREZ, J., REESE, B. E., BIRNBAUMER, L. & FARBER, D. B. (2011). Specific interaction of Galphai3 with the Oa1 G-protein coupled receptor controls the size and density of melanosomes in retinal pigment epithelium. *PLoS One*, 6, e24376.
- ZAMIR, N., RIVEN-KREITMAN, R., MANOR, M., MAKLER, A., BLUMBERG, S., RALT, D. & EISENBACH, M. (1993). Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 197, 116-22.
- ZENG, X. H., YANG, C., KIM, S. T., LINGLE, C. J. & 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, 5879-84.
- ZENG, Y., CLARK, E. N. & FLORMAN, H. M. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol*, 171, 554-63.
- ZHANG, F., KLEBANSKY, B., FINE, R. M., XU, H., PRONIN, A., LIU, H., TACHDJIAN, C. & LI, X. (2008). Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20930-4.
- ZHANG, L. (2006). Cholinergic Receptor Knockout Mice.
- ZHANG, Y., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., MUELLER, K. L., COOK, B., WU, D., ZUKER, C. S. & RYBA, N. J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112, 293-301.
- ZHANG, Y., MALEKPOUR, M., AL-MADANI, N., KAHRIZI, K., ZANGANEH, M., LOHR, N. J., MOHSENI, M., MOJAHEDI, F., DANESHI, A., NAJMABADI, H. & SMITH, R. J. (2007a). Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet*, 44, 233-40.
- ZHANG, Z., ZHAO, Z., MARGOLSKEE, R. & LIMAN, E. (2007b). The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci*, 27, 5777-86.
- ZHAO, G. Q., ZHANG, Y., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., ERLÉNBAACH, I., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115, 255-66.
- ZHAO, L., BURKIN, H. R., SHI, X., LI, L., REIM, K. & MILLER, D. J. (2007). Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 309, 236-44.
- ZHAO, L., REIM, K. & MILLER, D. (2008). Complexin I deficient sperm are subfertile due to a defect in zona pellucida penetration. *Reproduction*.
- ZIEGLER, A., DOHR, G. & UCHANSKA-ZIEGLER, B. (2002). Possible roles for products of polymorphic MHC and linked olfactory receptor genes during selection processes in reproduction. *Am J Reprod Immunol*, 48, 34-42.
- ZIEGLER, A., KENTENICH, H. & UCHANSKA-ZIEGLER, B. (2005). Female choice and the MHC. *Trends Immunol*, 26, 496-502.
- ZIEGLER, A., SANTOS, P. S., KELLERMANN, T. & UCHANSKA-ZIEGLER, B. (2010). Self/nonself perception, reproduction and the extended MHC. *Self Nonself*, 1, 176-191.
- ZIEGLER, B. L., LAMPING, C., THOMA, S. & THOMAS, C. A. (1992). Single-cell cDNA-PCR: removal of contaminating genomic DNA from total RNA using immobilized DNase I. *Biotechniques*, 13, 726-9.
- ZITRANSKI, N., BORTH, H., ACKERMANN, F., MEYER, D., VIEWIG, L., BREIT, A., GUDERMANN, T. & BOEKHOFF, I. (2010). The "acrosomal synapse": Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa. *Commun Integr Biol*, 3, 513-21.
- ZUCCARELLO, D., FERLIN, A., GAROLLA, A., MENEGAZZO, M., PERILLI, L., AMBROSINI, G. & FORESTA, C. (2011). How the human spermatozoa sense the oocyte: a new role of SDF1-CXCR4 signalling. *Int J Androl*, 34, e554-65.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung eines humanen Spermiums.	1
Abbildung 1.2:	Übersicht über physiologische Aufgaben eines Spermiums im weiblichen Genitaltrakt bis zur Befruchtung einer Eizelle.....	3
Abbildung 1.3:	Molekularer Ablauf der Akrosomreaktion.	10
Abbildung 1.4:	Übersicht über charakteristische Bestandteile des extrazellulären Milieus im weiblichen Genitaltrakt.	12
Abbildung 1.5:	Übersicht über die chemosensorischen Organe einer Maus.....	14
Abbildung 1.6:	Typische Vertreter von Geschmacksstoffen der fünf Basisgeschmacksqualitäten süß, umami, salzig, sauer und bitter.	16
Abbildung 1.7:	Übersicht über das Geschmackssystem der Zunge.	17
Abbildung 1.8:	Potentielle Rezeptormoleküle der Geschmacksqualitäten „salzig“ und „sauer“.	18
Abbildung 1.9:	Schematische Übersicht über G Protein-gekoppelte Geschmacksrezeptoren und ihre möglichen Ligandenbindungsstellen.	20
Abbildung 1.10:	Modell der Signaltransduktion von Tas1- und Tas2-Rezeptoren in Zungengewebe.....	22
Abbildung 3.1:	Schematische Übersicht der Komponenten des Semi-dry Blotting Transfersystems.....	51
Abbildung 3.2:	Morphometrische Untersuchung des Spermienkopfes.....	60
Abbildung 3.3:	Motilitätsparameter der CASA-Messung.	63
Abbildung 3.4:	Coomassie-Färbung von Mausspermien.	66
Abbildung 3.5:	Exemplarische Fura-2 Messung einer Spermien-Zell-Population.	72
Abbildung 3.6:	Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von „BL-IRES mCherry“ unter Kontrolle des Tas1r1-Promotors.	75
Abbildung 3.7:	Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von „BL-IRES-hrGFP“ unter Kontrolle des Tas2r131-Promotors.	76
Abbildung 4.1:	Nachweis der PKD2L1 Antikörperspezifität in der Wallpapille der Maus.	82
Abbildung 4.2:	Immunhistochemische Analyse der PKD2L1 Expression im Hoden.	84
Abbildung 4.3:	Immunhistochemischer Nachweis der PKD2L1 Expression im Nebenhoden.....	85
Abbildung 4.4:	Western Blot Nachweis der PKD2L1 Expression in männlichem Keimdrüsengewebe.	87

Abbildung 4.5:	Analyse der subzellulären Lokalisation des PKD2L1 in murinen Spermien.	89
Abbildung 4.6:	Immunreaktivität des PKD2L1 Z Antiserums in Mausspermien.	90
Abbildung 4.7:	Immuncytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation von α -Gustducin in Säugerspermien.	92
Abbildung 4.8:	Immunhistochemischer Nachweis von α -Gustducin in Wallpapillen von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Mäusen.	95
Abbildung 4.9:	Schematischer Überblick über die Exon-Struktur des α -Gustducins.	97
Abbildung 4.10:	α -Gustducin Immunreaktivität im Hoden von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Mäusen.	98
Abbildung 4.11:	Analyse der Gustducin-Immunreaktivität in Gustducin-KO und Wildtyp-Spermien.	99
Abbildung 4.12:	Western Blot Analyse der α -Gustducin Immunreaktivität im Keimdrüsengewebe von Wildtyp- und Gustducin-defizienten Mäusen.	102
Abbildung 4.13:	Übersicht über nicht im Hoden exprimierte Bitterrezeptoren.	106
Abbildung 4.14:	Ergebnisse der RT-PCR Analysen mit Tas2r116-spezifischen Primerpaaren.	107
Abbildung 4.15:	Nachweis von Bitterrezeptor-Transkripten mit mittlerer bis starker Bandenintensität in RT-PCRs mit cDNA des Maushodens.	109
Abbildung 4.16:	Exemplarische Dokumentation der RT-PCR-Befunde der Bitterrezeptor Subtypen mit schwacher Amplifikationsintensität aus cDNA des Hodens.	111
Abbildung 4.17:	Graphische Darstellung der Sequenzähnlichkeit und Intensität der RT-PCR-Produkte von Tas2-Rezeptoren im Hoden der Maus.	113
Abbildung 4.18:	Immunhistochemische Analyse mit einem anti-Tas2r138 Antikörper.	115
Abbildung 4.19:	Analyse des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP in Wallpapillen.	117
Abbildung 4.20:	Lokalisation des Tas2r131 Expressionsmarkers GFP im Maushoden.	119
Abbildung 4.21:	Analyse der GFP-Lokalisation in verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens einer Tas2r131 GFP Reportermaus.	121
Abbildung 4.22:	Nachweis von GFP in isolierten Spermien von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tas2r131 GFP Reportermausen.	122
Abbildung 4.23:	Morphologie des Hodens von Tas2r131-defizienten Mäusen.	125
Abbildung 4.24:	HE-Färbung des Nebenhodens von Wildtyp-Mäusen und Tas2r131 GFP Reportermausen.	126
Abbildung 4.25:	Analyse der Morphologie der Spermien von Wildtyp- und Tas2r131-defizienten Tieren.	128
Abbildung 4.26:	Auswirkungen der Tas2r131-Defizienz auf das Körpergewicht und die Reproduktionsorgane männlicher Mäuse.	129

Abbildung 4.27: Übersicht über die Keimzellbildung im Hoden heterozygoter Tiere.	132
Abbildung 4.28: Genotyp-Verteilung von Nachkommen Tas2r131-heterozygoter Zuchtpaare.	133
Abbildung 4.29: Vergleich der Spermienmotilität von Tieren mit unterschiedlichem Tas2r131 Genotyp.	135
Abbildung 4.30: Calcium-Ionophor induzierte Akrosomreaktion in Wildtyp- und Tas2r131-defizienten Spermien.	138
Abbildung 4.31: Spontane Exocytoserate in Mausspermien verschiedener Tas2r131 Genotypen.	139
Abbildung 4.32: RT-PCR Analyse zum Nachweis der Expression von Tas1r-Transkripten im Hoden der Maus.	141
Abbildung 4.33: Immunhistochemischer Nachweis des Tas1r3 Proteins in der Wallpapille der Maus.	143
Abbildung 4.34: Immunhistochemische Analyse der Tas1r3 Expression im murinen Hoden.	144
Abbildung 4.35: Immunhistochemische Analyse der Tas1r3 Expression im Nebenhoden der Maus.	145
Abbildung 4.36: Immuncytochemischer Nachweis des Tas1r3 Proteins in Mausspermien.	146
Abbildung 4.37: Analyse der subzellulären Lokalisation des Tas1r3 Rezeptors in Spermien der Maus.	147
Abbildung 4.38: Immunhistochemische Analyse der Tas1r3 Expression im Geschmacksgewebe der Ratte.	148
Abbildung 4.39: Immunhistochemischer Nachweis des Tas1r3 Proteins im Rattenhoden.	149
Abbildung 4.40: Analyse der Tas1r3 Expression und Lokalisation in Spermien der Ratte.	150
Abbildung 4.41: Kontrolle der Spezifität von humanen Tas1r Antikörpern im Western Blot.	154
Abbildung 4.42: Immuncytochemische Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Tas1r1 Rezeptors in humanen Spermien.	155
Abbildung 4.43: Western Blot Analyse der Tas1r1 Expression in humanen Spermien und transfizierten HEK293-Zellen.	157
Abbildung 4.44: Expressionsanalyse des Tas1r2 in humanen Spermien.	158
Abbildung 4.45: Immuncytochemische Analyse der Tas1r3 Expression in humanen Spermien.	159
Abbildung 4.46: Nachweis des Tas1r3 Proteins in Membranpräparationen humaner Spermien.	160
Abbildung 4.47: Nachweis des Tas1r1 Reporterproteins mCherry und des Tas1r3 Rezeptorproteins in Pilzpapillen.	163

Abbildung 4.48: Analyse der mCherry-Fluoreszenz im Hoden der Tas1r1 mCherry Maus.....	164
Abbildung 4.49: Co-Färbung von Tas1r3 und mCherry im Hoden Tas1r1-defizienter Tiere.	165
Abbildung 4.50: Analyse der mCherry Lokalisation während der Spermienreifung im Nebenhoden.	167
Abbildung 4.51: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Spermien der Tas1r1 mCherry Reportermauslinie.....	168
Abbildung 4.52: Histologische Analyse der Hodenmorphologie von Tas1r1-defizienten Mäusen.	171
Abbildung 4.53: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis apoptotischer Zellen im Maushoden mit Hilfe der TUNEL-Färbung.	173
Abbildung 4.54: Quantitativer Vergleich der Apoptose im Hoden von Mäusen mit unterschiedlichem Tas1r1 Genotyp.	174
Abbildung 4.55: Morphometrischer Vergleich von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Spermien.	176
Abbildung 4.56: Fluorimetrische Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Spermien nach Stimulation mit Glutamat.....	179
Abbildung 4.57: Einzelzellmessung des Ca^{2+} -Signals in Spermien nach einer Stimulation mit Glutamat und dem Umami Enhancer IMP.....	181
Abbildung 4.58: Verlauf der Cholesterol-Auslagerung während der Kapazitierung von Spermien mit unterschiedlichem Tas1r1 Genotyp.....	183
Abbildung 4.59: Analyse der Akrosomreaktion von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Tieren nach Stimulation mit A23187 und <i>Zona pellucida</i>	185
Abbildung 4.60: Vergleich der spontanen Akrosomreaktionsrate in Spermien von Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Mäusen.	186
Abbildung 4.61: Untersuchung der Wirkung von Glutamat auf die Akrosomreaktion in Tas1r1-defizienten und Wildtyp-Spermien.....	187
Abbildung 4.62: Effekt von Süßsubstanzen auf die Akrosomreaktion.....	188
Abbildung 4.63: Vergleich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in unkapazitierten Spermien von Wildtyp- und Tas1r1 <i>Knockin</i> -Tieren.....	189
Abbildung 4.64: Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen in Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren nach der Kapazitierung.....	190
Abbildung 4.65: Übersicht über basale Ca^{2+} -Konzentrationen in Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren.	191
Abbildung 4.66: Basale cAMP-Konzentration in Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Spermien in Abhängigkeit vom Kapazitierungsstatus.....	192
Abbildung 4.67: Vergleich der basalen cAMP Konzentration in Spermien verschiedener Tas1r1 Genotypen.....	193
Abbildung 4.68: Vergleich der nach PDE-Inhibition durch IBMX akkumulierten cAMP-Menge in Spermien verschiedener Tas1r1 Genotypen.	194

Abbildung 4.69:	Effekt von Mononatriumglutamat auf die cAMP-Konzentration in Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Spermien.	195
Abbildung 5.1:	Übersicht über den Expressionsnachweis verschiedener gustatorischer Rezeptormoleküle im männlichen Reproduktionssystem.	197
Abbildung 5.2:	Übersicht über den Reproduktionsphänotyp Tas1r1-defizienter Mäuse.	200
Abbildung 5.3:	Hypothetisches Modell der Signaltransduktion von Tas1-Rezeptoren in Spermien von Wildtyp- und Tas1r1-defizienten Tieren.....	202
Abbildung 5.4:	Schematische Übersicht über promiskuitive Aminosäurerezeptoren der Klasse C GPCRs.....	206
Abbildung 5.5:	Schematische Übersicht über potentielle Funktionen von Tas1-Rezeptoren in männlichen Keimzellen im weiblichen Genitaltrakt.	208
Abbildung 5.6:	Hypothetisches Modell der Expression von Bitterrezeptoren in männlichen Keimzellen und daraus resultierende putative Spermienpopulationen.	212
Abbildung 5.7:	Mögliche physiologische Rolle von Bitterrezeptoren für die Bildung und Funktion männlicher Keimzellen.	215
Abbildung 5.8:	Hypothetisches Modell der PKD2L1-Funktion in Spermien.	219

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Temperaturprogramm der Genotypisierungs-PCR der Tas1r1 mCherry und der Tas2r131 GFP Mauslinien.....	78
Tabelle 3.2:	Temperaturprogramm zur Genotypisierung der Gustducin-defizienten Mauslinie	78
Tabelle 4.1:	Analyse der Fertilität von α -Gustducin-defizienten Mäusen	96
Tabelle 4.2:	Übersicht über Proteine mit Homologie zum immunogenen Peptid der verwendeten Gustducin-Antiseren.	101
Tabelle 4.3:	Übersicht über die Amplifikation von Bitterrezeptor-Transkripten aus murinem Hodengewebe mittels RT-PCR.....	108
Tabelle 4.4:	Fertilität von Tas2r131-defizienten Mäusen	130
Tabelle 4.5:	Analyse der Fertilität von Tas1r1-defizienten Mäusen	169
Tabelle 4.6:	Genotyp-Verteilung der Nachkommen von Tas1r1-heterozygoten Zuchttieren.....	170
Tabelle 4.7:	Effekt des Tas1r1 Genotyps auf die männlichen Reproduktionsorgane der Maus	175
Tabelle 4.8:	CASA-Analyse der Motilität von Tas1r1-defizienten Spermien	177

8.3 Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AE	arbiträre Einheiten
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CASA	<i>computer assisted semen analysis</i>
cDNA	komplementäre DNA
CV	Circumvallate Papille (Wallpapille)
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerin
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	desoxy-Nukleotid-5'-triphosphat
dUTP	desoxy-Uridin-triphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EIA	Enzym-Immunassay
ER	endoplasmatische Retikulum

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor (G protein coupled receptor)
GTP	Guanosintriphosphat
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobuline
IMP	Inosinmonophosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-thio-galactosid
Ki	<i>Knockin</i>
KO	<i>Knockout</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
M	molar
mA	Milliampère
mAC	membranständige Adenylylcyclase
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NBT	Nitroblue Tetrazolium-chlorid
NGS	Normales Ziegen Serum (normal goat serum)

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
nM	nanomolar
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKD	<i>Polycytic kidney disease</i>
PLC	Phospholipase C
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>) [Vielfache der Gravitationskonstante von 9,81 m/s ²]
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
sAC	lösliche Adenylylcyclase (<i>soluble adenylate cyclase</i>)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate poly-acrylamid gel-electrophoresis</i>
sNHE	<i>sperm Na⁺/H⁺ exchanger</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
s. u.	siehe unten
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
TRP	<i>transient receptor potential channel</i>
U	units
u. a.	und andere
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNO	Vomeronasales Organ
VFT	<i>venus flytrap</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZP	<i>Zona pellucida</i>

8.4 Publikationsverzeichnis

ORIGINALARBEITEN

Meyer D, Voigt A, Widmayer P, Borth H, Huebner S, Breit A, Marschall S, Hrabé de Angelis M, Boehm U, Meyerhof W, Gudermann T, Boekhoff I (2012). *Expression of Members of the Tas1 Family of Taste Receptors in Mammalian Spermatozoa: Functional role of Tas1R1 in regulating basal Ca²⁺ and cAMP levels in spermatozoa*. PLoS One, 7, e32354

Fehr J*, **Meyer D***, Widmayer P, Borth HC, Ackermann F, Wilhelm B, Gudermann T and Boekhoff I (2007). *Expression of the G-protein alpha-subunit gustducin in mammalian spermatozoa*. J Comp Physiol A 193: 21-34, * *Erstautoren*

Heydecke D*, **Meyer D***, Ackermann F, Wilhelm B, Gudermann T and Boekhoff I (2006). *The multi PDZ domain protein MUPP1 as a putative scaffolding protein for organizing signaling complexes in the acrosome of mammalian spermatozoa*. J Androl 27: 390-404, * *Erstautoren*

Deacon RM, Brook RC, **Meyer D**, Haeckel O, Ashcroft FM, Miki T, Seino S and Liss B (2006). *Behavioral phenotyping of mice lacking the K ATP channel subunit Kir6.2*. Physiol Behav 87: 723-33

Butscheid Y, Chubanov V, Steger K, **Meyer D**, Dietrich A and Gudermann T (2006). *Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly is a plasma membrane protein of mouse sperm head*. Mol Reprod Dev 73: 350-60

ÜBERSICHTSARTIKEL

Zitranski N, Borth H, Ackermann F, **Meyer D**, Vieweg L, Breit A, Gudermann T and Boekhoff I (2010). *The “acrosomal synapse”: Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa*. Communicative & Integrative Biology (CIB) Volume 3, Issue 6

TAGUNGSBEITRÄGE

D. Meyer, A. Voigt, P. Widmayer, H. Borth, A. Breit, U. Boehm, T. Gudermann, W. Meyerhof, I. Boekhoff. *Expression of Tas1 Taste Receptors in Mammalian Spermatozoa: Functional role of Tas1r1 in regulating basal Ca^{2+} and cAMP concentrations in spermatozoa*. 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), Stockholm, Schweden (2012)

D. Meyer, A. Voigt, P. Widmayer, H. Borth, S. Huebner, A. Breit, S. Marschall, M. Hrabé de Angelis, U. Boehm, W. Meyerhof, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of Members of the Tas1 Family of Taste Receptors in Mammalian Spermatozoa*. 1st International Caesar Conference "Sperm signaling and motility", Bonn (2011)

D. Meyer, H. Borth, P. Widmayer, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of Tas1R taste receptor subtypes in mammalian spermatozoa*. 20th congress of the European Chemoreception Research Organization (ECRO), Avignon, Frankreich (2010)

H. Borth, **D. Meyer**, P. Widmayer, J. Gabler, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Receptors of pheromone sensing cells are also expressed in mouse spermatozoa*. 50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (2009)

H. Borth, **D. Meyer**, A. Wagner, J. Fehr, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Sensory G protein subtypes in mammalian spermatozoa*. 49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (2008)

H. Borth, **D. Meyer**, A. Wagner, J. Fehr, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Sensory G protein subtypes in mammalian spermatozoa*. Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Marburg (2008)

D. Meyer, J. Fehr, H. Borth, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann and I. Boekhoff. *G Protein subtypes in mammalian spermatozoa: Expression profile of α -Gustducin and associated $G\beta\gamma$ subunits*. 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (2007)

D. Meyer, J. Fehr, H. Borth, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann and I. Boekhoff. *G Protein subtypes in mammalian spermatozoa: Expression profile of α -Gustducin and associated $G\beta\gamma$ subunits*. 51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Salzburg, Österreich (2007)

D. Meyer, J. Fehr, H. Borth, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of the G Protein α -Subunit Gustducin in Mammalian Spermatozoa*. Europäische Gesellschaft für Endokrinologie, Budapest, Ungarn (2007)

D. Meyer, J. Fehr, H. Borth, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of the G Protein α -Subunit Gustducin in Mammalian Spermatozoa*. 28th annual meeting of the Association for Chemoreception Sciences (ACHems), Sarasota, Florida, USA (2006)

F. Ackermann, **D. Meyer**, D. Heydecke, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The Multi PDZ domain protein MUPP1 at the acrosome of vertebrate spermatozoa*. 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (2006)

D. Meyer, J. Fehr, H. Borth, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of the G Protein α -Subunit Gustducin in Mammalian Spermatozoa*. 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (2006)

F. Ackermann, **D. Meyer**, D. Heydecke, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The Multi PDZ Domain Protein MUPP1 as a Putative Scaffolding Protein for Organizing Signaling Complexes in the Acrosome of Mammalian Spermatozoa*. Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Braunschweig (2006)

J. Fehr, **D. Meyer**, H. Borth, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of the G Protein α -Subunit Gustducin in Mammalian Spermatozoa*. Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Braunschweig (2006)

D. Meyer, J. Fehr, H. Borth, F. Ackermann, P. Widmayer, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *Expression of the G Protein α -Subunit Gustducin in Mammalian Spermatozoa*. 17th congress of the European Chemoreception Research Organization, Granada, Spanien (2006)

D. Heydecke, **D. Meyer**, Frauke Ackermann, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The Multi PDZ Domain Protein MUPP1 at the Acrosome of Vertebrate Spermatozoa*. 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (2005)

D. Heydecke, **D. Meyer**, Frauke Ackermann, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The PDZ Domain Protein MUPP1 is expressed in Spermatozoa of Vertebrates*. 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Münster (2005)

D. Heydecke, **D. Meyer**, Frauke Ackermann, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The PDZ Domain Protein MUPP1 is expressed in Spermatozoa of Vertebrates*. 25th Blankenese Conference "Signalling in Sensory Systems", Hamburg (2005)

F. Ackermann, D. Heydecke, **D. Meyer**, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The Multi PDZ Domain Protein MUPP1 as a Scaffolding Protein for Organizing Signaling Complexes in Mammalian Spermatozoa*. Europäische Gesellschaft für Endokrinologie, Göteborg, Schweden (2005)

F. Ackermann, D. Heydecke, **D. Meyer**, B. Wilhelm, T. Gudermann, I. Boekhoff. *The Multi PDZ Domain Protein MUPP1 as a Scaffolding Protein for Organizing Signaling Complexes in Mammalian Spermatozoa*. Konferenz "Cell-Cell interaction in reproduction", Gießen (2005)

H.-J. Müller, **D. Meyer**, J. Beck, B. Metzner, K. H. Röhm. *Phage Display Epitope Mapping of the E.coli Asparaginase Protein for Epitopes Relevant in Hypersensitivity Reactions of Adult Patients Treated with PEG-Asparaginase for Acute Lymphatic Leukemia (ALL)*. 45th Annual Meeting American Society of Hematology, San Diego, Kalifornien, USA (2003)

PATENTANMELDUNG

DE 10 2005 028 453.1: Verfahren zur Bestimmung und Beeinflussung der Fertilität männlicher Säugetiere und des Menschen,
T. Gudermann, I. Boekhoff, **D. Meyer**

8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei ALLEN bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Thomas Gudermann für die Möglichkeit, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Marburg bzw. München meine Dissertation anfertigen zu können und dafür, dass er die Begutachtung dieser Arbeit übernommen hat.

Bei meinen unbekannten Zweitgutachtern möchte ich mich für ihre Mühe bei der Begutachtung bedanken.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Ingrid Boekhoff für die intensive und sehr gute Betreuung meiner Dissertation, die große Unterstützung, unsere vielen Diskussionen, ihre Begeisterung und ihr stetiges Fordern und Fördern. Ich habe wissenschaftlich und persönlich wahnsinnig viel von ihr gelernt. Danke Ingrid!

Bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich mich für die finanzielle und ideelle Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanken.

Bei Prof. W. Meyerhof vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Anja Voigt und Sandra Hübner, sowie bei Dr. U. Böhm (ZMNH, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) möchte ich mich für die Bereitstellung der Tas1r1 mCherry und der Tas2r131 GFP Mauslinien und die vielen hilfreichen Tipps und Diskussionen bedanken. Prof. G. Aumüller (Philipps-Universität Marburg), PD B. Wilhelm (Philipps-Universität Marburg) und Prof. A. Mayerhofer (LMU München) möchte ich für ihre Hilfe bei reproduktionsbiologischen Fragen, ganz besonders bei den morphologischen Analysen danken. Ich danke auch Frau Dr. Susan Marschall am Helmholtz Zentrum München für die Durchführungen der CASA-Messungen. Mein Dank gilt außerdem Dr. Patricia Widmayer (Universität Hohenheim) für ihre Unterstützung bei immunhistochemischen und *in situ* Analysen sowie ihre Begeisterung und interessante wissenschaftliche Diskussionen. Für die Bereitstellung von Plasmiden, Antikörpern, Primern und KO-Mäusen möchte ich mich zudem bei H. Breer (Universität Hohenheim), B. Buße (Universität des Saarlandes), R. Margolskee (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, USA), H. Matsunami (Duke University, Durham, USA), D. Reed (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, USA), H. Schmale (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), K. Schwarzenbacher (Helmholtz Zentrum München) und C. Zuker (Columbia University, New York, USA) bedanken.

Ein weiteres dickes Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie sowohl in Marburg als auch in München. Dabei geht ein ganz besonderer Dank an Dr. Hermann Kalwa, für seine wahnsinnige Hilfsbereitschaft, seine vielen tollen Ideen, unzählige wissenschaftliche Diskussionen, seine stetige Unterstützung, viele gemeinsame Abende, seine Freundschaft und seinen unerschütterlichen Glauben an mich und meine Fähigkeiten. Danke außerdem, dass ich dir und Fabienne beim Umzug helfen durfte! Dr. Andreas Breit und Dr. Thomas Büch möchte ich für vielfältige wissenschaftliche Diskussionen und Impulse danken. Mein Dank gilt außerdem den guten Seelen des Labors Marga Losekam und Heinz Janser sowie dem Tierstall-Team in München Petra Eigner, Sandra Barfuß und Brigitte Mayerhofer für ihre tolle Hilfe und Unterstützung.

Ein riesiges Dankeschön von ganzem Herzen geht an die „Spermien-Mädels“. Besonderen Dank für ihre unschätzbare fachliche und persönliche Unterstützung, stetige Aufmunterung und Freundschaft schulde ich Heike Borth und Nele Zitranski. Aber auch bei Lilli Arndt, Laura Vieweg, Andrea Wartenberg, Frauke Ackermann, Shu-An Liu und Franziska Henze sowie Ellen Damm und Jürgen Solinski („Spermien-Mädels ehrenhalber“) möchte ich mich für die schöne Zeit, die wir miteinander hatten, die viele experimentelle Hilfe und intensive Diskussionen, Korrekturen und Ermunterungen sowie unzählige Kaffeepausen (auch bei schleimigem Kuchen ganz ohne Murren) bedanken. Ihr habt alle dazu beigetragen, dass das Labor ein bisschen „Zuhause“ wurde.

Ganz besonders möchte ich meiner ganzen Familie danken. Dabei geht ein riesiges Dankeschön an meine Eltern Doris und Alard Meyer, die mich immer ganz selbstverständlich und uneingeschränkt unterstützt haben und mir die Sicherheit geben, dass ich jederzeit nach Hause kommen kann! Danke!

Der größte Dank geht an meinen Freund Carsten Wilmskötter für seine Unterstützung, Ermunterung, Motivation, Aufheiterung, Geduld und Leidenschaft während meiner Doktorarbeit, vor allem aber für seine Liebe. Danke!