

Zusammenfassung

Spermien orientieren sich, um für die Befruchtung zur Eizelle zu gelangen, in einem chemischen Gradienten von Faktoren, die von der Eizelle freigesetzt werden. Diesen Orientierungsprozess nennt man Chemotaxis. Für Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata* ist der Faktor das Peptid Resact. Resact bindet an eine Rezeptor-Guanylylzyklase (GC), die daraufhin cGMP synthetisiert. Der Anstieg der cGMP-Konzentration führt direkt oder indirekt dazu, dass Ca^{2+} -Kanäle öffnen. In dieser Arbeit habe ich die GC biochemisch und funktionell charakterisiert, sowie erste Versuche zur Adaptation der Spermien durchgeführt.

Bisher wurde angenommen, dass die GC in Spermien von *A. punctulata* mit einer Dichte von ~ 400 GC-Molekülen/ μm^2 im Flagellum des Spermiums vorkommt. Ich habe mit zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen eine GC-Dichte von ~ 4.700 (densitometrische Auswertung von Coomassie-gefärbten Proteingelen) bzw. ~ 11.000 GC-Molekülen/ μm^2 (Bindestudien) nachgewiesen. Die GC-Dichte wurde also um das 12 bis 24-fache unterschätzt. Des Weiteren konnte ich durch Vernetzungsexperimente zeigen, dass die funktionelle Einheit der GC ein Trimer aus drei GC-Untereinheiten ist. Die Bindestudien zeigen, dass die Bindung von Resact an das Trimer mit negativer Kooperativität erfolgt. Dies ermöglicht der GC auf Resactkonzentrationen über einen Konzentrationsbereich von mehr als 4 Größenordnungen zu reagieren. Anhand der GC-Dichte, der Affinität für Resact und der cGMP-Bestimmung in *Quenched-Flow* Experimenten wurde eine Syntheserate für die aktivierte GC von 4 bis 5 cGMP/GC s^{-1} bestimmt. Diese Syntheserate ist deutlich höher als bisher angenommen und entspricht in etwa der Syntheserate der GC-E aus Sehstäbchen. Die von mir bestimmte Syntheserate reicht theoretisch aus, um die Ca^{2+} -Antwort des Spermiums auf die Bindung eines einzigen Resactmoleküls auszulösen.

Signalwege müssen nicht nur an- sondern auch abgeschaltet werden. Dies geschieht meist auf mehreren Ebenen des Signalweges. Ich konnte zeigen, dass die GC, als erste Komponente des Signalweges, durch Dephosphorylierung mit einer Halbwertszeit von ~ 200 ms inaktiviert wird. Erste Experimente zur Adaptation von Spermien zeigen unerwartete und interessante Ergebnisse: Auf Hintergrundkonzentrationen von etwa 0,005 bis 5 nM Resact ist das Resact-induzierte Ca^{2+} -Signal (Testreiz) - im Vergleich zu Kontrolle - größer. Die Spermien reagieren also empfindlicher. Der Grad der Empfindlichkeit nimmt dabei mit der Konzentration des Testreizes zu. Erst bei sehr hohen Hintergrundkonzentrationen (> 5 nM) werden die Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale kleiner. Die Spermien desensibilisieren.