

Johannes Solzin: Chemotaxis von Seeigel-Spermien - kinetische Messungen intrazellulärer Botenstoffe. 2002

Das Eizell-Peptid Resact wirkt chemotaktisch auf Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata*. Resact bindet an eine membranständige Rezeptor- Guanylylzyklase auf dem Spermienflagellum und aktiviert so eine Signalkaskade. Dies führt dazu, dass in dem Spermium u.a. die cGMP-/cAMP- Konzentration, die Ca²⁺-Konzentration, sowie der pH-Wert ansteigen. Die zeitliche Abfolge und damit die kausalen Zusammenhänge der einzelnen physiologischen Reaktionen waren bisher unbekannt. Aus diesem Grund verwendete ich die Quenched-Flow- und die Stopped-Flow-Methode um die einzelnen Reaktionen zeitlich aufgelöst - d.h. im Millisekunden-Maßstab - zu messen. Durch diese Methoden war es erstmals möglich die zeitliche Abfolge der einzelnen Reaktionen zu bestimmen. Die Messungen zeigen, dass hohe Resact-Konzentrationen einen extrem schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration induzieren. Die cGMP- Konzentration steigt innerhalb der ersten 25 ms an und erreicht ihren halbmaximalen Wert schon nach ca. 200 ms. Während schon picomolare Resact-Konzentrationen einen Anstieg der cGMP-Konzentration auslösen, steigt die cAMP-Konzentration erst bei nanomolaren Resact-Konzentrationen an. Der cAMPAnstieg ist, verglichen mit dem cGMP-Anstieg, wesentlich kleiner und langsamer. Ungefähr 250 ms nach der Resact-Stimulation beginnt der Ca²⁺-Einstrom. Dieser besteht aus einem "frühen" und einem "späten" Ca²⁺-Signal. Das frühe Ca²⁺-Signal kann schon durch einzelne Resact-Moleküle ausgelöst werden. Im Gegenteil zum späten Ca²⁺-Signal, findet das frühe Ca²⁺-Signal zeitgleich mit der Resact-induzierten Änderung der Schwimmverhaltens statt. Das frühe Ca²⁺-Signal stellt daher die zentrale Reaktion in der Resact-induzierten Signalkaskade dar. Experimente mit caged-cGMP bzw. caged-cAMP zeigen, dass das frühe Ca²⁺-Signal durch den cGMP-Anstieg ausgelöst wird: Der cGMP- induzierte Ca²⁺-Einstrom ist dem frühen Ca²⁺-Signal sehr ähnlich, der cAMP- induzierte Ca²⁺-Einstrom nicht. Sowohl das späte Ca²⁺-Signal als auch der cAMP-Anstieg werden nur durch hohe Resact-Konzentrationen ausgelöst und sind - zumindest in Gegenwart von IBMX - langsamer als das frühe Ca²⁺- Signal. Dies deutet darauf hin, dass der cAMP-Anstieg den späten Ca²⁺- Einstrom auslöst. An Hand der lag-Zeit des Ca²⁺-Einstroms konnte man erkennen, dass weder cGMP noch cAMP direkt einen Ca²⁺-Kanal öffnen. Über welchen Mechanismus der Ca²⁺-Einstrom erfolgt, ist unbekannt. Das pH-Signal reagiert, wie das Ca²⁺-Signal, auf Resact-Konzentrationen über mehr als 6 Größenordnungen. Die lag-Zeit des pH-Signals ist nur bei hohen Resact-Konzentrationen kürzer als die des Ca²⁺-Signals. Bei niedrigen Resact-Konzentrationen beginnt das pH-Signal nach dem frühen Ca²⁺-Einstrom. Dieses Ergebnis zeigt, dass der pH-Anstieg nicht den Ca²⁺-Einstrom aktiviert. Des Weiteren wurde mit der Quenched-Flow-Methode gezeigt, dass das Eizellpeptid Asterosap in *Asterias amurensis*-Spermien einen extrem schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration auslöst, während es zu keinem cAMP-Anstieg kommt. Diese Messungen unterstützen andere Messungen, die zeigten, dass der Rezeptor für Asterosap - wie der Resact-Rezeptor - eine GC ist.

The egg-peptide resact induces a chemotactical response of sperm from sea urchin *Arbacia punctulata*. By binding to a receptor-guanylyl cyclase on the flagellar membrane resact activates a signaling-cascade. This leads to an increase in cGMP-/cAMP-concentration, Ca²⁺-concentration and pH. The sequence and thereby the causal relations of the single physiological reactions were unknown before. In order to reveal the sequence of the signaling events I have established two methods which allowed time-resolved measurements (e.g. in millisecond time-scale) of the physiological reactions. The quenched-flow-method was used to detect the time-course of the cGMP-/cAMP-concentration. Therefore it was combined with cGMP-/cAMP- sensitive Radioimmunoassays. The stopped-flow-method was used to record the timecourse of the Ca²⁺- or pH-sensitive fluorescence-indicators. Both methods enabled me to measure for the first time the sequence of the physiological reactions. The measurements showed, that resact induces a fast and high increase of the cGMP-concentration. The cGMP-concentration starts rising within the first 25 ms and reaches its

half-maximal concentration within 200 ms. A cGMP-increase is already induced at picomolar resact-concentrations whereas a cAMP-increase is only induced by nanomolar resact-concentrations. Furthermore the cAMP-increase is slighter and slower compared to the cGMP-increase. Around 250 ms after the stimulation with resact the Ca²⁺-concentration increases. This Ca²⁺-signal can be divided in an "early" and a "late" Ca²⁺-signal. While the early Ca²⁺-signal can be already triggered by single resact-molecules the late Ca²⁺-signal is less sensitive to the eggpeptide. The early Ca²⁺-signal is either directly or through other signaling events triggered by cGMP. The cAMP-increase is - at least in the presence of the PDE-inhibitor IBMX - slower than the late Ca²⁺-signal. Therby cAMP could only trigger the late Ca²⁺-signal. In contrast to the late Ca²⁺-signal the early Ca²⁺-signal is induced at the same time as the resact-induced change of the swimming-behavior. Thus the early Ca²⁺-signal represents the crucial reaction in the resact-induced signaling-cascade. Like the early Ca²⁺-signal, the pH responds to resact-concentrations over more than 6 orders of magnitude. The delay of the pH-change is only at high resact-concentrations faster than the delay of the Ca²⁺-signal. At low resact-concentrations the pH increases after the Ca²⁺-concentration. Contrary to other publications, this results shows that the pH-increase does not trigger the Ca²⁺-increase. Quenched-flow-measurements on sperm of the starfish *Asterias amurensis* showed that the egg-peptide asterosap induces an extremely fast and high cGMP-increase, whereas no change in cAMP-concentration can be measured. These results supports the ideas that the receptor of asterosap is - like the resact-receptor - a guanylylcyclase and that cAMP seems to be unimportant for fast chemotactical responses.