

Cystein-reiche sekretorische Proteine  
(CRISPs) des männlichen Genitaltrakts  
von Pferd und Schwein

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl. Biochemikerin Alexandra Schambony  
geboren am 10.12.1970 in Fulda

1999

Referent: Prof. Dr. J. Alves  
Koreferent: Prof. Dr. E. Töpfer-Petersen

Tag der Promotion: 11.02.1999  
Datum der Veröffentlichung: 03.03.1999

## Zusammenfassung

Bei Säugern wurden bislang drei Formen der Cystein-reichen sekretorischen Proteine (CRISPs), CRISP-1, CRISP-2 und CRISP-3, identifiziert. CRISP-1 und CRISP-2 werden überwiegend im männlichen Genitaltrakt exprimiert, während CRISP-3 in verschiedenen Geweben und Zellen nachgewiesen wurde. CRISPs besitzen 16 konservierte Cysteinreste, die überwiegend in der C-terminalen Hälfte der Proteinsequenz lokalisiert sind. Funktionelle Untersuchungen an der Ratte zeigen, daß CRISP-2 an der Spermatogenese und CRISP-1 an der Gametenfusion beteiligt ist.

Die Identifizierung eines equinen Seminalplasmaproteins als Mitglied der CRISP-Familie eröffnete die Möglichkeit diese fertilitätsrelevanten Proteine näher zu untersuchen. Die Identifizierung und Sequenzierung von drei equinen und zwei porcinen CRISPs zeigte, daß diese Proteine in weiten Bereichen mit ihren Homologen aus anderen Säugerspezies identisch sind. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß CRISP-1 und CRISP-2 im männlichen Genitaltrakt nicht wie bisher angenommen auf den Nebenhoden bzw. Hoden beschränkt sind. Beide Proteine werden in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen transkribiert, CRISP-2 darüberhinaus auch im Nebenhodenkopf.

Das im equinen Seminalplasma vorkommende Protein konnte durch massenspektrometrische Analyse seiner Peptide als CRISP-3 identifiziert werden. Die leichte Zugänglichkeit großer Mengen dieses Proteins gab die Möglichkeit zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung. Equines CRISP-3 ist ein lösliches monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kD. Die 16 Cysteinreste bilden acht Disulfidbrücken, die das wichtigste strukturgebende Element des Proteins darstellen. CRISP-3 besitzt wie alle CRISPs keinerlei hydrophobe oder zur Interaktion mit Phospholipidmembranen geeignet erscheinende Domäne. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß equines CRISP-3 in vitro mit Phospholipidvesikeln wechselwirkt.

Auch bei Pferd und Schwein konnte, wie für andere Spezies beschrieben wurde, eine Assoziation der CRISPs an die Spermatozoen nachgewiesen werden, deren Mechanismus allerdings noch unklar ist. Eine direkte Interaktion mit den Phospholipiden scheint jedoch möglich. Eine Beteiligung an der Spermatogenese und der Gametenfusion ist damit prinzipiell möglich. Die Bedeutung von CRISPs für die Fruchtbarkeit wird durch die Quantifizierung der spermiengebundenen CRISPs bei 12 verschiedenen Hengsten deutlich. Die pro Spermium bestimmte Menge CRISPs korreliert sehr gut mit der Fertilität der Tiere. Damit könnten CRISPs als Marker für die Fertilität von Zuchttieren geeignet sein.

Auch equines CRISP-3 scheint eine Rolle beim Befruchtungsvorgang zu spielen. CRISP-3 bindet an ein sekretorisches Protein des Endometriums, p19. Dieses Protein der Lipocalin-Familie ist sehr wahrscheinlich an der frühen Embryonalentwicklung beteiligt. CRISP-3 könnte im Komplex mit p19 sowohl zum Zeitpunkt der Besamung als auch nach der Befruchtung eine möglicherweise regulatorische Funktion haben.

Die Klärung der Funktion von CRISPs bei der Befruchtung bedarf weiterer Untersuchungen. Mit der Identifizierung der equinen und porcinen CRISPs eröffnet sich die Möglichkeit diese Proteine an Haus- und Nutztieren mit gut untersuchter Reproduktionsbiologie weiter zu erforschen.

**Schlagworte:** CRISP, männlicher Genitaltrakt, Befruchtung

## Abstract

In mammals, three forms of CRISPs, referred to as CRISP-1, CRISP-2, and CRISP-3, have been identified. CRISP-1 and CRISP-2 are expressed predominantly in the male genital tract, but CRISP-3 has been detected in a variety of tissue and cell types. CRISPs are characterized by 16 conserved cysteine-residues, 14 of them located in the c-terminal half of the protein. Studies on the rat CRISPs indicate that CRISP-2 seems to be involved in spermatogenesis while CRISP-1 is thought to play a role in gamete fusion.

The identification of an equine seminal plasma protein as a new member of the CRISP family has been the basis of further studies on these fertility related proteins. Sequencing of three equine and two porcine CRISPs revealed a high degree of homology to the known mammalian CRISPs, particularly to the human homologues. In the equine and porcine male genital tract the expression of CRISP-1 and CRISP-2 is not restricted to the epididymis and the testis. Expression of both proteins in accessory sexual glands, and of CRISP-2 in caput epididymis could be detected.

The seminal plasma protein of the horse has been identified as CRISP-3 by mass spectrometry and peptide mapping. The secretion of this protein in seminal plasma allowed isolation of considerable amounts followed by biochemical and biophysical characterization. Equine CRISP-3 is a soluble monomeric 25 kDa protein. All 16 cysteine-residues are engaged in 8 disulphide bridges which seem to be a main structural feature of the protein. Although CRISP-3, like the other CRISPs, contains no hydrophobic or lipid-binding domains, the protein does interact with phospholipid vesicles in vitro.

Equine and porcine CRISPs associate with the sperm plasma membrane, as demonstrated for rat mouse and human CRISPs before. Although the mechanism of membrane interaction is not known yet, an association with the phospholipid bilayer seems possible. The presence of CRISPs on the head of acrosome reacted spermatozoa, as demonstrated, is a prerequisite for participation in gamete fusion. A critical role of CRISPs in fertilization is supported further by the fact that the amount of sperm bound CRISPs of stallion spermatozoa shows a strong correlation to the fertility of the stallion as judged by statistics from artificial insemination obtained during the breeding season. These results indicate that CRISPs could be useful as a marker in fertility diagnostics.

The physiological functions of CRISP-3 are up to now unknown. Equine CRISP-3, which is one of the main seminal plasma proteins in the horse, could play a role in the early stage of fertilization- The binding of CRISP-3 to p 19, a secretory protein of the equine endometrium, has been demonstrated. P 19, a member of the lipocalin family, seems to play a role in early development of the embryo. A complex of p 19 and CRISP-3 could play a role, probably as regulatory factors, at the time of insemination as well as in later events.

The function of CRISP-3 and also of CRISP-1 and CRISP-2 in the fertilization process has to be studied in detail, to determine the role of these proteins on a molecular basis. The identification of equine and porcine CRISPs allows studies on domestic animals with well characterized reproduction and thus may lead to a better understanding of the molecular basis of fertilization.

**key words:** CRISP, male genital tract, fertilization

An dieser Stelle ist es mir ein Bedürfnis und eine Freude, meinen aufrichtigen Dank an folgende Personen zu richten:

Frau Prof. Dr. Edda Töpfer-Petersen danke ich nicht nur für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten sondern vielmehr für das faszinierende Thema, ihre uneingeschränkte Unterstützung, den wissenschaftlichen Freiraum und ihre stetige Gesprächsbereitschaft auch in stressigen Zeiten.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves möchte ich für die kreativen Diskussionen und für die Vertretung meiner Arbeit danken.

Herrn Dr. Manfred Raida gilt mein besonderer Dank für seine Begeisterungsfähigkeit, viele schöne Nachmittage und für seine Unterstützung bei der Massenspektrometrie.

Bei Herrn Dr. Heiner Wolfes bedanke ich mich für Oligonukleotide, den Crash-Kurs "wissenschaftliches Schreiben in englischer Sprache" und viele aufbauende Worte.

Herrn Dr. Claus Urbanke danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und seine unschätzbare Hilfe bei der Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann, Herrn Dr. Peter Müller und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Biophysik sei für die freundliche Aufnahme in Berlin und ihr Interesse an meinen Untersuchungen gedankt. Rudi Erlemann danke ich für die Einführung in das Fluorimeter und die wertvollen Ratschläge.

Den Mitarbeitern des Landgestüts Celle und insbesondere Herrn Dr. Harald Sieme möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Flexibilität danken.

Herrn Dr. Detlef Rath und dem Mitarbeitern der Landwirtschaftlichen Forschungsanstalt in Mariensee danke ich für ihre Hilfe bei der Präparation von porcinem Probenmaterial.

Herrn Prof. Dr. B. Meinecke, Frau Dr. Meinecke-Tillmann und ihren Mitarbeitern danke ich für die Bereitschaft, Räumlichkeiten zu teilen. Edith und Moni, Anja, Axel, Carsten, Markus, John und Alf gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und viele fröhliche Feiern.

Bei Herrn Dr. Hermann Bader bedanke ich mich für die Lehrstunden in Tieranatomie, seine Kooperationsbereitschaft und für seine Hilfe bei der Probengewinnung. Herrn Prof. Dr. C. Weitze gilt mein Dank für seine stete Gesprächsbereitschaft. Petra Hasenleder möchte ich für ihre Hilfe bei der Immunhistologie danken. Margret

Schäfer gilt mein Dank für ihre stets gute Laune und ihre Hilfe in allen Lebenslagen. Frauke Fricke danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei der Spermatologie.

Nasi und Simone danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Zusammenarbeit in der Molekularbiologie, Alexandra für ihre Genauigkeit und die gute Zusammenarbeit auf unserem gemeinsamen Arbeitsgebiet. Tom gilt mein Dank für seine unerschütterliche Ruhe, kreative Gespräche und nette Plaudereien. Christel, Christine, Alexa, Renate, Anna, Zuzanna, Oliver und Michael sei für die herzliche Arbeitsatmosphäre gedankt.

Marc Gentzel danke ich für sachkundige und erfolgreiche Hilfe im Labor, für analytisches Denken, für sein Verständnis und seine Rücksicht und viele lange Nächte. in denen er Zeit für meine Schwierigkeiten hatte, für das Lesen vieler hundert Seiten zum Teil grauenhafter Texte, seine unendliche Geduld und vieles mehr. Brigitta und Lutz Gentzel gilt mein Dank für immer frischen Kaffee, manches gute Essen und immerwährende Gesprächsbereitschaft.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihr Verständnis, ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre Anteilnahme an den Mühen, Rückschlägen und Freuden der naturwissenschaftlichen Arbeit danken.

## Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis enthält alle gebräuchlichen Abkürzungen. Alle hier nicht aufgeführten Abkürzungen sind im Text erklärt.

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
CD	Circular Dichroismus
cDNA	komplementäre DNA
CTC	Chlortetracyclin
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
HIC	hydrophobic interaction chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
kD	Kilodalton
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBT	Nitroblau Tetrazoliumsalz
OD	optische Dichte
OGP	n-Octylglycopyranosid
PBHS	phosphate buffered high salt
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PNA	Peanut Agglutinin
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	sodium dodecylsulfate
SSP	sequenzspezifischer Primer
TBS	Tris buffered saline
TCA	trichloro acetic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>Spermatogenese</b>	<b>5</b>
<b>Oogenese</b>	<b>8</b>
<b>Posttestikuläre Spermienreifung</b>	<b>9</b>
<b>Der Befruchtungsvorgang</b>	<b>12</b>
Akzessorische Geschlechtsdrüsen und Seminalplasma	12
Die Rolle des Ovidukts	12
Kapazitation	13
Bindung an die zona pellucida	16
Akrosomreaktion	18
Fusion	19
<b>Cystein-reiche sekretorische Proteine (CRISPs)</b>	<b>23</b>
CRISP-Proteine im männlichen Genitaltrakt	23
Strukturelle Eigenschaften von CRISP-Proteinen	24
Funktion von CRISP-Proteinen	25
<b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>28</b>
SDS-Gelelektrophorese	28
Proteinbestimmung	29
Gewinnung und Vorbehandlung von Spermien	29
Herstellung von Spermienextrakten	30
Gewinnung und Vorbehandlung von Gewebeproben	30
Herstellung von Gewebeextrakten für Blots	30
2 D-Gelelektrophorese	30
Enzymatische Spaltung	31
Analyse der Peptide mittels LC-MS	31
<b>Isolierung von CRISPs</b>	<b>32</b>
Isolierung von CRISP-3 aus equinem Seminalplasma	32
Isolierung von CRISP-1 aus equinem und porcinem Nebenhoden	33
Isolierung von CRISPs aus equinen Spermien	33
<b>Immunchemischer Nachweis von CRISPs</b>	<b>33</b>
Western Blot	33
Indirekte Immunfluoreszenz	34
Immunhistologie	35
ELISA	35
<b>Ermittlung von potentiellen Bindungspartnern von equinem CRISP-3</b>	<b>36</b>
Gewinnung und Vorbehandlung von Uterus-Spülungen	36
Identifizierung potentieller CRISP-3 Liganden im equinen Uterus	37
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>37</b>
mRNA Isolierung	37
RT-PCR	38
3'-RACE	39
5'-RACE	39
Herstellung kompetenter Zellen	40
Klonierung	40
Sequenzierung	41



<b><i>in vitro</i> Kapazitation</b>	<b>42</b>
Nachweis der Kapazitation mit CTC-Färbung	43
<b>Biophysikalische Untersuchungen</b>	<b>44</b>
CD-Spektren	44
Interaktion von equinem CRISP-3 mit Lipidvesikeln	44
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>45</b>
<b>RT-PCR und Sequenzierung von CRISP-3</b>	<b>45</b>
<b>RT-PCR und Sequenzierung von CRISP-1 und CRISP-2</b>	<b>49</b>
<b>RT-PCR und Sequenzierung von porcinem CRISP-1 und CRISP-2</b>	<b>53</b>
<b>Etablierung eines qualitativen und quantitativen ELISA-Testsystems</b>	<b>61</b>
<b>CRISPs auf equinen Spermien</b>	<b>64</b>
Quantifizierung	64
Lokalisation von CRISPs auf equinen und porcinen Spermien	65
Abhängigkeit der Fertilität von der Menge spermiegebundener CRISPs	70
<b>Isolierung von equinem CRISP-3 aus Seminalplasma</b>	<b>72</b>
<b>Isolierung von CRISPs aus equinem Nebenhoden</b>	<b>75</b>
<b>Isolierung von CRISPs aus equinen Spermienextrakten</b>	<b>76</b>
<b>Proteinchemische Charakterisierung von equinem CRISP-3</b>	<b>78</b>
Peptidmap	78
Bestimmung des isoelektrischen Punkts	79
<b>Biophysikalische Charakterisierung von equinem CRISP-3</b>	<b>81</b>
CD-Spektren	80
Analytische Ultrazentrifugation	82
Interaktion mit Phospholipidvesikeln	83
<b>Identifizierung eines Bindungspartners für equines CRISP-3</b>	<b>85</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>87</b>
<b>Sequenzierung und Genexpression equiner und porciner CRISPs</b>	<b>87</b>
<b>Haben CRISPs eine Bedeutung für den Befruchtungsvorgang ?</b>	<b>91</b>
<b>Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>114</b>
<b>A-equus caballus CRISP-3 mRNA</b>	<b>114</b>
<b>B-equus caballus CRISP-1 mRNA</b>	<b>115</b>
<b>C-equus caballus CRISP-2 mRNA</b>	<b>116</b>
<b>D-sus scrofa CRISP-1 mRNA</b>	<b>117</b>
<b>E-sus scrofa CRISP-2 mRNA</b>	<b>118</b>
<b>F-Primersequenzen</b>	<b>119</b>
Standard-Primer	119
equines CRISP-1	119
equines CRISP-2	119
equines CRISP-3	120
porcines CRISP-1	120
porcines CRISP-2	120

# 1. Einleitung

Die Reproduktionsbiologie beschäftigt sich mit der Entwicklung und Interaktion der Keimzellen, welche letztlich zu einem neuen Lebewesen führt. Die Befruchtung, also die Fusion eines Spermiums mit einer Eizelle, ist nur das Ende einer Reihe komplexer Vorgänge (*Review Aitken 1997*). Trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte, die nicht zuletzt durch den Einsatz moderner biochemischer und molekularbiologischer Methoden ermöglicht wurden, sind die molekularen Mechanismen der Fortpflanzung noch weitgehend ungeklärt.

Der Ablauf des Befruchtungsvorgangs wird beim Säuger in verschiedene Abschnitte unterteilt. Nach der Ejakulation wandern die Spermien im weiblichen Genitaltrakt zunächst in den Eileiter (Ovidukt). Hier werden die Spermien bis zur Ovulation der Eizelle gespeichert. Nach der Freisetzung durchlaufen sie einen notwendigen, aber bisher nur wenig verstandenen Prozeß, die Kapazitation. Erst danach sind die Spermien in der Lage die Eizelle zu befruchten. Die eigentliche Interaktion zwischen Spermien und Eizelle beginnt mit der Bindung der Spermien an die Oocyte umgebende *zona pellucida*, wodurch in kapazitierten Spermien eine Exocytose, die sogenannte Akrosomreaktion ausgelöst wird. Die Freisetzung lytischer Enzyme ermöglicht die Penetration der *zona pellucida* und die Spermien erreichen die Eizelle. Nach Bindung an die Zellmembran der Oocyte wird die Fusion eingeleitet. Die Penetration der Eizellmembran führt zur Aktivierung der Eizelle und die Entwicklung des Embryos beginnt.

Voraussetzung dafür ist die vollständige Entwicklung und Reifung der Keimzellen. Daher soll auf die Vorgänge von der Entwicklung eines Spermiums bis zur eigentlichen Befruchtung näher eingegangen werden.

## Spermatogenese

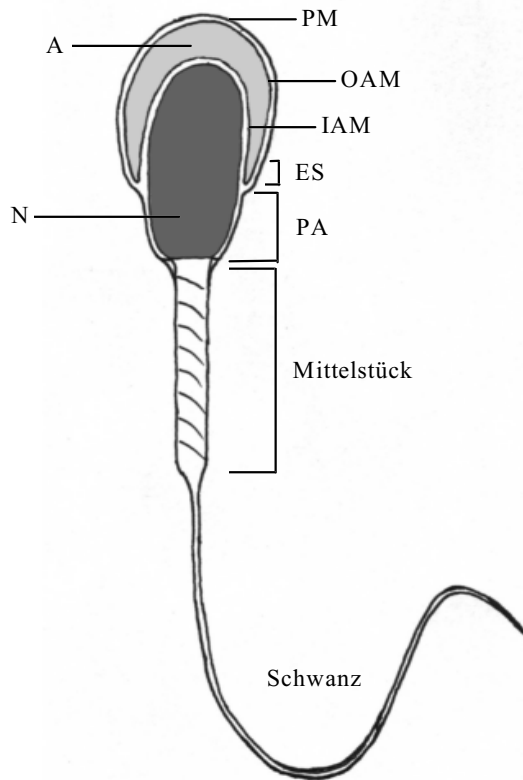
Als Spermatogenese bezeichnet man die Bildung haploider Keimzellen (Spermien) aus diploiden Stammzellen (Spermatogonien) im Hoden. Die Spermatogonien vermehren sich durch mitotische Teilung. Mit Beginn der Differenzierung entwickeln sich zunächst Spermatocyten I. Ordnung, aus denen durch die beiden Reifeteilungen (Meiose) je zwei Spermatocyten II. Ordnung (nach der 1. Reifeteilung) und schließlich je vier Spermatoziden (nach der 2. Reifeteilung) entstehen.

Neben den Spermatogonien findet man im Hoden weitere sehr spezialisierte Zellen: Die Leydig-Zellen liegen außerhalb der Samenkanälchen in der Umgebung der Blutkapillaren. Sie produzieren unter hormoneller Kontrolle der Hypophyse (Luteinisierendes Hormon LH) das männliche Sexualhormon Testosteron. Die als Sertoli-Zellen bezeichneten somatischen Zellen der Samenkanälchen übernehmen verschiedene Aufgaben. Sie bilden die Blut-Hoden-Schranke, eliminieren nicht lebensfähige Spermien durch Phagozytose und unterstützen die Entwicklung der Spermatogonien zu unreifen Spermien. Die Spermatogonien sind mit den Sertoli-Zellen und untereinander durch *gap-junctions* und Desmosom-ähnliche Strukturen miteinander verbunden. Während ihrer Entwicklung wandern die Keimzellen in Richtung des Lumens der Hodenkanälchen, begleitet von Verschluß und Neubildung der Zell-Zell-Verbindungen.

Die Einleitung und zeitliche Steuerung dieses Reifungsprozesses ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Neuere Arbeiten zeigen jedoch in eindrucksvoller Weise, daß die Reifung von den Spermatogonien und nicht von den Sertoli-Zellen kontrolliert wird. Die Möglichkeit der Transplantation von Spermatogonien zwischen Maus und Ratte erlaubt die Beobachtung der Spermatogenese einer Spezies in einem fremden Organismus. Es zeigte sich, daß die Spermatogenese immer dem Zeitablauf der Spenderspezies folgt. Die Spermatogenese wird folglich durch den Genotyp der Keimzellen bestimmt und nicht durch die umgebenden somatischen Zellen. Die Sertoli-Zellen unterstützen sowohl die Reifung eigener als auch fremder Spermien, so daß selbst die parallele Entwicklung der Spermatocyten zweier verschiedener Spezies in einer Testis möglich ist (Franca et al. 1998).

Bereits während der Reifung der Spermatocyten zu Spermatiden können Veränderungen in der Expression verschiedener Proteine beobachtet werden. Eine Bedeutung dieser Proteine an der Spermatogenese wird diskutiert (Cossio et al. 1995). Die Spermatiden entwickeln sich unter Chromatinkondensation, Längsstreckung, Mitochondrienfusion, Ausbildung des Flagellums vom distalen Centriol aus und Abstoßung des Cytoplasmas zu unreifen Spermien. Diese zeigen bereits den typischen Aufbau eines Spermatozoons (Abb. 1-1). Während dieser Phase bilden sie einen proakrosomalen Vesikel, aus dem das spätere Akrosom entsteht.

Das Akrosom kann aufgrund seiner Entstehung aus fusionierenden Golgi-Vesikeln und seiner enzymatischen Ausstattung als ein spezialisiertes Lysosom betrachtet werden. Es



A=Akrosom  
 ES= Äquatorialsegment  
 IAM=innere akrosomale Membran  
 N=Nukleus  
 OAM=äußere akrosomale Membran  
 PA=Postakrosom  
 PM=Plasmamembran

**Abb. 1-1:** Schematische Darstellung eines Spermiums

enthält ebenso wie Lysosomen viele hydrolytische Enzyme, darunter Proteasen und Hyaluronidasen, die vermutlich für das Durchdringen der die Oocyte umgebenden Glykoproteinmatrix, der *zona pellucida*, benötigt werden. Weiterhin enthält das Akrosom auch spezifische Proteasen, die in Lysosomen nicht vorkommen, z.B. Proacrosin, die inaktive Vorstufe von Acrosin (Yanagamachi 1994).

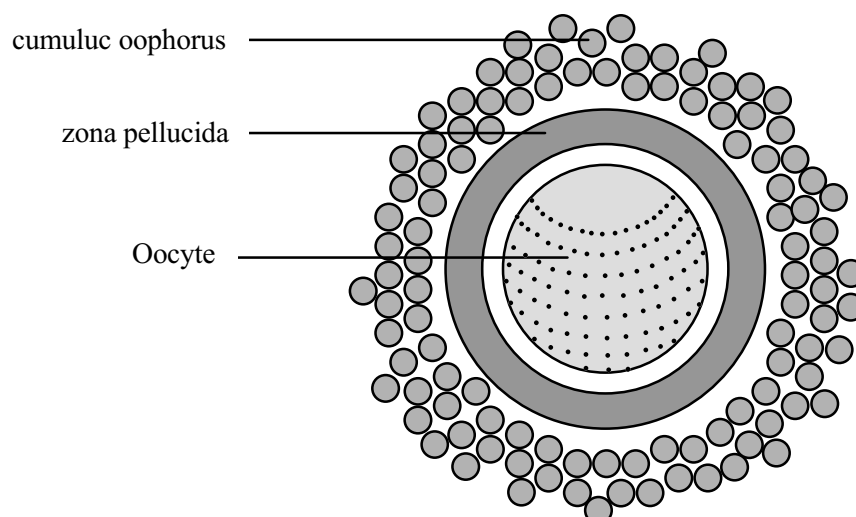
Spermien werden morphologisch in Kopf, Mittelstück und Schwanz unterteilt. Auch die Plasmamembran von Spermien ist im Unterschied zu somatischen Zellen in bestimmte voneinander abgegrenzte Bereiche gegliedert: Akrosom oder akrosomale Kappe, Äquatorialsegment, Postakrosom, Mittelstück und Schwanz (Abb. 1-1). Diese Gliederung scheint mit den darunter liegenden Organellen in Zusammenhang zu stehen. Beispielsweise umfaßt die akrosomale Kappe das Akrosom und das Mittelstück den Bereich des Flagellums, in dem sich die Mitochondrien befinden. Die Organisation und Aufrechterhaltung der Kompartimentierung wird vermutlich durch Membranproteine erreicht, welche mit dem darunter liegenden Cytoskelett verbunden sind (Mei et al. 1997, Moos et al. 1998). Die Membrankomponenten können zwar innerhalb einer Region nicht aber zwischen den Regionen frei diffundieren. Dies gilt insbesondere für Membranproteine, Cholesterol und Glykolipide (Eddy 1994). Die Kompartimentierung

kann beispielsweise über monospezifische Antikörper oder Lektine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen erkennen, demonstriert werden.

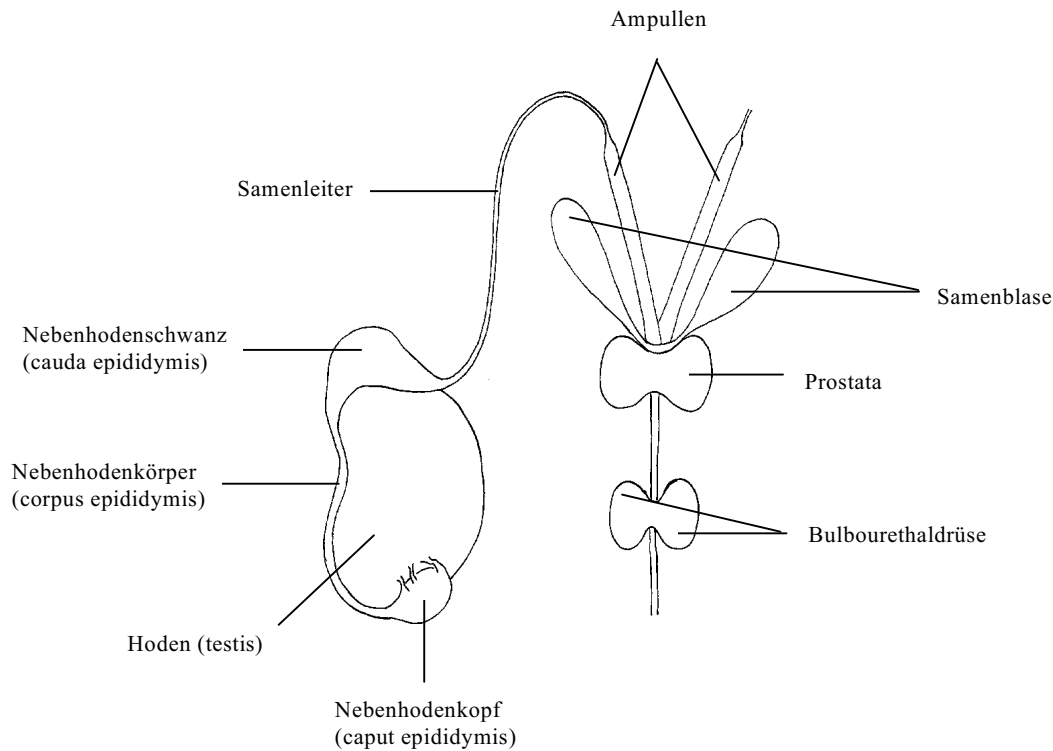
## Oogenese

Die Oogenese beginnt bereits während der Embryonalentwicklung. Es entstehen durch mitotische Teilung der Urkeimzellen im Ovar Oogonien, aus denen sich Oocyten I. Ordnung entwickeln, die von einer Follikelzellschicht umgeben sind (Primärfollikel). Die Oocyten I. Ordnung sind in der Prophase der ersten Reifeteilung arretiert. Nach der Geschlechtsreife entwickeln sich die Follikel unter hormoneller Kontrolle weiter. Das Follikelepithel wird vielschichtig und der Follikel wird von Bindegewebe umschlossen (Sekundärfollikel). In diesem Stadium beginnt die Bildung der die Eizelle umgebenden Glykoproteinschicht, der *zona pellucida*. Je nach Spezies reifen in jedem Zyklus ein oder mehrere Follikel unter Bildung der flüssigkeitsgefüllten Follikelhöhle zu Graaf'schen Follikeln (Tertiärfollikeln). Die Meiose wird erst in den reifen Follikeln fortgesetzt. Die zweite Reifeteilung wird in der Metaphase unterbrochen und erst nach der Befruchtung vollendet (Wassarman 1994).

Die Oocyte (Abb. 1-2) ist zum Zeitpunkt der Ovulation vollständig gereift. Im Gegensatz dazu sind testikuläre Spermien nicht befruchtungsfähig.



**Abb. 1-2:** Schematische Darstellung einer Oocyte.



**Abb. 1-3:** Schematische Darstellung der männlichen Geschlechtsorgane

## Posttestikuläre Spermienreifung

Nach der Spermatogenese im Hoden passieren die Spermien den Nebenhoden (Epididymis). Die Epididymis liegt zwischen Hoden und Samenleiter (Abb.1-3). Sie besteht aus einem vielfach aufgewundenen Kanal mit stark gefalteten Wänden und Mikrovillibesatz, der zur Vergrößerung der Oberfläche führt. Der Nebenhoden wird in drei Bereiche unterteilt, die als Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz (caput, corpus und cauda) bezeichnet werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Proteinexpression und -sekretion. Im Nebenhodenkopf und -körper durchlaufen die Spermien eine Reihe von Veränderungen, die als Nebenhodenreifung bezeichnet werden. Der Nebhodenschwanz dient als Speicherorgan für gereifte Spermatozoen, die dort nach der Passage von Nebenhodenkopf und -körper bis zur Ejakulation verbläben.

Beim Eintritt in den Nebenhoden sind die Spermien weder beweglich noch befruchtungsfähig. Diese Fähigkeiten erlangen sie erst während ihrer Passage durch die Epididymis. Im Verlauf des Reifungsprozesses beobachtet man im Kern eine Stabilisierung des Chromatins und eine Vernetzung der Protamine durch zusätzliche Disulfidbrücken. Die Lipidzusammensetzung und damit die Fluidität der Plasmamembran, insbesondere der Cholesterolgehalt, wird modifiziert. Änderungen der Proteinausstattung

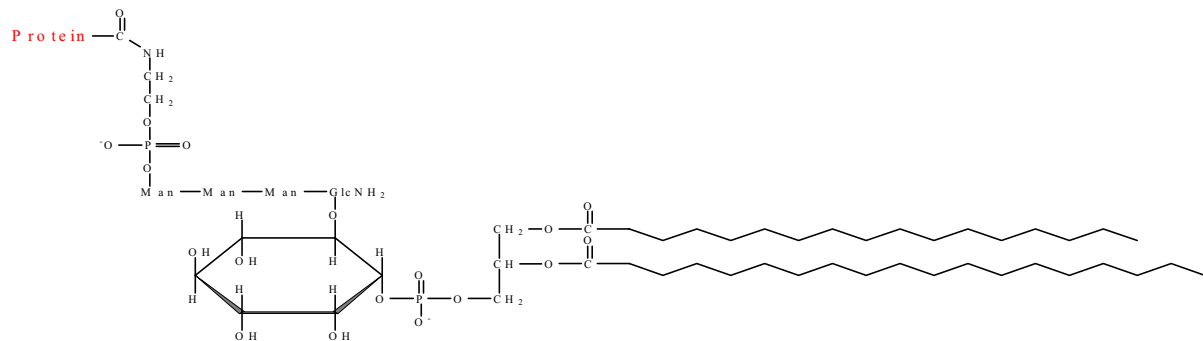
der Membran können zwischen einzelnen Membrankompartimenten variieren. Die Steuerung dieser Vorgänge ist noch unklar, allerdings werden einige dieser Veränderungen durch Enzyme des Nebenhodensekrets bewirkt, beispielsweise Änderungen der Kohlenhydratstruktur von Glykoproteinen, Cluster-Bildung, veränderte Lokalisation auf der Spermienoberfläche (*Srivastava und Olson 1991*), Variationen der Epitop-Expression und posttranslationale Modifikation (*Review: Myles 1993, Linder et al. 1995, Cooper 1996*). Diese Prozesse sollen im folgenden an einigen ausgewählten Beispielen erläutert werden.

Das Nebenhodensekret enthält sowohl extrazelluläre Glykosidasen als auch Glykosyltransferasen. Die Sekretion dieser Proteine ist in den einzelnen Regionen des Nebenhodens verschieden, was auf eine schrittweise Modifikation von Glykostrukturen während der Nebenhodenpassage deutet. Ein Beispiel für diese Vorgänge ist ein 26 kD Glykoprotein der Rattenspermien, dessen Kohlenhydratanteil 60% der Gesamtmasse ausmacht. Während der Nebenhodenpassage konnte die Übertragung von Galactose auf endständige N-Acetyl-Glucosaminreste durch eine Galactosyltransferase gezeigt werden (*Fourie et al. 1996*).

Beispiele für die Änderung der Lokalisation und proteolytische Prozessierung während der Nebenhodenpassage sind die bereits im Hoden exprimierten integralen Membranproteine PH-20 und PH-30 (*Fertilin, Blobel et al. 1992*). Diese Proteine sind im Hoden auf dem gesamten Spermium (PH-20) bzw. dem gesamten Kopf (PH-30) verteilt. Nach der Nebenhodenreifung ist die Lokalisation beider Proteine auf das Postakrosom beschränkt. Diese Veränderung der Lokalisation ist mit einer proteolytischen Prozessierung gekoppelt, die zur Präsentation neuer Epitope führt. Die im Nebenhoden aktiven Proteasen sind bislang noch unbekannt, die Prozessierung läßt sich aber *in vitro* mit Trypsin imitieren. Für PH-30 wurde auch eine autokatalytische Prozessierung postuliert, da dieses Protein eine Metalloproteasedomäne enthält, die nach der Nebenhodenpassage nicht mehr nachweisbar ist (*Review: Evans und Kopf 1998*).

Neben der Modifikation vorhandener Proteine assoziieren sekretorische Proteine des Nebenhodenepithels (*Vreeburg et al. 1992*), darunter das für die Vorwärtsbeweglichkeit notwendige *forward motility protein* (*Acott et al. 1978, Acott et al. 1981, Acott et al. 1983, Majunder et al. 1990*), an die Spermienmembran. Lange Zeit wurde angenommen, daß diese Proteine nur peripher an die Membran assoziieren, während Transmembranproteine bereits während der Spermatogenese synthetisiert werden.

Neuere Arbeiten zeigen jedoch, daß einige Proteine des Nebenhodensekrets, darunter die DE-Proteine der Ratte, nicht nur oberflächlich an die Plasmamembran binden, sondern sehr fest assoziiert werden. Die Mechanismen für diese Assoziation sind noch unbekannt. Kürzlich konnte für ein humanes Nebenhodenprotein gezeigt werden, daß dieses über Glycosylphosphatidylinositol (GPI, Abb. 1-4) in der Membran verankert wird.



**Abb. 1-4:** Grundstruktur eines GPI-Ankers

Das humane epididymale CD 52 Antigen wird während der Nebenhodenpassage über seinen GPI-Anker in die Spermienmembran integriert (Kirchhoff et al. 1997, Schroter et al. 1997). GPI-verankerte Proteine scheinen auch als Membranrezeptoren für lösliche Proteine zu fungieren (Fraser 1998). Obwohl GPI-Anker nur in die äußeren Lipidschicht der Membran eingelagert sind, konnte für GPI-verankerte Proteine von Leukozyten gezeigt werden, daß sie durch Aktivierung einer Tyrosinkinase an der Signaltransduktion beteiligt sind. Der Mechanismus der Aktivierung eines intrazellulären Enzyms durch ein nur in der äußeren Lipidschicht der Membran verankertes Protein ist zur Zeit noch unklar. Nach der Abspaltung des GPI-Ankers wäre aber eine Interaktion der Spaltprodukte mit anderen Rezeptoren denkbar (Pratt und Gaulton 1993).

Manche intrazellulären Enzyme der Spermien werden erst während der Nebenhodenreifung aktiviert. Ein eindrucksvolles Beispiel ist die Aktivierung der Proteinkinase A. Proteinkinase A ist zwar bereits in testikulären Spermien vorhanden, zeigt jedoch nur geringe Aktivität. Während der Passage durch die Epididymis wird sie an der Membran verankert und aktiviert (Sullivan 1998). Auch hier wird die Beteiligung eines epididymalen GPI-Proteins vermutet. Nebenhodenschwanzspermien sind im Gegensatz zu Nebenhodenkopfspermien bereits in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Diese Fähigkeit erlangen sie durch die vielfältigen Reifungsprozesse während der Nebenhodenpassage. Die Verankerung der Proteinkinase A ist einer von vielen Faktoren, die dazu beitragen.



# Der Befruchtungsvorgang

## **Akzessorische Geschlechtsdrüsen und Seminalplasma**

Bei der Ejakulation werden die Spermien mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, dem Seminalplasma, vermischt. Der Begriff akzessorische Geschlechtsdrüsen umfaßt die sekretorischen Verdickungen der Samenleiter, die Ampullen, die Samenblasen, die Prostata und die Bulbourethraldrüsen. Speziesabhängig werden nicht alle dieser Organe ausgeprägt. Die Hauptmenge des Seminalplasmas wird von der Samenblase, ein geringerer Anteil von den übrigen akzessorischen Geschlechtsdrüsen produziert. Das Seminalplasma enthält neben verschiedenen Proteinen Gelbildner, biogene Amine, das Antioxidans Ergothionin sowie Citrat, das als Puffersubstanz und neben  $K^+$ -Ionen der Osmoregulation dient. Die Proteinausstattung des Seminalplasmas ist speziesabhängig unterschiedlich. Die wichtigsten Seminalplasmaproteine bei Pferd, Rind und Schwein (Esch et al. 1983, Seidah et al. 1987, Scheit et al. 1988, Einspanier et al. 1991, Wempe et al. 1992, Calvete et al. 1994, Calvete et al. 1996a, Calvete et al. 1996b, Calvete et al. 1997,) sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

**Tabelle 1-1:** Hauptproteinkomponenten des Seminalplasmas von Hengst, Eber und Bulle

	<b>Pferd</b>	<b>Schwein</b>	<b>Rind</b>
<b>Fibronectin-Typ</b>	HSP-1, HSP-2	pB1	PDC-109
<b>Spermadhäsine</b>	AWN	AWN-1, AWN-2, AQN-1, AQN-2, AQN-3	aSFP
<b>CRISPs</b>	CRISP-3 (HSP-3)		

Durch den Kontakt der Spermien mit dem Seminalplasma wird eine Anreicherung von Seminalplasmaproteinen auf der Spermienoberfläche beobachtet. Diese Proteine dienen als Dekapazitationsfaktoren dem Schutz der Spermien bei der Ejakulation und der Passage durch den weiblichen Genitaltrakt. Andere Proteine tragen zur gelartigen Verfestigung des Ejakulats bei und verhindern so ein Abfließen aus dem weiblichen Genitaltrakt.

## **Die Rolle des Ovidukts**

Die Spermien gelangen nach der Ejakulation aus dem Uterus zunächst in den Isthmus, den uterusnahen Bereich des Eileiters (Ovidukt), wo sie mit den Epithelzellen interagieren (Thomas et al. 1997) und ihre aktiven Bewegungen nahezu einstellen. Die Bindung der

Spermien an das Oviduktepithel wird vermutlich über Kohlenhydrate vermittelt, die von spezifischen Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, Lektinen, der Spermien erkannt werden (Suarez 1998, Suarez et al. 1998). Beim Rind verläuft die Bindung über Fucose-Reste (Lefevbre et al. 1997). Die Kohlenhydratreste, die bei der Bindung erkannt werden, können speziesabhängig variieren.

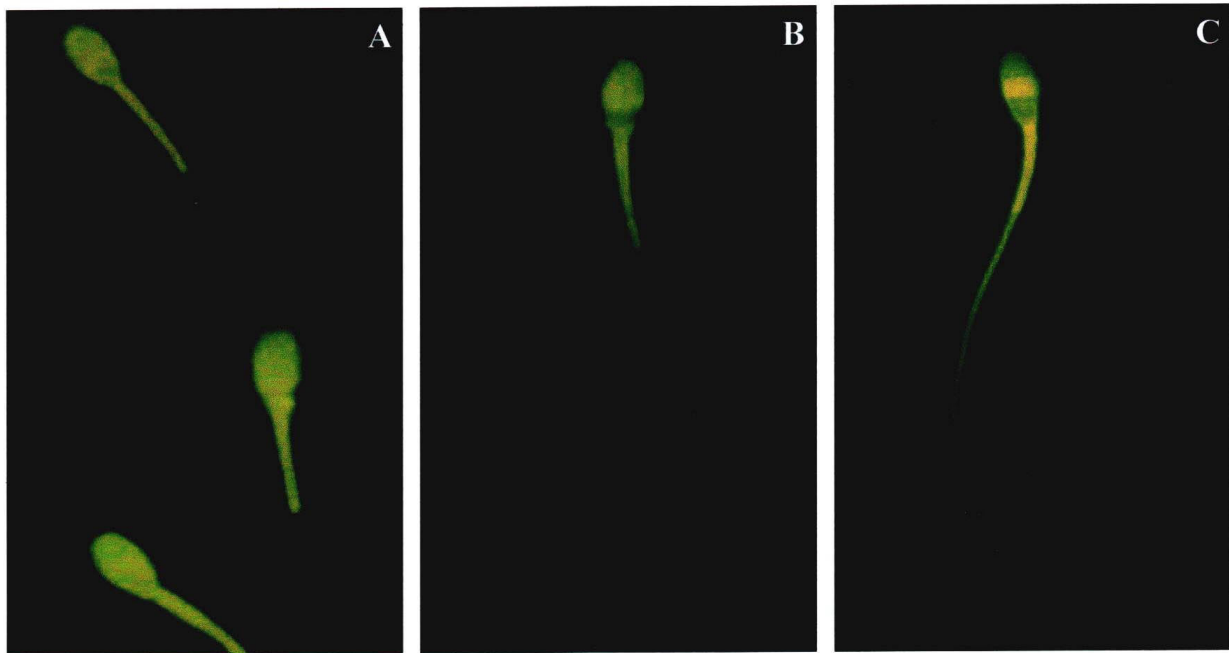
Das Ovidukt dient jedoch nicht nur als Spermienreservoir, sondern spielt eine wichtige Rolle für das Überleben der Spermien, die Regulation der Kapazitation, sowie die Anzahl Spermatozoen, die auf die Eizelle treffen. Die Bindung an das Oviduktepithel bewirkt die Erhaltung eines niedrigen intrazellulären Calciumspiegels in den Spermien trotz der hohen Calciumkonzentration im Ovidukt und hält die Spermien im unkapazitierten Zustand (Dobrinski et al. 1997). Dies ermöglicht das Überleben der Spermatozoen bis zur Ovulation, da kapazitierte Spermien nur eine kurze Lebensdauer haben. Das Ovidukt spielt aber auch eine Rolle für die Steuerung der Kapazitation (Ellington et al. 1993).

### **Kapazitation**

Die Kapazitation (Yanagimachi 1994) ist ein durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx gekennzeichneter, wenig definierter Vorgang, der die Spermien befähigt, die Eizelle zu befruchten. Während der Kapazitation treten erneut verschiedene Modifikationen der Spermien auf. Einige Enzyme werden aktiviert, die Membranzusammensetzung und die Stoffwechselaktivität verändern sich, ebenso die Menge oder Lokalisation bestimmter Glykoproteine (Medeiros und Parrish 1996).

Kapazitierte Spermien zeigen Änderungen in ihren Bewegungsmustern, die als Hyperaktivierung bezeichnet werden. Die Kapazitation lässt sich auch durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fluorophore wie Chlortetracyclin (CTC), anhand der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine und der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion verfolgen. Am gebräuchlichsten ist derzeit die CTC-Färbung (Varner et al. 1987, Varner et al. 1992, Adeoya-Osiguwa und Fraser 1993), bei der je nach Zustand der Spermien charakteristische Fluoreszenzmuster auftreten (Abb.1-5).

Die Kapazitation kann *in vitro* in Kulturmedien mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und BSA erreicht werden. Die Funktion dieser Substanzen, insbesondere des Albumins (BSA) bei der Kapazitation war lange Zeit strittig. Mit der Aufklärung der Signaltransduktionskaskaden, die zur Kapazitation führen, wurde die Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  klar (Review Fraser 1995). Die Rolle von BSA scheint inzwischen ebenfalls geklärt zu sein. Es konnte gezeigt



**Abb. 1-5:** CTC-Färbung von Hengstspermien in verschiedenen Stadien. a: unkapazitiert, b: kapazitiert, c: akrosomreagiert

werden, daß *in vitro* Cholesterol aus der Spermienmembran von BSA gebunden wird. Die Bedeutung des Cholesterolefflux aus der Spermienmembran ist allgemein anerkannt.

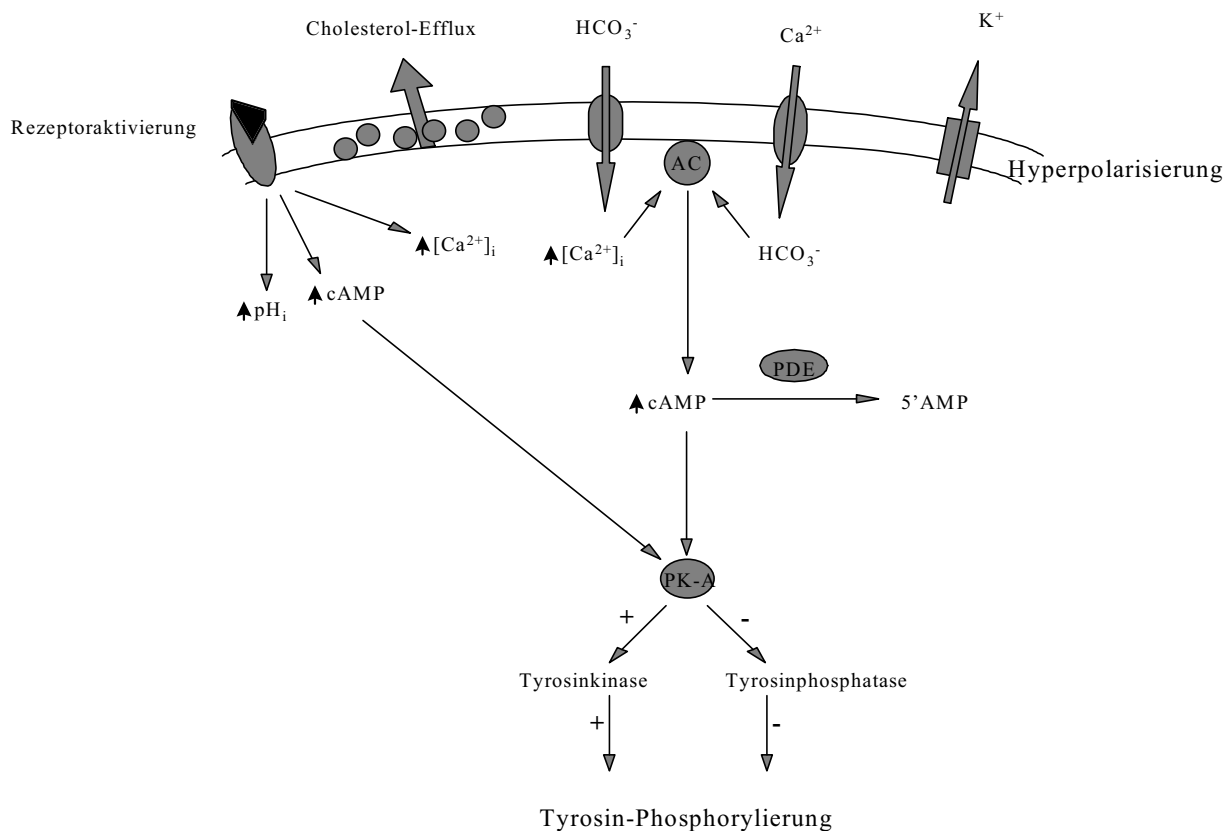
Bislang wurde angenommen, daß der Cholesterolefflux die Fluidität der Membran so modifiziert, daß die nachfolgende Akrosomreaktion erleichtert wird. Der Verlust von Cholesterol ist aber darüber hinaus auch notwendig für die Induktion der Signaltransduktionskaskaden (Zarintash *et al.* 1996), die zur Hyperaktivierung (Cross und Razy-Faulkner 1997) und Akrosomreaktion führen. Darüberhinaus wurde die Exposition eines Mannose-Rezeptors beobachtet, der eine Rolle für die Interaktion mit den Glykoproteinen der *zona pellucida* spielen könnte. *High-density*-Lipoproteine (HDL) und weitere Lipidtransferproteine des Oviduktsekrets spielen durch die Bindung von Cholesterol der Spermienmembran eine wichtige Rolle bei der Kapazitation *in vivo* (Review Cross 1998).

Die Signaltransduktion des Spermiums wird durch den Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ - und  $HCO_3^-$ -Konzentration ausgelöst. Parallel steigt durch den Cholesterol-Verlust der intrazelluläre pH-Wert (Cross 1998) und es kommt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran (Abb. 1-6). Während der Kapazitation werden Ionenkanäle und -transporter aktiviert sowie eine  $Ca^{2+}$ -ATPase deaktiviert (Fraser und McDermott 1992, DasGupta *et al.* 1994), so daß  $Ca^{2+}$  und  $HCO_3^-$  in die Zelle einströmen und  $K^+$  aus der Zelle ausströmt. Der Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert Adenylatcyclasen und führt somit zur Erhöhung des cAMP-Spiegels, welche die Aktivierung der cAMP-abhängigen

Proteinkinase A zur Folge hat (Carrera et al. 1996, Galantino-Homer et al. 1997, Visconti et al. 1998, Review Visconti und Kopf 1998). Proteinkinase A phosphoryliert Serin- und Threoninreste an ihren Zielproteinen und aktiviert oder inhibiert diese. Proteinkinase A ist im Mittelstück an das Cytoskelett gebunden (Moos et al. 1998) und spielt eine Rolle bei der Steuerung der Motilität (Mei et al. 1997, Visconti et al. 1997).

Obwohl noch nicht geklärt ist, wodurch die Ionenkanäle der Spermien aktiviert werden, liegen der Kapazitation dieselben Signaltransduktionswege zugrunde, die bereits von somatischen Zellen bekannt sind. Allerdings werden bei den Spermatozoen im Gegensatz zu somatischen Zellen Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität nicht direkt durch die Bindung des entsprechenden Liganden aktiviert. Die Tyrosinkinasen der Spermien werden cAMP-abhängig reguliert, ein bislang einzigartiger Mechanismus (Fénichel et al. 1996, Galantino Homer 1997, Aitken et al. 1998, Visconti und Kopf 1998).

Es ist noch nicht bekannt, wodurch die Kapazitation und das Loslösen der Spermien vom Epithel ausgelöst und reguliert wird. Bei einigen Spezies ist dieser Vorgang allerdings mit der Ovulation koordiniert, d.h. die Spermien kapazitieren erst dann, wenn die Ovulation stattgefunden hat. Die Diskussionen über die auslösenden Faktoren umfassen praktisch



**Abb. 1- 6:** Die wichtigsten bei der Kapazitation auftretenden Veränderungen des Spermiums und ihr Zusammenhang mit der Signaltransduktion. AC=Adenylatcyclase, PDE=Phosphodiesterase, PK-A=Proteinkinase A

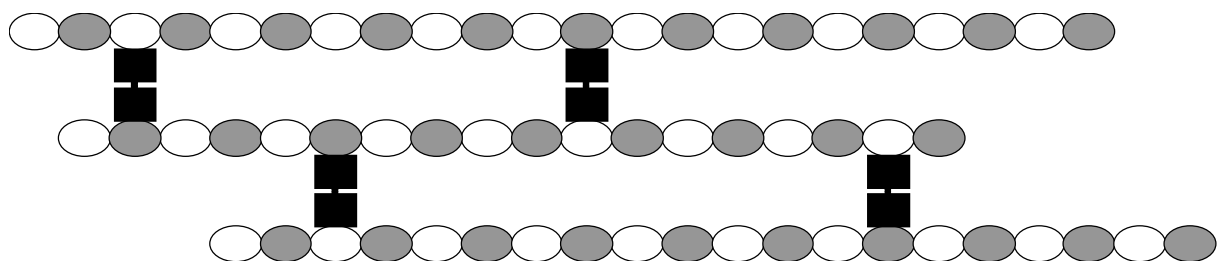
alle im weiblichen Genitaltrakt vorkommenden Substanzen, insbesondere Proteine und Hormone.

Die kapazitierten Spermien binden nicht mehr an das Oviduktepithel, sondern bewegen sich aktiv in Richtung des Ovars und treffen im oberen Teil des Ovidukts, der Ampulle, auf die Eizelle. Damit beginnt die eigentliche Interaktion der beiden Gameten.

Zunächst muß das Spermium den *cumulus oophorus*, eine Hülle von Cumulus-Zellen passieren. Das größte Hindernis auf dem Weg des Spermiums zur Eizelle ist jedoch die *zona pellucida*, eine dichte Glykoproteinmatrix, die die Eizellen der Säuger umgibt.

### **Bindung an die zona pellucida**

Die *zona pellucida* ist 2 bis 25 µm dick und besteht aus drei Glykoproteinen, die bei der Maus als ZP 1, ZP 2 und ZP 3 bezeichnet werden. Aufgrund uneinheitlicher Benennung der Proteine anderer Spezies, werden die Zona-Proteine nach ihren Genen ZPA, ZPB und ZPC genannt. Diesen entsprechen ZP2 (=ZPA), ZP 1 (=ZPB) und ZP 3 (=ZPC) der Maus. ZPA und ZPC bilden heterodimere Filamente, die über ZPB-Homodimere quervernetzt sind (Abb. 1-7, *Wassarman et al. 1996, Yurewicz et al. 1998*).



**Abb. 1-7:** Aufbau der *zona pellucida* (schematisch). weiß-grau: ZPA-ZPC-Heterodimere, schwarz: ZPB Homodimere

Sowohl die Kohlenhydratketten als auch die Proteine werden als Liganden bei der Bindung der Spermien an die *zona pellucida* diskutiert (*Jones und Williams 1990, Review: Foltz 1995*). Dabei unterscheidet man vor und nach der Akrosomreaktion primäre und sekundäre Bindung der Spermien an die *zona pellucida*. Die Bindung an die *zona pellucida* ist bei der Maus am besten untersucht. Daher sollen die folgenden Abläufe an diesem Beispiel erläutert werden.

Der wichtigste Ligand für die primäre Bindung scheinen O-glykosidische Kohlenhydrate von ZPC zu sein (*Wassarman 1992, Wassarman 1995a, Wassarman 1995b*). Die Beteiligung von N-glykosidisch verknüpften Strukturen wird derzeit diskutiert (*Shur 1998*). Welche Spermienproteine als primäre Rezeptoren in Frage kommen ist noch unklar.

Kohlenhydratstrukturen mit Galactose, N-Galactosamin, N-Glucosamin, Fucose und Mannose kommen als Liganden in Frage (Thaler und Cordullo 1996, Shur 1998, Loeser und Tulsiani 1999). Als mögliche primäre Zona-Rezeptoren werden beispielsweise  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase (GalTase), und die Proteine p95 und sp56 diskutiert. GalTase und sp56 binden die Kohlenhydratanteile der *zona pellucida*, für p95 wird sowohl eine Protein-Kohlenhydrat als auch eine Protein-Protein-Interaktion diskutiert (Wassarman und Litscher 1995, Shur 1998). Die Transmembranproteine GalTase und p95 können direkt die zur Akrosomreaktion führende Signalkaskade auslösen (Gong et al. 1995), periphere Membranproteine wie sp56 nur indirekt. Für GalTase konnte bereits die Aktivierung von G-Proteinen gezeigt werden, allerdings sind GalTase defizient *knock out* Mäuse fertil und die Bindung ihrer Spermien an die *zona pellucida* ist unverändert (Shur 1998). Es ist daher wahrscheinlich, daß nicht nur ein primärer Zona-Rezeptor existiert, sondern die primäre Bindung und Auslösung der Akrosomreaktion speziesspezifisch über mehrere Rezeptoren vermittelt wird (Wassarman 1995c, Johnston et al. 1998).

Neben den bisher genannten Proteinen wird auch für PH-20, sp47 und eine Mannosidase eine Beteiligung an der Zona-Bindung diskutiert. Bei anderen Spezies werden darüberhinaus weitere potentielle Zona-Rezeptoren diskutiert. Beim Schwein dominieren N-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate als Liganden (Kudo et al. 1998). Es wurde gezeigt, daß neben sp47 (Ensslin et al. 1998) und p68/62 (Tanphaichitr et al. 1998) auch Spermadhäsine an Kohlenhydrate der porcinen *zona pellucida* binden. Spermadhäsine sind kleine Seminalplasmaproteine, die peripher an die Spermienmembran assoziieren (Review Töpfer-Petersen et al. 1995a, Töpfer-Petersen et al. 1995b, Töpfer-Petersen et al. 1997, Töpfer-Petersen et al. 1998). Auch Zonadhäsin (Hardy und Garbers 1995, Gao und Garbers 1998) könnte eine Rolle spielen.

Die sekundäre Bindung an die *zona pellucida* erfolgt über ZPA. Als sekundärer Rezeptor wirkt vermutlich eine Protease, eventuell Acrosin (Jones und Williams 1990, Wassarman 1992, Review: Foltz 1995). Dieses besitzt neben der Proteaseaktivität eine Affinität zu sulfatierten Kohlenhydraten, im Fall des Akrosins zur *zona pellucida* und zu Fucoidan. Ein anderer möglicher sekundärer Zona-Rezeptor ist PH-20, ein 64 kD Protein mit Hyaluronidase-Aktivität. PH-20 nach der Akrosomreaktion auch auf der inneren akrosomalen Membran nachweisbar und könnte dort als sekundärer Zona-Rezeptor fungieren.

Die Erkennung von Kohlenhydratstrukturen ist ein zentrales Element der Bindung an die *zona pellucida* und der Auslösung der Akrosomreaktion. Die speziesabhängig unterschiedliche Glykosylierung der *zona pellucida* wird auch als Element der Speziespezifität der Fortpflanzung diskutiert. Die Interaktion von Proteinen mit Kohlenhydraten wird überwiegend von Wasserstoffbrücken und in geringerem Ausmaß von hydrophoben Wechselwirkungen vermittelt (Weis und Drickamer 1996). Die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Sauerstoffatomen und Hydroxylgruppen der Zucker und basischen und sauren Aminosäuren in einer definierten Orientierung erlaubt die spezifische Erkennung bestimmter Kohlenhydratstrukturen.

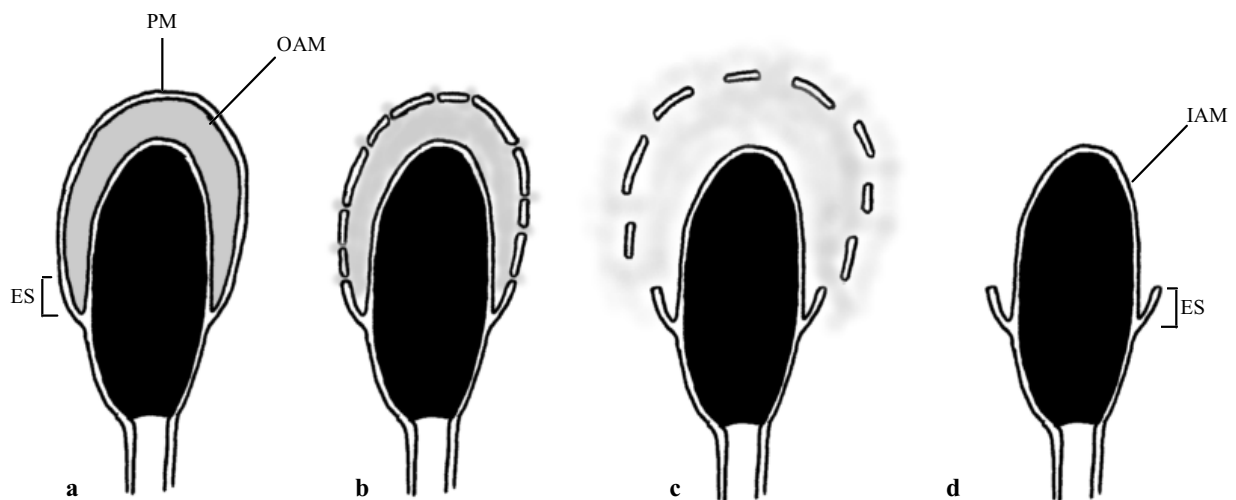
### **Akrosomreaktion**

Die Akrosomreaktion ist ein exocytotischer Prozeß, bei dem die äußere akrosomale Membran (*outer acrosomal membrane*, OAM) und die Plasmamembran fusionieren (Abb. 1-8). Zwischen der Plasmamembran und OAM liegt ein Actin-Gerüst, welches vorzeitige, spontane Fusion dieser beiden Membranen und damit die spontane Akrosomreaktion verhindert.

Die Akrosomreaktion wird durch die Bindung an die *zona pellucida* induziert. Die Zona-Rezeptoren aktivieren über einen oder mehrere Rezeptoren G-Proteine. Der weitere Ablauf ist noch nicht vollständig geklärt. Die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration läßt auf eine Phosphatidylinositolkaskade schließen. Durch Diacylglycerol, ein Spaltprodukt von Phosphatidylinositoldiphosphat, wird die  $Ca^{2+}$ -abhängige Proteinkinase C aktiviert. Es ist noch weitgehend unbekannt, welche Proteine durch die Proteinkinase C aktiviert werden. Man beobachtet allerdings Tyrosinphosphorylierung (Naz et al. 1996, Brewis et al. 1998), den Abbau der Aktinfilamente zwischen Plasmamembran und OAM und die Aktivierung von Ionenkanälen (Sungin und Breitbart 1996).

Auf den ersten  $Ca^{2+}$ -Influx folgt eine zweite stärkere Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dabei spielt neben der Aktivierung von Ionenkanälen auch die Depolarisierung der Plasmamembran und dadurch ausgelöste Öffnung von spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanälen eine Rolle (Arnoult et al. 1996, Florman 1998). Die  $Ca^{2+}$ -Kanäle werden vermutlich erst bei der Kapazitation in Funktion gesetzt und sind durch die Hyperpolarisierung bis zur Akrosomreaktion geschlossen. Die Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Spiegels induziert die Exocytose, analog zur gesteuerten exocytotischen Freisetzung sekretorischer Vesikel in somatischen Zellen. Plasmamembran und OAM

fusionieren an mehreren Stellen und lösen sich im Gegensatz zur Exocytose somatischer Zellen vom Spermienkopf, so daß bei der Akrosomreaktion die innere akrosomale Membran (IAM) freigelegt wird (Abb.1-8).



**Abb. 1-8:** Schematische Darstellung der Akrosomreaktion (nach: Yanagamachi 1988)

A=Akrosom, ES=Äquatoriale Segment, PM=Plasmamembran, OAM=Äußere Akrosomale Membran, IAM=Innere Akrosomale Membran

Durch die Freisetzung der hydrolytischen Enzyme wird die *zona pellucida* partiell gespalten und die Spermien durchdringen die Glykoproteinhülle. Daneben treten mit der Akrosomreaktion erneut Veränderungen in der Plasmamembran des Spermiums auf. Einerseits wird durch die Akrosomreaktion die innere akrosomale Membran (IAM) des Spermiums exponiert, andererseits findet man eine Neuorientierung von verschiedenen Proteinen der Plasmamembran. Diese Veränderungen betreffen überwiegend die speziell für die spätere Fusion mit der Eizelle relevanten Regionen, die Äquatorialregion sowie den postakrosomalen Bereich (Review: Myles 1993). Nach der Akrosomreaktion sind die Spermien in der Lage, die *zona pellucida* zu durchdringen und mit der Eizelle zu fusionieren.

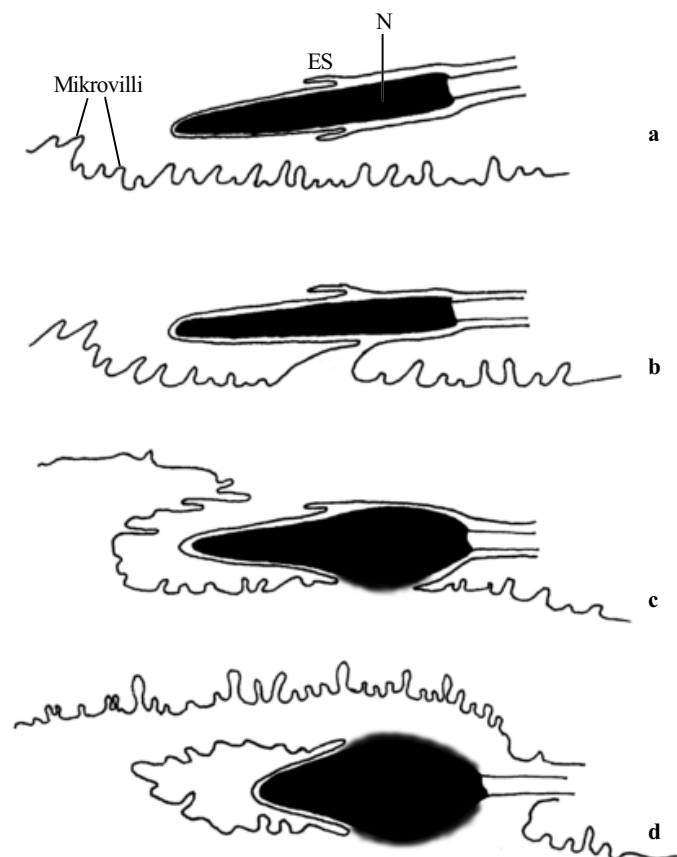
### **Fusion**

Auch die Bindung des Spermiums an die Eizelle ist ebenso wie die Bindung an die *zona pellucida* eine spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung. Die Bindungsproteine befinden sich im Äquatoriale Segment bzw. im hinteren Bereich des Kopfsegments der Spermatozoen (Review: Myles 1993, Abb.1-9a). In diesem Membranbereich findet man nach abgeschlossener Akrosomreaktion vermehrt Proteine, von denen man annimmt, daß sie an der Bindung an das Oolemma und an der Fusion der Gameten beteiligt sind.



Bindung und Fusion können durch Antikörper gegen Immunzellen blockiert werden, woraus geschlossen wurde, daß hier Fc-Rezeptor- und CD 4-ähnliche Proteine beteiligt sein könnten. (Review: Foltz 1995). Man vermutet weiterhin, daß Integrine bei der Zell-Zell-Erkennung zwischen Spermium und Eizelle eine Rolle spielen. Auf Eizellen konnten verschiedene Integrine nachgewiesen werden, wobei dem Integrin  $\alpha_6\beta_1$ , das auf den Mikrovilli der Eizelle lokalisiert ist, besondere Bedeutung zuzukommen scheint (Almeida *et al.* 1995). Diese These wird unterstützt durch die Identifizierung von Integrinliganden, sogenannte Disintegrine, in der Spermienmembran. Die meisten Disintegrine präsentieren das Tripeptid RGD an ihrer Oberfläche. Das am besten untersuchte Spermien-Disintegrin ist PH-30 oder Fertilin (Blobel *et al.* 1992, Evans *et al.* 1998).

Die eigentliche Fusion zwischen Spermium und Eizelle wird durch Verschmelzen der Spermienmembran mit Mikrovilli der Plasmamembran der Eizelle eingeleitet (Abb.1-9b). Benachbarte Mikrovilli umschließen den Kopf des Spermiums, der zusammen mit den Mikrovilli von der Eizelle aufgenommen wird (Abb.1-9c und 1-9d). Man nimmt an, daß die



**Abb. 1-9:** Fusion eines Spermiums mit der Plasmamembran der Eizelle. ES=Äquatorialschiff, N=Nucleus (nach: Yanagamachi (1994))

Membranfusion durch Proteine der Spermienmembran initiiert wird, die entweder bereits an der Bindung beteiligt sind oder durch die Bindung eine die Fusion begünstigende Konformation einnehmen.

Es existieren nur wenige Modelle für den Ablauf der Fusion zweier Zellmembranen. Der am besten untersuchte Fusionsprozeß ist das Eindringen eines Virus in seine Wirtszelle. Das Modell beruht auf der Untersuchung des Infektionsmechanismus von Influenza-Viren. Die Viren werden über Rezeptor-gekoppelte Endocytose in einem Lysosom von der Zelle aufgenommen. Der saure pH-Wert im Innern des Lysosoms führt zu einer Konformationsänderung eines viralen Transmembranproteins, so daß zwei Fusionspeptide exponiert werden. Diese integrieren in die Membranen von Virus und Lysosom und induzieren die Fusion. Ähnliche Mechanismen, die keine extremen pH-Änderung erfordern wurden auch für andere Viren postuliert.

Die Homologie eines Abschnitts von PH-30 mit viralen Fusionspeptiden führte zu intensiven Untersuchungen dieses potentiellen Fusionspeptid und der Interaktion mit Lipidvesikeln. Es zeigte sich, daß das Peptid in der Lage ist, unilamellare Vesikel zu fusionieren, sofern sie etwa 20% saure Phospholipide enthalten (Martin *et al.* 1998). Die biologische Funktion dieses Proteins sollte anhand eines Fertilin-defizienten Mausmodells untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß Spermien der Knock-out-Mäuse *in vitro* weder an die *zona pellucida* binden, noch mit der Eizelle fusionieren. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen ist fraglich, da *in vivo* die Spermien Fertilin-defizienter Mäuse auch nicht an die Epithelzellen des Ovidukts binden (Cho *et al.* 1998). Die Möglichkeit, daß in den *knock out* Mäusen neben Fertilin auch andere Proteine nicht funktionell exprimiert werden wurde von den Autoren nicht ausgeschlossen. Eine Beteiligung von Fertilin an der Fusion von Spermium und Eizelle ist damit unwahrscheinlich geworden (Myles 1998).

Weitere möglicherweise an der Fusion von Spermium und Eizelle beteiligte Proteine sind Cystein reiche sekretorische Proteine (CRISP), die aus dem Nebenhodensekret an die Spermien assoziieren. Es konnte gezeigt werden, daß CRISP-spezifische Antikörper und gereinigte CRISPs die Fusion von Spermien mit der Eizelle hemmen. Die Bindung der Spermien an die Plasmamembran der Oocyte wird dagegen nicht beeinflusst (Rochwerger *et al.* 1992). Diese Beobachtung zeigt, daß Bindung und Fusion zwei voneinander getrennt Prozesse sind, die durch verschiedene Proteine vermittelt werden. CRISPs besitzen weder Transmembrandomänen noch ausreichend lange hydrophobe Bereiche,

so daß ein Interaktionsmechanismus dieser Proteine nach dem beschriebenen Modell nicht möglich erscheint. Es gibt zur Zeit noch keine Hinweise, wie CRISPs mit der Eizelle interagieren, es ist aber anzunehmen, daß sie bei der Fusion von Spermium und Eizelle eine wichtige Rolle spielen.

Nach der Fusion mit einem Spermium werden in der Eizelle eine Reihe von Reaktionen in Gang gesetzt, welche die Befruchtung durch weitere Spermien (Polyspermie) verhindern. Man unterscheidet schnelle und langsame Blockade der Polyspermie. Die schnelle Blockade wird durch eine bis zu 60 sec anhaltende Depolarisierung der Eizellmembran erreicht, die eine Fusion mit weiteren Spermien verhindert. Gleichzeitig findet man eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes und Oszillationen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, möglicherweise induziert durch ein Spermienprotein (Parrington *et al.* 1996), die die exocytotische Ausschüttung des Inhalts der Rindengranula bewirken. Diese enthalten proteolytische Enzyme (Miller *et al.* 1993), welche die Glykoproteine der *zona pellucida* so modifizieren, daß sie die Akrosomreaktion nicht mehr auslösen und die *zona pellucida* für die Spermien undurchlässig wird. Auch bereits akrosomreagierte Spermien binden nicht mehr an die *zona pellucida*, da die Bindungsstelle an ZPA durch proteolytische Spaltung zerstört wird (Moller und Wassarman 1989).

Durch die Fusion mit einem Spermium wird die Eizelle aktiviert. Die zweite Reifeteilung wird unter Abstoßung eines Polkörperchens vollendet und das Chromatin beginnt ebenso wie das des Spermiums zu decondensieren. Mit der Bildung eines gemeinsamen Zellkerns und der ersten Zellteilung beginnt die Entwicklung des Embryos.

## **Cystein-reiche sekretorische Proteine (CRISPs)**

### ***CRISP-Proteine im männlichen Genitaltrakt***

Erstmals wurden Nebenhoden-spezifische Proteine der Ratte, deren Transkription und Expression androgenreguliert ist, 1976 von Cameo und Blaquier beschrieben. Sie wurden aufgrund ihres Laufverhaltens in SDS-PAGE relativ zu BSA als Protein B, C, D und E bezeichnet. Ein weiteres Protein, das AEG (Acidic Epididymal Glycoprotein) der Ratte, für das eine Beteiligung an der Spermienreifung angenommen wurde, erwies sich als identisch mit Protein D/E (*Charest et al. 1988*).

Innerhalb des Nebenhodens findet man regionale Unterschiede in bezug auf die Expression der einzelnen Proteine: Protein D wird in caput, corpus und cauda exprimiert, Protein E dagegen nur in corpus und proximaler cauda. Da die Proteine ausschließlich auf Spermien nach Passage des Nebenhodens, nicht aber auf testikulären Spermien nachgewiesen werden, nimmt man an, daß sie aus dem Nebenhodensekret an die Spermienoberfläche assoziieren (*Brooks 1987a*). Spätere Arbeiten zeigen, daß die Proteine D und E im Nebenhoden männlicher Ratten bereits am ersten postnatalen Tag nachweisbar sind. Die Proteinmenge steigt dann vom 20. bis zum 120. Tag stetig an bis sie ca. 10% des gesamten löslichen Proteins ausmacht (*Charest et al. 1989*).

Ähnliche bzw. homologe Proteine wurden inzwischen auch in anderen Spezies gefunden, wobei das Homologon aus der Maus neben dem DE-Protein der Ratte am besten untersucht ist. Es wird entweder als MEP-7 oder als CRISP-1 bezeichnet (*Rankin et al. 1992, Eberspaecher et al. 1995*).

Neben den bisher beschriebenen DE-Proteinen und dem Maus-Homologon CRISP-1 wurden weitere Vertreter der CRISP-Familie identifiziert. In der Maus sind neben dem epididymalen CRISP-1 ein testikuläres CRISP-2 (*Kasahara et al. 1989*) und ein weiteres CRISP-3 (*Haendler et al. 1993, Mizuki et al. 1992a*) genanntes Protein aus der Speicheldrüse bekannt. Auch CRISP-1 wird in geringen Mengen androgenabhängig in der Speicheldrüse der Maus gebildet (*Haendler et al. 1993*). Diese Proteine sind vermutlich identisch mit den Genprodukten von aeg-1 und aeg-2 aus den Speicheldrüsen männlicher Mäuse (*Mizuki et al. 1992a*). Kürzlich wurden die humanen Proteine CRISP-1, CRISP-2 und CRISP-3 identifiziert und sequenziert (*Krätschmar et al. 1996*).

Zur CRISP-Familie gehören auch die in den Hoden von Mensch, Maus und Ratte gefundenen TPX-Proteine (*Kasahara et al. 1989, Maeda et al. 1998*) sowie ein 28 kD-

Protein, das aus speziellen Granula humaner Neutrophiler isoliert wurde (Kjeldsen *et al.* 1996). TPX-1 ist identisch mit CRISP-2 (Krätzschar *et al.* 1996, Mizuki *et al.* 1992b). Beim Meerschweinchen wurde das akrosomale Autoantigen 1 (AA1) als Homologen der murinen und humanen TPX-1 Proteine identifiziert (Hardy *et al.* 1988, Foster *et al.* 1996). Man sollte eine Vereinheitlichung der Bezeichnungen in Erwägung ziehen, da die epididymalen Proteine DE, AEG und CRISP-1 als identisch anzusehen sind, ebenso das testikuläre TPX-1 und CRISP-2 sowie das in der Speicheldrüse gefundene CRISP-3 und das aeg-2 Genprodukt (Kasahara *et al.* 1995).

### **Strukturelle Eigenschaften von CRISP-Proteinen**

Mitte der achtziger Jahre wurde die Aminosäuresequenz von Protein D ermittelt (Brooks *et al.* 1986b), das 227 Aminosäuren, vier potentielle Glykosylierungsstellen und eine Masse von ca. 30 kD besitzt. Interessanterweise sind 14 von insgesamt 16 Cysteinresten in der C-terminalen Hälfte des Proteins zu finden. Sequenzvergleiche und Untersuchungen der Sekundärstruktur von Protein D, ergaben keinen Hinweis auf potentielle Membranintegrationsdomänen. Das Protein besitzt einen Isoelektrischen Punkt von 4,0-4,4 (Lea *et al.* 1978).

Aufgrund von Sequenzanalysen interner Peptide der Proteine D und E wurde angenommen, daß es sich bei diesen beiden um identische Proteine handelt, die unterschiedlich glykosyliert sind (Brooks *et al.* 1996b, Brooks 1987). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Differenz von 2 kD im Molekulargewicht nicht auf Variationen der Glykosylierungsmuster sondern auf das Protein selbst zurückzuführen ist. Protein E scheint gegenüber Protein D N-terminal verlängert zu sein, was bisher aufgrund der N-terminalen Modifikation beider Proteine nicht erkannt wurde, da eine Sequenzierung des N-Terminus nicht möglich ist. Ein neuer monoklonaler Antikörper erkennt jedoch ein Epitop in der N-terminalen Region von Protein E nicht aber Protein D. Das Epitop kann nur durch Proteasen, aber nicht durch Deglykosylierung zerstört werden, was auf eine unterschiedliche N-terminale Aminosäuresequenz schließen läßt (Xu und Hamilton 1996, Xu und Hamilton 1997).

Proteine mit zu CRISPs homologen Domänen findet man in Reptilien- und Insektengiften und in einigen PR-Proteinen (Pathogenesis-related protein) von Pflanzen, z.B. Tabak und Mais. PR-Proteine sind Teil der pflanzlichen Stressantwort. Sie werden teilweise konstitutiv, vor allem aber bei pathogenen Infektionen oder osmotischem Stress exprimiert. PR-Proteine werden in fünf Familien unterteilt, wobei die fungizid wirkenden

Proteine der PR-5 Familie Ähnlichkeiten mit CRISP-Proteinen aufweisen (Review Rigden und Coutts 1988). Die Struktur von Zeamatin, ein PR-5 Protein aus Mais, ist inzwischen bekannt. Sie enthält sehr viel  $\beta$ -Faltblatt, organisiert zu einem sogenannten  $\beta$ -Sandwich (Batalia et al. 1996).

### **Funktion von CRISP-Proteinen**

Über die Funktion der CRISP- bzw. DE-Proteine ist derzeit nur wenig bekannt. Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion erhielt man für ein CRISP-Protein, das im Gift einer mexikanischen Eidechsenart gefunden wurde. Helothermin, das ca. 45% Ähnlichkeit mit den CRISP-Proteinen aufweist, blockiert durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Reticulum (SR) von Herz- und Skelettmuskelzellen. Dabei ist unklar, wie das Protein in die Zellen gelangt, vermutlich sind dafür andere Komponenten des Giftes erforderlich, eine membrandestabilisierende Wirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Mochca-Morales 1990, Morrissette et al. 1995).

Über die Funktion der CRISP-Proteine der Säuger wurde lange spekuliert. Alle bisher bekannten CRISP-1 wurden auf den Spermien der jeweiligen Spezies nachgewiesen. Die Tatsache, daß bei den DE-Proteinen der Ratte freie SH-Gruppen gefunden wurden, führte zu der Annahme, das Protein sei über Disulfidbrücken kovalent an ein Membranprotein der Spermien gebunden. Diese Vermutung wurde durch den Befund gestärkt, daß das Protein auch mit Salzkonzentrationen von 0,6M NaCl nicht von Spermien extrahiert werden konnte (Rochwerger et al. 1992).

Bei den Maus-Proteinen gibt es keine Hinweise auf eine kovalente Bindung an ein Membranprotein, die Proteine sind im Gegenteil nur lose an die Spermienmembran assoziiert und lassen sich weitgehend ohne Verwendung von Detergenzien extrahieren (Rankin et al. 1992). Ein weiterer Unterschied ist der annähernd neutrale IP der Maus Proteine; man findet hier vier Isoformen mit Isoelektrischen Punkten zwischen 6,8 und 7,4. Humanes CRISP-1 konnte ebenfalls auf den Spermien nachgewiesen werden (Hayashi et al. 1996).

Da das DE-Protein akrosomreagierter Spermien in der für die Bindung und Fusion der Gameten verantwortlichen Äquatorialregion zu finden ist, wird jedoch eine Rolle in der Bindung und/oder Fusion angenommen (Rochwerger und Cuasnicú 1992). Erste Hinweise auf eine solche Funktion lieferten Studien über die Inhibition der Gametenfusion

durch gereinigtes DE-Protein (Rochwerger et al. 1992). DE-Protein inhibiert konzentrationsabhängig die Fusion, nicht aber die Bindung der Gameten. Die Inhibition kann durch Überführen der Zellen in DE-freies Medium aufgehoben werden. Ein ähnlicher Effekt läßt sich mit Antikörpern gegen das DE-Protein erzielen (Quasnicú et al. 1984). Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß es eine Bindungsstelle auf dem Oolemma gibt, die erst während der Reifung der Eizellen. Erst mit dem Erscheinen der DE-Bindungsstelle erlangen die Eizellen die Fähigkeit zur Fusion mit dem Spermium (Cohen et al. 1996). Untersuchungen zur Eignung von DE als Immunkontrazeptivum zeigten, daß die Immunisierung gegen DE sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Ratten zu temporärer Unfruchtbarkeit führt. (Perez Martinez et al. 1995). Bei männlichen immunisierten Tieren wird weder die Synthese, noch die Sekretion und Assoziation an die Spermien im Nebenhoden beeinträchtigt. Die Spermien solcher Tiere binden zwar *in vitro* an Zona-freie Eizellen, fusionieren jedoch nicht. (Ellerman et al. 1998)

Kürzlich wurde demonstriert, daß das testikuläre CRISP-2 an der Bindung der Spermatozyten an die Sertoli-Zellen beteiligt ist und damit eine Rolle für die Spermatogenese spielen könnte (Maeda et al. 1998). Das sehr ähnliche CRISP-3 wurde außer in der Speicheldrüse beim Menschen in sekretorischen Vesikeln von Granulozyten (Kjeldsen et al. 1996) und in der Maus in Pre-B-Zellen gefunden (Pfisterer et al. 1996), die Funktion dieses Proteins in den Immunzellen ist allerdings bislang noch ungeklärt. Die Transkription des CRISP-3-Gens wurde außerdem in einer Reihe von Geweben, darunter Thymus, Ovar und Prostata nachgewiesen, während die Transkription von CRISP-2 auf den Hoden beschränkt ist und CRISP-1 nur im Nebenhoden und in geringerem Ausmaß in der Speicheldrüse transkribiert wird (Haendler et al. 1996).

## **Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Die CRISP-Proteinfamilie umfaßt strukturell einzigartige Proteine, deren acht Disulfidbrücken das Hauptstrukturmerkmal darstellen. Zwei der drei beim Säuger bekannten Typen kommen überwiegend im männlichen Genitaltrakt vor und spielen nach neueren Erkenntnissen eine wichtige Rolle bei der Spermatogenese, der posttestikulären Spermienreifung und bei der Fusion mit der Oocyte. Bislang wurden CRISPs ausschließlich bei Nagern und Menschen untersucht. Die Identifizierung eines Hauptproteins des equinen Seminalplasmas als Homologon zur CRISP-Proteinfamilie bildet die Grundlage zur Untersuchung der CRISP-Homologen in Haus- und Nutztieren.

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit ist die Sequenzierung und Charakterisierung des equinen Seminalplasmaproteins. Aus der Sequenz lassen sich Informationen zum Aufbau und zur Größe des Proteins ableiten, die die Grundlage für eine proteinbiochemische Charakterisierung bilden. Darüberhinaus ist die Kenntnis der Sequenz essentiell für die Abgrenzung von den anderen, einander sehr ähnlichen Formen der CRISPs im Gewebe und auf Spermien. Die Sequenzierung eröffnet überdies die Möglichkeit, mit spezifischer RT-PCR die Transkription der für dieses Protein codierenden mRNA im männlichen Genitaltrakt zu untersuchen.

Mit diesen Untersuchungen ließen sich Informationen über die Bedeutung und möglicherweise die Funktion des CRISPs bei der Befruchtung gewinnen. Es kann erwartet werden, daß die Charakterisierung dieses Hauptproteins des equinen Seminalplasmas zu einem besseren Verständnis der Funktion der CRISP-Proteine beiträgt.



## 2. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in Analysenqualität von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

### Proteinchemische Methoden

#### **SDS-Gelelektrophorese**

Proteinproben werden mit dem gleichen Volumen 2x Auftragspuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau) gemischt und 5 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die Proben kurz anzentrifugiert und in diskontinuierlichen SDS Polyacrylamid Gelen nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Üblicherweise werden 15%ige Trenngele (15 % Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 8,3 µl / 10 ml TEMED, 25 µl / 10 ml 40 % APS) verwendet, alternativ Gradientengele von 4-20 % bzw. 10-20 % (4-20 % bzw. 10-20 % Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 8,3 µl / 10 ml TEMED, 25 µl / 10 ml 40 % APS). Die Trenngele werden mit einem 5%igen bzw. 4 %igen Sammelgel (4 bzw. 5 % Acrylamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 10 µl / 10 ml TEMED, 25 µl / 10 ml APS) überschichtet, nach dem Auspolymerisieren in die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS) eingesetzt und die Proben aufgetragen (max. 20 µl / Tasche). Zum Einlauf der Proben wird eine Spannung von konstant 100V, danach von konstant 200 V angelegt (Elektrophorese System: BioRad Mini-Protean II, BioRad, USA).

#### *Coomassie-Färbung*

SDS-Gele werden direkt nach dem Lauf 30 min in Färbelösung (0,25% Coomassie Brilliant Blue R (Serva Heidelberg, Deutschland), 40% Methanol, 10 % Eisessig) leicht geschüttelt. Zur Entfärbung des Hintergrundes werden die Gele drei- bis viermal 30 bis 60 min in Entfärbelösung (7 % Eisessig) gewaschen.

#### *Silberfärbung*

Die Silberfärbung wird nach dem Prinzip der sauren Färbung durchgeführt. Die SDS-Gele werden zunächst mindestens 45min in 12,5 % TCA fixiert und zweimal 5min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach werden die Gele 45min in Thiosulfat-Lösung (0,5M Na-Acetat, 20 mM Na-Thiosulfat je 250 ml, 0,5% Glutaraldehyd) inkubiert. Die Gele werden nach

sechsmaligem Waschen für 5 min in H<sub>2</sub>O 30 min in Silberlösung (6 mM AgNO<sub>3</sub>, 0,05 % Formaldehyd) inkubiert. Überschüssiges Silbernitrat wird durch abspülen (10s) mit H<sub>2</sub>O entfernt und die Banden in 0,236M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,01 % Formaldehyd entwickelt bis sie deutlich zu sehen sind. Die Färbereaktion wird mit 50mM Glycin gestoppt.

Gefärbte Gele werden zwischen zwei Lagen angefeuchteten *Gel Drying Film* (Promega, Madison, WI, USA) gelegt, in Trocknungsrahmen (Promega, Madison, WI, USA) eingespannt und bei Raumtemperatur getrocknet (ca. 18 - 24 h).

### **Proteinbestimmung**

Der Gesamtproteingehalt von Proben wird mit einem Mikrobiuret-Assay bestimmt, Stammlösung: 0,59 M Na-Citrat-Dihydrat, 0,94 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 69 mM CuSO<sub>4</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O. Alle Standards und Proben werden in Duplikaten angesetzt.

Um störende Einflüsse von Puffersubstanzen zu minimieren, werden die Proteine aus der Probelösung mit TCA gefällt. Dazu wird ein Aliquot der Probe mit dem gleichen Volumen 20 % TCA gemischt und 30 min auf Eis gekühlt. Eine Standardreihe von 50 bis 800µg BSA wird analog behandelt. Das gefällte Protein wird in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus Hanau, Deutschland) 10min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen.

Die Proteinpellets werden in 50µl 2 M NaOH gelöst und mit 500µl Gebrauchslösung (1 Teil Stammlösung, 20 Teile 0,75 M NaOH) gemischt. Nach 15min bei Raumtemperatur werden 450 µl H<sub>2</sub>O zugesetzt, gemischt und die Extinktion bei 334nm gemessen.

### **Gewinnung und Vorbehandlung von Spermien**

Hengstejakulate werden unter Verwendung einer künstlichen Vagina, Eberjakulate mit Hilfe der Massagetechnik von darauf trainierten Tieren gewonnen. In beiden Fällen werden die Ejakulate durch Gaze filtriert, um eventuell vorhandenen Schleim zu entfernen. Die so vorbereiteten Ejakulate können direkt für in vitro Kapazitationsversuche eingesetzt werden. In diesem Fall muß die Temperatur auf 37/39°C gehalten werden.

Für biochemische Untersuchungen läßt man die Ejakulate auf Raumtemperatur abkühlen. Zur Entfernung des Seminalplasmas werden die Ejakulate 10min bei 150 x g zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus Hanau, Deutschland), das Seminalplasma abgenommen und die Spermien noch dreimal (Hengst) bzw. fünfmal (Eber) mit PBS (10 mM Na-/K-Phosphat pH7,4, 150 mM NaCl) gewaschen. Zur Entfernung oberflächlich

assoziierter Proteine werden die Spermien noch zweimal mit PBHS (10mM Na-/K-Phosphat pH7,4, 500 mM NaCl) gewaschen. Bei Eberspermien wird den Waschlösungen 1 mM PMSF und 10 mM Benzamidin zugesetzt, da die sehr fragilen Spermien leicht hochaktive Serinproteasen freisetzen. Diese Hochsalz-gewaschenen Spermien werden für ELISAs, Indirekte Immunfluoreszenz und zur Gewinnung von Spermienextrakten verwendet.

### ***Herstellung von Spermienextrakten***

Membrangebundene Proteine der Spermien können aus Hochsalz-gewaschenen Spermien durch Extraktion mit verschiedenen Detergenzien gewonnen werden. Je nach weiterer Verwendung werden die Spermien in TBS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 2 % OGP oder CHAPS und 1 mM PMSF, 20 mM Benzamidin in TBS 1 h bei 4°C extrahiert. Zellreste werden 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in einem frischen Gefäß bei -20°C aufbewahrt.

### ***Gewinnung und Vorbehandlung von Gewebeproben***

Organe von Schlachttieren oder Kastrationen werden von Haut, Fett- und Bindegewebe befreit und falls nötig zerteilt. Die Gewebestücke werden auf Trockeneis schockgefroren, in sterile Gefäße verpackt und bei -80°C gelagert.

### ***Herstellung von Gewebeextrakten für Blots***

Für Proteinextrakte werden etwa 0,5g Gewebe in 5 ml TBS/ complete® (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) mit dem Ultrathurrax homogenisiert und anschließend 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der die löslichen Proteine enthaltende Überstand wird abgenommen und das Pellet gegebenenfalls in 250µl TBS / complete® resuspendiert. Nach der Bestimmung des Proteingehalts werden die Proben entsprechend verdünnt, mit 2x SDS-Auftragspuffer gemischt, denaturiert und gleiche Mengen Gesamtprotein / Tasche im SDS-Gel aufgetrennt.

### ***2 D-Gelelektrophorese***

Die 2 D Gelelektrophorese wird unter Verwendung von 11cm langen Immobiline Drystrips (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Strips werden vor der Verwendung 18 h rehydratisiert (9 M Harnstoff, 0,5 % Nonidet P 40, 0,5 % Ampholine pH 3-pH 10, 3µl Eisessig). Die Proben, etwa 5-10 µg Protein, werden in 2 D-Auftragspuffer (9 M Harnstoff, 2 % Nonidet P 40, 0,25 % Bromphenolblau) gelöst und je Strip 15-20 µl in einem Probengefäß (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala,

Schweden) auf die *Strips* gesetzt. Die Proteine werden auf einem Multiphor Elektrophorese System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) 20h nach Herstellerangaben fokussiert.

Nach Beendigung der ersten Dimension werden die *Strips* in 20 ml SDS-Equilibrierlösung (0,05 M Tris-HCl, pH 6,8, 6 M Harnstoff, 1 % SDS, 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau) 15 min equilibriert und in die Tasche eines 15%igen SDS-Polyacrylamidgels eingesetzt. Der Lauf erfolgt wie für SDS-Gele beschrieben. Aufgrund der relativ geringen Probenmenge wird eine Silberfärbung durchgeführt.

Falls nicht alle fokussierten *Strips* gleichzeitig in der zweiten Dimension aufgetrennt werden, können sie nach der Fokussierung bei -20°C aufbewahrt werden.

### ***Enzymatische Spaltung***

Für die Spaltung von Proteinen mit Endoproteinasen (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), werden die Proteine mittels *Reversed-Phase*-HPLC gereinigt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Falls möglich wird die Konzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm, sonst bei 220 nm bestimmt. Durch Zugabe eines entsprechenden Volumens 10 x konzentrierter Puffer werden die folgenden Puffer hergestellt: 20mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 9,0 für Endoproteinase Lys-C, 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,8 für Endoproteinase Glu-C, und 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8,0 für Endoproteinase Asp-N. Nach Zugabe von 1µg Protease je 100 µg Protein werden die Ansätze 18h bei 37°C bzw. 25°C (Endoproteinase Glu-C) inkubiert und die Proteasen 5 min bei 90°C hitzeinaktiviert. Falls die Probenkonzentration geringer als 1 µg / µl ist, werden die Proben lyophilisiert und in einem entsprechend geringeren Volumen wieder aufgenommen.

### ***Analyse der Peptide mittels LC-MS***

Massenspektrometrie und LC-MS-Läufe wurden mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Manfred Raida im Institut für Peptidforschung, Hannover durchgeführt.

Der enzymatische Verdau wird in einem Mikro-HPLC-System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) mit einer Kapillar-UV-Durchflußzelle (LC-Packings, Amsterdam, Niederlande) über eine C<sub>18</sub>-ODS-AQ *Reversed-Phase* Säule (1 x 100 mm, YMC, Schembeck, Deutschland) bei einer Flußrate von 20 µl/ min bei Raumtemperatur getrennt. Das Injektionsvolumen beträgt 5µl. Alle Trennungen werden in einem Gradienten aus H<sub>2</sub>O mit 0,08 % TFA (Laufmittel A) und Acetonitril/ Wasser (9:1) mit 0,065 % TFA (Laufmittel B) von 10 % Laufmittel B bis 100 % Laufmittel B bei einem Anstieg von 1 % / min durchgeführt.

Das Eluat wird über eine Silica Kapillare (50µm ID, 45 cm Länge, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) direkt in einem Sciex API III Massenspektrometer (PE-Sciex, Langen, Deutschland) im positiven Modus analysiert. Die Daten werden über einen m/z Bereich von 400 bis 2400 mit 4s / scan in 0,3 m/z Schritten aufgenommen. Die Datenaufnahme erfolgt über das Tune-Programm, die manuelle Auswertung mit MacSpec 3.3 (beide PE-Sciex, Langen, Deutschland). Zur Analyse der Rohdaten wird außerdem das Programm SHERPA 3.1.1 (Taylor und Walsh 1996) eingesetzt.

## **Isolierung von CRISPs**

### ***Isolierung von CRISP-3 aus equinem Seminalplasma***

Frische Hengstejakulate werden durch Mull filtriert und falls erforderlich von Schleim befreit. Das Seminalplasma wird durch 10minütige Zentrifugation bei 13000x g gewonnen. Zellfreies Seminalplasma kann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Im ersten Schritt werden die Heparin-bindenden Proteine aus 200 bis 500ml Seminalplasma mittels Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose (Amersham-Pharmacia, 3,7 cm x 25 cm) abgetrennt. Als Puffer wird TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) verwendet. Alle Chromatographien werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die nicht gebundene Fraktion wird durch Dialyse (SpektraPor MWCO 6000-8000) bei 4°C gegen H<sub>2</sub>O von niedermolekularen Substanzen und Salz befreit und anschließend lyophilisiert (Christ Osterode/ Harz, Deutschland). Die Proteine werden in maximal 50 ml TBS aufgenommen und im gleichen Puffer über eine Sephadex G50 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia, zwei gekoppelte Säulen à 5cm x 90 cm) aufgetrennt. Die CRISP-3 enthaltenden Fraktionen werden im ELISA ermittelt, vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 4-6ml 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gepuffert mit 20 mM Tris-HCl pH 7,4 aufgenommen, 5 min bei 13000 x g zentrifugiert und CRISP-3 über Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butyl-Sepharose (Amersham Pharmacia, 1 cm x 10 cm) in einem Gradienten von 1M bis 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 7,4 eluiert. Zur Entfernung von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Protein ausgiebig gegen H<sub>2</sub>O dialysiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird bei -20°C gelagert und bei Bedarf eine Lösung von 1,5 mg/ ml hergestellt. Proteinlösungen werden aliquotiert bei -20°C gelagert. In einigen Fällen kann der letzte Schritt durch *Reversed-Phase*-HPLC ersetzt werden. In diesem Fall wird über eine C<sub>8</sub>-Säule (Macherey Nagel) mit einem Gradienten

von 25 % bis 55 % Acetonitril / 0,1 % TFA in Wasser / 0,1 % TFA chromatographiert (HPLC-System: Beckman, München, Deutschland).

### ***Isolierung von CRISP-1 aus equinem und porcinem Nebenhoden***

Zur Proteinisolierung werden etwa 5-8g Nebenhodengewebe in 50ml TBS mit dem Ultrathurrax homogenisiert und anschließend 10min bei 13000 x g (Sorvall RC 5C, Sorvall Bad Homburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand erhält die löslichen Proteine, darunter CRISP-1.

Die löslichen Proteine werden mittels Chromatofocussierung an Polybufferexchanger 94 (Amersham Pharmacia, 1 cm x 50 cm) in einem pH-Gradienten von pH8 bis pH 6 nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Der Startpuffer ist 25mM Tris-Acetat pH 8,3, als Eluent wird Polybuffer96 (Amersham Pharmacia) 1:10 verdünnt und pH6,0 mit Essigsäure eingestellt.

Die weitere Reinigung erfolgt über Reversed-Phase HPLC an einer C<sub>8</sub>-Säule (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) in einem Gradienten von 10% bis 70 % Acetonitril / 0,1 % TFA in Wasser / 0,1 % TFA.

### ***Isolierung von CRISPs aus equinen Spermien***

Hochsalz-gewaschene Spermien aus frischen Ejakulaten werden für 2h bei 4°C mit OGP extrahiert und danach 10min bei 4°C mit 13000 x g abzentrifugiert. Die solubilisierten Spermienproteine werden über Chromatofocussierung getrennt, wie für CRISP-1 beschrieben, jedoch wird dem Elutionspuffer 0,8% OGP zugesetzt. Die nicht gebundenen Proteine werden in einem pH-Gradienten von pH9 bis pH 7 rechromatographiert. Als Startpuffer wird dabei 25mM Ethanolamin HCl pH9,4, als Eluent Polybuffer 96 1:10, pH 7,0 (HCl) verwendet.

## **Immunochemischer Nachweis von CRISPs**

Zum immunochemischen Nachweis stand ein polyklonales Hühnerantiserum zur Verfügung, das durch Immunisierung von SPF-Hühnern mit HPLC-gereinigtem equinem CRISP-3 erhalten wurde. Das Antiserum wird im folgenden als anti-HSP-3 bezeichnet.

### ***Western Blot***

Für Western Blots werden die Proteine aus SDS-Gelen im Semi-Dry Verfahren (Semi-Dry Blotter Biometra, Göttingen, Deutschland) auf PVDF-Membranen (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) übertragen. Dazu werden die auf Gelgröße zugeschnittenen

PVDF-Membranen zunächst mit Methanol befeuchtet und anschließend ebenso wie 6 Lagen Blotpapier (Schleicher & Schuell Dassel, Deutschland) in Blot-Puffer (39mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0375% SDS, 20% (v/v) Methanol) equilibriert. Der Blot-Sandwich wird nach Herstellervorschrift aufgebaut und die Proteine in 90 bis 180min mit 1 mA / cm<sup>2</sup> geblottet. Die Qualität der Übertragung kann bei ausreichenden Proteinmengen durch Färbung der Membran in PonceauS (5 min, 0,5 % Ponceau S in 1 % Essigsäure) und anschließendes Entfärben in H<sub>2</sub>O kontrolliert werden. Sollten die Membranen trocken werden, müssen sie vor dem Kontakt mit wäßrigen Lösungen zunächst wieder in Methanol befeuchtet und danach mit H<sub>2</sub>O abgespült werden.

Die Membranen werden vor der Detektion mindestens 1h bei Raumtemperatur in TBS mit 1 % Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) blockiert. Zum Nachweis von CRISPs wird das Antiserum 1:30000 in TBS mit 1% Blocking Reagenz (= Blockierlösung) verdünnt und die Membranen für 1h bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert. Die Inkubation kann alternativ über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Überschüssiges Antiserum wird durch dreimaliges Waschen für 10min in TBS entfernt und die Membranen anschließend 1h in einer 1:5000 Verdünnung eines anti-Hühner-IgY-Alkalische Phosphatase Konjugats (Dianova) bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der colorimetrischen Detektion werden die Membranen dreimal in TBST (0,1% Tween 20 in TBS) und zweimal in Detektionspuffer (0,1M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl) gewaschen. Die Membranen werden in Detektionslösung (0,4mg / ml NBT, 0,19 mg / ml BCIP in Detektionspuffer) entwickelt bis die Banden gut sichtbar sind (15min bis 18 h) und die Reaktion in H<sub>2</sub>O gestoppt.

### ***Indirekte Immunfluoreszenz***

Spermiensuspensionen werden 10min in PBS-gepuffertem 3% Formaldehyd, 1% Glutaraldehyd fixiert und überschüssiger Aldehyd durch Waschen mit 50mM Glycin in PBS für 3 x 5 min entfernt. Die Suspensionen werden dann auf sauberen Objektträgern ausgestrichen und über Nacht getrocknet. Die Präparate können trocken bei 4°C gelagert werden. Zum Nachweis von CRISPs werden die Präparate in PBS rehydriert und 1h bei 37°C in PBSS (PBS, 10% Ziegenserum) blockiert. Anschließend werden die Objektträger jeweils 1 h bei 37°C mit Antiserum, 1:3000 in PBSS, und einem anti-Hühner-IgY-Cy 3-Konjugat, 1:300 in PBSS, inkubiert, gefolgt von jeweils drei Waschsritten in PBS. Die Präparate werden mit einem Tropfen Mounting Medium (2,5% DABCO, 50 % Glycerin, PBS) und einem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack abgedichtet. Die Präparate werden unter einem Zeiss-Axioskop Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für

Cy-3 Konjugate wird ein 546 nm-Excitationsfilter und ein 590 nm-Emissionsfilter verwendet.

### ***Immunhistologie***

Das Gewebe wird direkt nach der Präparation in max. 1 cm x 1 cm große Stücke zerteilt und in 4 % PBS-gepuffertem Formaldehyd mindestens 48h fixiert. Zur Entfernung überschüssiger Fixierlösung werden die Gewebe 24h in 70 % Ethanol gewaschen, dann in frischer 70 % Ethanolösung nochmals über Nacht gewaschen und anschließend dehydriert. Dazu werden die Präparate jeweils 1h in 80 % Ethanol, 2 x in 96 % Ethanol und 2 x in 100 % Ethanol inkubiert. Es folgen jeweils zwei einstündige Inkubationsschritte in Essigsäure-N-butylester und in Paraffin bei 60°C. Die Präparate werden dann in Paraffin eingebettet und bei 4°C gelagert.

Zur Immunfärbung werden 8 bis 10µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost plus Objektträger aufgebracht. Die Objektträger werden über Nacht bei 37°C und dann 12 h bei 56°C getrocknet und können dann bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden.

Zur Rehydrierung werden die Schnitte 3x 5 min in Xylol, 5 min in 100 % Ethanol, 2 min in 96 % Ethanol, 30 min in 85 % Ethanol und 3 x 5 min in PBS inkubiert. Es folgt eine Inkubation in 10 % Ziegenserum in PBS für 20 min, um unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren, überschüssiges Serum wird durch Waschen mit PBS für 5 min entfernt. Danach werden die Objektträger je 1h mit anti-HSP-3 und mit anti-chicken-Alkalische Phosphatase (Dianova) inkubiert, gefolgt von je drei Waschschritten in PBS. Zur Färbung werden die Präparate mit einer 1:50-Verdünnung von NBT/BCIP-Stammlösung (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in Detektionspuffer mindestens 2 h inkubiert, falls nötig kann bis zu 18h gefärbt werden. Die Reaktion wird durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt und die Präparate mit Glyceringelatine (Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland) eingedeckt und nach dem Erkalten mit Nagellack abgedichtet.

### ***ELISA***

#### *Qualitativer ELISA*

Dieser Test dient zur qualitativen Bestimmung von CRISPs, z.B. in Chromatographie-Fractionen. Die zu testende Proteinprobe wird an eine Mikrotiterplatte (Immobilon, Dynatech, Deutschland) gebunden, indem 25µl der Probelösung und 75µl Coating-Puffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6) je *well* gemischt und 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Für HPLC-Fractionen werden zur Neutralisation 25µl 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 zu 25 µl Probelösung gegeben und nur 50µl Coating-Puffer zugesetzt. Nach



der Bindung der Probe wird die Platte mit BSA gesättigt, dazu wird 1h bei 37°C mit 200 µl / well mit 5 % BSA in ELISA-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100) inkubiert. CRISPs werden mit 100µl / well einer 1:200000 Verdünnung von anti-HSP-3 in 0,5 % BSA / ELISA-Puffer detektiert. Es folgen jeweils Inkubationen mit 100 µl / well anti-chicken-biotin (1:2000, Dianova) und Streptavidin-Peroxidase Konjugat (1:40000, Dianova). Alle Schritte werden bei 1h bei 37°C inkubiert. Nach jedem Schritt wird die Platte dreimal mit 200µl / well ELISA-Puffer, nach der letzten Inkubation zusätzlich einmal mit Wasser, gewaschen. Zur colorimetrischen Detektion werden 100 µl / well Orthophenylendiamin (OPD Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland) 20 mg / 10 ml Substratpuffer (20 mM Zitronensäure, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 5,0) eingesetzt. Nach 20 bis 45 min bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 50µl 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Extinktion bei 492nm in einem ELISA-Reader (ICN Meckenheim, Deutschland) gemessen.

Zur Bestimmung von Bindungskurven wird analog verfahren, jedoch von einem Reagenz eine Verdünnungsreihe pipettiert und alle anderen Konzentrationen konstant gehalten.

#### *Kompetitiver ELISA zur Quantifizierung von CRISPs*

Bei diesem Verfahren wird die Menge Antikörper, die das gebundene Antigen erkennt, durch Inkubation mit einer Antigen-haltigen Lösung konzentrationsabhängig reduziert. Durch Standardisierung mit definierten Mengen Kompetitor kann die Menge CRISPs in einer unbekannt Probe bestimmt werden.

Die Mikrotiterplatte wird mit 1 µg / well HPLC-gereinigtem equinen CRISP-3 beschichtet und blockiert. Eine Standardreihe von 5µM bis 5 pM HIC-gereinigtes equines CRISP-3 sowie Verdünnungsreihen von 1:2 bis 1:1024 der zu bestimmenden Probelösungen werden mit einer 1:600000 Endverdünnung von anti-HSP-3 1h bei 37°C inkubiert, Spermienproben 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, und zweimal 100µl auf die blockierte Platte pipettiert. Alle weiteren Schritte werden wie für den qualitativen ELISA durchgeführt.

## **Ermittlung von potentiellen Bindungspartnern von equinem CRISP-3**

### ***Gewinnung und Vorbehandlung von Uterus-Spülungen***

Der Uterus einer Stute wurde mit 1l 154 mM NaCl gespült. Die Spülflüssigkeit wird anschließend lyophilisiert, in 200ml H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen und über eine Ultrafiltrationsmembran mit 1 kD Ausschlußgrenze (Millipore Eschborn, Deutschland) in

einer 250 ml Ultrafiltrationskammer (Millipore Eschborn, Deutschland) konzentriert. Das Konzentrat wird in derselben Kammer dreimal mit je 200ml H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut lyophilisiert. Die bei der Spülung gewonnenen Proteine werden in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung aliquotiert eingefroren.

### ***Identifizierung potentieller CRISP-3 Liganden im equinen Uterus***

Die Proteine aus der Uterus-Spülung werden 1:10 mit Coating-Puffer verdünnt und an eine Mikrotiterplatte gebunden. Vor der immunchemischen Detektion mit anti-HSP-3 wird 1 h mit 5 µg / ml equinem CRISP-3 inkubiert. Als Kontrolle wird dieser Schritt weggelassen.

Für Western Blot Analysen wird analog verfahren. Dazu werden 10µl der Proteinlösung mit 10 µl Auftragspuffer gemischt, 5min auf 95°C erhitzt und in 4-20% SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine werden auf PVDF-Membranen übertragen. Vor der immunchemischen Detektion von CRISPs werden die Membranen mit 5µg / ml equinem CRISP-3 1 h inkubiert.

Zur Isolierung der potentiellen Bindungspartner werden je 300µl Proteinlösung mit 20 µl Ameisensäure versetzt und mittels RP-HPLC aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen werden wie oben beschrieben an Mikrotiterplatten gebunden und im ELISA getestet. Die positiven Fraktionen werden konzentriert und die Proteinmassen bestimmt. Zur Identifizierung der Proteine werden sie N-terminal ansequenziert.

## **Molekularbiologische Methoden**

### ***mRNA Isolierung***

Poly-A<sup>+</sup>-RNA wird durch Bindung an Oligo-dT<sub>18</sub>-Dynabeads (Dyna, Hamburg, Deutschland) direkt aus Gewebelysaten isoliert. Das Gewebe wird in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und ca. 10 mg Homogenat in 5 ml Lysis-Binding-Puffer (100mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1 % SDS) suspendiert. Nach vollständiger Lyse wird die genomische DNA durch eine 0,9mm Kanüle gesichert und das Lysat 5min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur mit 200µl Dynabeads inkubiert. Die Beads werden je einmal mit SDS-Hochsalz-Puffer (100mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM LiCl, 2 mM EDTA, 0,5 % SDS), Hochsalz-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM LiCl, 2 mM EDTA) und Niedrigsalz-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 125 mM LiCl, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend die mRNA durch dreiminütiges Erhitzen auf 65°C mit 200µl

Elutionspuffer (2 mM EDTA pH 8,0) eluiert. Zur weiteren Reinigung wird das Eluat mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und die mRNA aus der wässrigen Phase mit 600µl Ethanol und 20 µl 3 M Natrium-Acetat gefällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation bei 4°C für 20min bei 13000 x g pelletiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl 0,1 x TE Puffer aufgenommen.

### **RT-PCR**

10 µl der RNA-Präparation werden mit 1 µl 10 µM Oligo-dT<sub>18</sub>-*Primer* und 1 µl H<sub>2</sub>O 10 min auf 70°C erhitzt und danach sofort auf Eis abgekühlt, um die RNA zu denaturieren. Nach der Zugabe von 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl 100 mM DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix (GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) wird die Mischung 2min auf 42°C erwärmt und dann 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase (GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) zugegeben und weitere 50min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen auf 70°C denaturiert und die cDNA bei -20°C gelagert. Falls RNA die weiteren Reaktionen stören könnte, kann die RNA durch 2U RNase H 20 min bei 37°C verdaut werden. Die RNase wird ebenfalls durch Erhitzen auf 70°C denaturiert.

Die so hergestellte cDNA wird als Template für die folgende PCR-Reaktion eingesetzt. Als Primer wurden verschiedene, den jeweiligen Erfordernissen angepaßte Oligonucleotide verwendet.

Für einen 50 µl PCR-Ansatz werden folgende Komponenten gemischt:

5 µl 10 x Puffer  
3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl 10 mM dNTP-Mix  
1 µl cDNA  
1 µl *Primer 1*  
1 µl *Primer 2*  
37,8 µl H<sub>2</sub>O  
0,2 µl (1 U) AGS Gold

Alternativ wurden 2,5U Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland oder AGS Hybaid, Heidelberg, Deutschland) mit 3µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> und dem vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffer eingesetzt. Der Ansatz wird mit Mineralöl überschichtet und die PCR-Reaktion in einem *Thermocycler* (Landgraf, Hannover, Deutschland oder AGS Hybaid, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden für die jeweiligen *Primerpaare* optimiert.

Die Reaktionsprodukte werden in einem 1,5%igen Agarose-Gel (Agarose: GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) in TPE-Puffer (20mM Tris-Phosphat, pH8,0,

2 mM EDTA) mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und die Banden auf einem Transilluminator mit Videodokumentationssystem bei 254nm angeregt und fotografiert.

### 3'-RACE

Für die 3'-RACE (Frohman et al. 1998) PCR wird die cDNA-Synthese nach obigem Protokoll durchgeführt. Für die folgende PCR, Ansatz mit AGS Gold Polymerase wie oben beschrieben, werden ein sequenzspezifischer *Primer* (SSP) und ein 5' verlängerter Oligo-dT<sub>16</sub>-*Primer* (3'-RACE-Primer) verwendet. Zur Amplifikation wird folgendes PCR-Programm durchlaufen:

	5 Zyklen	40 Zyklen	
5 min 92°C	60 s 92°C abkühlen mit 3°C / s auf 40°C 30 s 40°C 90 s 72°C	60 s 92°C 60 s T <sub>M</sub> (SSP) 90 s 72°C	10 min 72°C

### 5'-RACE

Zur Amplifikation der 5'-Enden der mRNA (Frohman et al. 1998) wird zur cDNA-Synthese nach dem oben beschriebenen Protokoll statt des Oligo-dT<sub>8</sub>-*Primers* ein sequenzspezifischer *Primer* für die zu amplifizierende mRNA eingesetzt und nach der cDNA-Synthese ein RNaseH-Verdau durchgeführt. Die so erhaltene cDNA wird mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und mit 30 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 eluiert. An die 3'-Enden der gereinigten cDNA wird durch Terminale Desoxynukleotid Transferase (TdT) ein Homopolymer von dC angehängt. Dazu werden 17 µl cDNA, 5 µl 5 x TdT-Puffer und 2,5 µl 1 mM dCTP gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 10 U TdT wird der Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym 10 min bei 70°C inaktiviert.

Die folgende PCR-Reaktion wird nach dem Protokoll für AGS-Gold Polymerase angesetzt. Es werden jedoch 2 µl cDNA und als *Primer* ein zweiter sequenzspezifischer *Primer* und ein 5'-RACE-*Primer* eingesetzt. Die PCR wird unter den folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei die *Annealing*temperatur für jeden sequenzspezifischen *Primer* individuell empirisch ermittelt werden muß.

	45 Zyklen	
5 min 95°C	90 s 95°C abkühlen mit 3°C / s auf 54-45°C 45 s 54-45°C 60 s 72°C	10 min 72°C

## **Herstellung kompetenter Zellen**

Für die Transformation wird der Bakterienstamm E. Coli JM109 (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Der Stamm hat folgenden Genotyp: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), relA1, supE44,  $\Delta(\text{lac-proAB})$ , [F', traD36, proAB,  $\text{laq}^\Delta\text{Z}\Delta\text{M15}$ ]. Medienkomponenten und Agar werden von GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland bezogen.

Die Bakterien werden auf Minimalmedium-Platten (34mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,6 mM NaCl, 19 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 11 mM Glucose, 1 mM Thiamin-HCl, 15 g / l Agar, pH 7,4) angezogen. Ein einzelner Klon wird in einer Über-Nacht-Kultur in LB-Medium (10g / l Trypton, 5 g / l Hefeextrakt, 5 g / l NaCl) unter Schütteln bei 37°C vermehrt. Die Über-Nacht-Kultur wird 1:100 mit frischem Medium verdünnt und bis zu einer Zelldichte von 0,40,6  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden 5 min bei 4500 x g zentrifugiert, das Pellet in 40% des Kulturvolumens eiskaltem TFB-1 (30 mM K-Acetat, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 100 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut wie oben zentrifugiert und in 4% des Ausgangsvolumens TFB-2 (10mM MOPS, pH 6,5, 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM RbCl, 15 % Glycerin) resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wird in 100  $\mu\text{l}$  Aliquoten in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

## **Klonierung**

Zur Klonierung von PCR-Produkten wird die DNA aus dem PCR-Ansatz mit dem DNA Clean Kit (AGS Heidelberg) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 10mM Tris HCl pH 8,0 eluiert. Die gereinigte DNA wird über TA-Klonierung in einen pGEM Vektor (pGEM-T Cloning Kit, Promega, Madison, WI, USA) kloniert. Dazu werden 1  $\mu\text{l}$  (50 ng) Vektor DNA und maximal 7  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt im molaren Verhältnis 1:2, 1:1 oder 2:1 mit 1  $\mu\text{l}$  10 x Ligationspuffer und 1  $\mu\text{l}$  (3 Weiss Units) T4 DNA-Ligase gemischt, das Volumen falls erforderlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 10  $\mu\text{l}$  ergänzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz kann bis zur Transformation bei -20°C gelagert werden.

Auf je 100  $\mu\text{l}$  auf Eis aufgetaute kompetente Zellen werden 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz pipettiert, durch vorsichtiges Rühren gemischt und 60min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden dann 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und danach wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  Soc-Medium (20 mg / ml Trypton, 5 mg / ml Hefeextrakt, 10 mM

NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose) werden die Zellen 60 min bei 37°C geschüttelt und anschließend 200µl und 400 µl auf LB-Agarplatten mit 100 µg / ml Ampicillin, 0,1 mM IPTG und 40 µg / ml X-Gal ausplattiert. In Plasmiden, die ein Insert tragen, ist das Gen für das α-Peptid der β-Galactosidase zerstört, so daß die Kolonien nicht gefärbt sind, während Klone mit intaktem β-Galactosidase Gen durch die Umsetzung von X-Gal blau erscheinen.

Positive Klone werden auf eine neue Platte umgesetzt und eine Probe der Kultur in einer PCR mit für das Insert spezifischen Primern überprüft. Von Klonen, die das korrekte Insert tragen, werden Über-Nacht-Kulturen in 4ml LB-Medium mit 100µg / ml Ampicillin angeimpft und das Plasmid aus der Über-Nacht-Kultur gewonnen. Die Plasmid-Präparation erfolgt nach dem Protokoll für Nucleobond AX20 Plasmid Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland).

### **Sequenzierung**

Für die Sequenzierung nach der Sanger-Methode (Sanger et al. 1977) wird sowohl Plasmid-DNA als auch PCR-Produkte eingesetzt. Plasmid-DNA wird mit dem *DIG-Taq Sequencing Kit* (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) sequenziert. Das Kit enthält Digoxigenin-markierte M13-Sequenzieprimer, deren Bindungsstelle auf dem Plasmid liegt. Pro Sequenzierreaktion werden 500ng Plasmid-DNA eingesetzt und die Reaktion nach dem Herstellerprotokoll pipettiert, jedoch wird die Taq-Polymerase durch 2,5 U Taq-Pwo-Mix (AGS, Heidelberg, Deutschland) pro Ansatz und den entsprechenden Puffer ersetzt.

PCR-Produkte können direkt mit dem *BioCycle Sequencing Kit* (GATC, Konstanz, Deutschland) sequenziert werden. Als Sequenzieprimer werden die PCR-Primer oder andere sequenzspezifische Primer eingesetzt. Die Markierung der Stränge erfolgt in diesem Fall über biotinylierte didesoxy-Nukleotide. Die Reaktionen werden mit mindestens 100 ng PCR-Produkt nach dem Protokoll des Herstellers angesetzt. Es wurde der Herstellerempfehlung folgend 3U Thermosequenase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet.

Die Sequenzierreaktionen werden auf einem *Direct Blotter* (GATC, Konstanz, Deutschland) aufgetrennt und direkt auf eine Nylonmembran übertragen. Das Sequenziergel ist ein 4%iges Polyacrylamidgel (Long Ranger, Biozym Hess. Oldendorf, Deutschland) in TBE-Puffer (128mM Tris, 42 mM Borsäure, 2,4 mM EDTA) mit 7 M Harnstoff. Nach dem Lauf wird die Membran getrocknet und die DNA 2min 30 s unter

UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Vor der Detektion der Banden wird die Membran je 5 min mit H<sub>2</sub>O und Maleinsäurepuffer (10 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl) gewaschen und 45 min mit 1% Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in Maleinsäurepuffer blockiert. Anschließend wird 45 min mit anti-Digoxygenin-Alkalische Phosphatase Konjugat (1:10000, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) bzw. mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat (1:10000, Dianova) in 1% Blocking Reagenz inkubiert und danach dreimal 10 min mit Waschpuffer (0,3% Tween20, Maleinsäurepuffer) und zweimal 5 min mit Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl) gewaschen. Alle Inkubationsschritte werden in einem Hybridisierungssofen (AGS Hybaid, Heidelberg, Deutschland) unter Rotation bei 37°C durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgt entweder mittels Chemolumineszenz oder alternativ mit NBT/ BCIP.

Für die Chemolumineszenzdetektion wird die Membran 10 min mit CDP-Star (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), 1:100 in Detektionspuffer, inkubiert, mit möglichst wenig Flüssigkeit in Polypropylenfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak) 2 bis 8 h exponiert. Der Film wird 3 min entwickelt, kurz in Wasser gewaschen und 5 min fixiert (Röntgenentwickler und -fixierer, Agfa).

Für die colorimetrische Detektion wird die Membran über Nacht in einer 1:50 Verdünnung von NBT/ BCIP (Stammlösung Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in Detektionspuffer entwickelt und die Reaktion durch Waschen in H<sub>2</sub>O gestoppt.

### ***in vitro* Kapazitation**

Die Vorgänge im weiblichen Genitaltrakt, die die Spermatozoen befähigen, mit der Eizelle zu interagieren, können *in vitro* nachgeahmt werden. Nach der Entfernung des Seminalplasmas, werden die Spermien kapazitierenden Bedingungen ausgesetzt und die Änderungen in der Calcium-Verteilung in der Zelle mit Calcium-bindenden Fluorophoren verfolgt. Vor Versuchsbeginn wird die Zellzahl und die Motilität der Spermien bestimmt.

Zur Zellzahlbestimmung wird ein Aliquot 1:200 in 10% NaCl verdünnt und in einer Thoma-Kammer gezählt. Zur Beurteilung der Motilität werden 5 µl Spermien suspension auf einen vorgewärmten Objektträger gebracht und auf einem Heiztisch bei 39°C unter dem Mikroskop beobachtet.

Ejakulierte Spermien müssen vor der Kapazitation vom Seminalplasma getrennt werden, da dieses kapazitationshemmende Proteine enthält. Um die Zellen möglichst wenig zu

belasten und gleichzeitig eine Selektion motiler Spermien zu erreichen, wird ein swim-up durchgeführt. Man unterschichtet 10ml swim-up-Puffer (20 mM HEPES, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 95 mM NaCl, 1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM Glucose, 60 mM Saccharose, 5 mM Na-Pyruvat, 0,5 % BSA, pH 7,6) mit 1,5 ml Ejakulat und nimmt nach einer Stunde die oberen 2-3 ml, welche die motilen Spermien enthalten, ab. Die Spermien werden durch Zentrifugation bei 100x g (Labofuge GL, Heræus) konzentriert und die Zellzahl sowie die Motilität bestimmt.

Die Spermiesuspension wird auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit Kapazitationsmedium (Medium 199 (Serva Heidelberg, Deutschland) supplementiert mit 29mM Na-Lactat, 10 mM HEPES, 2,3 % BSA, 75 µg/ml Penicillin, 25 µg/ml Streptomycin) verdünnt und je 2 ml in einem sterilen Reaktionsgefäß 1 bis 3 h bei 37°C unter 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Je nach Versuchsablauf wird alle 30 bis 60min ein Aliquot entnommen und der Fortgang der Kapazitation verfolgt. Die Akrosomreaktion kann bei kapazitierten Spermien durch Zusatz von Calcium-Ionophor A 23132 in einer Endkonzentration von 1µg/ml oder Lyso-Phosphatidylcholin in einer Endkonzentration von 10µg/ml induziert werden. In beiden Fällen werden die Reagenzien direkt dem Kapazitationsmedium zugesetzt und die Spermien 5 min bei 37°C inkubiert.

### ***Nachweis der Kapazitation mit CTC-Färbung***

Die Färbung beruht auf der Fluoreszenzzunahme von Chlortetracyclin (CTC, Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland) in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ . Die CTC-Lösung (20 mM Tris-HCl, 5 mM Cystein, 130 mM NaCl, 1 mM CTC, pH 7,6) muß täglich frisch angesetzt und dunkel aufbewahrt werden. Zur Färbung werden 20µl Spermiesuspension mit 20µl CTC-Lösung gemischt, 1-2min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Jena, Deutschland) bei 450-490nm Excitation, 520 nm Emission beurteilt.



## **Biophysikalische Untersuchungen**

### ***CD-Spektren***

Die CD-Spektren wurden mit der freundlichen Unterstützung von Prof. Dr. Jürgen Alves im Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Für die Messungen wurden natives und HPLC-gereinigtes CRISP-3 in einer Konzentration von 1 mg/ml und reduziertes CRISP-3 in einer Konzentration von 0,08 mg/ml eingesetzt.

### ***Interaktion von equinem CRISP-3 mit Lipidvesikeln***

Die Untersuchungen zur Interaktion mit Lipidvesikeln wurden mit der freundlichen Unterstützung durch Prof. Dr. Andreas Herrmann und Dr. Peter Müller in der Abteilung Biophysik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I an der Humboldt-Universität in Berlin durchgeführt.

In Chloroform gelöste Phospholipide werden in einem Glasröhrchen in der gewünschte Zusammensetzung gemischt und unter Stickstoffstrom getrocknet. Nach der Resuspension in 0,5 ml PBS werden die Lipidlösungen auf Eis 10min mit Ultraschall behandelt, um *Small unilamellar vesicles* (SUVs) herzustellen. Es wurden 4mM Lipidlösungen aus reinem Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylcholin in einem molaren Verhältnis von 2:1 mit Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Sphingomyelin (SM) verwendet. Eine Stammlösung von 100µM CRISP-3 in PBS wird aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

Die Fluoreszenzmessungen werden in einem Aminco Bowman Spektrometer (Rochester, USA) durchgeführt. Eine 2µM Lösung von CRISP-3 wird bei 37°C unter Rühren mit einer Vesikelsuspension titriert und nach jedem Schritt ein Fluoreszenzspektrum mit Excitation bei 285 nm (Spaltbreite Ex. 2 nm, Em. 4 nm) aufgenommen.

### 3. Ergebnisse

#### RT-PCR und Sequenzierung von CRISP-3

Da mit den vorhandenen Antikörpern keine Unterscheidung der einzelnen Mitglieder der CRISP-Proteinfamilie möglich war, mußten Möglichkeiten gefunden werden, zwischen verschiedenen CRISPs zu differenzieren. Von der equinen CRISP-Familie lagen außer drei internen Peptidsequenzen von CRISP-3 keine Sequenzinformationen vor. Diese sind aber für die proteinchemische Identifizierung einzelner Proteine notwendig.

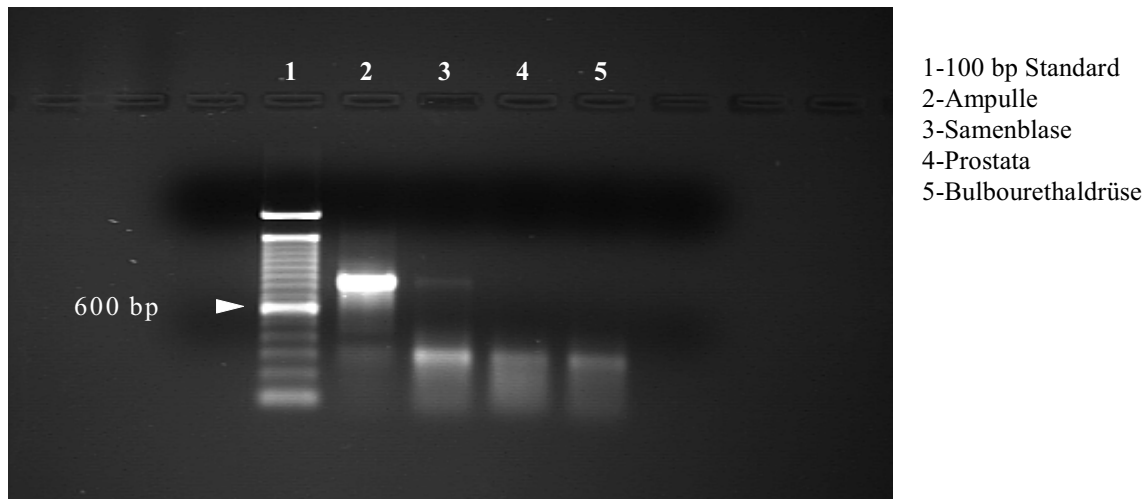
Daher wurde zunächst aufgrund der bekannten Peptidsequenzen (Nessau et al. 1994) und Vergleichen der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten mRNA-Sequenzen für CRISPs anderer Spezies ein sequenzspezifischer Primer entwickelt (Abb3-1). Die Aminosäuresequenz des Peptids ist identisch mit der von humanem CRISP-3 und die dafür codierende humane mRNA-Sequenz enthält einen in allen CRISPs konservierten Bereich. Als Primersequenz wurde die humane Sequenz verwendet und zwar so, daß der Primer mit der konservierten Sequenz endet.

ec CRISP-3-AS:	TPNA	V	V	G	H	Y	T	Q	V	V	W	Y
hs CRISP-3-AS:	TPNA	V	V	G	H	Y	T	Q	V	V	W	Y
hs CRISP-3-RNA:	GTG	GTT	GGA	CAT	TAT	ACA	CAG	<b>GTT</b>	<b>GTT</b>	<b>TGG</b>		

**Abb. 3-1:** Peptidsequenzen von equinem und humanem CRISP-3 und mRNA-Sequenz von humanem CRISP-3 zur Konstruktion eines sequenzspezifischen Primers. Ein in allen bekannte CRISPs konservierter Bereich ist fett markiert.

Aufgrund der großen Mengen CRISP-3 im Seminalplasma, war anzunehmen, daß es von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen Ampulle, Samenblase, Prostata und Bulbourethraldrüse exprimiert wird. Der sequenzspezifische Primer (ssp CRISP) wurde in Kombination mit einem Oligo-dT-Primer (RACE 1) zur Amplifikation eines Fragmentes der CRISP-3 mRNA aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen eingesetzt. Die PCR lieferte ein etwa 800 bp großes Produkt in der Ampulle und wesentlich schwächer in der Samenblase. (Abb. 3-2)

Das Produkt aus der Ampulle wurde kloniert, sequenziert und aus der daraus erhaltenen Sequenz Primer für eine 5'-RACE-PCR und überlappende Fragmente ausgewählt. Das etwa 600 bp große 5'-RACE Produkt und die überlappenden Fragmente wurden ebenfalls kloniert und sequenziert. Alle Sequenzen wurden durch Sequenzierung von je mindestens zwei Klonen überlappender Fragmente bestätigt und die endgültige Sequenz



**Abb.3-2:** 3'-RACE PCR in cDNA der akzessorischen Geschlechtsdrüsen

von 1295 Nukleotiden (Anhang A) in der EMBL-Datenbank deponiert (Acc. No. AJ 001400).

Die mRNA besteht aus einem 58 Nukleotide langen 5'-untranslatierten Bereich, einem offenen Leseraster von 738 und einem 3'-untranslatierten Bereich von 499 Nukleotiden Länge. Die Nukleotide 1262 bis 1267 repräsentieren das Polyadenylierungssignal (*Wickens und Stephenson 1984, Wickens 1990*). Das offene Leseraster kodiert für 246 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1-22 stellen ein potentielles hydrophobes Signalpeptid dar. Das durch dessen Abspaltung vermutete reife Protein (AS 23-246) enthält 16 Cysteine, deren Positionen dem für bisher bekannte CRISPs beschriebenen Muster entsprechen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz enthält keine potentielle O-Glykosylierungsstelle (*NetOglyc*).

**Tabelle 3-1:** Homologie von equinem CRISP-3 zu anderen Mitgliedern der CRISP-Familie

	mRNA	Protein
hs CRISP-2 (TPX 1, Q 60477)	82 %	73 %
cp CRISP-2 (AA1 U35712)	78 %	70 %
hs CRISP-3 (SGP 28 X94323).	77 %	65 %
rn CRISP-1 (SCG, P12020)		57 %
mm CRISP-1 (SCG-1, Q03401)		57 %
Helothermin (Q91055)		54 %
hs CRISP-1 (P54107)		44 %

Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Die größte Homologie sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene besteht zu humanem CRISP-2 und humanem CRISP-3. In Abb. 3-3 ist beispielhaft die Homologie zwischen equinem CRISP-3 und humanem CRISP-2, humanem CRISP-3 und SCG der Ratte gezeigt.

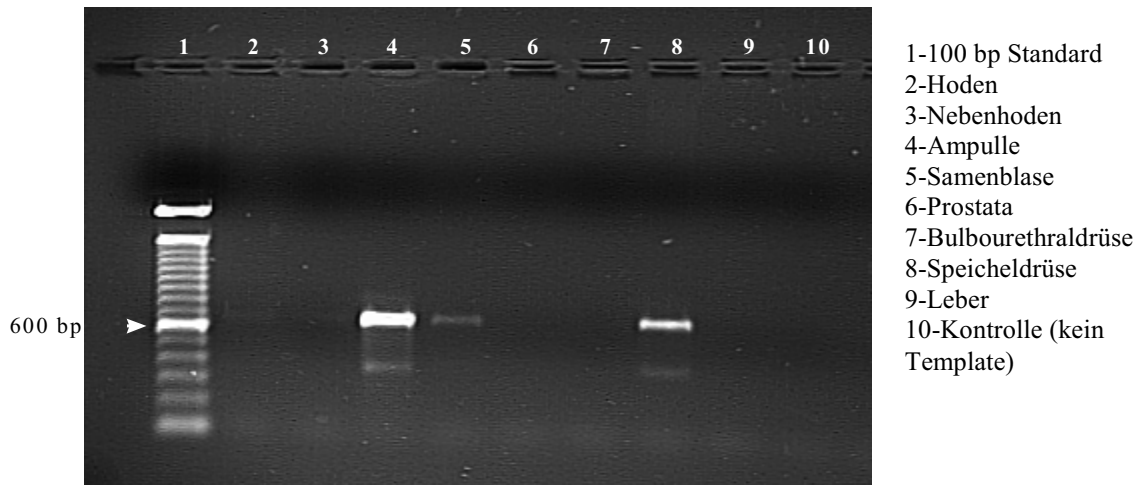
ec CRISP-3	MALLPVLLFLAAVLLPF FPA SGQDPGFAALSITKSEVQKEIVNKHNDLRRTVSPIASNML
hs CRISP-2	MALLPVL FLVTVLLPS LPA EGKDPAFTALLTQLQVQREIVNKHNELRKAVSPPASNML
hs CRISP-3	MTLFPVLLFLVAGLLPS FPA NEDKDPAFTALLTQTQVQREIVNKHNELRRAVSPPARNML
rn SCG	MALMLVLLFLAAVLLPSSLQDITDEWDRDLENLSTTKLSVQEEIINKHNQLRRTVSPSGSDDL
ec CRISP-3	KMQWDSKTATNAQNWANKCLLQHSKAEDRAVGMTKCGENLFMSSIPNSWSDAIQNWHDDEVHDF
hs CRISP-2	KMEWSREVTTNAQRWANKCTLQHSDPEDRKTST RCGENLYMSSDPTSWSSAIQSWYDEILDF
hs CRISP-3	KMEWNKEAAANAQKWANQCNYRHSNPKDRMT SLKCGENLYMSSASSWSSQAIQSWFDEYNDF
rn SCG	RVEWDHDAYVNAQKWANRCIYNHSPLQHRRT TLKCGENLFMANYPASWSSVLDWYDESLDF
ec CRISP-3	KYGVGPKTFNAVVGHYTQVVWYSSYRVGCGIAYCPKQGTLLKYYVCOYCPAGNYVNKINTPYE
hs CRISP-2	VYGVGPKSPNAVVGHYTQLVWYSTYQVCGIAYCPNQDSLKYYVCOYCPAGNMNRKNTPYQ
hs CRISP-3	DFGVGPKTFNAVVGHYTQVVWYSSYLVGCGNAYCPNQKVLKYYVCOYCPAGNWANRLVYPYE
rn SCG	VFGFGPKKVGKVGHYTQVVWNSTFLVACGVVAECPDQ PLKYFYVCHYCPGGNYVGRLYSPYT
ec CRISP-3	QGTPCARCPGNCNGLCTNSCEYEDLVSNCDSLKKIAGCEHELLKENCKTTCCENKIYZ
hs CRISP-2	QGTPCAGCPDDCDKGLCTNSCOYQDILLSNCDSLKNTAGCEHELLKEKCKATCLCENKIYZ
hs CRISP-3	QGAPCASCPDNCDDGLCTNSCKYEDLYSNCDSLKLTLTCKHQIVRDSCKASCNCSNIYZ
rn SCG	EGEPCDSCPGNCEDEGLCTNSCEYEDNYSNCGDLKMMVSCDDPELLKEGCRASCFCEDKIHZ

**Abb. 3-3:** Homologie zwischen equinem CRISP-3 und humanem CRISP-2 und CRISP-3 und dem SCG der Ratte

hellgrau: in allen Sequenzen identische Aminosäuren, dunkelgrau: in ec CRISP-3, hs CRISP-2 und hs CRISP-3 identische Aminosäuren

Aus der Gesamtsequenz der mRNA wurden zwei spezifische Primer (eC3-5 und eC3-6), die in Regionen mit geringer Homologie zu anderen CRISP-Sequenzen liegen, ausgewählt. Die Transkription der mRNA in den Geweben des equinen männlichen Genitaltraktes wurde mittels RT-PCR detektiert. Es zeigte sich, daß die Transkription auf die Ampulle, die Samenblase und die Speicheldrüse beschränkt ist (Abb. 3-4).

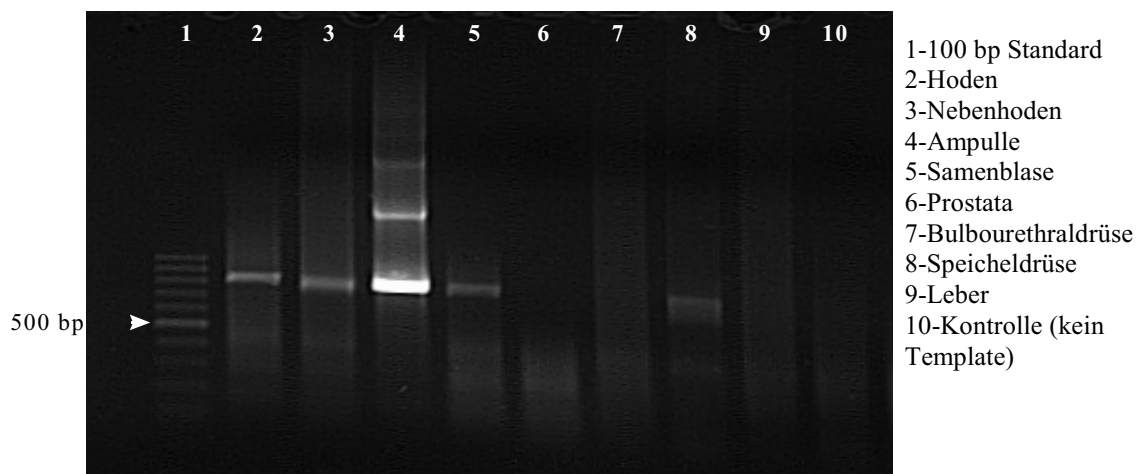
Das aus der sequenzierten mRNA abgeleitete Protein wurde als equines CRISP-3 eingestuft, obwohl sowohl die mRNA als auch die Proteinsequenz größere Homologie zu CRISP-2 aus Mensch und Meerschweinchen aufweisen. Dagegen sprach die Transkription in Ampulle, Samenblase und Speicheldrüse. Bisher konnte nur CRISP-3 in akzessorischen Geschlechtsdrüsen nachgewiesen werden, während CRISP-2 immer im Hoden transkribiert wird. Darüberhinaus entspricht der Aufbau der gefundenen mRNA der von CRISP-1 und CRISP-3, aber nicht der von CRISP-2. Der 5'-untranslatierte Bereich aller bisher bekannten CRISP-2 mRNAs umfaßt etwa 250 Nukleotide, während



**Abb.3-4:** Gewebeverteilung der CRISP-3 Transkripte im Genitaltrakt des Hengstes

der von CRISP-1 und CRISP-3 deutlich kürzer ist. Damit spricht auch ein 5'-untranslatierter Bereich von 58 Nukleotiden für eine Einstufung als CRISP-3.

Die spezifische RT-PCR wurde durch eine 3'-RACE-PCR (ssp CRISP und RACE 1) mit dem ersten sequenzspezifischen Primer, der nur eine CRISP-spezifische Bande lieferte ergänzt. Die 3'-RACE-PCR ergab neben Ampulle, Samenblase und Speicheldrüse zusätzlich positive Signale im Hoden und Nebenhoden (Abb. 3-5). Die cDNA-Synthese wurde in allen Fällen durch eine für die  $\beta$ -Aktin mRNA spezifische PCR überprüft. Die Kontrolle der cDNA-Synthese war für alle verwendeten cDNAs positiv (nicht gezeigt).



**Abb.3-5:** 3'-RACE-PCR zur Amplifizierung CRISP-spezifischer Transkripte im Genitaltrakt des Hengstes

## RT-PCR und Sequenzierung von CRISP-1 und CRISP-2

Die Produkte des 3'-RACE aus Hoden und Nebenhoden wurden kloniert und sequenziert. Es stellte sich heraus, daß beide Sequenzen sowohl voneinander als auch von der CRISP-3 mRNA Sequenz verschieden sind. Aus den erhaltenen Sequenzen wurden ebenfalls Primer für eine 5'-RACE PCR und überlappende Fragmente (eC1-1 bis eC1-7 und eC2-1 bis eC2-6) ausgewählt und die Produkte kloniert und sequenziert.

Alle Sequenzen wurden durch Sequenzierung von je mindestens zwei Klonen überlappender Fragmente bestätigt und die endgültigen Sequenzen von 1379 Nukleotiden für ec CRISP-1 und 1195 Nukleotiden für ec CRISP-2 (Anhang B und C) in der EMBL-Datenbank eingereicht (Acc. No. AJ006631 und AJ 006632).

Die CRISP-1 mRNA umfaßt 1379 Nukleotide, darunter ein offenes Leseraster von 753 Nukleotiden (109-861). Die mRNA enthält 518 Nukleotide 3'-untranslatierten Bereich mit einem Polyadenylierungssignal an Position 1339-1343. Das offene Leseraster der 1195 Nukleotide großen CRISP-2 mRNA umfaßt 735 Nukleotide (204-938). Der 3'-untranslatierte Bereich mit dem Polyadenylierungssignal an Position 1146-1150 ist insgesamt 257 Nukleotide lang. Das offene Leseraster der CRISP-1 mRNA kodiert für 251, das der CRISP-2 mRNA für 244 Aminosäuren. Beide Aminosäuresequenzen enthalten potentielle hydrophobe Signalpeptide, bei CRISP-1 Aminosäure 1-24, bei CRISP-2 Aminosäure 1-22. Die daraus abgeleitete reifen Proteine (AS 25-251 und AS 23-244) enthalten die für CRISPs charakteristischen 16 Cysteine..

Die mRNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz wurden mit dem FASTA-*Pearson und Lipman 1988*) bzw. BLAST- (*Altschul et al. 1990*) Programm mit Sequenzen aus der EMBL- und der swissprot-Datenbank verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2a und 3-2b dargestellt

**Tabelle 3-2:** Homologie von equinem CRISP-2 (a) und CRISP-1 (b) zu anderen Mitgliedern der CRISP-Familie

<b>a</b>	<b>mRNA</b>	<b>Protein</b>
hs CRISP-2 (X95239, M25532)	86 %	75 %
cp CRISP-2 (AA1 U35712)	80 %	72 %
mm CRISP-2 (TPX-1 P16563)	73 %	65 %
rn CRISP-2 (D1032991)	76 %	
hs CRISP-3 (SGP 28 X94323)	77 %	
ec CRISP-3 (AJ001400)	83 %	65 %

<b>b</b>	<b>mRNA</b>	<b>Protein</b>
hs CRISP-1 (X95237, S80310, D38451)	75 %	79 %
hs CRISP-3 (SGP 28 X94323)	60 %	47 %
cp CRISP-2 (AA1 U35712)	60 %	47 %
hs CRISP-2 (X95239, M25532)	58 %	47%
ec CRISP-3 (AJ001400)	58 %	
mm CRISP-1 (SCG-1, Q03401)		40%
rn CRISP-1 (SCG, P12020)		39 %

**a**

```

ec CRISP-1: MTMKHFLFLAAAAAGFLPVVIRAKPASVPYHTLLELATVQEEIVTVHNTLRRGVVPPASNMLKMNWSEEAQNARRLSAQCEL
hs CRISP-1: MEIKHLLFLVAAAC-LLPMLSMKKKSARDQFNKLVTDLPNVQEEIVNIHNALRRRVVPPASNMLKMSWSEEAQNARIFSKYCDM
hs TPX-1 : FLVTVLLPSLPAEKGDPAFALLTTQLQVOREIVNKHNELRRAVSPFASNMLKMEWSREVTTNAQRWANKCTL
ec CRISP-3: LFLAAVLLPFFP-----ASGQDPGFAALSITKSEVQKEIVNKHNDLRRTVSPLASNMLKMQWD SKTATNAQNWANKCLL
mm CRISP-1: MALMLVLLFLLAAV---LPPSLLDSSQENRLEKLSITKMSVQEEIVSKHNQLRRMVSPSGSDDLKMEWNYDAQVNAQQWADKCTF
rn CRISP-1: LSTTKLSVQEEIINKHNQLRRTVSPLSGSDDLRFVEVDHDAVYNAQKWANRCI

ec CRISP-1: IESKAVERRITNTFCGENMHLTSYPI$WSNVIGIWFSESKYFKYQWISTDDEVIIIEHYTQLVWATSYLIGCGISSCSKRRSIQY
hs CRISP-1: TESNPLERRLPNTFCGENMMHTSYPVSWSSVIGVWYSESTSEFKHGEWTTDDDDITTDHYTQIVWATSYLIGCAIASCRQQGSERY
hs TPX-1 : QHSDPEDRK-TSTRCGENLYMSSDPTSWS$AIQSWYDEILDFVYGVGPKSPNAV-VGHYTVLVWYSTYQVGGCIAYCPNQDSLKY
ec CRISP-3: QH$KAEDRAVGTMKCGENLFMSSIPNSWSDAIQ$NWHDEVHDFKYGVGPKTPNAV-VGHYTVVWYSSYRVGCGIAYCPKQGTLLKY
mm CRISP-1: SHSP-IELRTTNLRCGENLFMSSYLASWSSAIQGWYNEYKDLTYDVGPKQPD$V-VGHYTVVWVNSTFQVACVAECPKN-PLRY
rn CRISP-1: YNHSPLQHRTTTTLRCGENLFMANYPASWSSVIO$WYDES LDFVFG-FGPKKVGKVGHYTVQVWVNSTFLVACVAECPDQ-PLKY

ec CRISP-1: LYVCHYCHEGNDPDKKNVPYNMCTPCKDCPNDCEDRLCTNFCPLYDESNKCKTQKEALGCSHL$VKLFCKATCLCDTEIK
hs CRISP-1: LYVCHYCHEGNDP$ETKNEPYKTVGVEACPSNCDKLC$TNPCIIYDEYFDCDIQVHYLGCNHS$TILFCKATCLCDTEIK
hs TPX-1 : YVVCQYCPAGNMNRKNTPYQOGTPCAGCPDDCDKGLCTNSCQYQD$LLSNCD$SLKNTAGCEHELLKECKATCLCENKI
ec CRISP-3: YVVCQYCPAGNYVNKINTPYEQGTPCARCPGN$DNGLCTNSCEYEDLVSNCDSLKKIAGCEHELLKENCKTTCCENKI
mm CRISP-1: YVCHYCPVGNVYQGRLYTPYTAG$PCASCPDHCE$DGLCTNSCGHEDKYTNCKYLLKMLSC$EHELLKKGCKATCLCEGKI
rn CRISP-1: FVCHYCPGGNYVGRLYSPYTEGEPCD$CPGNCE$DGLCTNSCEYEDNYSNCGDLK$KMSVSCDDP$LLKEGCRASCFCEDKI

```

**b**

```

ec CRISP-2: ---MAFLPVVMFLAAVLLPSLPTEG-DPAF-ALLTTQTOVQOREIVNKHNELRKSSLSPPASNMLKMEWSREATSNAKRWANKCTLE
hs TPX-1 : ---MALLPV-LFLVTVLLPSLPAEKGDPAFALLTTQLQVOREIVNKHNELRKA-VSPPASNMLKMEWSREVTTNAQRWANKCTIQ
cp TPX-1 : ---MALLPVVFLITMLLPCVLTNGKDPAFALLTTQ$QVONEIINKHNOLRKS-VTPASNMLKMEWSREAAVNAQKWANRCTLV
ec CRISP-3: ---MALLPVLLFLLAAVLLPFFPASGQDPGFAALSITKSEVQKEIVNKHNDLRR-TVSPASNMLKMQWD$SKTATNAQNWANKCLLQ
mm TPX-1 : ---MAWFQVMLFV$FALLLRSPLTEGKDPDF$TSLTNQLQVOREIVNKHNELR$RS-VNPTGSDILKMEWSIQATTNAQKWANKCILE
rn CRISP-1: MALMLVLLFLLAAVLLP$SLLDQTTDEWDRDLENLSTTKLSVQEEIINKHNQLRR-TVSPSGSDDLRFVEVDHDAVYNAQKWANRCIYN

ec CRISP-2: H$SADDRKTST-RCGENLYMSSDPTP$WSDAIQ$TWYDESLDFTYGVGPKSAGSVVGHYTVAVWYSSYRVGCGIAYCPNOESLKY$YV
hs TPX-1 : HSDPEDRKTST-RCGENLYMSSDPTSWS$AIQSWYDEILDFVYGVGPKSPNAV$VGHYTVLVWYSTYQVGGIAYCPNQDSLKY$YV
cp TPX-1 : HSNPDDRKTST-KCGENLYMSSDPS$WSDAIQ$WFE$SDFTFVGVGPKSHNAV$VGHYTVLVWYSSYLVGCGIAYCPNQDSLKY$YV
ec CRISP-3: H$KAEDRAVGTMKCGENLFMSSIPNSWSDAIQ$NWHDEVHDFKYGVGPKTPNAV$VGHYTVVWYSSYRVGCGIAYCPKQGTLLKY$YV
mm TPX-1 : H$SKDDRKINI-RCGENLYMSTDP$TLWSTFVIQ$WYNE$NEDFVYGVGKAP-NSAVGHYTVLVWYSS$FKIGCGIAYCPNODNLKY$YV
rn CRISP-1: H$SPLQHR$TTTTL-KCGENLFMANYPASWSSVIO$WYDES LDFVFG-FGPKKVGKVGHYTVQVWVNSTFLVACVAECPDQ-P$LYFYV

ec CRISP-2: CQYCPVGNV$NKNTPYQOGHPCAMCPGN$DNGICTNSCEYEDLLSNCD$SLKQAGCEHELLKECKATCR$CESKIY
hs TPX-1 : CQYCPAGNMNRKNTPYQOGTPCAGCPDDCDKGLCTNSCQYQD$LLSNCD$SLKNTAGCEHELLKECKATCLCENKIY
cp TPX-1 : CQYCPAGNNVYTKNTPYKQGI$PCASCPGH$ENGLCTNSCEYEDLLSNCE$SLKNTAGCEHOLLVEKCKATCR$CEDKIY
ec CRISP-3: CQYCPAGNYVNKINTPYEQGTPCARCPGN$DNGLCTNSCEYEDLVSNCDSLKKIAGCEHELLKENCKTTCCENKIY
mm TPX-1 : CHYCPMGNV$MKKSTPYQOGTPCASC$PNNCE$NGLCTNSCDFEDLLSNCE$SLKTSAGCKHELLKTKQATCLCE----
rn CRISP-1: CHYCPGGNYVGRLYSPYTEGEPCD$CPGNCE$DGLCTNSCEYEDNYSNCGDLK$KMSVSCDDP$LLKEGCRASCFCE----

```

**Abb.3-6**

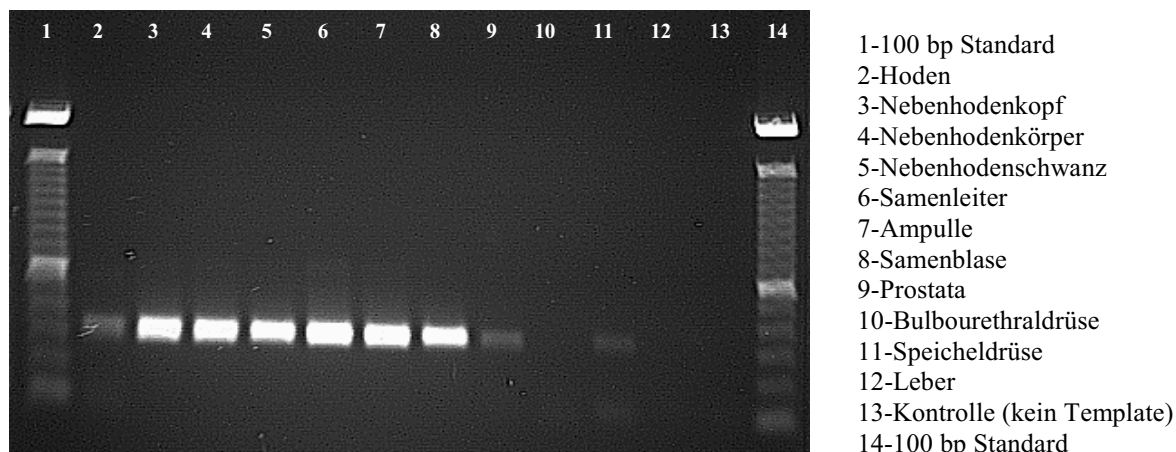
**a:** Homologie zwischen equinem CRISP-1 und humanem CRISP-1 und CRISP-2, equinem CRISP-3 und CRISP-1 aus Maus und Ratte

**b:** Homologie zwischen equinem CRISP-2 und humanem CRISP-2, Meerschweinchen CRISP-2, equinem CRISP-3, murinem CRISP-2 und CRISP-1 der Ratte.

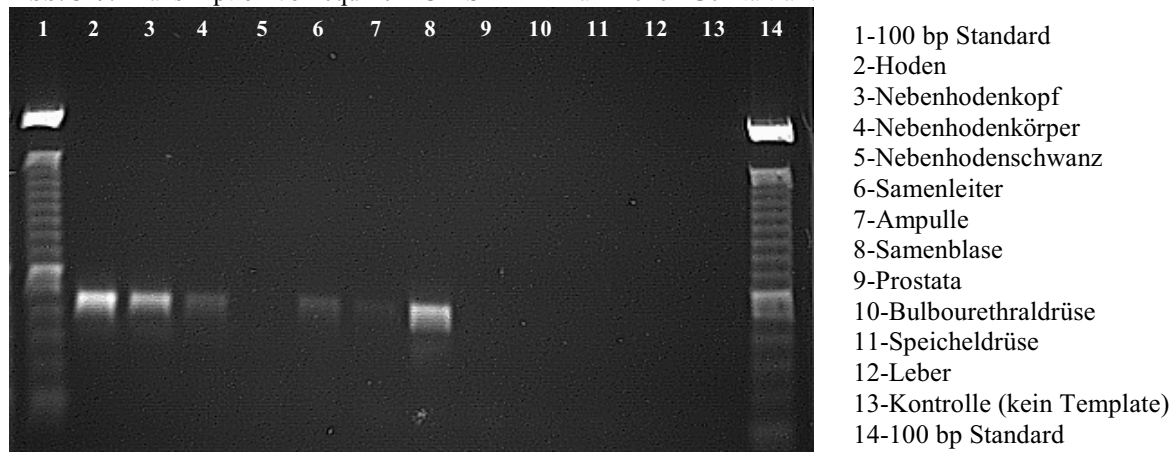
hellgrau: in allen Sequenzen identische Aminosäuren, dunkelgrau: in den nächsten Homologen identische Aminosäuren

In Abb. 3-6a ist beispielhaft die Homologie zwischen equinem CRISP-1 und humanem CRISP-1 und CRISP-2, CRISP-1 der Maus und der Ratte und equinem CRISP-3 gezeigt. Homologien zwischen equinem CRISP-2 und CRISP-2 aus Mensch, Meerschweinchen und Maus sowie equinem CRISP-3 und CRISP-1 der Ratte zeigt Abb. 3-6b.

Aus den Sequenzen wurden jeweils zwei spezifische Primer (eC1-8 und eC1-9 bzw. eC2-2 und eC2-4) ausgewählt, um die Transkription in den Geweben des männlichen Genitaltrakts mittels RT-PCR nachzuweisen. Die Amplifikation eines 350bp großen Fragments von CRISP-1 und eines 450bp Fragments von CRISP-2 wurde wie bei CRISP-3 beschrieben durchgeführt. Die Transkription von CRISP-1 und CRISP-2 ist weit weniger auf bestimmte Organe beschränkt als die von CRISP-3. CRISP-1 Transkripte wurden im gesamten Nebenhoden, dem Samenleiter, der Ampulle und der Samenblase amplifiziert. Schwächere Signale zeigten Hoden, Prostata und Speicheldrüse (Abb. 3-7). CRISP-2 wird stark in Hoden, Nebenhodenkopf und Prostata detektiert, schwächer in Nebenhodenkörper, Samenleiter und Ampulle (Abb. 3-8). Keine Produkte wurden in der Bulbourethraldrüse, der Leber und der Negativkontrolle (ohne Template) erhalten.



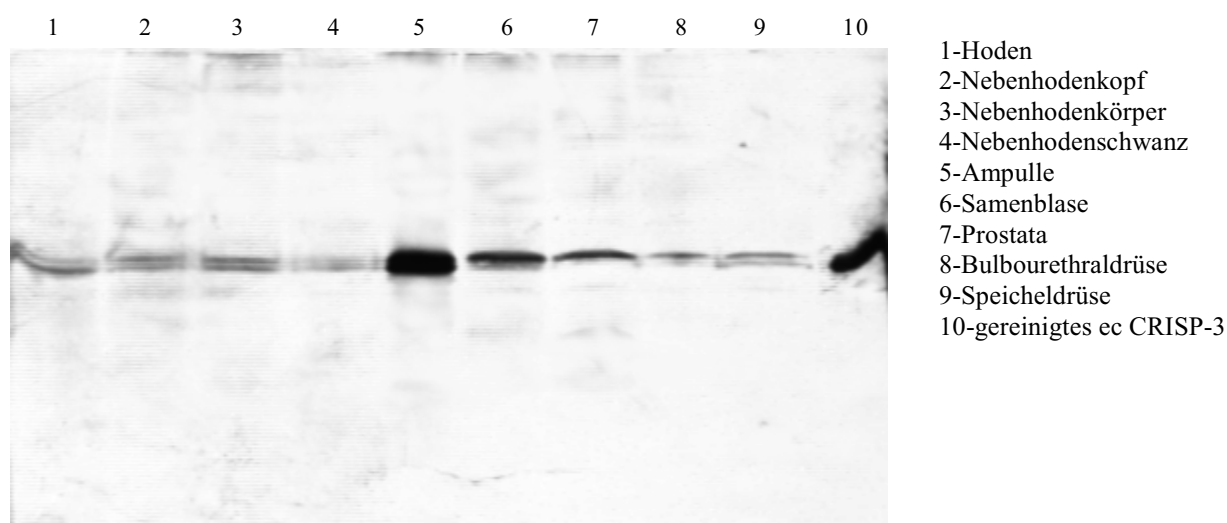
**Abb. 3-7:** Transkription von equinem CRISP-1 im männlichen Genitaltrakt



**Abb. 3-8:** Transkription von equinem CRISP-2 im männlichen Genitaltrakt



Die Expression der CRISPs in den Geweben wurde durch einen Western Blot der entsprechenden Gewebeextrakte bestätigt (Abb.3-9). CRISPs konnten im Hoden, im gesamten Nebenhoden, der Ampulle, der Samenblase, der Prostata, der Bulbourethraldrüse und der Speicheldrüse nachgewiesen werden. In der Bulbourethraldrüse wurde keine Transkription von CRISPs gefunden. Es könnte sich also um die Expression eines weiteren CRISPs handeln oder, was wahrscheinlicher ist, um Sekrete aus den anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen, die sich vor der Entnahme der Gewebe verteilt haben.



**Abb. 3-9:** Western Blot von equinen Gewebextrakten

Mit Ausnahme der akzessorischen Geschlechtsdrüsen wird in den Extrakten eine Doppelbande angefärbt. Dies könnte auf das Vorhandensein von zwei Proteinen oder auf proteolytischen Abbau während der Extraktion zurückzuführen sein. Da die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, daß in Hoden, Nebenhodenkopf und -körper CRISP-1 und CRISP-2 und in der Speicheldrüse CRISP-1 und CRISP-3 transkribiert werden, ist dies vermutlich auf die Expression von zwei verschiedenen CRISPs zurückzuführen. In den akzessorischen Geschlechtsdrüsen wird dagegen scheinbar nur eine Form exprimiert.

Aufgrund der Schwierigkeiten, Gewebe von fertilen Hengsten und insbesondere Stuten zu erhalten und der Probleme bei der Kultivierung und *in vitro* Fertilisation equiner Oocyten, eignet sich das Pferd schlecht für physiologische und funktionelle Experimente. Beim Schwein existieren diese Probleme nicht, so daß es als ein geeignetes Modelltier erscheint. Allerdings waren bislang keine porcinen CRISPs bekannt. Daher wurde zunächst versucht, die entsprechenden mRNA-Sequenzen zu ermitteln.

## **RT-PCR und Sequenzierung von porcinem CRISP-1 und CRISP-2**

Die Strategie, die zur Klonierung und Sequenzierung der porcinen CRISPs verfolgt wurde, ist an die erfolgreiche Sequenzierung der equinen Homologen angelehnt. Das 3'-RACE mit dem sequenzspezifischen Primer (ssp CRISP) und dem Oligo-dT-Primer (RACE 1) lieferte in Hoden, Nebenhoden, Samenblase und Bulbourethraldrüse ein Produkt, nicht aber in Prostata, Speicheldrüse und Leber.

Die Sequenzierung der Produkte aus Hoden, Nebenhoden und Samenblase zeigte, daß die Sequenzen aus Hoden und Samenblase identisch und homolog zu humanem CRISP-2 sind. Die Sequenz aus dem Nebenhoden unterscheidet sich von dieser und ist homolog zum humanen CRISP-1. Das Produkt aus der Bulbourethraldrüse konnte nicht kloniert und sequenziert werden.

Für CRISP-1 und CRISP-2 wurden die von der ersten Sequenzierung nicht erfaßten Bereiche mit spezifischen Primern sequenziert (sC1-3 bis sC1-6 und sC2-3 bis sC2-6) und eine 5'-RACE-PCR (sC1-1, sC1-2, sC2-1 und sC2-2) durchgeführt, um die Sequenz des 5'-Endes der mRNA zu erhalten. Dies ist für die CRISP-2 mRNA gelungen, der Sequenz der CRISP-1 mRNA fehlt der 5' untranslatierte Bereich und die ersten Aminosäuren. Die gelesenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung mehrerer Klone und überlappender Fragmente bestätigt. Die Nukleotidsequenz der CRISP-2 und die partielle Sequenz CRISP-1 mRNA-Sequenz wurden in der EMBL Datenbank eingereicht (Acc. Number AJ 006633 und AJ 006634).

Das offene Leseraster der porcinen CRISP-2 mRNA kodiert für 244 Aminosäuren. Aminosäure 1-22 stellen ein potentiell hydrophobes Signalpeptid dar. Das daraus abgeleitete reife Protein (AS 23-244) enthält die in allen CRISPs konservierten 16 Cysteine. Das Leseraster der CRISP-1 mRNA wurde aufgrund der Homologie zur humanen und equinen CRISP-1 mRNA und der Positionen der 16 Cysteinreste ermittelt. Die partielle Sequenz kodiert für 201 Aminosäuren. Damit sind erstmals Sequenzen für porcine CRISPs vollständig bzw. partell bekannt.

Die aus der mRNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit dem dem FASTA- (*Pearson und Lipman 1988*) bzw. BLAST- (*Altschul et al. 1990*) Programm mit anderen bisher bekannten Sequenzen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

**Tabelle 3-3:** Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz von porcinem CRISP-1 und CRISP-2 zu den Homologen aus Mensch, Maus Ratte und Meerschweinchen

<b>a</b>	<b>ss CRISP-1</b>
hs CRISP-1 (P54107)	64 %
mm CRISP-1 (SCG Q03401)	42 %
rn CRISP-1 (SCG P12020)	39 %

<b>b</b>	<b>ss CRISP-2</b>
hs CRISP-2 (TPX-1 16562)	80 %
mm CRISP-1 (TPX-1 P16563)	69 %
rn CRISP-2 (TPX-1 D1032991)	68 %
cp CRISP-2 (AA1)	78 %

Abb. 3-10 zeigt die Homologie zwischen porcinem CRISP-1 (Abb3-10a) und seinen Homologen aus Mensch, Maus und Ratte und humanem CRISP-2 (Abb3-10b).

**a**

ssCRISP-1:	YKTLLELATVQEEIVTVHNTFRRGVSPPASNSL	34
hsCRISP-1:	MEIKHLLFLVAAACLPLMSMKKKSARDQFNKLVTDLPNVQEEIVNIHNALRRRVVPPASNML	63
rnSCP:	MALMLVLLFLAAVLPPSLLQDSTDDEWDRDLENLSTTKLSVQEEIINKHNQLRRTVSPSGDILL	63
mmCRISP-1:	MALMLVLLFLAAVLPPSLLQDSSQE-NR-LEKLSSTKMSVQEEIVSKHNQLRRMVSPSGDILL	61
hsCRISP-2:	MALLPVLFL-VTVLLPSL-PAEGKDA--FTALLTTQLVQREIVNKHNELRKAVSPPASNML	59
ssCRISP-1:	KMNGSEEAQNARMLLKDCELLESNALKRRIINTFCGENRMLTDPVSWN-VIRIWYSESKYF	96
hsCRISP-1:	KMSWSEEAQNARIFSKYCDMTESNPLERRLPNTFCGENMHMTSYPVSWSSVIGVWYSESTSF	126
rnSCP:	RVEWDHDAVYVNAQKWANRC-IYNHSPLOHRTTTLKCGENLFMANYFASWSSVIQDWYDESLDF	125
mmCRISP-1:	KMEWNYDAQVNAQQWADKCTFSHS-PIELRTTNLRCGENLFMSSYLASWSSAIQGWYNEYKDL	123
hsCRISP-2:	KMEWSREVTNAQRWANKCTLQHSDEPK-TSTRCGENLYMSSDFTSWSSAIQSWYDEILDF	121
ssCRISP-1:	KYGEWTLTDDDVTVVEHYTQIVWATSYLIGCGLSGCGKSAHYLYICHYCHEGNDPNKKNPEY	159
hsCRISP-1:	KHGEWTLTDDDIITDHYTQIVWATSYLIGCAIASCRQQGSPRYLYVCHYCHEGNDPETKNEPY	189
rnSCP:	VFG-FGPKKVGKVGHYTQVWVNSTFLVACGVAECP-DQPLKVFYVCHYCPGGNYVGRLYSPY	186
mmCRISP-1:	TYDV-GPKQPDSVVGHYTQVWVNSTFQVACGVAECPK-NPLRYVYVCHYCPVGNYPGRLYTPY	184
hsCRISP-2:	VYGVGPKSPNAV-VGHYTQLVWYSTYQVCGCIAYCPNQDSLKYVYVCHYCPAGNMMNRKNTPY	183
ssCRISP-1:	RRGTPCGDCPDYCEDKLCNPLCYDEYSNCKAOTRGPCCSHVSVQQLCKASCLCHTEIK	239
hsCRISP-1:	KTGVPCAECPNCEDKLCNPCIYDEYFDQDIQVHYLGCNHSTILFCATCLCDETEIK	249
rnSCP:	TEGEPDCSPGNCEDGLCTNSCEYEDNYSNCGDLKMMVSCDDPLLKEGCRASCFCEDKIH	246
mmCRISP-1:	TAGEPCASCPTHCEGLCTNSCGHEDKYTNCKYLKMLSCHEHELLKKGCKATCLCEGKIH	244
hsCRISP-2:	QQGTPCAGCPDCKGLCTNSCQVQLLSNCDLKNATGCEHELLKKEGCKATCLCENKIY	243

**Abb.3-10**

**a:** Homologie von porcinem CRISP-1 zu humanem CRISP-1 (P54107), SCP Ratte (P12020), SCP Maus (Q03401) und humanem CRISP-2 (P16562)

grau: identische Aminosäuren

**b**

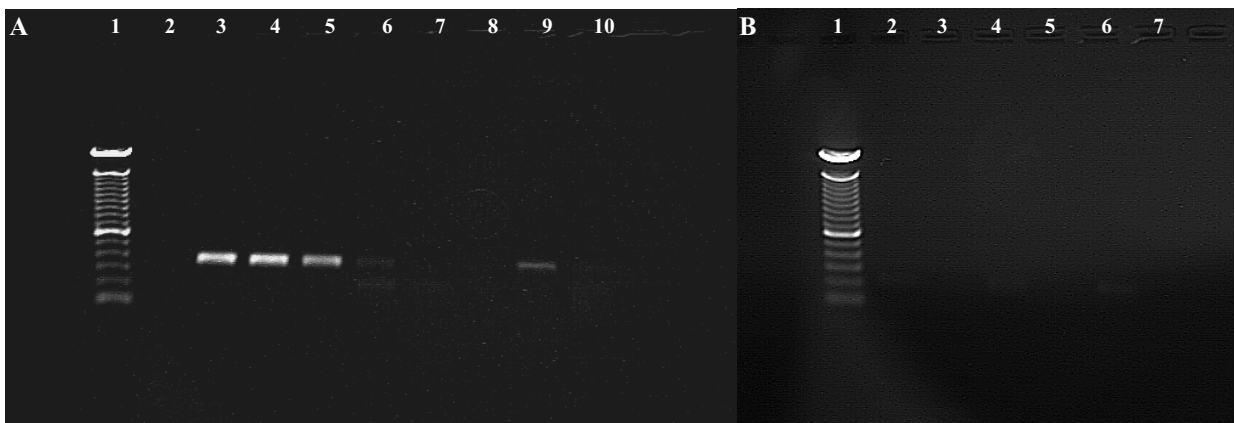
ss CRISP-2:	MALLPMLVFLAAVLLPSFPTEGKDPCEFTALLTSQPOIQKEIVAKHNELRRSVSPASNMLK	16
hs CRISP-2:	MALLP-VLFLVTVLLPSLPAEGKDPAFTALLTQLQVOREIVNKHNLRKAVSPPASNMLK	59
cp TPX-1:	MALLPVVVFLLITMLLPVLTNGKDPAFTALITTSQVQNEIINKHNQLRKSVTPPASNMLK	63
ec CRISP-3:	MALLPVLLFLAAVLLPFFPASCQDPGFALSLITKSEVQKEIVNKHNDLRRTVSPLASNMLK	63
mm CRISP-1:	MAWFQVMLFVFALLLRSPLETEGKDPDFTSLLTNQLQVOREIVNKHNLRRSVNETGSDIILK	61
ss CRISP-2:	MEWSRETSANAQKWANKCTLEHSDPDDRKTST-KCGENLYMSSDPAAWSDAIQSWFDERHD	78
hs CRISP-2:	MEWSREVTTNAQRWANKCTLOHSDPEDRKTST-RCGENLYMSSDPTSWSSAIQSWYDEILD	121
cp TPX-1:	MEWSREAAVNAQKWANRCTLVHSDPDDRKTST-KCGENLYMSSDPSWSDAIQSWFDESQD	126
ec CRISP-3:	MQWDSKLTATNAQNWANKCLLOHSKAEDRAVGTMKCGENLFMSSIPNSWSDAIQNHDEVDH	125
mm TPX-1:	MEWSIQATTNAQKWANKCILEHSSKDDRKINI-RCGENLYMSTDPITLWSFVIQSWYNEED	123
ss CRISP-2:	FVYGAGPKSSSAVVGHYTQLVWYSSYRVGCGIAYCPNOENLKYVVVCQYCPAPNNVSKKNT	141
hs CRISP-2:	FVYGVGPKSPNAVVGHYTQLVWYSTYQVVGCGIAYCPNQDSLKYVVVCQYCPAGNNMNRKNT	183
cp TPX-1:	FTEFGVGPKSHNAVVGHYTQLVWYSSYLVGCGIAYCPNQDSLKYVVVCQYCPAGNNVYTKNT	189
ec CRISP-3:	FKYGVGPKTPNAVVGHYTQVWYSSYRVGCGIAYCPKQGTLYVVVCQYCPAGNYVVKINT	186
mm TPX-1:	FVYGVGAKPNSAV-GHYTQLVWYSSFKIGCGIAYCPNQDNLKYFYVCHYCPMGNVMKKST	184
ss CRISP-2:	PYQEGTPCASCPCGDCDDGLCTNTCQYEDLLSNCDLSLKKTAGCGHELLKEKCKATCLCEGKIY	201
hs CRISP-2:	PYQQGTPCAGCPDDCDKGLCTNSCQYQDLLSNCDLSLKNNTAGCEHELLKEKCKATCLCENKIY	243
cp TPX-1:	PYKQGTPCASCPCGHCENGLCTNSCEYEDLLSNCELSLKNNTAGCEHOLLVEKCKATCRCEDKIY	249
ec CRISP-3:	PYEQGTPCARCPGNCNDGLCTNSCEYEDLVSNCDLSLKKIAGCEHELLKENCKTTCOCENKIY	246
mm TPX-1:	PYQQGTPCASCPCNNCENGLCTNSCDFEDLLSNCELSLKTAGCKHELLKTKCQATCLCEDKIY	244

**Abb.3-10**

**b:** Homologie von porcinem CRISP-2 zu humanem CRISP-2 (P16562), TPX-1 (CRISP-2) aus Meerschweinchen (Q60477), equinem CRISP-3 (Q19010) und murinem TPX-1 (CRISP-2) (P16583)

grau: identische Aminosäuren

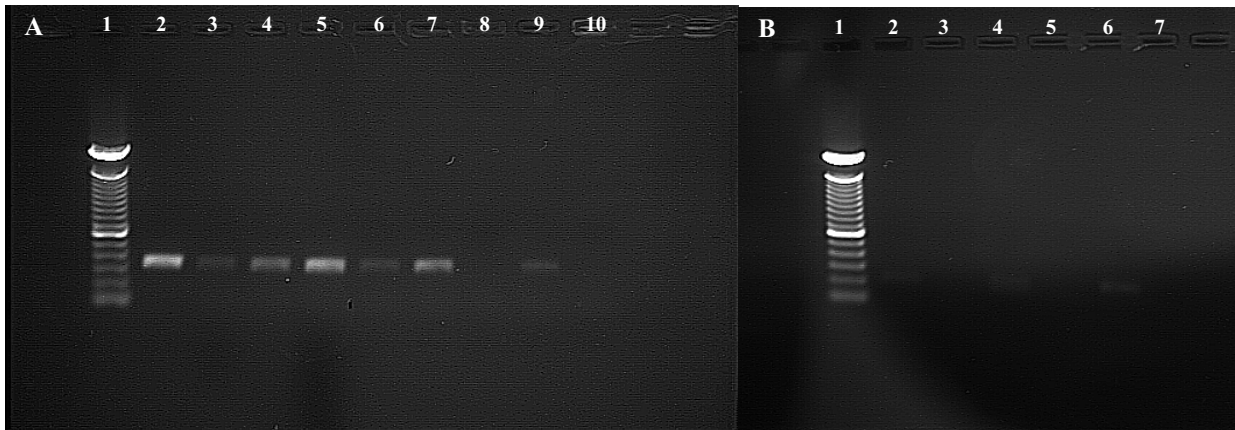
Die Transkription der mRNA für CRISP-1 und CRISP-2 im männlichen und weiblichen Genitaltrakt des Schweines wurde mit spezifischer RT-PCR nachgewiesen (porcines CRISP-1: sC1-4 und sC1-5, porcines CRISP-2: sC2-3 und sC2-4). Die PCR wurde analog zur spezifischen PCR beim Pferd durchgeführt, die Sequenzen und der Primer sind in Anhang F aufgeführt.



**Abb. 3-11:** RT-PCR zum Nachweis der Transkription von porcinem CRISP-1

A: 1-100 bp Standard, 2-Hoden, 3-Nebenhodenkopf, 4-Nebenhodenkörper, 5-Nebenhodenschwanz, 6-Samenblase, 7-Prostata, 8-Bulbourethraldrüse, 9-Speicheldrüse, 10.Leber

B: 1-100 bp Standard, 2-Uterus, 3-Üterotubale Verbindung (UTV), 4-Isthmus, 5-Ampulle, 6-Ovar, 7-Leber



**Abb. 3-12:** RT-PCR zum Nachweis der Transkription von porcinem CRISP-1

A: 1-100 bp Standard, 2-Hoden, 3-Nebenhodenkopf, 4-Nebenhodenkörper, 5-Nebenhodenschwanz, 6-Samenblase, 7-Prostata, 8-Bulbourethraldrüse, 9-Speicheldrüse, 10.Leber

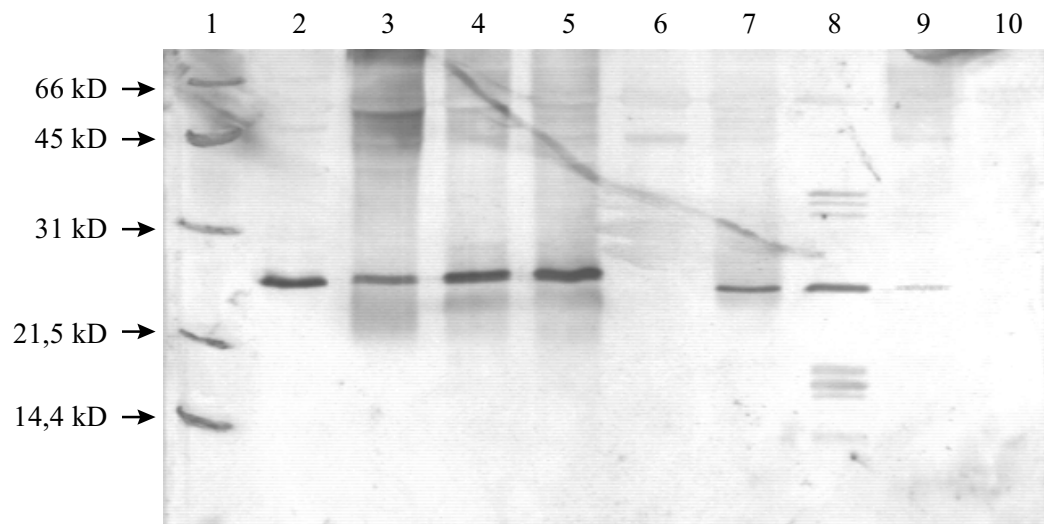
B: 1-100 bp Standard, 2-Uterus, 3-Uterotubale Verbindung (UTV), 4-Isthmus, 5-Ampulle, 6-Ovar, 7-Leber

Im weiblichen Genitaltrakt konnte weder für CRISP-1 noch für CRISP-2 eine Transkription detektiert werden. Dagegen zeigte sich, daß im männlichen Genitaltrakt die Transkription von CRISP-1 auf den Nebenhoden beschränkt ist. Darüberhinaus ließ sich eine wenn auch geringere Transkription in der Speicheldrüse nachweisen (Abb. 3-11). CRISP-2 hingegen wurde im gesamten männlichen Genitaltrakt mit Ausnahme der Bulbourethraldrüse und in der Speicheldrüse transkribiert. Die stärksten PCR-Signale fanden sich im Hoden, im Nebenhodenschwanz und in der Prostata (Abb. 3-12).

Die Expression der Proteine konnte durch einen Western Blot von Gewebeextrakten bestätigt werden. Das gegen equines CRISP-3 gerichtete Antiserum kreuzreagiert offensichtlich nicht nur mit equinem CRISP-1 und CRISP-2 sondern auch mit der porcinen CRISP-Proteinfamilie. CRISPs konnten in den Extrakten aus Hoden, Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz sowie Prostata, Bulbourethraldrüse und Speicheldrüse nachgewiesen werden (Abb. 3-13). Auffällig ist, daß das detektierte Protein in Prostata, Bulbourethraldrüse und Speicheldrüse ein scheinbares Molekulargewicht von 24,3 kD aufweist, während es im Hoden 26 kD und im Nebenhoden 26,6 kD groß ist. Die Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte erfolgte anhand der logarithmischen Auftragung der Laufstrecken von Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht. In Gewebeextrakten von weiblichen Tieren konnte wie in der RT-PCR kein Protein nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Im Samenblasenextrakt wurde kein CRISP detektiert, obwohl die RT-PCR eine Transkription in diesem Gewebe zeigte. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, daß in der Samenblase des Ebers eine sehr große Menge Spermadhäsine und weitere

Seminalplasmaproteine sezerniert werden, so daß der Anteil an CRISP-2 unter der Detektionsgrenze liegt. Der Western Blot bestätigt die Synthese von CRISPs in der Bulbourethraldrüse. Da weder Transkripte für CRISP-1 noch für CRISP-2 in diesem Gewebe detektiert wurden, liegt der Schluß nahe, daß es sich bei dem hier exprimierten Protein um porcines CRISP-3 handeln könnte.



**Abb.3-13:** Western Blot von Gewebeextrakten Eber

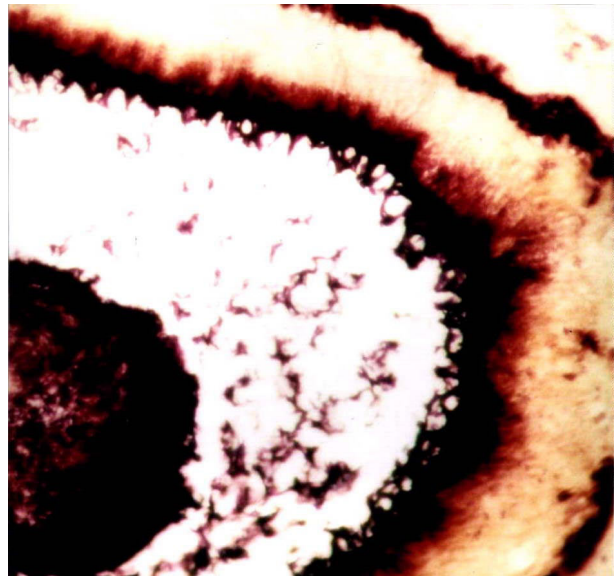
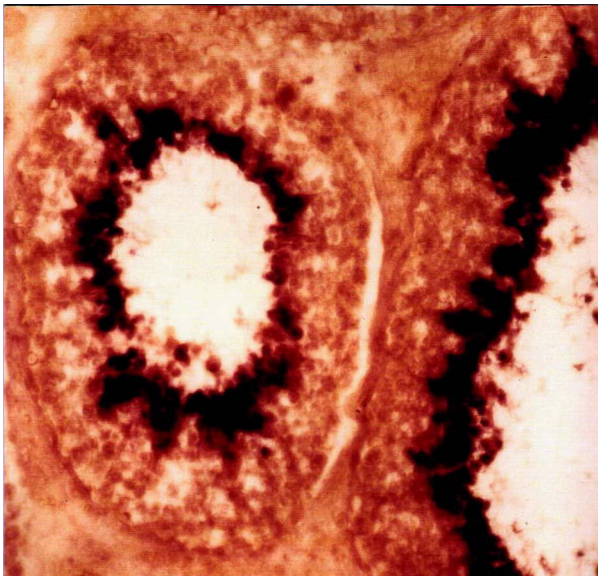
1-Molekulargewichtsstandard, 2-Hoden, 3-Nebenhodenkopf, 4-Nebenhodenkörper, 5-Nebenhodenschwanz, 6-Samenblase, 7-Prostata, 8-Bulbourethraldrüse, 9-Speicheldrüse, 10-Leber

Die Ergebnisse der RT-PCR und der immunchemischen Detektion in den Gewebeextrakten stimmten mit denen der Immunhistologie weitgehend überein. In der Immunhistologie konnten CRISP-Antigene im Hoden, dem gesamten Nebenhoden, dem Samenleiter, den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, hier insbesondere auch in der Samenblase, sowie in der Speicheldrüse nachgewiesen werden (Abb. a-j). Im weiblichen Genitaltrakt zeigte sich entgegen der negativen Resultate aus RT-PCR und Western Blot eine leichte Färbung in Uterotubaler Verbindung und Isthmus. Da diese durch Konkurrenz mit equinem CRISP-3 gehemmt wird, handelt es sich um eine spezifische Epitoperkennung.

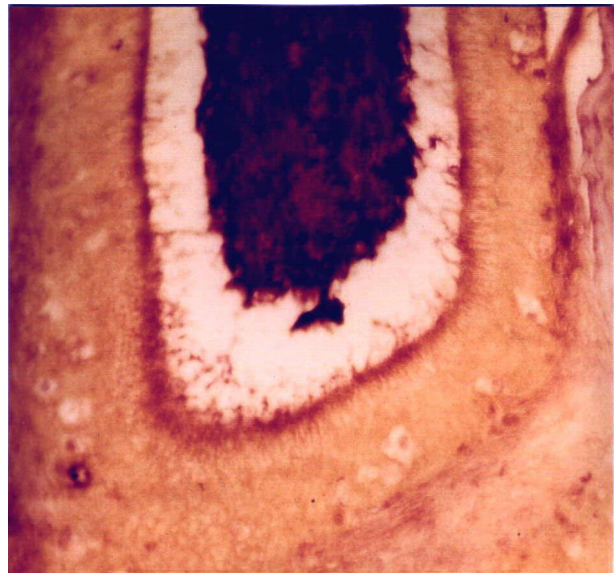
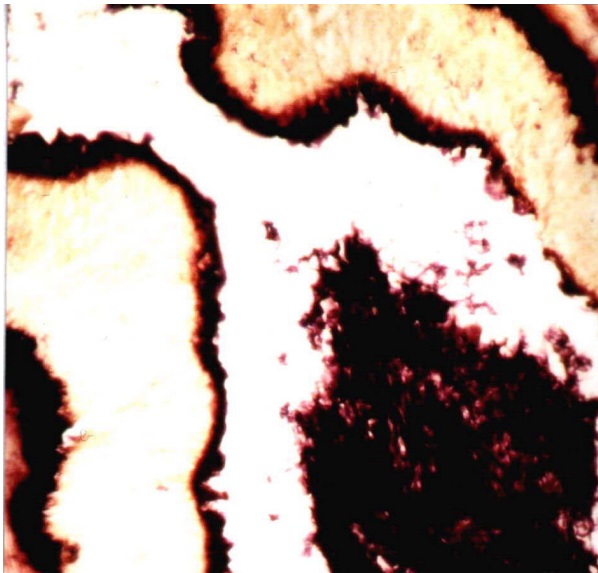


**Abb. 3-14:** immunhistologischer Nachweis von CRISPs im männlichen und weiblichen Genitaltrakt des Schweins.

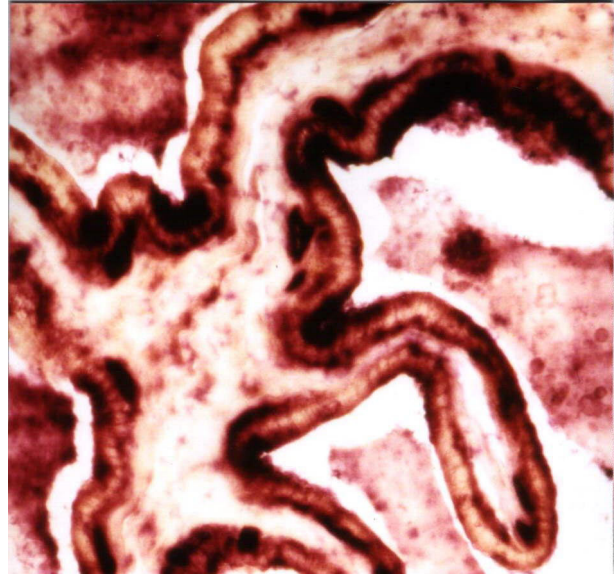
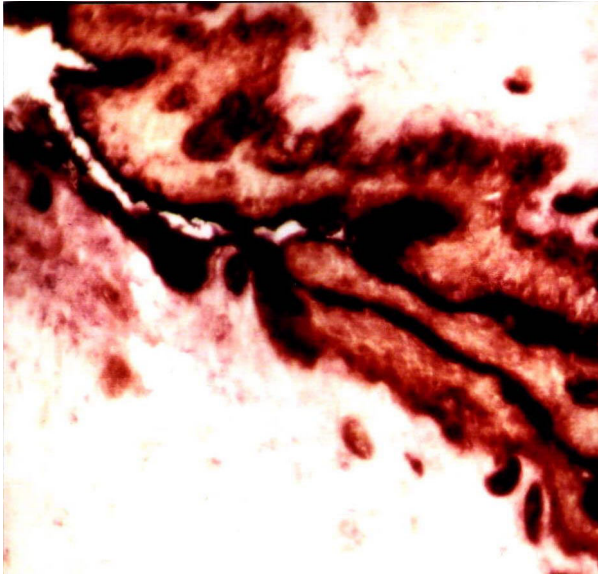
**a-Hoden, b-Nebenhodenkopf**



**c-Nebenhodenkörper, d-Nebenhodenschwanz**



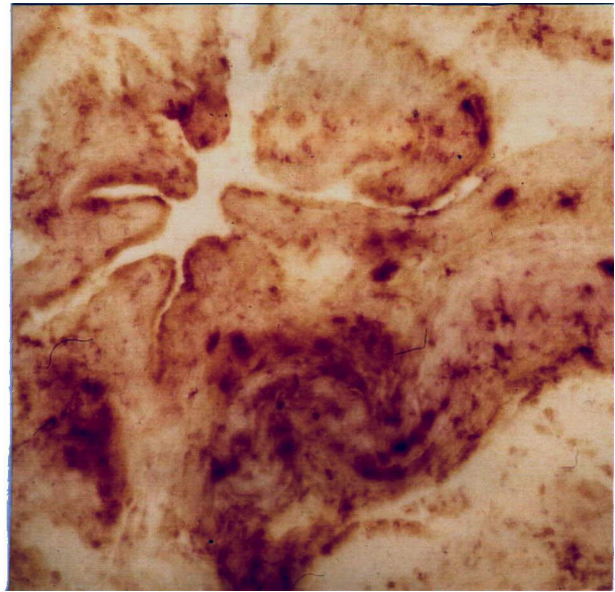
**e-Samenleiter, f-Samenblase**



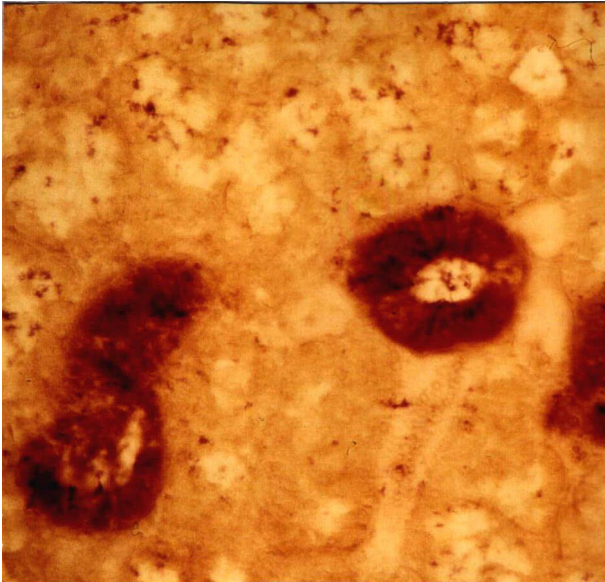


**Abb. 3-14:** immunhistologischer Nachweis von CRISPs im männlichen und weiblichen Genitaltrakt des Schweins.

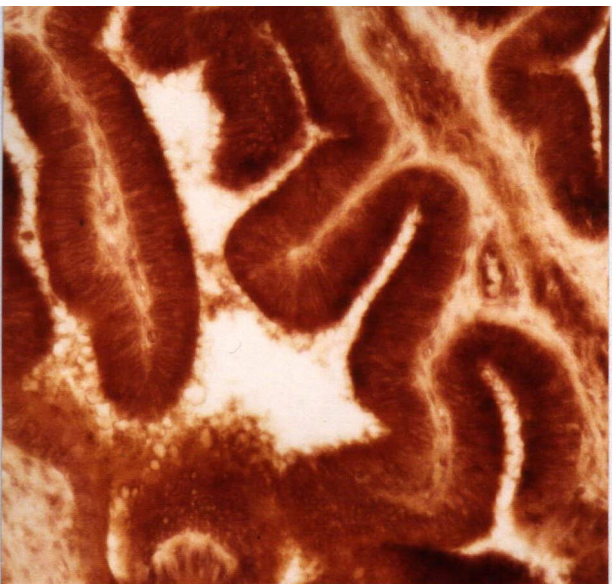
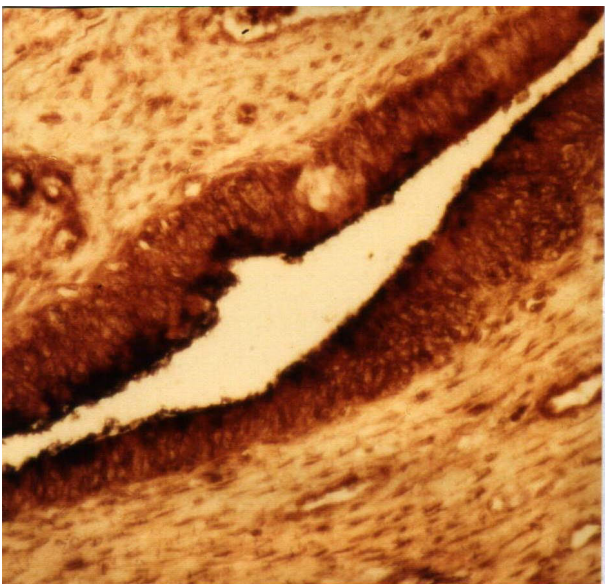
**g-Prostata, h-Bulbourethraldrüse**



**Speicheldrüse, k-Uterus**



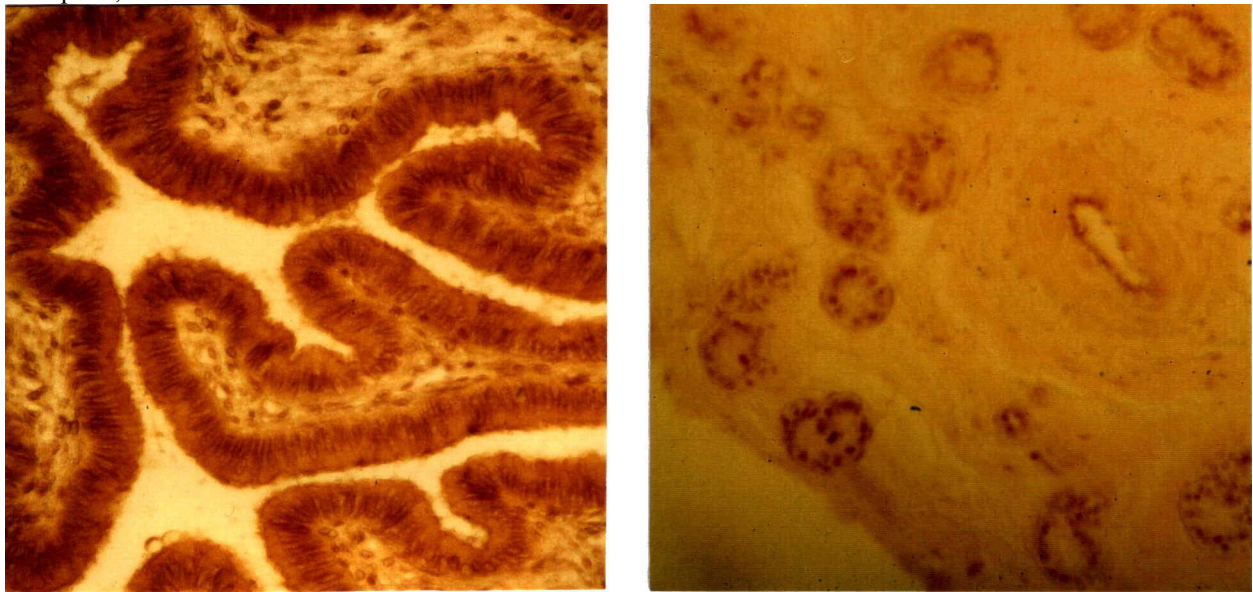
**l-Uterotubale Verbindung (UTV), m-Isthmus**





**Abb. 3-14:** immunhistologischer Nachweis von CRISPs im männlichen und weiblichen Genitaltrakt des Schweins.

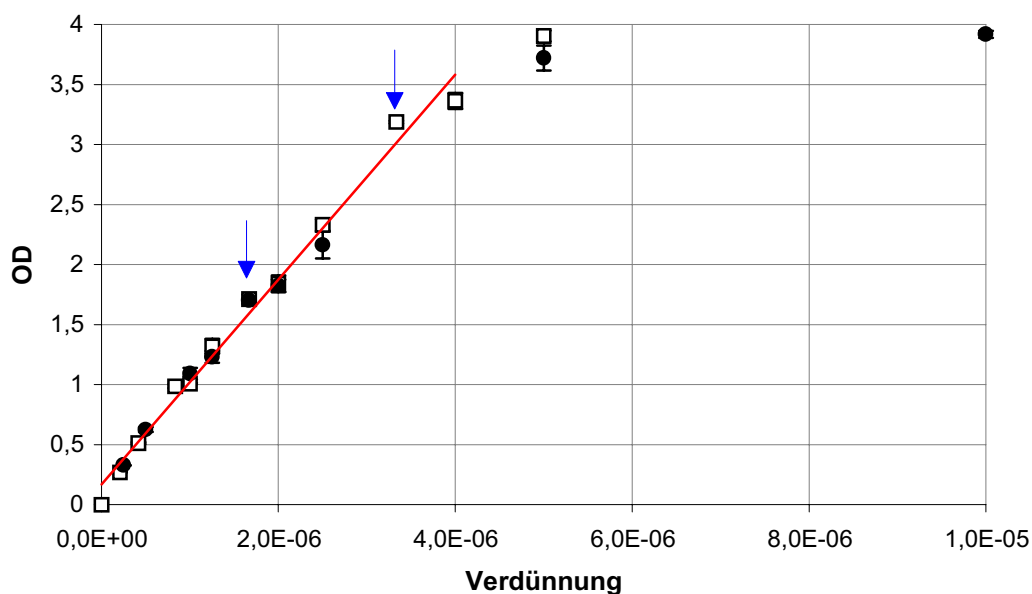
n-Ampulle, o-Kontrolle



Die Immunhistologie von Hoden und Nebenhoden zeigte, daß im Hoden vorwiegend die sich entwickelnden Spermatozyten gefärbt wurden und im Nebenhoden sowohl die Epithelzellen als auch die in den Nebenhodenkanälen liegenden Spermien. In den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und der Speicheldrüse werden ebenfalls die sekretorischen Zellen und in der Samenblase auch stark das Lumen gefärbt. Im weiblichen Genitaltrakt zeigt sich eine sehr schwache Färbung in Uterotubaler Verbindung (UTV) und Isthmus. Die Detektion im weiblichen Genitaltrakt ist zwar durch Konkurrenz von gereinigtem CRISP-3 hemmbar, allerdings wurden weder in der RT-PCR noch im Western Blot CRISPs im Genitaltrakt der Sau nachgewiesen.

## Etablierung eines qualitativen und quantitativen ELISA-Testsystems

Zur Etablierung von Analysen mit Hilfe der ELISA-Technik, mußte zunächst die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung des zur Verfügung stehenden Antiserums ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden in zwei unabhängigen Tests Verdünnungsreihen des Antiserums mit Verdünnungsfaktoren von  $10^4$  bis  $2,5 \cdot 10^{-7}$  und  $5 \cdot 10^{-5}$  bis  $2 \cdot 10^{-7}$  hergestellt und auf einer mit  $1 \mu\text{g}$  CRISP-3/well beschichteten Mikrotiterplatte getestet. Es ergab sich ein linearer Bereich für Verdünnungsfaktoren von  $10^{-4}$  bis  $4 \cdot 10^{-6}$  bei guter Übereinstimmung der unabhängig ermittelten Werte (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15:** Ermittlung der Bindungskurve von anti-HSP-3

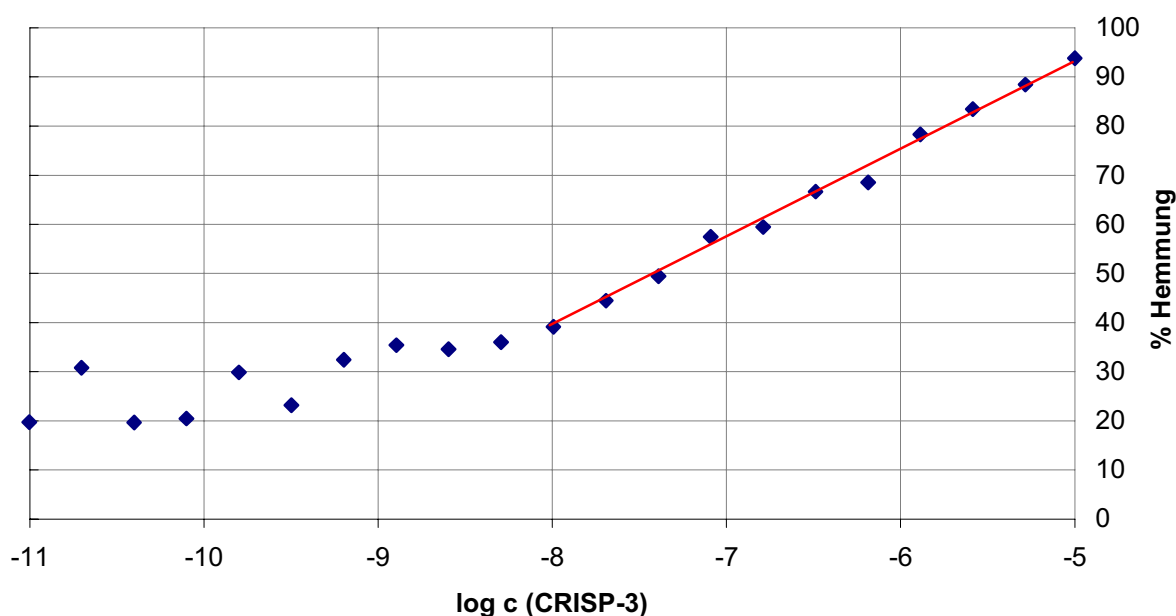
Die Grafik zeigt zwei unabhängig ermittelte Kurven (□ Kurve 1, ● Kurve 2) und die Linearisierung des Bereichs für Verdünnungsfaktoren von 0 und  $4 \cdot 10^{-6}$  (Linie). Die Pfeile markieren die Werte für qualitative ( $3,3 \cdot 10^{-6}$ ) und quantitative ( $1,7 \cdot 10^{-6}$ ) Bestimmungen

Für qualitative Tests wurde eine Konzentration des Antiserums gewählt, die gerade noch im linearen Bereich liegt, also ein Verdünnungsfaktor von  $3,3 \cdot 10^6$  (entspricht einer Verdünnung von 1:300000). Diese Konzentration erlaubte die qualitative Detektion auch relativ geringer Probenmengen.

Die quantitative Bestimmung von CRISP-3 sollte mittels eines kompetitiven ELISA erfolgen. Dabei wird die Probe mit einer definierten Menge Antikörper vorinkubiert, so daß abhängig von der Konzentration des Antigens in der Probe ein Teil der Antikörper

nicht mehr für die Bindung an die Platte zur Verfügung steht. Die Kalibrierung erfolgt mit einer Reihe bekannter Mengen des Antigens.

Als Randbedingungen für eine quantitative Analyse müssen folgende Voraussetzungen erfüllt werden. Erstens soll die Antikörperkonzentration im linearen Bereich liegen. Zweitens sollte die Inkubationszeit der enzymatischen Reaktion konstant sein. Drittens sollten die Werte der photometrischen Messung zwischen 0 und 10D, keinesfalls aber über 2 OD liegen, da sonst die Meßwerte ungenau werden. Aufgrund dieser Überlegungen wurde für quantitative Bestimmungen eine Ausgangsverdünnung des Antiserums von 1:600000 (Verdünnungsfaktor  $1,7 \cdot 10^6$ ) verwendet. Zur Überprüfung wurde eine Testreihe von  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  bis  $10 \text{pg} / \text{ml}$  HPLC-gereinigtem CRISP-3 eingesetzt.

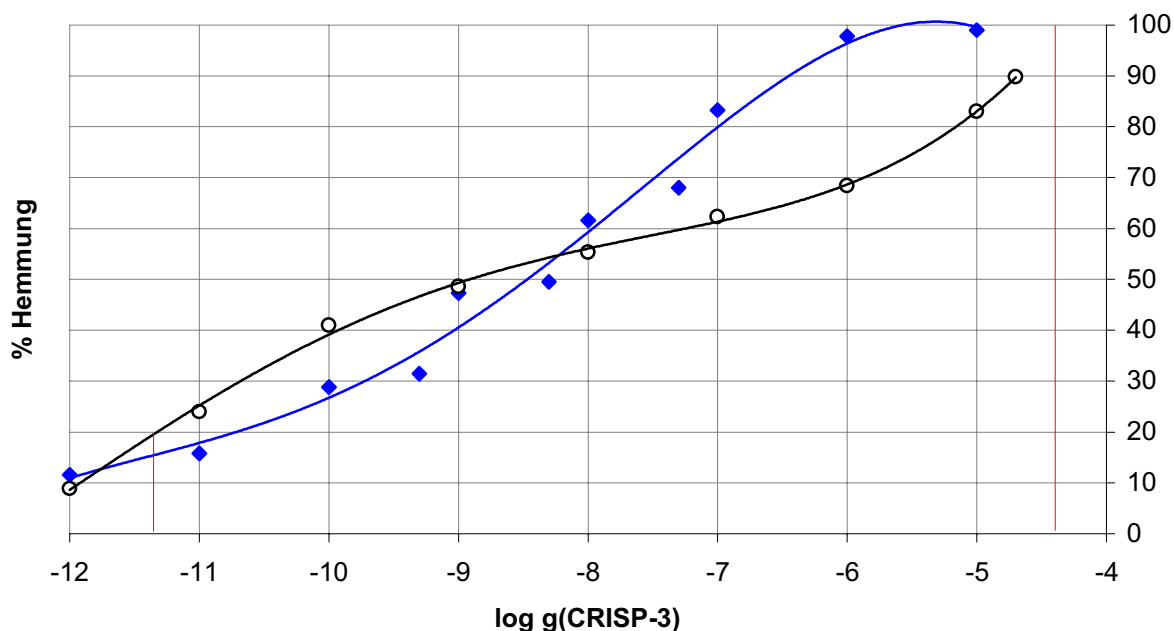


**Abb. 3-16:** Standardkurve für einen kompetitiven ELISA mit Konkretorkonzentrationen von  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  bis  $10 \text{pg} / \text{ml}$ . Die Grafik zeigt die gemessenen Werte (◆) und den linearen Bereich (Linie).

Die gemessene optische Dichte lag zwischen 0,2 und 1,8 und entspricht damit den oben genannten Voraussetzungen. Die erreichte Hemmung umfaßt einen Bereich von 20 bis 100 % und war bei einer Konkretorkonzentration zwischen  $10 \text{ng} / \text{ml}$  bis  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  zu dieser proportional (Abb. 3-16).

Da das Antiserum gegen HPLC-gereinigtes, also denaturiertes CRISP-3 gerichtet ist, mußte vor der Quantifizierung von CRISP-3 in biologischen Proben überprüft werden, ob die Verwendung von nativem CRISP-3 als Konkretor das Ergebnis verändert. Dazu wurden Testreihen von  $10 \mu\text{g}$  bis  $1 \text{pg}$  HPLC-gereinigtes CRISP-3 und von  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  bis  $1 \text{pg} / \text{ml}$  natives (HIC-gereinigtes) CRISP-3 als Konkretor eingesetzt (Abb. 3-17). Es ist

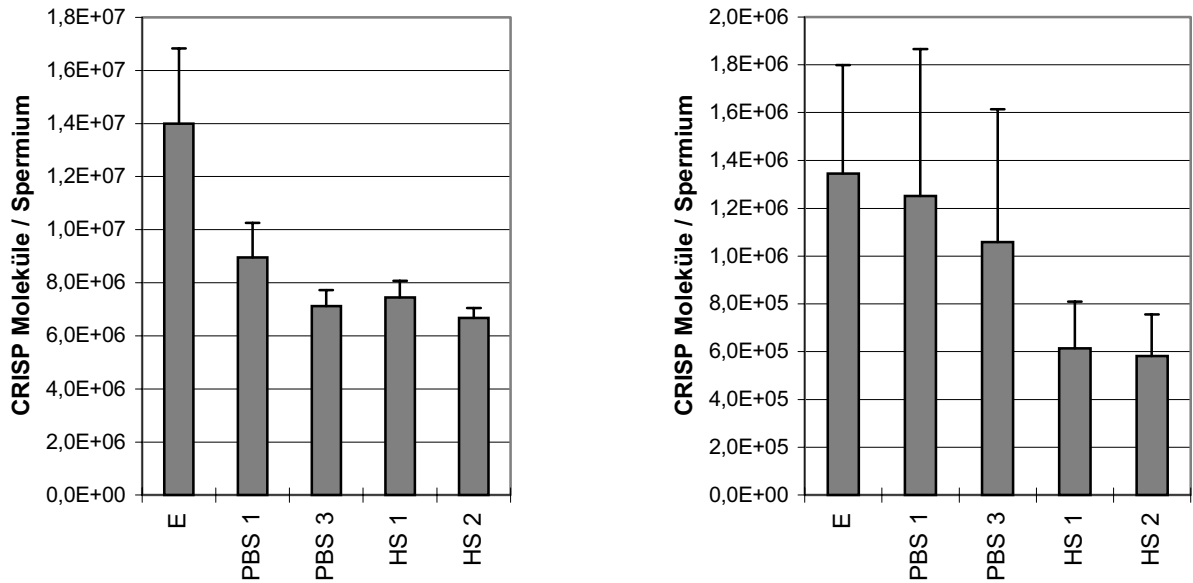
eine deutliche Veränderung der Kurvenform zu erkennen. Die Hemmkurve, die mit nativem CRISP-3 erhalten wurde, entspricht nicht der idealen Sättigungskurve. Für die nachfolgenden Bestimmungen wurden daher KompetitorKonzentrationen von 5 pg / ml bis 50 µg / ml eingesetzt, um einen möglichst großen Bereich abzudecken.



A

bb. 3-17: kompetitiver ELISA mit HPLC-gereinigtem CRISP-3 (O) und nativem CRISP-3 (♦). Der Meßbereich für die weiteren quantitativen Bestimmungen ist eingezeichnet.

Diese drastischen Unterschiede sind vermutlich auf Denaturierung und dadurch bedingte Epitopveränderungen bei der HPLC-Reinigung zurückzuführen. Das zur Verfügung stehende polyklonale Antiserum enthält viele Antikörper mit verschiedener Spezifität und Affinität. Dadurch unterscheiden sich die das native und das denaturierte Protein bindenden Antikörperpopulationen. Aufgrund dieser Befunde wurde für die Quantifizierung von nativen Proben 0,5 pg bis 5 µg nativ gereinigtes CRISP-3 als Standardprotein eingesetzt. Für die Beschichtung der Platte konnte weiterhin HPLC-gereinigtes Protein verwendet werden, da dies keinen Einfluß auf das Ergebnis hat.



**Abb. 3-18:** Bestimmung der Menge CRISP auf equinen Spermien aus zwei Ejakulaten verschiedener Individuen nach Entfernen des Seminalplasmas (E), nach ein- (PBS 1) und dreimaligem (PBS 3) Waschen mit PBS und nach ein- (HS 1) und zweimaligem (HS 2) Waschen mit PBHS

## CRISPs auf equinen Spermien

### Quantifizierung

Um die Frage nach einer Bedeutung von CRISP-3 für die Befruchtung, wie sie für andere CRISPs des männlichen Genitaltrakts beschrieben wurde, zu klären, mußte zunächst überprüft werden, ob das Protein an die Spermienmembran bindet. Aufgrund der hohen Konzentration im Seminalplasma mußte das Seminalplasma protein möglichst vollständig entfernt werden. Mehrfaches Waschen der frisch ejakulierten Spermien mit PBS sollte alle schwach assoziierten Proteine entfernen. Um jedoch auch die Proteine zu lösen, die durch ionische Wechselwirkungen an die Membran binden, wurde zusätzlich mit 0,5 M NaCl gewaschen.

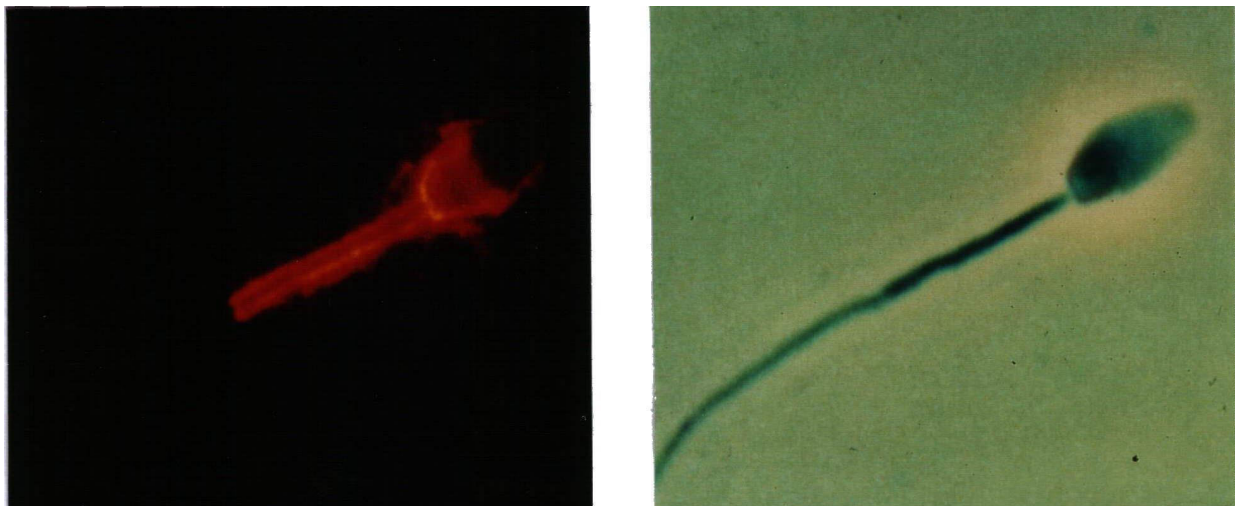
Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Ejakulaten von zwei verschiedenen Hengsten sowohl in den Anteilen an CRISP-3, die in den einzelnen Schritten entfernt werden, als auch wesentlich drastischer in der Gesamtmenge des an die Spermien assoziierten Proteins. Die nicht mit Hochsalz entfernbare Menge variiert in den gezeigten Beispielen um den Faktor 10 (Abb. 3-18).

Diese Ergebnisse zeigen, daß es verschiedene Qualitäten der Bindung an die Spermien gibt. Eine Fraktion ließ sich mit PBS entfernen, ein weiterer Teil mit 0,5M NaCl und auch nach der Behandlung mit PBHS verblieb ein Teil des Antigens auf den Spermien. Die Ursache für verschiedene Fraktionen könnten Modifikationen von CRISP-3 oder, wie in anderen Spezies, die Existenz mehrerer verschiedener CRISPs sein.

Es stellte sich die Frage, ob verschiedene CRISPs eine definierte Lokalisation auf den Spermien einnehmen oder gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, ob CRISPs bei Individuen mit wenig CRISP-Antigen auf den Spermien gleichmäßig reduziert sind oder nur in einer bestimmten Region. Diese Fragen ließen sich durch indirekte Immunfluoreszenz (IIF) klären.

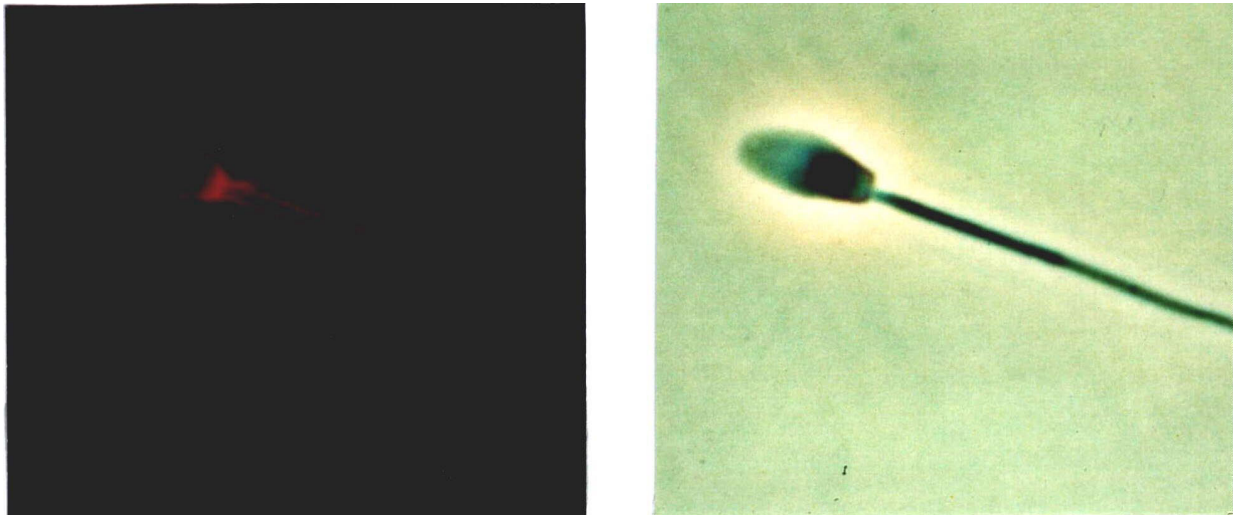
### ***Lokalisation von CRISPs auf equinen und porcinen Spermien***

Auf mit Hochsalz-PBS gewaschenen und fixierten equinen Spermien wurden CRISP-Antigene mit anti-HSP-3 und mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Es zeigte sich, daß nach der Behandlung mit PBHS die Menge detektierbarer CRISPs im postakrosomalen und äquatorialen Bereich von Spermien mit insgesamt geringer Antigenmenge deutlich reduziert ist (Abb. 3-19a und 3-20 a). Im Bereich des Mittelstücks gab es dagegen keine erkennbaren Unterschiede zwischen Spermien mit hoher und niedriger Anzahl CRISP-Moleküle pro Spermium.



**Abb. 3-19:** PBHS-gewaschenes Spermium eines Ejakulats mit viel CRISP-Antigen  
a: IIF mit anti-HSP-3 und anti-chicken-Cy3, b: Phasenkontrastaufnahme





**Abb. 3-20:** PBHS-gewaschenes Spermium eines Ejakulats mit wenig CRISP-Antigenen  
 a: IIF mit anti-HSP-3 und anti-chicken-Cy3, b: Phasenkontrastaufnah

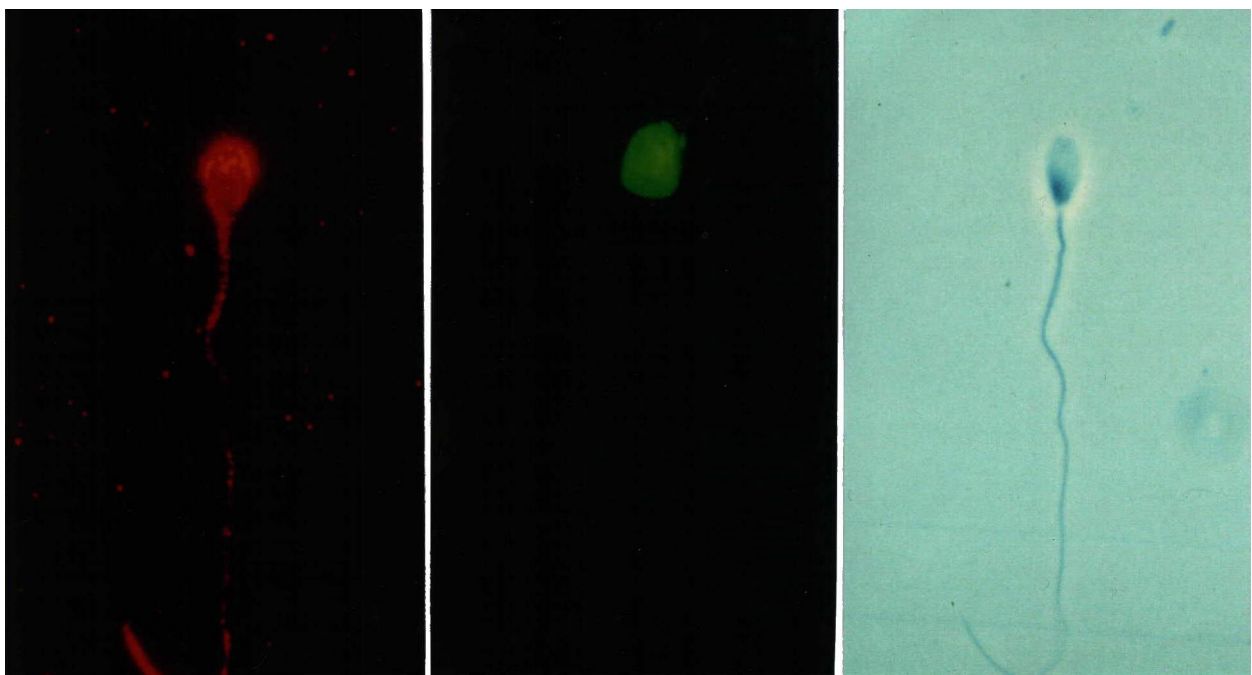
Da die deutlichsten Unterschiede im Bereich des Äquatoralsegments und des Postakrosoms beobachtet wurden und in diesen Bereichen die Bindung und Fusion mit der Eizelle eingeleitet wird, könnten CRISPs in der Tat eine Rolle bei der Gameteninteraktion spielen. Das Waschen von Spermien mit 0,5M NaCl kann allerdings nicht als physiologisch angesehen werden, daher wurde das Experiment unter in vitro Kapazitationsbedingungen wiederholt. Es wurde ein Ejakulat eines Hengstes mit  $>5 \times 10^6$  CRISP- Antigenen auf den Spermien eingesetzt.

Motile Spermien wurden durch swim-up selektiert und von Seminalplasma befreit, in Kapazitationsmedium überführt und die Kapazitation mittels CTC-Färbung verfolgt. Beim Hengst zeigen die Spermien ähnlich wie bei der Maus bei Kapazitation und Akrosomreaktion charakteristische Fluoreszenzmuster. In Proben mit über 60% als kapazitiert eingestufte Spermien, wurde durch Zugabe von Lyso-Phosphatidylcholin die Akrosomreaktion ausgelöst. Von allen Schritten, swim-up, kapazitiert und nach Induktion der Akrosomreaktion wurden Proben fixiert und vorhandene CRISPs mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Zusätzlich wurden durch ein Lektin aus der Erdnuß, PNA (Peanut Agglutinin, *Cheng et al. 1996*), Glykoproteine des Akrosoms gefärbt, so daß eine Beurteilung des Status jeder einzelnen Zelle möglich ist.

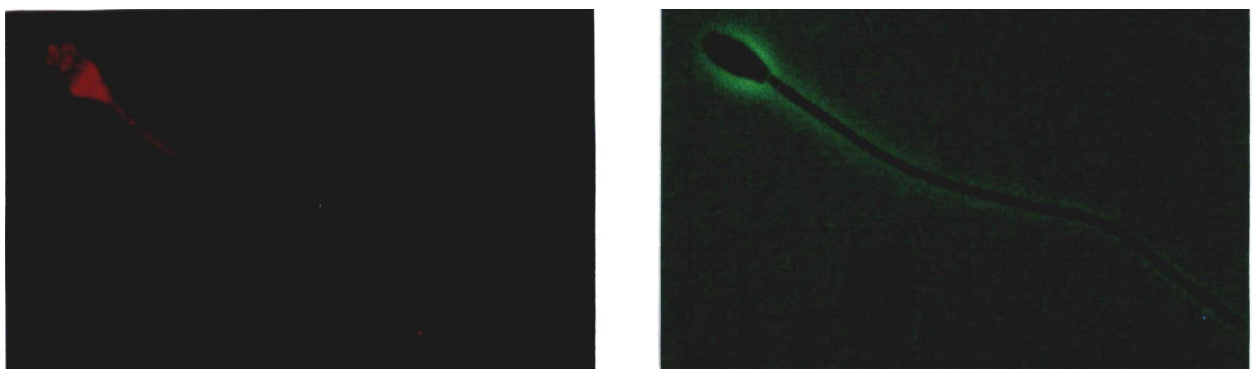
Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen einerseits, daß auch nach in vitro Kapazitation und Akrosomreaktion noch CRISPs im postakrosomalen und äquatorialen Bereich vorhanden sind (Abb. 3-21f). Damit ist eine Beteiligung am Befruchtungsvorgang zwar nicht belegt, aber möglich. Andererseits bestätigen sie die

bisherigen Beobachtungen, daß es verschiedene Fraktionen von CRISP-Antigenen auf den Spermien gibt. Es zeigte sich bei unkapazitierten und kapazitierten, nicht aber bei akrosomreagierten Spermien zusätzlich zur bisher beschriebenen Fluoreszenz auch eine Färbung im Bereich des Akrosoms (Abb. 3-21a und d). Diese verschwindet bei akrosomreagierten Spermien. Da auch mit PBHS behandelte Spermien keine Fluoreszenz am Akrosom zeigen, ist davon auszugehen, daß durch die hyperosmotischen Bedingungen das Akrosom und damit ein weiterer Teil CRISP-Antigene entfernt wird (s. Abb. 3-19 und 3-20).

**Abb. 3-21:**

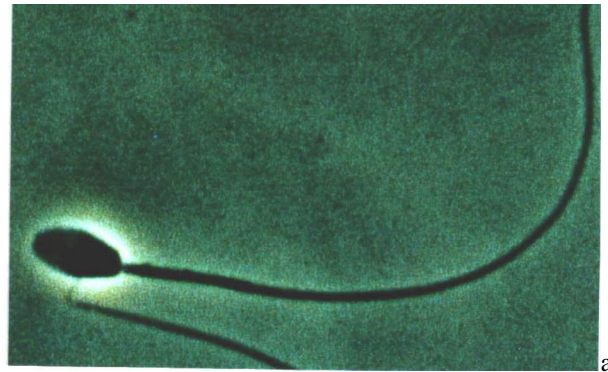
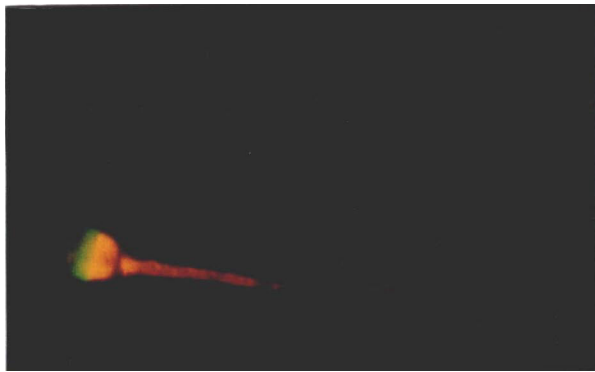


nach swim-up **a:** anti-HSP-3, **b:** PNA-Lektin, **c:** Phasenkontrastaufnahme



kapazitiert **d:** anti-HSP-3, **e:** Phasenkontrastaufnahme

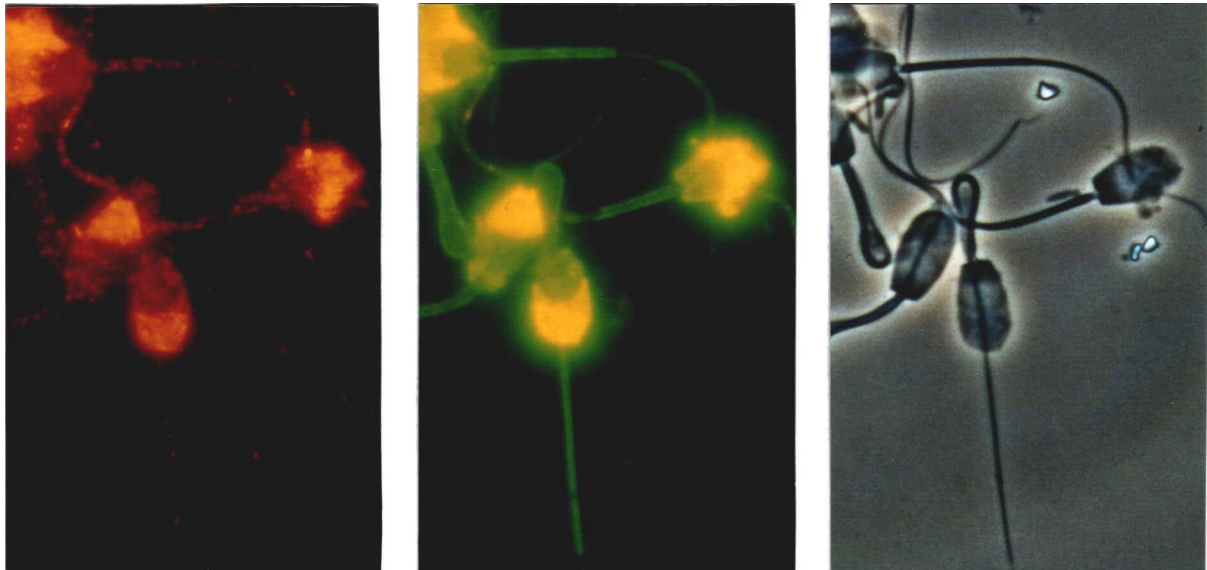




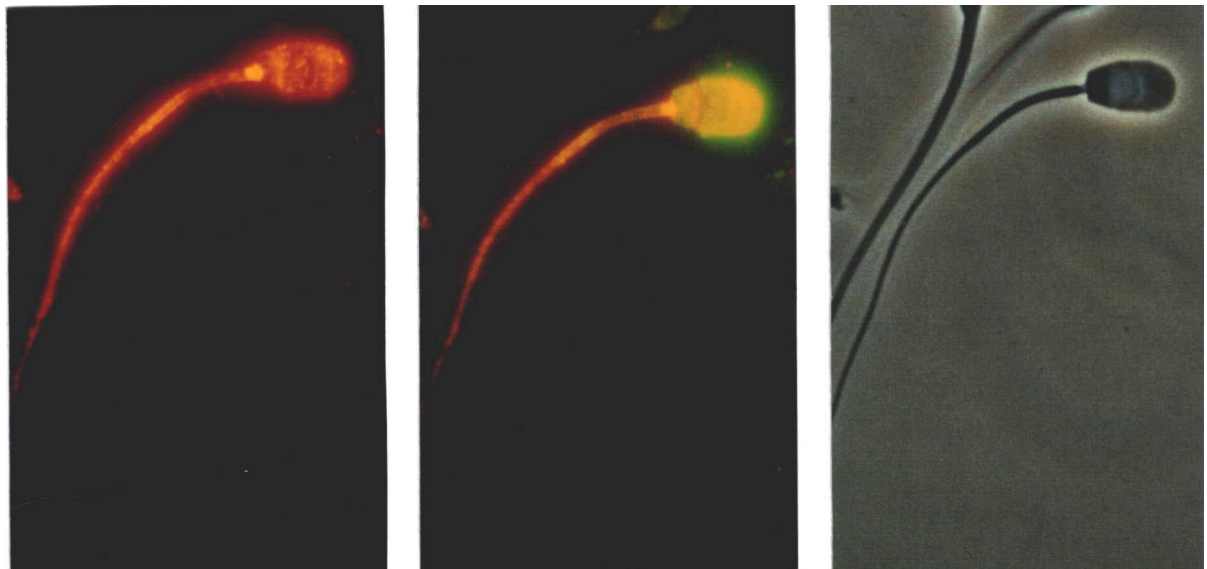
krosomreagiert **f:** anti-HSP-3 und PNA, **g:** Phasenkontrastaufnahme

Für den Nachweis der Lokalisation auf porcinen Spermien wurden kryokonservierte Nebenhodenschwanzspermien verwendet, da auf ejakulierten Spermien die im porcinen Seminalplasma dominierenden Spermadhäsine die CRISP-Antigene verdecken. Die Lokalisation der Antigene auf porcinen Nebenhodenschwanzspermien wurde wie beim Pferd mit indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Bei porcinen Spermien war die Färbung im akrosomalen Bereich unkapazitierter Spermien wesentlich stärker als bei equinen Spermatozoen und wurde im Verlauf der Kapazitation schwächer (Abb. 3-22a und d). Wie beim Pferd verschwindet die Fluoreszenz im Akrosom nach der Akrosomreaktion und es bleibt nur eine Färbung des Postakrosoms und des Mittelstücks. Die Fluoreszenz im Äquatoralsegment ist bei Eberspermien wenig ausgeprägt (Abb. 3-22g). Der Nachweis der Kapazitation erfolgte während der Kapazitation durch CTC-Färbung und nach der Fixierung mit einem gegen die äußere akrosomale Membran gerichteten Antiserum (anti-OAM, Abb. 3-22b, e und h). Es zeigte sich, daß CRISP-Antigene auch bei porcinen Spermien nach Kapazitation und Akrosomreaktion noch im postakrosomalen Bereich vorhanden sind. Dies stützt die Vermutung, daß CRISPs bei allen Säugern ähnliche Funktionen erfüllen und eine Rolle für die Befruchtung spielen können.

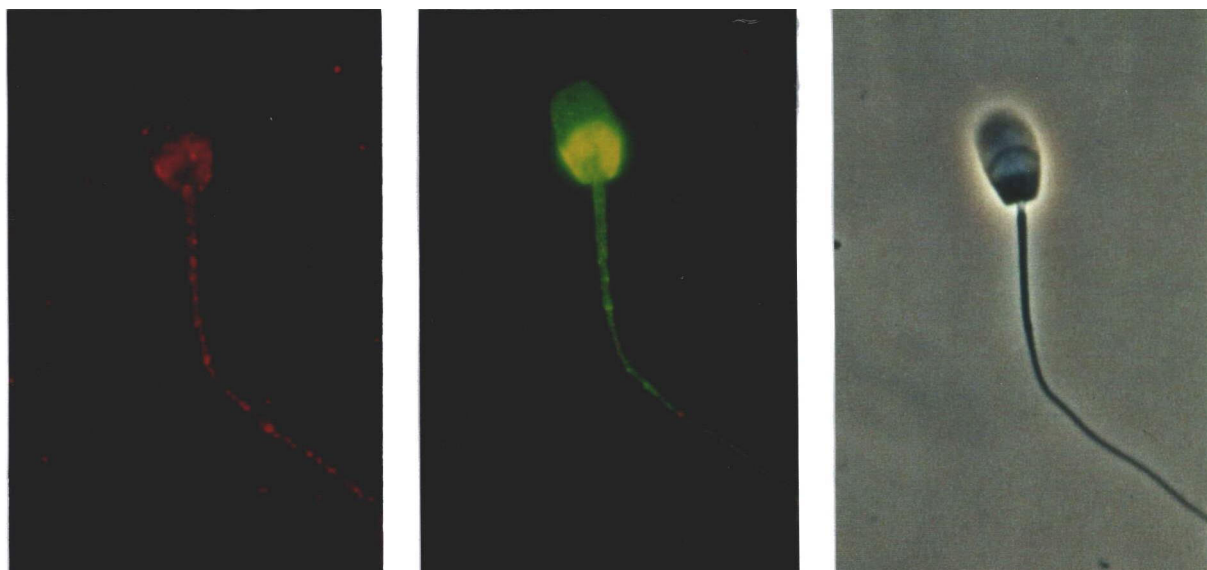
**Abb. 3-22:** Lokalisation von CRISPs auf porcinen Nebenhodenschwanzspermien  
(a-c) gewaschen: a-anti-HSP-3, b-anti-OAM, c-Phasenkontrastaufnahme



(d-f) kapazitiert: d-anti-HSP-3, e-anti-OAM, f-Phasenkontrastaufnahme



(g-j) akrosomreagiert: d-anti-HSP-3, e-anti-OAM, f-Phasenkontrastaufnahme



### Abhängigkeit der Fertilität von der Menge spermiengebundener CRISPs

Weiterhin stellte sich vor dem Hintergrund der Befunde zu einer möglichen Beteiligung der DE-Proteine der Ratte an der Gametenfusion die Frage, ob die beobachteten individuellen Unterschiede in der Menge und Lokalisation der CRISPs Auswirkungen auf die Fertilität der Tiere haben. Um diese Frage zu klären, wurden Ejakulate von 12 Deckhengsten untersucht. Die Ejakulate werden für die künstliche Besamung eingesetzt, so daß detaillierte Daten über die Anzahl der besamten Stuten und die daraus resultierenden Trächtigkeiten sowie die daraus hervorgegangene Anzahl der lebenden Fohlen existieren.

Aufgrund der Ergebnisse der Analyse sukzessiver Waschschriffe wurden die Spermien für diesen Zweck dreimal mit PBS und zweimal mit PBHS gewaschen, um nur den Anteil CRISPs zu erfassen, der fest an die Spermien gebunden ist. Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen der fest an die Spermien assoziierten Menge CRISPs und der Trächtigkeits- und Abfohlrate der besamten Stuten (Abb. 3-23). Die Korrelationskoeffizienten betragen 0,94 bzw. 0,90. Sowohl die Absolutwerte der Abfohlrate als auch der Korrelationskoeffizient waren erwartungsgemäß niedriger als die der Trächtigkeitsrate, da die Abfohlrate durch weitere nicht auf die Spermienqualität zurückzuführende Faktoren beeinflusst wird. Dagegen läßt die Konzentration von CRISP-3 im Seminalplasma keine Rückschlüsse auf die Menge CRISPs an den Spermien zu.

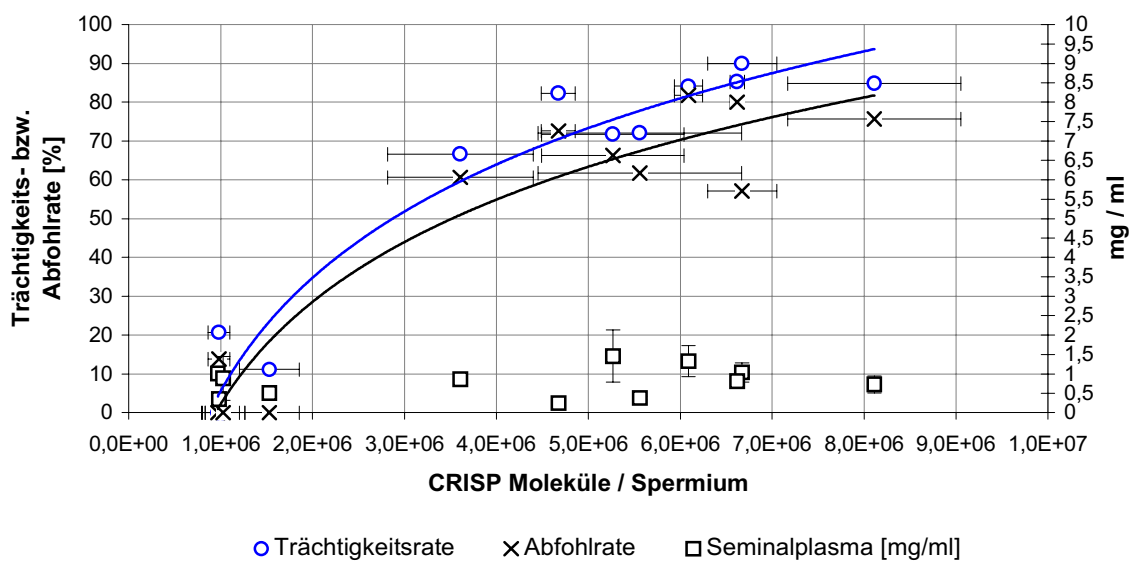
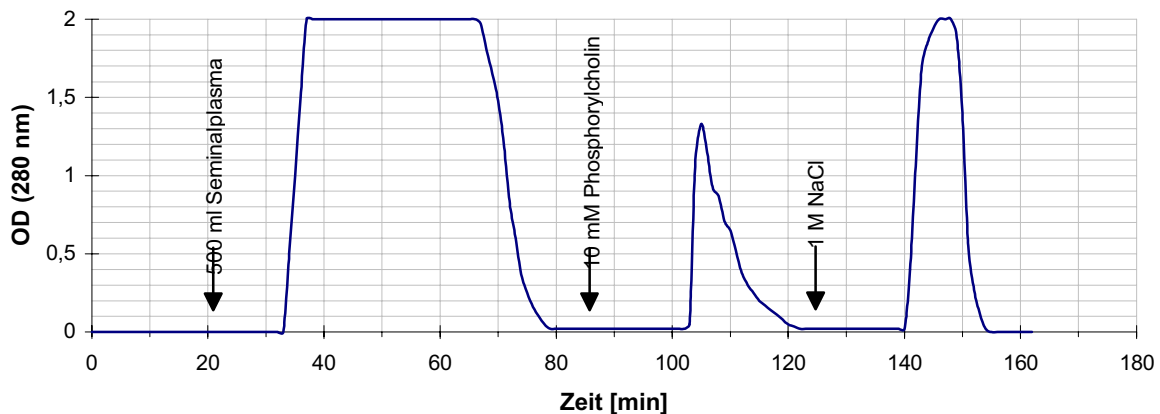


Abb. 3-23: Darstellung der Trächtigkeits- (O) bzw. Abfohlraten (x) nach Besamung mit Ejakulaten von 12 Deckhengsten in Abhängigkeit von der gemessenen Menge CRISPs pro Spermium

Auf eine weitergehende statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs, teilweise weniger als 10 besamte Stuten, und fehlender Daten zu saisonalen Schwankungen verzichtet. Die statistische Erfassung dieses Phänomens mit größerem Stichprobenumfang und über den gesamten Deckzeitraum eines Jahres wird derzeit von Frau Alexandra Reineke in unserem Institut durchgeführt. Ihre bisherigen Ergebnisse zeigen eine saisonale Abhängigkeit der erhaltenen Werte, bestätigen jedoch weitgehend die hier beschriebenen Ergebnisse.

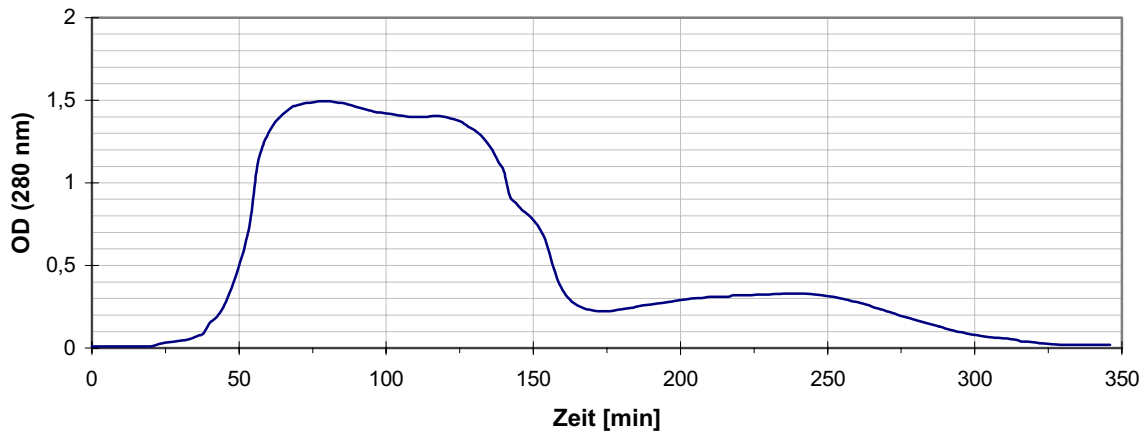
## Isolierung von equinem CRISP-3 aus Seminalplasma

Equines CRISP-3 wurde aus spermienfreiem Seminalplasma durch drei aufeinanderfolgende Chromatographieschritte isoliert. Die im equinen Seminalplasma vorkommende Menge an CRISP-3 macht etwa 57 % des gesamten Proteingehalts aus. In der ersten Chromatographie wurden die Heparin-bindenden Komponenten des Seminalplasmas durch eine Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose entfernt (Abb. 3-24a). Die Heparin-bindenden Fraktionen enthalten etwa ein Drittel der gesamten Seminalplasmaproteine, dieser Anteil ist jedoch für die Isolierung von CRISP-3 nicht relevant. Der nicht bindende Anteil der Seminalplasmaproteine (Peak 1, 33-75 min), der zu etwa 10 % aus CRISP-3 besteht, wurde dialysiert, lyophilisiert und bildet in 50 ml TBS aufgenommen das Ausgangsmaterial für die nächste Chromatographie.



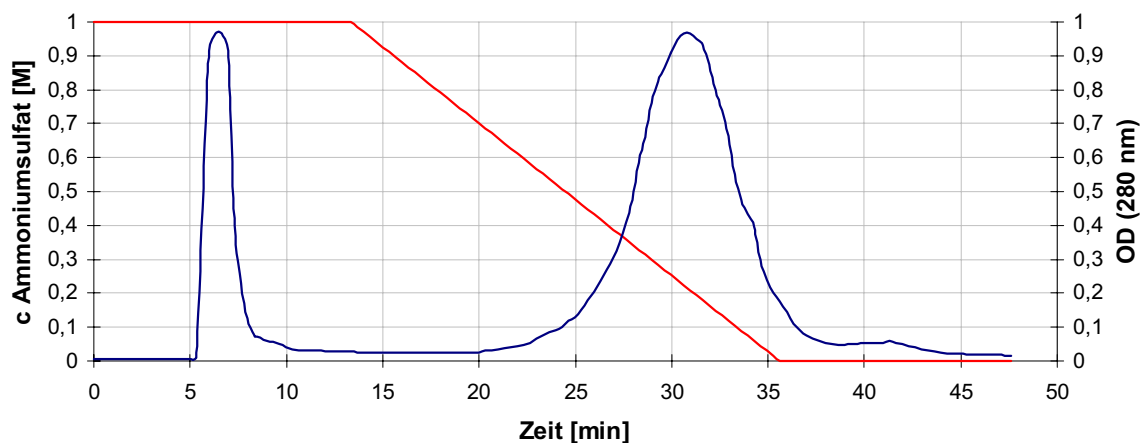
**Abb.3-24a** :Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose. CRISP-3 befindet sich im ersten Peak bei 33-75 min.

Diese Lösung wurde über eine Gelfiltration an Sephadex G 50 weiter aufgetrennt (Abb. 3-24b). Es ist bekannt, daß die Proteine HSP-1 und HSP-2 Multimere von etwa 7075 kD bilden, und in diesen Komplexen nicht an Heparin-Sepharose binden. In der Gelfiltration wurden diese hochmolekularen Komplexe sowie kleinere Verunreinigungen abgetrennt. Die CRISP-3 enthaltenden Fraktionen (175-215min) wurden mittels ELISA und SDS-Gelelektrophorese ermittelt. Sie enthalten 1014 % des Gesamtproteins, davon 3438 % CRISP-3 (Tabelle 3-4).



**Abb. 3-24b:** Gelfiltration an Sephadex G 50. CRISP-3 eluiert im Bereich 175-215 min.

Zur Entfernung aller verbleibenden Kontaminationen wurde das Lyophilisat der CRISP-3 haltigen Fraktionen in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aufgenommen und das Protein in einer Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) an Butyl-Sepharose gereinigt (Abb. 3-24c). CRISP-3 eluiert bei etwa 350 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als > 99% reines Protein. Der große Vorteil der HIC gegenüber der alternativ eingesetzten Reversed Phase HPLC ist die native Präparation des Proteins, die speziell für funktionelle Untersuchungen essentiell ist.



**Abb. 3-24c:** HIC an Butyl-Sepharose. blau-Absorption bei 280 nm, rot-Ammoniumsulfatkonzentration. CRISP-3 eluiert zwischen 25 min und 36 min

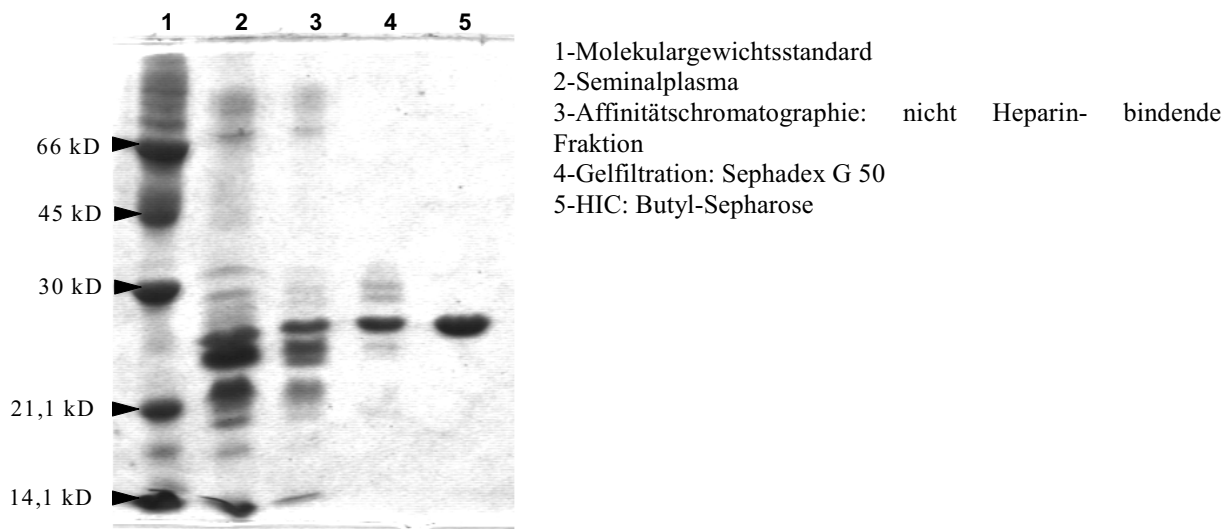
Die Ausbeute an CRISP-3 betrug 2540 % der Ausgangsmenge. Die größten Verluste treten bei der Gelfiltration und der HIC auf. Gelfiltrationsfraktionen mit hohem Anteil Kontaminanten wurden nicht verwendet. Teilweise Denaturierung bei der HIC führt dazu, daß ein Teil des Proteins mit Lösungsmitteln von der Säule eluiert werden mußte. Dieser

Anteil wurde verworfen. Die Präparation wurde durch SDS-Gelelektrophorese und der Quantifizierung von Gesamtprotein und CRISP-3 in den einzelnen Schritten verfolgt. In Abbildung 3-25 und Tabelle 3-4 sind typische Ergebnisse einer Präparation gezeigt.

Für einige Anwendungen, beispielsweise für die proteinchemische Charakterisierung, bei der die Denaturierung nicht stört, wurde die HIC durch Reversed Phase HPLC ersetzt. Minimale Anteile des Säulenmaterials, Sepharose, stören die massenspektrometrische Analyse.

**Tabelle 3-4:** Anteil an Gesamtprotein von CRISP-3 nach den einzelnen Präparationsschritten, Anreicherungsfaktor von CRISP-3.

Fraktion	% Gesamtprotein	% CRISP-3	Anreicherungsfaktor
Seminalplasma	100	6,7	1
Affinitätschromatographie	66,4	10,0	1,5
Gelfiltration	12,7	36,7	5,5
HIC	2,1	99,3	14,9



**Abb. 3-25:** SDS-Gelelektrophorese (Silber Färbung) einer Präparation von equinem CRISP-3; gezeigt sind die CRISP-3 enthaltenden Fraktionen der einzelnen Präparationsschritte

## Isolierung von CRISPs aus equinem Nebenhoden

Equine CRISPs wurden aus TBS-Extrakten des Nebenhodengewebes gewonnen. Die Extrakte wurden jeweils über Chromatofocussierung an PBE 94 in einem pH Gradienten von pH 8 bis pH 6 getrennt und in den Fraktionen jeweils der pH-Wert bestimmt und CRISPs mittels ELISA detektiert (Abb. 3-26a und b).

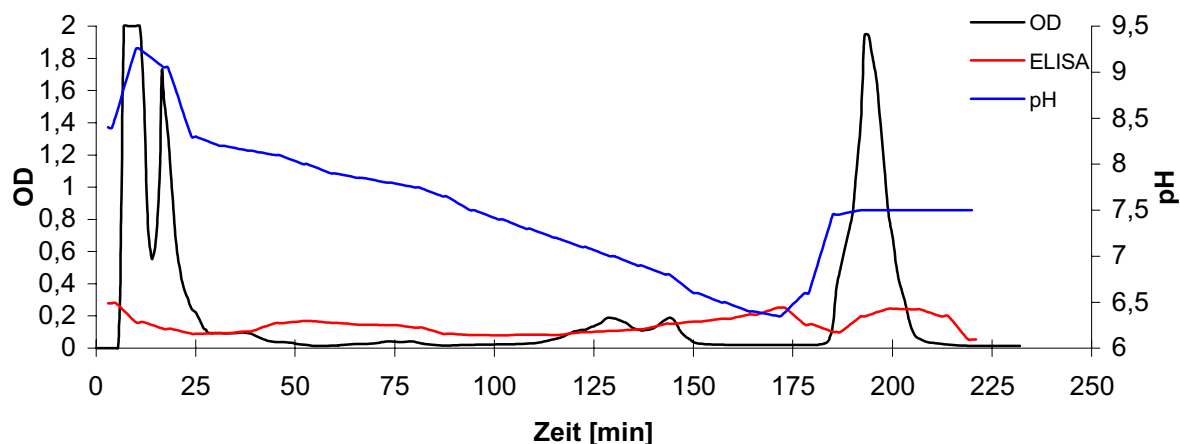


Abb. 3-26a: Chromatofocussierung von equinen Nebenhodenkörperextrakten

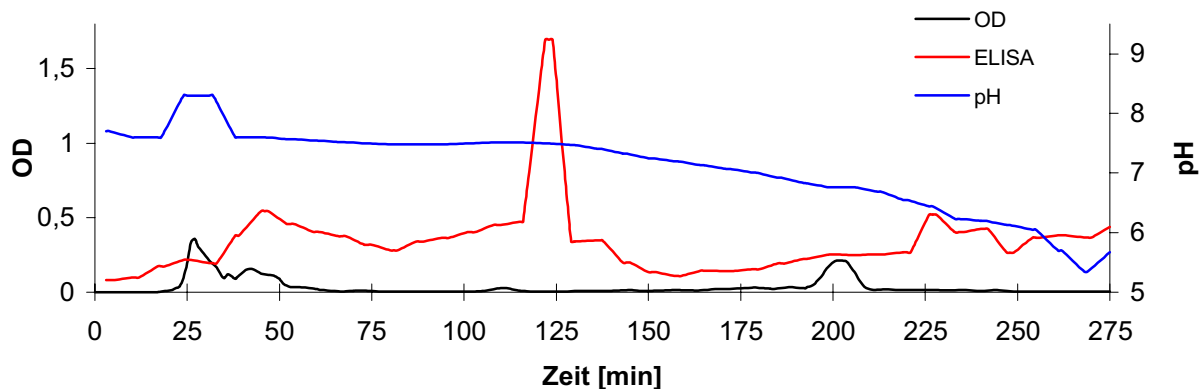


Abb. 2-26b: Chromatofocussierung von equinen Nebenhodenschwanzextrakten

Aus dem Nebenhodenschwanz wurden größere Mengen CRISPs isoliert als aus dem Nebenhodenkörper. Auf eine Quantifizierung der Ausbeute wurde aber aufgrund der sehr geringen Menge verzichtet. Die CRISP enthaltenden Fraktionen wurden eingengt und die Proteine über Reversed Phase HPLC isoliert. Gleiche Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert.



Aus equinem Nebenhoden wurden acht verschiedene Fraktionen in den HPLC-Läufen isoliert. Von diesen wurde zunächst die Masse bestimmt, um festzustellen, ob die isolierten Proteine identisch sind. In drei Fraktionen konnte eine Masse bestimmt werden (Tabelle 3-5). Die übrigen Fraktionen enthielten nur breite Massenverteilungen, die sonst nur bei Glykoproteinen beobachtet werden. Die drei gefundenen Massen sind nicht identisch, so daß nicht genügend Material für ein Peptidmapping zur Verfügung stand.

**Tabelle 3-5:** Massen der aus dem Nebenhoden isolierten CRISPs

<b>Fraktion</b>	NHa	NHb	NHc	NHd	NHe	NHf	NHg	NHh	NHj
<b>Masse [kD]</b>	24991	20,536	-	24,821	24,606	-	-	-	

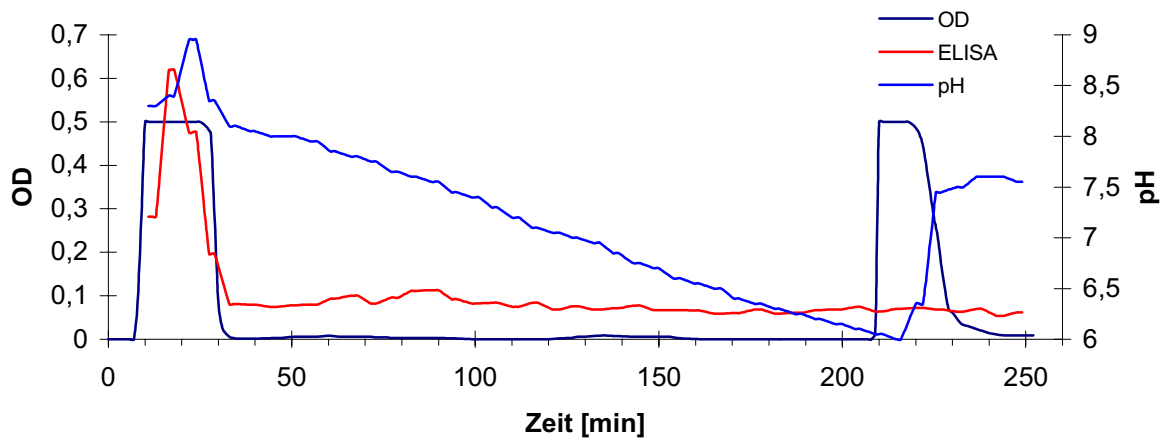
Nur die Masse NHa läßt sich mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz vereinbaren, sie entspricht aber nicht dem vorhergesagten reifen Protein, für das eine Masse von 25685 Dalton berechnete wurde. Die Abspaltung von AS 1-32 resultiert in einer theoretischen Masse von 24885 Dalton, die innerhalb der Fehlergrenzen mit der Masse aus NHa übereinstimmt. Die anderen Massen könnte Fragmente von CRISP-1 darstellen oder, wahrscheinlicher, andere Proteine.

### **Isolierung von CRISPs aus equinen Spermienextrakten**

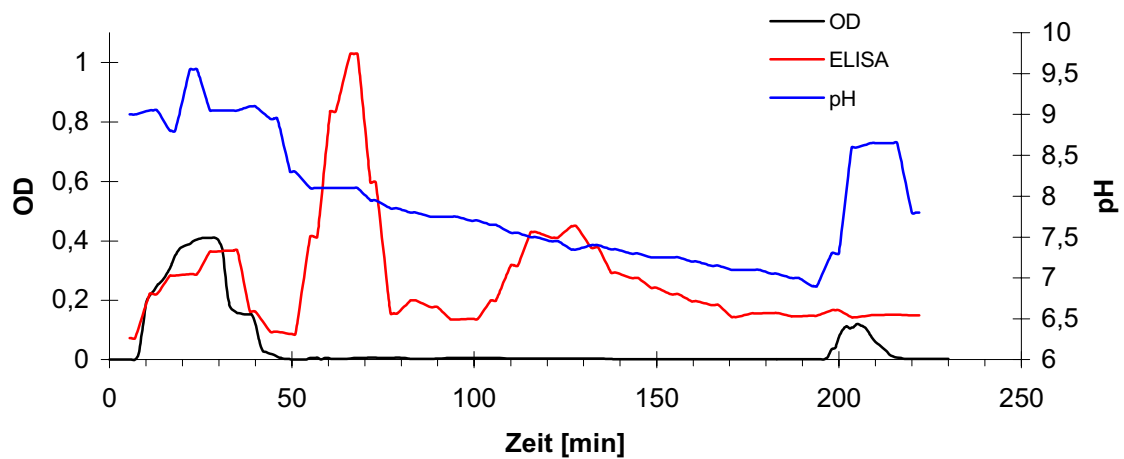
Die nach dem Waschen mit PBHS noch an die Spermien assoziierten CRISPs wurden mit 1% Octylglucopyranosid extrahiert und wie für CRISP-1 beschrieben mit der Chromatofokussierung in einem pH-Gradienten von pH 8 bis pH 6 getrennt. Die Analyse der Fraktionen im ELISA zeigte jedoch, daß die Hauptmenge CRISPs bei pH 8 nicht an das Säulenmaterial bindet (Abb. 3-27a).

Die Fraktionen des ersten Peaks (5-32min) wurden vereinigt, der pH auf 9,4 eingestellt und in einem pH-Gradienten von pH 9 bis pH 7 rechromatographiert. In dieser Chromatographie trennten sich die CRISPs in zwei breite Peaks (Abb. 3-27b), die von 55-72 min und von 110-140 min eluierten. Die Fraktionen der beiden Peaks wurden getrennt vereinigt, konzentriert und über Reversed Phase HPLC weiter getrennt.

Die im nachfolgenden ELISA positiven Fraktionen wurden lyophilisiert und die Masse der isolierten Proteine bestimmt.



**Abb.3-27a:** Chromatofokussierung Spermienextrakt (Pferd) pH 8-6



**Abb.3-27b:** Chromatofokussierung Spermienextrakt (Pferd) pH 9-7  
Rechromatographie Fraktion 1-5 aus der Fokussierung pH 8-6

Aus den Fraktionen 10-13 (55 bis 72min), die bei pH 8,0 eluierten, ergaben sich 6 positive HPLC-Fraktionen mit den folgenden Massen:

**Tabelle 3-6:** Massen der aus equinen Spermien isolierten CRISPs

Fraktion	ES a	ES b	ES c	ES d	ES e	ES f
Masse [kD]	25,64	24,722	26,52	-	25,424	24,987

Die Massen der drei aus dem zweiten Pool isolierten Proteine konnten aufgrund der geringen Menge und der breiten Massenverteilung nicht bestimmt werden.

Die Masse von 25640 Dalton aus ESa stimmt mit der theoretischen Masse eines CRISP-1 Fragments AS 26-251 mit einer theoretischen Masse von 25636 Dalton gut überein. Dieses Fragment wäre gegenüber dem vorhergesagten reifen Protein um das N-

terminale Lysin verkürzt. Die in Fraktion ESf gefundene Masse entspricht exakt mit der für CRISP-3 experimentell bestimmten Masse. Auch in diesem Fall stammen die nicht zugeordneten Massen vermutlich von Fremdproteinen.

## Proteinchemische Charakterisierung von equinem CRISP-3

### Peptidmap

Die Identität zwischen dem aus dem equinen Seminalplasma isolierten CRISP und dem Produkt der *ec* CRISP-3 mRNA wurde durch proteolytische Spaltung und massenspektrometrische Analyse überprüft.

Die Masse des isolierten Proteins wurde zu  $24987 \pm 4$  Dalton massenspektrometrisch bestimmt. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß das Protein N-terminal blockiert ist (*Nessau et al.*). Unter der Annahme, daß alle 16 Cysteine in Disulfidbrücken gebunden sind, das Protein nicht glykosyliert ist, AS 1-22 wie vorhergesagt das Signalpeptid bilden und Gln 23 zu pyro-Glutamat modifiziert ist, wurde eine Masse von 24993 für das prozessierte Protein berechnet. Dieser Wert stimmt gut mit der experimentell bestimmten Masse von  $24987 \pm 4$  überein.

Da aufgrund des blockierten N-Terminus eine N-terminale Sequenzierung des Proteins nicht möglich ist, wurde die Identität mit Hilfe eines Peptidmaps bestätigt. Dazu wurde ein Verdau des Proteins mit Endoproteinase Lys C auf einem Mikro-HPLC-System aufgetrennt und das Eluat direkt in einem Massenspektrometer analysiert. Die Daten wurden mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der CRISP-3 mRNA verglichen. Neun der gefundenen Peptidmassen konnten einwandfrei den berechneten Massen zugeordnet werden (Tabelle 3-7).

Unter den vorliegenden nicht reduzierenden Bedingungen konnte kein Cystein-haltiges Peptid identifiziert werden (Abb. 3-28), dagegen wurden höhere Massen gefunden, die keinem Peptid zugeordnet werden konnten. Dies bestätigt das frühere Ergebnis, daß alle Cysteinreste in Disulfidbrücken involviert sind. Die Masse des N-terminalen Peptids von

QDPGFAALSITKSEVQKEIVNKHNDLRRTVSPLASNMLKMQWDSKTATNAQNWANK CLLQHSKAEDRAVGTMKCG  
ENLFMSSIPNSWSDAIQ<sup>N</sup>NHDEVHDFK<sup>Y</sup>GVGPKTPNAVVGHYTQVVWYSSYRVGCGIAYCPKQ<sup>G</sup>TLK<sup>Y</sup>YYVC<sup>Q</sup>YC  
PAGNYVNKINTPYEQGTPCARCPGNC<sup>D</sup>NGLCTNSCEYEDLVSNC<sup>D</sup>SLKKIAGCEHELLKENCKTTC<sup>Q</sup>CENKIYZ

**Abb.3-28:** Position der mit LC-MS identifizierten Pentide (unterstrichen) in der abgeleiteten Aminosäuresequenz

1230 Dalton bestätigt die Hypothese, daß die N-terminale Aminosäure zu pyro-Glutamat modifiziert ist.

**Tabelle 3-7:** Vergleich der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den theoretischen Massen für Lys C-Peptide von equinem CRISP-3

Peptidmasse calc. <sup>1</sup> [g/mol]	Peptidmasse exp. <sup>2</sup> [g/mol]	Aminosäuren	Sequenz
1229,63	1229,78	1-12	pyro-QDPGFAALSITK>S
589,31	589,40	13-17	K<SEVQK>E
601,34	601,29	18-22	K<EIVNK>H
1952,27	1952,03	23-39	K<HNDLRRTVSPLASNMLK>M
793,34	793,36	40-45	K<MQWDSK>T
1217,58	1217,93	46-56	K<TATNAQNWANK<C
1076,53	1076,65	64-73	K<AEDRAVGTMK>C
619,33	619,30	103-108	K<YGVGPK>T
545,32	545,21	138-142	K<QGTK>Y

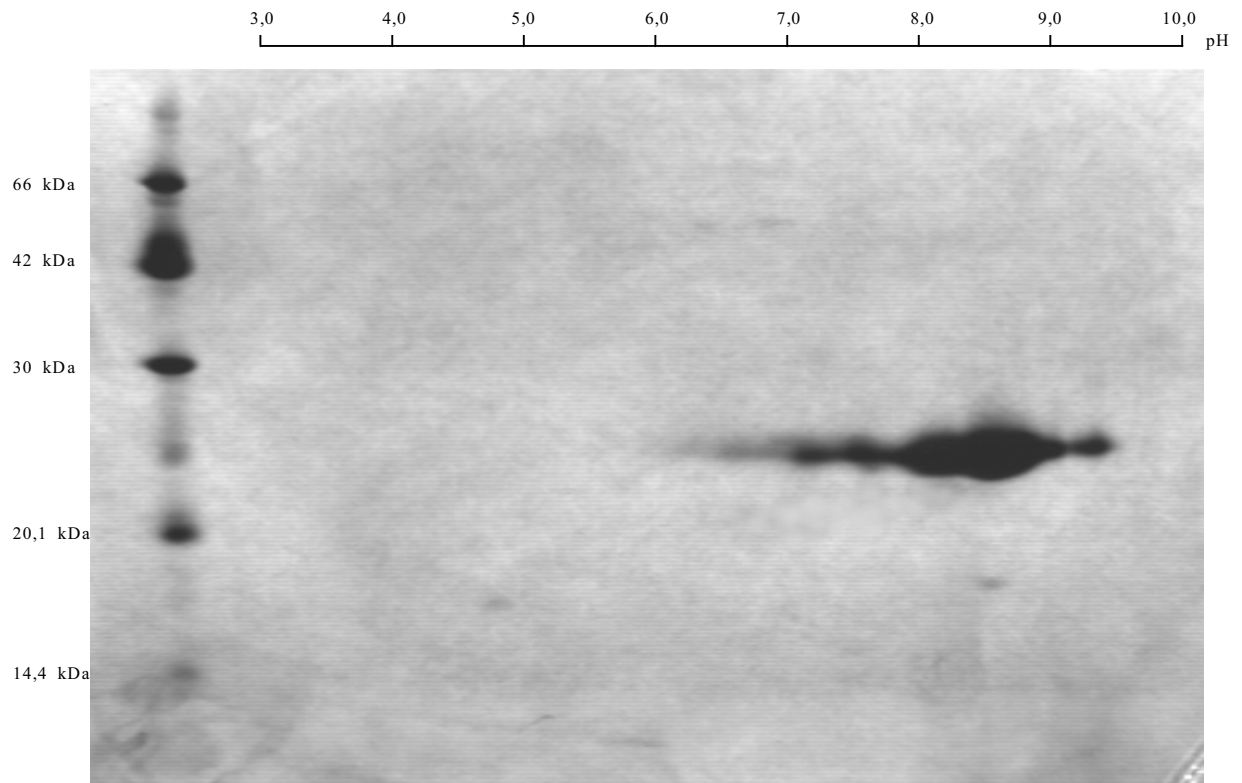
1-aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz berechnete Peptidmasse

2-experimentelle Peptidmasse

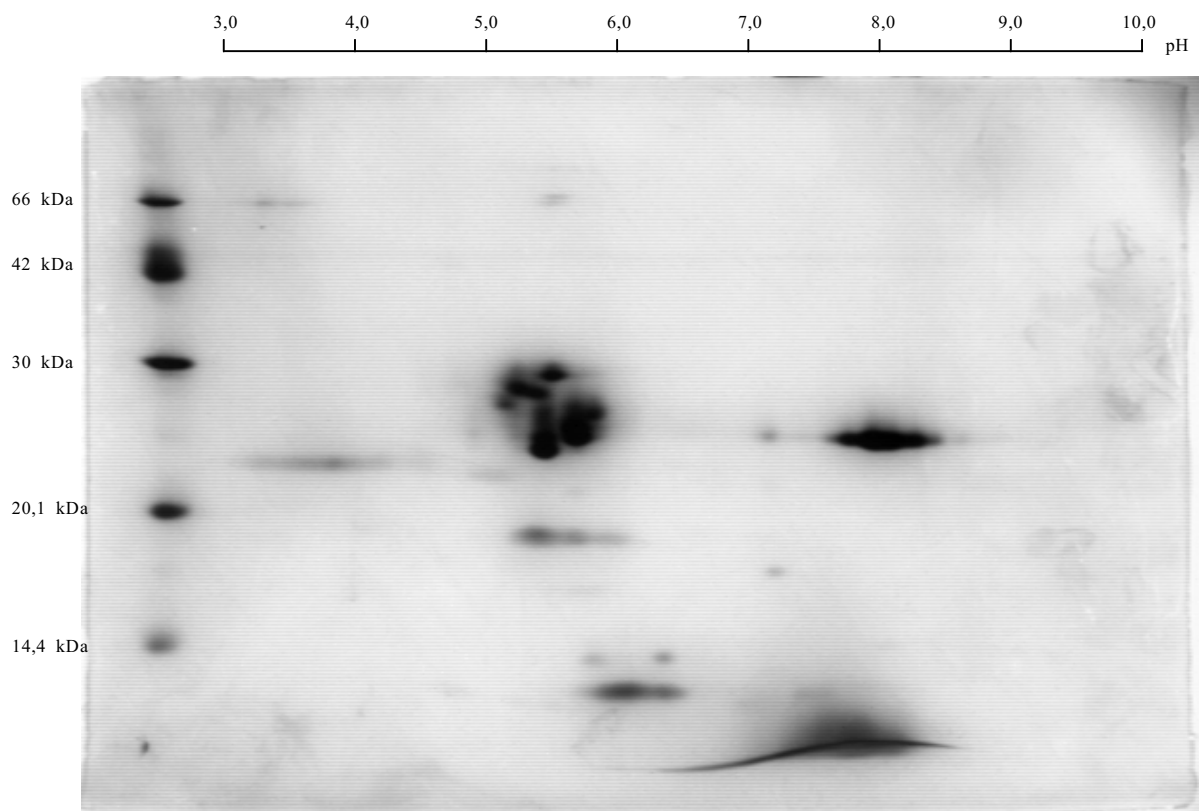
### **Bestimmung des isoelektrischen Punkts**

Aufgrund der durch das Peptidmap erhaltenen Ergebnisse wurde der Isoelektrische Punkt von CRISP-3 berechnet. Unter der Annahme, daß das aminoternale Glutamin zu pyro-Glutamat modifiziert wurde und daß alle Cysteinreste Disulfidbrücken bilden ergab sich ein Isoelektrischer Punkt von 8,0. Experimentell zeigte sich eine breite Bande in einem Bereich von 7,8 bis 8,8 (Abb. 3-29a).

Die Ursache für das schlechte Fokussieren des Proteins konnte nicht geklärt werden. Die Vermutung, daß das Phänomen durch Einflüsse im Laufe der Präparation verursacht wurde, hat sich nicht bestätigt. Sowohl natives als auch HPLC-gereinigtes Protein zeigten das gleiche Laufverhalten wie es auch bei der Fokussierung von frischem Seminalplasma erhalten wurde (Abb. 3-29b).



**Abb. 3-29a:** 2D-Elektrophorese von nativem CRISP-3



**Abb.3-29b:** 2D-Elektrophorese von equinem Seminalplasma

# Biophysikalische Charakterisierung von equinem CRISP-3

## CD-Spektren

CD-Spektren geben Aufschluß über die Anteile von  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *random coil* an der Sekundärstruktur des Proteins. Die deutlich verschiedenen Hemmkurven, die mit nativem und HPLC-gereinigtem CRISP-3 im kompetitiven ELISA erhalten wurden, deuteten auf die Exposition verschiedener Epitope und Veränderung der Proteinstruktur. Eine durch die Denaturierung bedingte Veränderung der Sekundärstruktur sollte durch CD-Spektren erkennbar werden.

Der Vergleich der CD-Spektren von nativem und HPLC-gereinigtem CRISP-3 zeigte jedoch nur sehr geringe Abweichungen (Abb. 3-30). Die Sekundärstruktur wird durch die denaturierenden Bedingungen der RP-HPLC nicht oder nur gering beeinflusst. Die Abweichungen liegen im Rahmen der Meßgenauigkeit.

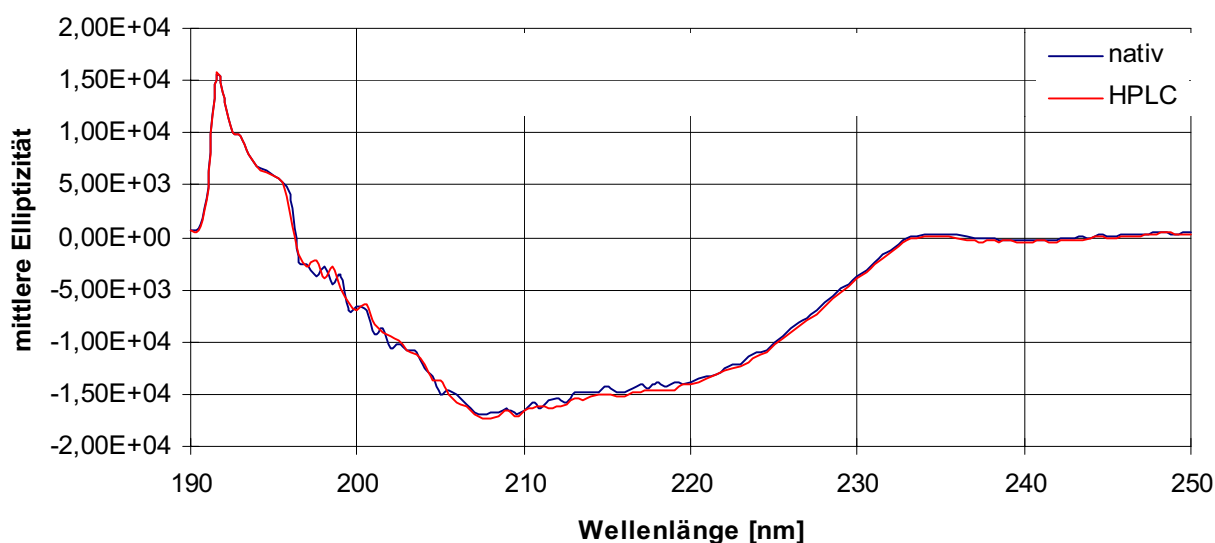
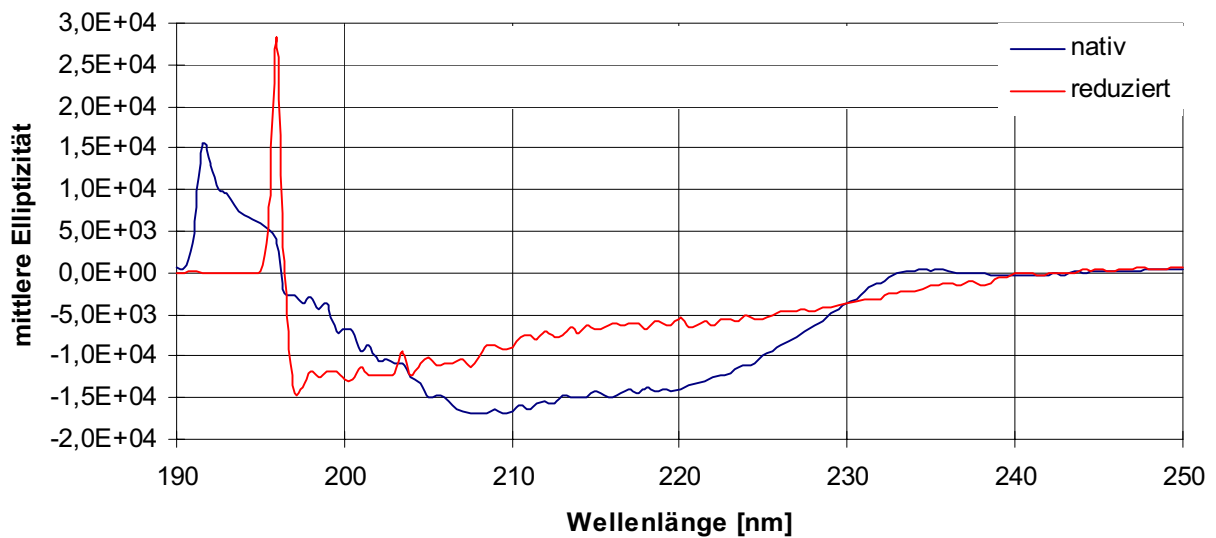


Abb.3-30: CD-Spektren im Bereich von 190 bis 250 nm für natives (dunkelblau) und HPLC-gereinigtes (rot) CRISP-3

Die Ermittlung der Sekundärstrukturanteile erwies sich als schwierig, es ergaben sich je etwa 40 % und unter 20 %. Auf die Angabe genauer Werte wird verzichtet, da keine Anpassung genügend zuverlässig war. Vergleichbare Werte lieferten auch CD-Spektren im nahen UV-Bereich, bei deren Auswertung allerdings neben  $\alpha$ -Helix und *random coil* verschiedene Arten von  $\beta$ -Faltblatt und *turns* berücksichtigt wurden (Magdaleno et al. 1997). Der Einfluß der Disulfidbrücken auf das Spektrum wurde durch Reduktion und

Carboxymethylierung des Proteins untersucht. Es zeigte sich, daß bei Reduktion die Sekundärstruktur dem *random coil* annähert (Abb. 3-31) Die Analyse ergab über 70% *random coil* und jeweils etwa gleiche Anteile von ca. 15 %  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt.



**Abb.3-31** CD-Spektren von nativem und reduziertem CRISP-3

Diese Ergebnisse zeigen den großen Einfluß der Disulfidbrücken auf die Sekundärstruktur und damit auf die Tertiärstruktur von equinem CRISP-3. Die bisher bekannten CRISPs zeigen einen hohen Grad Homologie und die strikte Konservierung der Positionen der Cysteinreste. Es ist anzunehmen, daß die Disulfidbrücken bei allen CRISPs ein strukturgebendes Element sind.

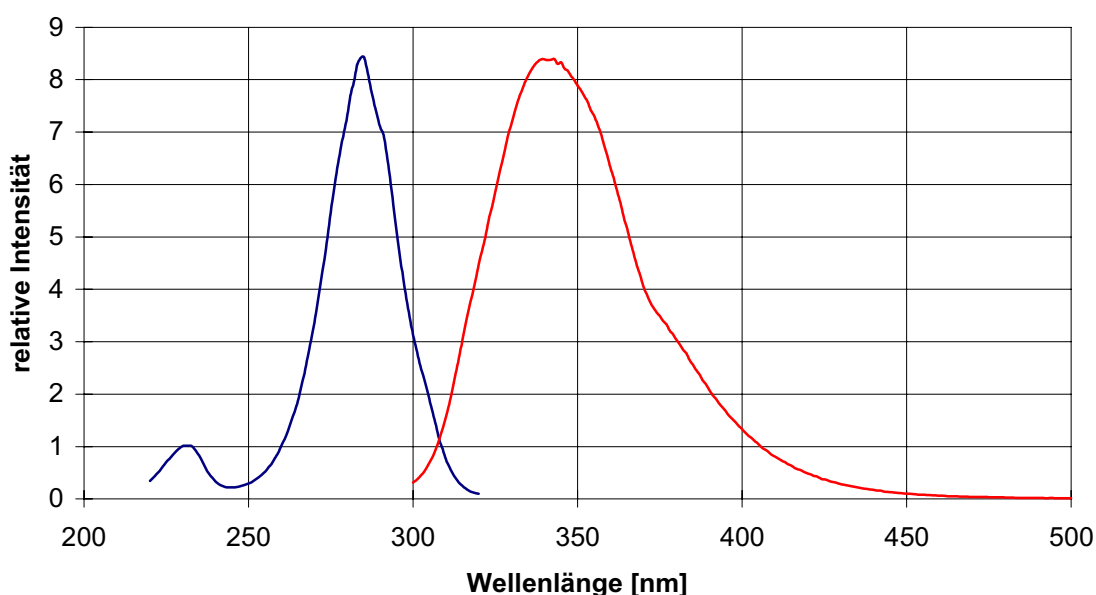
### **Analytische Ultrazentrifugation**

Die Analytische Ultrazentrifugation mit nativem equinem CRISP-3 wurde freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. Claus Urbanke am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Es ergab sich ein Sedimentationskoeffizient von ca. 2,5 Svedberg und ein Molekulargewicht von 26,5 kD. Das Protein liegt folglich als Monomer vor und ist annähernd globulär.

### **Interaktion mit Phospholipidvesikeln**

Die Untersuchungen wurden am Institut für Biophysik der Humboldt Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hermann durchgeführt. Dabei wurde die Wechselwirkung von equinem CRISP-3 mit Phospholipidvesikeln anhand der Änderung der Tryptophanfluoreszenz untersucht. Es wurden *small unilamellar vesicles* (SUVs) mit einem Durchmesser von 20 nm und verschiedener Lipidzusammensetzung verwendet.

Zunächst wurden die Excitations- und Emissionsspektren von CRISP-3 aufgenommen und die optimale Wellenlänge für die folgenden Messungen ermittelt. Das Excitationsmaximum liegt bei 285 nm, das Emissionsmaximum bei 343 nm (Abb. 3-31).

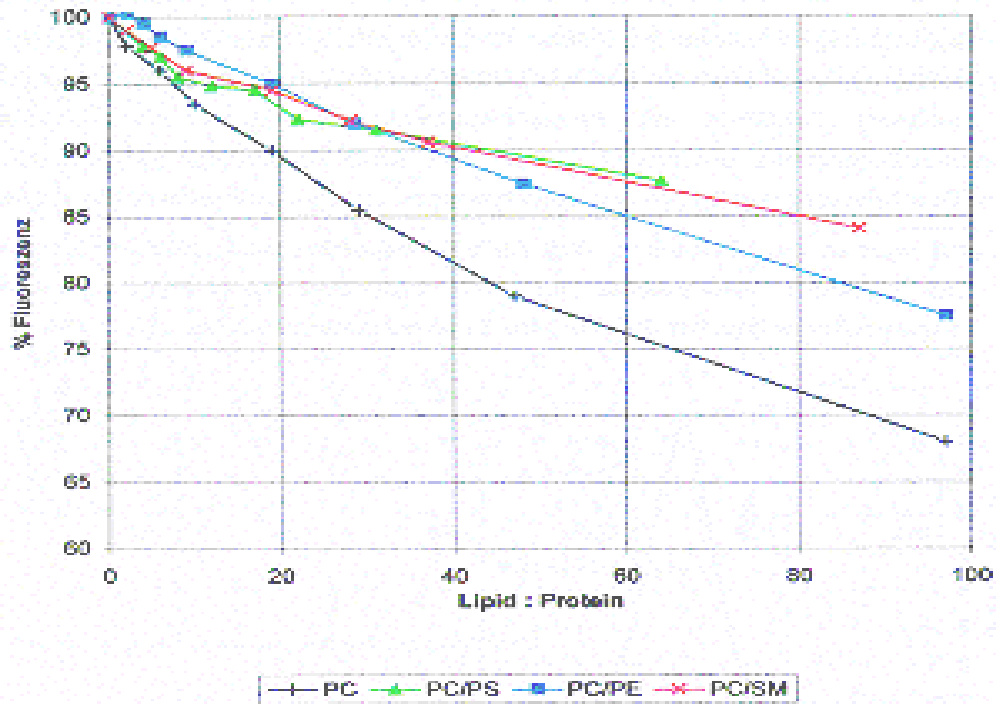


**Abb.: 3-31:** Excitations- (blau) und Emissionsspektren (rot) von equinem CRISP-3

Bei Zugabe von SUVs wurde eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet. Dies läßt auf eine Veränderung der Tryptophanumgebung und damit auf eine Wechselwirkung mit den Vesikeln schließen. Die Fluoreszenzabnahme war abhängig von der Zusammensetzung der Phospholipidvesikel (Abb. 3-32). Der größte Effekt wurde mit Phosphatidylcholin (PC)-Vesikeln beobachtet, der geringste mit PC/PS (Phosphatidylcholin/Phosphatidylserin)-Vesikeln.

Aufgrund des hohen pI von 8,3 wäre bei einer Interaktion mit den Kopfgruppen zu erwarten gewesen, daß CRISP-3 bevorzugt an saure Phospholipide wie Phosphatidylserin bindet. CRISP-3 interagiert aber am stärksten mit PC-Vesikeln, die aufgrund der permanenten Ladung des Cholins positiv geladen sind. Mit Sphingomyelin,





**Abb.3-32:** Änderung der Fluoreszenzintensität von CRISP-3 bei Zugabe von SUVs verschiedener Zusammensetzung

PC= Phosphatidylcholin, PS=Phosphatidylserin, PE=Phosphatidylethanolamin, SM=Sphingomyelin

ein Sphingolipid, welches ebenfalls eine Cholin-Gruppe trägt, wird jedoch eine deutlich geringere Wechselwirkung beobachtet. Dagegen konnte auch eine Interaktion mit Phosphatidylethanolamin gezeigt werden. Die beobachtete Lipidpräferenz, basische oder neutrale Phosphoglyceride, deutet auf eine hydrophobe Interaktion mit den Lipiden hin.

## Identifizierung eines Bindungspartners für equines CRISP-3

Ein Bindungspartner für das in großen Mengen im Seminalplasma vorkommende CRISP-3 wurde im Uterus der Stute vermutet. Das Ejakulat gelangt zuerst in den Uterus und der größte Teil des Seminalplasmas verbleibt dort, während die Spermien in das Ovidukt aufsteigen. Zur Gewinnung löslicher, sekretorischer Proteine des Endometriums wurde der Uterus einer Stute mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und die dadurch gewonnenen Proteine durch Ultrafiltration mit 1kD Ausschlußgrenze konzentriert und entsalzt.

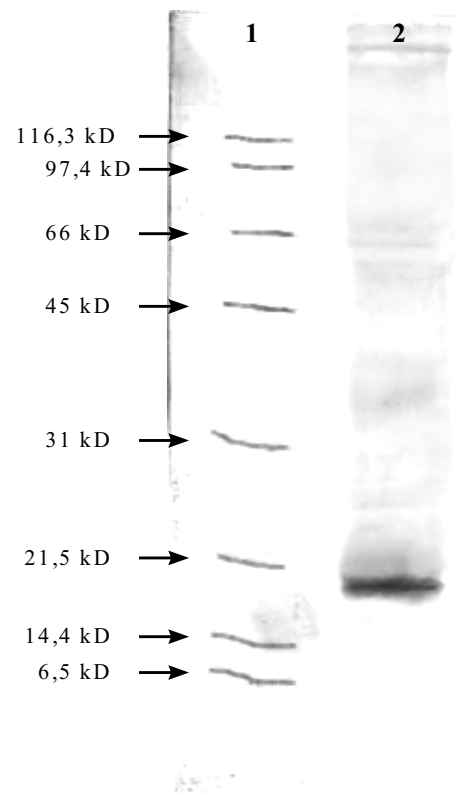
Die Bindung von CRISP-3 an eines oder mehrere dieser Proteine wurde im ELISA getestet. Dazu wurde vor der immunchemischen Detektion von CRISP-3 mit nativem, gereinigtem CRISP-3 in einer Konzentration von 5 µg/ml vorinkubiert. Aufgrund der positiven Resultate des ELISA wurden versucht, die an CRISP-3 bindenden Uterus-Proteine im Western Blot identifiziert. Auch in diesem Fall wurde der Blot vor der immunchemischen Detektion mit 5 µg/ml CRISP-3 vorinkubiert. Der Western Blot zeigt die Bindung an ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 19 kD (Abb.3-33).

Da ein möglicher Bindungspartner existiert, wurde versucht dieses Protein zu isolieren und zu identifizieren. Die aus der Uterus-Spülung gewonnenen Proteine wurden mittels RP-HPLC getrennt und die erhaltenen Fraktionen im ELISA wie oben beschrieben getestet. Es zeigte sich, daß

die Proteine in zwei Fraktionen (U19 und U21) von CRISP-3 gebunden wurden.

Zunächst wurde die Masse der Proteine in diesen Fraktionen bestimmt. Es wurde jeweils eine Masse erhalten, für U19 18,793 kD und für U21 20,536 kD.

Beide Fraktionen enthielten also sehr wahrscheinlich ein einzelnes Protein und wurden N-terminal sequenziert. Die Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Manfred Raida am Institut für Peptidforschung, Hannover durchgeführt.



**Abb. 3-33:** Western Blot von Proteinen aus einer Uterus-Spülung zur Identifizierung eines potentiellen Bindungspartners von equinem CRISP-3

1-Molekulargewichtsstandard  
2-Uterus-Spülung (>1 kD)

Es wurden folgende N-terminale Sequenzen erhalten:

U19: MGPDPNFDEKLVKGKWF SVALASN

U21: MGPDPNFDEKLVVKGXXFSVALA

Beide Sequenzen passen mit sehr guter Übereinstimmung zur Sequenz eines 19 kD-Proteins aus dem Endometrium der Stute, p19 (swissprot O28388), das zur Lipocalin-Familie gehört (Abb. 3-34).

U19: MGPDPNFDEKLV-KGKWF SVALASN

U21: M-PGDPNFDEKLVVKGXXFSVALA

p19: MGPDPNFDEKLV-KGKWF SVALASNE

**Abb. 3-34:** Übereinstimmung der Sequenzen CRISP-3 bindender Fraktionen löslicher Uterus-Proteine mit p19, einem Protein des equinen Endometriums.

## 4. Diskussion

Die Proteine der CRISP-Familie kommen beim Säuger vorwiegend im männlichen Genitaltrakt vor, wo sie unter Androgen-Kontrolle exprimiert werden. Bislang wurden die Proteine der Ratte, der Maus und des Menschen beschrieben. Man findet bei der Maus (*Kasahara et al. 1989, Mizuki et al. 1992, Eberspaecher et al. 1995*) und beim Menschen (*Krätzschar et al. 1996*) drei Formen, die als CRISP-1, CRISP-2 und CRISP-3 bezeichnet werden. Bei der Ratte sind bislang nur CRISP1 (*Cameo und Blaquier 1992*) und CRISP-2 bekannt. CRISP-1 der Ratte ist das am besten untersuchte Protein. Es scheint eine Rolle bei der Befruchtung zu spielen. Das Protein assoziiert aus dem Nebenhodensekret an die Spermatozoen (*Brooks 1987*) und ist vermutlich an der Fusion mit der Eizelle beteiligt (*Rochwerger und Cuasnuicú 1992*).

### Sequenzierung und Genexpression equiner und porciner CRISPs

Zunächst stellte sich die Frage, ob das aus dem Seminalplasma des Hengstes isolierte Protein, dessen interne Peptide Homologie zur Sequenz der CRISP-Proteine zeigen, ein neues Mitglied dieser Proteinfamilie ist. Das Protein wurde als CRISP identifiziert und aufgrund seiner Expression in Ampulle, Samenblase und Speicheldrüse als CRISP $\beta$  eingestuft. Der für das 3'-RACE aus einem in allen CRISPs konservierten Bereich konstruierte sequenzspezifische Primer erwies sich als geeignet auch die CRISP-cDNA aus Hoden und Nebenhoden zu amplifizieren. Die Sequenzierung dieser Produkte zeigte, daß auch beim Pferd drei CRISPs vorkommen, wie dies für die Maus und den Menschen beschrieben wurde. Die mRNA-Sequenzen der equinen CRISPs sind zu den bisher bekannten Sequenzen anderer Spezies homolog. Die CRISP1 Sequenzen sind den homologen Sequenzen anderer Organismen näher verwandt als den CRISP2 und CRISP-3 Sequenzen des gleichen Tieres. CRISP2 und CRISP-3 zeigen sowohl in einer Art als auch zu homologen Sequenzen anderer Arten gleichermaßen sehr hohe Homologie. Die Sequenzidentität ist bei CRISP-3 des Pferdes so hoch, daß die Einordnung der neuen Sequenz als CRISP2 oder CRISP-3 schwierig war. CRISP-2 wird in der Literatur als testisspezifisches Transkript eingestuft, während CRISP3 in verschiedenen Geweben und Zellen, aber nicht in Hoden und Nebenhoden nachgewiesen wurde (*Eberspaecher et al. 1995, Krätzschar et al. 1996*). Da im Hoden keine Transkripte von equinem CRISP-3 nachgewiesen wurde, konnte angenommen

werden, daß es sich nicht um CRISP-2 handelt. Der Vergleich des mRNA-Aufbaus stützt diese Annahme. Der 5'-untranslatierte Bereich umfaßt bei den bekannten CRISP-2 mRNAs in allen Fällen etwa 250, bei CRISP-1 und CRISP-3 unter 100 Nukleotide. Damit konnte die CRISP-3 mRNA mit 58 Nukleotiden 5'-untranslatiertem Bereich zweifelsfrei zugeordnet werden. Die vollständige Sequenzierung der equinen CRISP-2 mRNA entspricht in ihrem Aufbau den bekannten Sequenzen und bestätigt damit die Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen CRISP-Proteinen.

CRISP-3 Transkripte wurden nur in Ampulle und Samenblase sowie in der Speicheldrüse des Hengstes nachgewiesen. Die Expression von CRISP-1 und CRISP-2 ist dagegen selbst innerhalb des männlichen Genitaltrakts nicht auf ein Organ beschränkt (Tabelle) und steht damit im Widerspruch zu den für Maus und Mensch gefundenen Expressionsorten. Demnach sollte CRISP-2 ausschließlich im Hoden und CRISP-1 im Nebenhoden und der Speicheldrüse transkribiert werden (Brooks 1987, Eberspaecher et al. 1995, Krätzschar et al. 1996). Allerdings wurde die mRNA in diesen Fällen mittels Northern Blots detektiert, die nicht die Empfindlichkeit der RT-PCR erreichen. Bei der RT-PCR können dagegen prinzipiell insbesondere bei hoher Sequenzhomologie falsch positive Resultate auftreten. Dies wurde durch Sequenzierung der erhaltenen Produkte ausgeschlossen. Darüberhinaus wurden bei Maus und Mensch mit Ausnahme der Prostata keine akzessorischen Geschlechtsdrüsen untersucht.

**Tabelle 4-1:** Nachweis der Transkripte der equinen CRISPs im männlichen Genitaltrakt mittels RT-PCR. Es wurde zwischen sehr starken ++, deutlich erkennbaren + und sehr schwachen (+) Banden der PCR-Produkte bei gleich starken Banden der Kontroll-PCR (GAPDH) unterschieden.

	CRISP-1	CRISP-2	CRISP-3
Hoden		++	
Nebenhodenkopf	++	+	
Nebenhodenkörper	++	(+)	
Nebenhodenschwanz	++		
Samenleiter	++	(+)	
Ampulle	++	(+)	++
Samenblase	++	++	+
Prostata	(+)		
Bulbourethraldrüse			
Speicheldrüse	(+)		+
Leber			

Es ist interessant, daß CRISP-1 und CRISP-2 in der Ampulle und Samenblase transkribiert werden, aber die massenspektrometrischen Analysen des aus dem Seminalplasma isolierten Proteins nur CRISP-3 identifizieren. Dies deutet entweder darauf hin, daß die CRISP-1 und CRISP-2 mRNAs in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen nicht oder nur in geringem Ausmaß translatiert werden, oder daß die Proteine nicht sekretiert werden. Die Detektion von CRISPs im Western Blot gibt keinen Aufschluß darüber, weil das polyklonale Antiserum eine Unterscheidung der einzelnen CRISP-Formen nicht erlaubt.

CRISP-3 aus dem equinen Seminalplasma eignet sich aufgrund der leichten Zugänglichkeit großer Mengen gut für biochemische und biophysikalische Untersuchungen. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von CRISPs bei der Fortpflanzung ist das Pferd allerdings schlecht geeignet. Eine *in vitro* Kultur der Eizellen ist extrem schwierig und nicht etabliert, darüberhinaus ist Probenmaterial schlecht zu bekommen. Unter den Nutztieren bietet sich das Schwein als Modellorganismus an. Seine Reproduktionsphysiologie ist gut untersucht, darüberhinaus sind durch Experimente zur Herstellung transgener Schweine Methoden zur *in vitro* Kultivierung der Keimzellen und die *in vitro* Fertilisation gut etabliert.

Da porcine CRISPs noch nicht bekannt waren, wurden in einem ähnlichen Ansatz PCR-Produkte isoliert und die Sequenzen für porcines CRISP-1 und CRISP-2 identifiziert. Es zeigte sich eine ähnlich hohe Homologie zu den entsprechenden CRISPs des Menschen und anderer Spezies wie für die equinen Sequenzen. Die Untersuchung der Transkription in den Geweben des männlichen Genitaltrakts zeigte jedoch eine andere Verteilung (Tabelle). Im Western Blot konnte auch in der Bulbourethraldrüse ein CRISP detektiert werden. In diesem Gewebe wurden aber weder CRISP-1 noch CRISP-2 Transkripte amplifiziert. Es ist daher anzunehmen, daß es sich um porcines CRISP-3 handeln könnte.

**Tabelle 4-2:** RT-PCR zum Nachweis der Transkripte der porcinen CRISPs im männlichen Genitaltrakt. Es wurde zwischen sehr starken ++, deutlich erkennbaren + und sehr schwachen (+) Banden der Produkte bei gleich starken Banden der Kontroll-PCR (GAPDH) unterschieden.

	CRISP-1	CRISP-2	CRISP-3
Hoden		++	
Nebenhodenkopf	++	+	
Nebenhodenkörper	++	+	
Nebenhodenschwanz	++	+	
Ampulle	beim Schwein nicht ausgeprägt		
Samenblase		+	
Prostata		+	
Bulbourethraldrüse			?
Speicheldrüse	+	+	
Leber			

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von CRISP-1, CRISP-2 und CRISP-3 zeigt, daß die 16 Cysteine in definierten Abständen in allen Sequenzen konserviert sind. Weitere konservierte Aminosäuren sind vier Proline, drei davon in unmittelbarer Nähe eines Cysteinrestes, und drei Tryptophanreste. Darüberhinaus findet man neben einzelnen konservierten Aminosäuren zwei Bereiche mit vier aufeinanderfolgenden konservierten Aminosäuren (Abb.). Die Bereiche zwischen den Cysteinresten und ein Bereich vor dem ersten Cystein sind verhältnismäßig variabel. Die Kreuzreaktivität des polyklonalen Hühnerantiseraums mit mindestens sechs verschiedenen CRISPs weist jedoch darauf hin, daß die equinen und porcinen CRISPs daneben konservierte Epitope besitzen oder daß eine spezielle, durch die Disulfidbrücken bedingte Struktur erkannt wird. Die variablen Sequenzen repräsentieren mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die funktionellen Bereiche.

```

1  xxxxxxxxxxxLxxxxxxxxVQxEIxxxHNxxRxxxxPxxxxLxxxxxxxx
51  NAxxxxxCxxxxxxxxxxxxxxxxCGENxxxxxxxxWxxxIxxWxxEx
101 xxxxxxxxxxxxxxxxxxxHYTQxVWxxxxxxxxCxxxxCxxxxxxxxYxYxC
151 xYCxxGNxxxxxxxxPYxxGxPCxxCPxxCxxxxCTNxCxxxDxxxxCxxx
201 xxxxxxCxxxxxxxxCxxxCxCxxxxx

```

**Abb. 4-1:** Konservierte Aminosäuren in der CRISP-Familie. In einzelnen Fällen können die variablen Bereiche sowie N- und C-Terminus verkürzt sein.

CD-Spektren von nativem und reduziertem equinem CRISP-3 zeigen, daß die acht Disulfidbrücken das wichtigste strukturgebende Element darstellen. Die unmittelbare Nähe von Prolinen könnte auf *turns* hinweisen. CD-Spektren im nahen UV-Bereich bestätigen dies (*Magdaleno et al. 1997*). Die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation lassen darüberhinaus auf eine monomere, annähernd globuläre Form von equinem CRISP-3 schließen.

## **Haben CRISPs eine Bedeutung für den Befruchtungsvorgang ?**

Funktionelle Untersuchungen beschränken sich auf CRISP-1 und CRISP-2 der Ratte. Sie liefern Hinweise auf eine Rolle bei der Spermatogenese (CRISP-2) und der Gameteninteraktion (CRISP-1, DE-Proteine, *Rochwerger und Cuasnicú 1992*). Die temporäre Unfruchtbarkeit gegen CRISP-1 immunisierter Ratten, stützt die Vermutung, daß CRISP-1 ein fertilitätsrelevantes Protein ist, daß sich als Antigen für die Immunkontrazeption eignen könnte (*Founier-Delpech et al. 1985, Perez Martinez et al. 1993, Ellerman et al. 1998*).

Eine potentielle Bedeutung für die Fertilität bei Pferd und Schwein setzt eine Expression in oder eine Assoziation an die Keimzellen voraus. In der Immunhistologie konnte die Expression im Genitaltrakt des Ebers bestätigt werden. Vergleichbare Ergebnisse liegen für den Hengst vor (*Schambony et al. 1997, Schambony et al. 1998*). Aus der Immunhistologie können darüberhinaus Aussagen über die CRISPs exprimierenden Zelltypen getroffen werden. Im Hoden scheint CRISP-2 ausschließlich von den reifenden Spermatozyten synthetisiert zu werden. Im Nebenhoden zeigt sich dagegen eine Expression von CRISPs in den Epithelzellen. Die im Lumen der Kanäle liegenden Spermien werden ebenfalls stark gefärbt. Man nimmt an, daß CRISP-1 von den Epithelzellen sezerniert wird und aus dem Nebenhodensekret an die Spermienmembran assoziiert (*Brooks 1987*). In den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und der Speicheldrüse werden CRISPs ebenfalls von den Epithelzellen exprimiert und in das Lumen abgegeben. Während für einige Nebenhodenproteine eine Verankerung in der Membran nachgewiesen wurde, scheinen die Proteine der akzessorischen Geschlechtsdrüsen nur schwach an die Spermien zu assoziieren.

Die Expression in den Spermatogonien steht im Einklang mit der für CRISP-2 postulierten Funktion als Anheftungsfaktor der Spermatozyten an die Sertoli-Zellen und zeigt darüberhinaus, daß es sich um ein Genprodukt der Spermatozyten und nicht der



Sertoli-Zellen handelt. Untersuchungen mit rekombinanten, im Wildtyp nicht adhärenen Zelllinien zeigen, daß sich die CRISP-2 exprimierenden Zellen an kultivierte Sertoli-Zellen, aber nicht aneinander binden. CRISP-2 bindet dabei sehr wahrscheinlich an einen spezifischen Rezeptor der Sertoli-Zelle. Eine direkte Bindung an die Zellmembran wird dadurch unwahrscheinlich, da sich die Membran der Sertoli-Zellen in ihrer Lipidzusammensetzung nicht grundlegend von der anderer Zellen unterscheiden sollte, die rekombinanten Zellen aber selektiv an die Sertoli-Zellen binden. Die Bindung von CRISP-2 an einen Rezeptor der Sertoli-Zellen könnte im Zusammenhang mit der sehr hohen Homologie zwischen CRISP-2 verschiedener Spezies erklären, warum die Sertoli-Zellen die Reifung von Spermien verschiedener Spezies unterstützen. Der Rezeptor bindet möglicherweise mehrere homologe Proteine und vermittelt so den Kontakt zwischen den Sertoli-Zellen und den fremden Spermatozoen.

Das im Nebenhoden dominierende CRISP-1 wird im Gegensatz zu CRISP-2 nicht von den Spermien sondern von den Epithelzellen der Nebenhodenkanäle exprimiert (auch *Lea et al. 1978*). Es stellt sich die Frage, warum die Spermatozoen nur CRISP-2, aber nicht CRISP-1 synthetisieren. Es wäre denkbar, daß CRISP-1 nur unter bestimmten, nur im Nebenhoden gegebenen Umständen an die Spermien assoziieren kann. Allerdings haben die Spermien zum Zeitpunkt der Nebenhodenpassage ihre Proteinsynthese praktisch eingestellt und sind bereits sehr hoch spezialisiert. Möglicherweise benötigt CRISP-1 eine definierte Membranzusammensetzung und eine definierte Umgebung, die nur im Nebenhoden gegeben sind.

Auch bei Schwein und Pferd scheinen CRISPs aus dem Nebenhodensekret an die Spermien zu assoziieren. In den immunhistologischen Schnitten ist deutlich eine Färbung der im Lumen der Kanäle liegenden Spermien zu erkennen. Diese Beobachtung wurde durch indirekte Immunfluoreszenz bestätigt. CRISPs finden sich im Akrosom und auf der Plasmamembran im Bereich des Postakrosoms und des Mittelstücks. Die Antigene im Postakrosom scheinen wie die Homologen der Maus und der Ratte (*Rankin et al. 1992, Vreeburg et al. 1992*) fest an die Spermien gebunden zu sein. Ob diese Bindung allerdings über eine Interaktion des Proteins mit der Membran selbst oder mit einem Membranprotein vermittelt wird, ist noch strittig.

Untersuchungen der Bindung von CRISP-3 an Phospholipidvesikel haben gezeigt, daß CRISP-3 mit den Vesikeln interagiert. Die Interaktion ist abhängig von der Lipidzusammensetzung der Vesikel. CRISP-3 interagiert bevorzugt mit

Phosphatidylcholin-Vesikeln. Phosphatidylcholin stellt die größte Menge Phospholipid der äußeren Lipidschicht von Zellmembranen, während saure Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin überwiegend in der inneren Schicht zu finden sind. CRISP-3 ist folglich theoretisch in der Lage, mit Zellmembranen zu interagieren oder an diese direkt zu assoziieren. Ob und mit welchen Zellen das Protein assoziiert und inwieweit diese Eigenschaft physiologische Bedeutung hat, bleibt noch zu klären.

Aufgrund der hohen Homologie innerhalb der CRISP-Familie kann jedoch vermutet werden, daß CRISP-1 und CRISP-2 ähnliche Eigenschaften besitzen. Die direkte Interaktion von CRISPs mit Lipiden aus Zellmembranen wäre ein möglicher Mechanismus der Assoziation von CRISP-1 an die Spermienmembran. Equines CRISP-1 enthält gegenüber CRISP-3 einen höheren Anteil hydrophober Aminosäuren, die eine hydrophobe Wechselwirkung mit Lipidmembranen begünstigen würden. Eine durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierte Assoziation von CRISP-1 an die Spermienmembran ließe sich im Gegensatz zu einer ionischen Bindung nicht durch Erhöhung der Ionenstärke lösen. Experimentell läßt sich zeigen, daß CRISPs bei hohen Ionenstärken nicht von der Spermienmembran dissoziieren, so daß eine hydrophobe Wechselwirkung anzunehmen ist.

Nach Kapazitation und Akrosomreaktion verbleiben CRISP-Antigene im Äquatorialsegment, Postakrosom und Mittelstück, entsprechend der für Rattenspermien gezeigten Lokalisation der DE-Proteine (CRISP-1, *Brooks 1987*). Damit befinden sich die CRISPs in dem Bereich der Spermienmembran, der zuerst mit der Eizellmembran in Kontakt tritt, und in dem die Fusion der beiden Membranen beginnt. Für CRISP-1 der Ratte konnte eine Beteiligung an der Gametenfusion gezeigt werden. Die Zugabe von gereinigtem Protein oder CRISP-1-spezifischer Antikörper hemmt die Fusion der Keimzellen, aber nicht die Bindung der Spermien an die Plasmamembran der Oocyte (*Rochwerger und Cuasnicú 1992*). Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung und die zeitliche Koordination der Fusionsfähigkeit der Eizelle mit dem Auftreten der CRISP-1-Bindungsstellen (*Cohen et al. 1996*) lassen auf die Bindung von CRISP-1 an einen Rezeptor schließen. Diese Ergebnisse zeigen auch, daß die Bindung der Spermien an die Eizelle unabhängig von der Fusion erfolgt. Es sind also mindestens zwei Ligand-Rezeptor-Systeme an der Bindung der Spermien an die Eizelle und der Fusion der beiden Zellen beteiligt.

Die These, daß die Wechselwirkung von CRISPs mit ihren Zielzellen über einen Rezeptor vermittelt wird, stützen mehrere experimentelle Daten. Erstens die spezifische Bindung CRISP-2 exprimierender Zelllinien an Sertoli-Zellen. Zweitens die konzentrationsabhängige Hemmung der Gametenfusion durch gereinigtes CRISP-1 und drittens die spezifische Blockierung von Ryanodin-Rezeptoren durch Helothermin, ein CRISP aus dem Gift einer mexikanischen Eidechsenart (*Heloderma horridum horridum*).

Wie könnten CRISPs die Fusion der Plasmamembranen von Spermium und Eizelle induzieren? CRISPs sind aufgrund ihrer Primärstruktur nicht geeignet, die Membranfusion nach dem Modell der viralen Fusionspeptide einzuleiten. Die Beteiligung von Fertilin, einem Transmembranprotein der Spermien mit Homologie zu viralen Fusionspeptiden, an der Interaktion zwischen Spermium und Eizelle wurde lange Zeit postuliert. Untersuchungen an Fertilin-defizienten Mäusen (*knock out*) haben jedoch kürzlich gezeigt, daß die Spermien dieser Mäuse nicht an das Oviduktepithel oder *in vitro* an die *zona pellucida* binden (*Cho et al. 1998*). Damit ist die Funktion von Fertilin als Fusionsprotein unwahrscheinlich geworden. Fertilin scheint dagegen eine Rolle bei der Interaktion mit dem Oviduktepithel spielen. Eine Doppelfunktion bei der Anheftung im Ovidukt und bei der Fusion kann aber durch die *knock-out* Experimente nicht ausgeschlossen werden. Neben Fertilin werden derzeit nur CRISPs in Zusammenhang mit der Gametenfusion diskutiert.

Sofern aber CRISPs die Membranfusion induzieren, müssen noch andere Proteine daran beteiligt sein. Es ist vorstellbar, daß CRISP-1 durch die Bindung an seinen Rezeptor einerseits Spermien- und Eizellmembran in räumliche Nähe bringt und andererseits die Aggregation von Rezeptoren an der Kontaktstelle auslöst. Dies könnte direkt oder durch Bindung weiterer Proteine an die Rezeptoren und die Membran eine Krümmung der Eizellmembran verursachen, die die für die Fusion benötigte Energie verringert. Der eigentliche Fusionsprozeß könnte dann analog zu exocytotischen Prozessen unter Bildung eines Fusionskomplexes aus mehreren Proteinen unter Energieverbrauch ablaufen.

Sofern CRISPs an der Interaktion von Spermium und Eizelle beteiligt sind, sollte das Fehlen dieser Proteine die Fertilität beeinträchtigen. Ein Projekt zur Untersuchung der Funktion von CRISP-1 anhand von *knock-out* Mäusen erwies sich aufgrund des komplizierten Aufbaus des *crisp-1*-Gens als extrem schwierig und wurde aufgegeben (*persönliche Mitteilung Prof. Dr. Engel, Göttingen*). Die Bedeutung der CRISPs für die

Fertilität ließ sich durch die Untersuchung der Menge spermiengebundener CRISPs beim Hengst zeigen.

Pferde werden im Gegensatz beispielsweise zu Rindern nicht nach der Fertilität sondern nach der Eignung für den Reitsport selektiert. Dadurch ergibt sich eine Heterogenität in bezug auf die Fertilität von Deckhengsten, die sich bei einer hinreichenden Anzahl besamter Stuten aus der erzielten Trächtigkeitsrate ableiten läßt. Wird die Menge an CRISPs, die nach dem Waschen auf den Spermien verbleibt, mit der Fertilität der Tiere in Beziehung gesetzt, zeigt sich in eindrucksvoller Weise, daß auf den Spermien der als subfertil eingestuft Tiere deutlich weniger CRISPs nachzuweisen sind als bei den fertilen Hengsten. In Extremfällen unterscheidet sich die Anzahl CRISPs pro Spermium bei verschiedenen Hengsten um den Faktor 10. Die Ursache für die Fertilitätsstörung kann sowohl durch eine zu geringe Menge CRISP verursacht werden als auch durch das vollständige Fehlen einer CRISP-Form. Experimentell können die einzelnen CRISPs aufgrund der Kreuzreaktivität des Antiserums nicht unterschieden werden. Diese Untersuchung stützt jedoch die Hypothese, daß CRISPs beim Befruchtungsvorgang eine essentielle Rolle spielen.

Die immunchemische Unterscheidung der CRISPs, die nach Hochsalz-Behandlung auf den equinen Spermien verbleiben, ist nicht möglich. Da bei der Ratte und kürzlich beim Menschen CRISP-1 auf den Spermien nachgewiesen wurde, wurden CRISPs aus dem Nebenhoden und Hochsalz-gewaschenen Spermien isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Die Isolierung und massenspektrometrische Analyse von equinen epididymalen und spermiengebundenen CRISPs zeigte keine Übereinstimmung der Massen. Das läßt darauf schließen, daß mehrere CRISPs auf den Spermien vorhanden sind. Die Masse eines der aus den Spermien isolierten Proteine ist jedoch mit der für CRISP-3 bestimmten Masse identisch. Die Präsenz von CRISP-3 in Extrakten Hochsalz-behandelter Spermien kann sowohl durch unvollständige Entfernung als auch durch Assoziation an die Spermien bedingt sein. Obwohl CRISP-3 *in vitro* mit Phospholipidmembranen interagieren kann, erscheint es wahrscheinlicher, daß auch durch ausgiebiges Waschen nicht das gesamte CRISP-3 entfernt wird.

Ein Vergleich der experimentell bestimmten Massen mit theoretischen Massen von CRISP-1 ergab jedoch sowohl bei den epididymalen als auch bei den spermiengebundenen CRISPs eine Übereinstimmung. Das aus den Spermien isolierte Protein wäre jedoch N-terminal um sieben Aminosäuren verlängert. Eine abweichende

Prozessierung einer Population von CRISP-1 könnte die Ursache sein. Unterschiedliche Prozessierung von CRISP-1 konnte auch für die DE-Proteine der Ratte gezeigt werden. Protein D und E sind identisch, Protein D ist jedoch etwa 2 kD kleiner als Protein E. Der Massenunterschied wird nicht, wie zunächst vermutet durch unterschiedliche Glykosylierung verursacht, sondern durch eine N-terminale Verkürzung von Protein D. Die beiden Proteine lassen sich durch einen gegen den N-Terminus von Protein E gerichteten monoklonalen Antikörper unterscheiden (Xu und Hamilton 1996, Xu und Hamilton 1997). Beide Proteine können auf Spermien der Ratte nachgewiesen werden. Auch beim Pferd könnte es sich bei dem isolierten Spermienprotein um CRISP-1 handeln, welches in zwei Varianten prozessiert wird. Die Identität der beiden Proteine sollte jedoch durch Analyse der durch Proteaseverdau entstehenden Peptide überprüft werden.

In bezug auf funktionelle Untersuchungen steht CRISP-1 im Mittelpunkt des Interesses. Die Rolle von CRISP-3 bei der Fortpflanzung wurde dagegen bislang als unbedeutend angesehen, da das Vorkommen großer Mengen CRISP-3 im Seminalplasma nur beim Pferd bekannt ist. Diese Tatsache gibt allerdings Anlaß zu der Vermutung, daß CRISP-3 zumindest beim Pferd eine Rolle spielt. Das Ejakulat wird beim Pferd in die Vagina direkt vor der Cervix abgegeben und gelangt zunächst in den Uterus. Der Uterus der Stute ist relativ groß und es ist gezeigt worden, daß equine Spermien nicht nur an das Oviduktepithel sondern auch an das Endometrium binden. Ein potentieller Bindungspartner für CRISP-3 ist also zunächst im Uterus zu vermuten. Untersuchungen an löslichen sekretorischen Proteinen des Uterus zeigen, daß CRISP-3 an ein 19kD-Protein, p19, der Lipocalinsuperfamilie bindet. Es wird angenommen, daß p19 eine Rolle bei der frühen Embryonalentwicklung spielt, seine Funktion ist jedoch nicht geklärt (Crossett *et al.* 1996, Crossett *et al.* 1998). Lipocaline sind kleine, sekretorische Proteine, die strukturell durch ein sogenanntes  $\beta$ -barrel aus acht antiparallelen Faltblättern gekennzeichnet sind, in dessen Inneren der meist kleine hydrophobe Ligand, beispielsweise Fettsäuren, Retinol oder Steroide, gebunden wird (Review Flower 1996).

Lipocaline werden allgemein als Transportproteine für ihre Liganden angesehen. Lipocaline binden an spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. für einige Lipocaline konnte gezeigt werden, daß sie in Rezeptor-gekoppelter Endocytose von der Zielzelle aufgenommen werden. In den letzten Jahren wird eine Rolle von Lipocalinen bei der Aktivierung Regulation von Zellfunktionen und Proliferation diskutiert. Ein Lipocalin des humanen Endometriums PP14 tritt analog zu p19 in den ersten Monaten der

Schwangerschaft auf. PP14 ist ein starker Immunsuppressor (Review Flower 1993). Eine vergleichbare Funktion könnte, eventuell im Komplex mit CRISP-3, auch p19 ausüben. Die Expression von CRISP-3 in der Speicheldrüse, dem Thymus, B-Zellen und Neutrophilen könnte auf eine Wirkung auf das Immunsystem schließen lassen. Es hat sich aber gezeigt, daß CRISP-3 alleine keinen Effekt auf Immunzellen hat (persönliche Mitteilung Dr. Schuberth, Institut für Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover). Damit kann allerdings eine Immunmodulation durch einen Komplex von CRISP-3 und einem weiteren Protein nicht ausgeschlossen werden. Ein möglicherweise kooperatives Wirken von CRISP-3 und p19 erfordert weitere Untersuchungen.

Die Bindung von CRISP-3 an p19 ist insofern besonders interessant als beide basische Proteine mit Isoelektrischen Punkten von 8,0 (CRISP-3) und 9,3 (p19) sind. Aufgrund des hohen  $pI$  von CRISP-3 wäre ein saurer Ligand als wahrscheinlicher erschienen. Die Bedeutung der Bindung von CRISP-3 an ein Lipocalin des Endometriums für die Befruchtung und/oder die Embryonalentwicklung muß in der Zukunft weiter untersucht werden.

Lipocaline wurden auch im Nebenhoden der europäischen Eidechse *Lacerta vivipara* (Morel et al. 1993) und im Nebenhoden der Ratte gefunden (Brooks et al. 1986b, Girotti et al. 1992). Bei der Ratte handelt es sich um die erstmals gemeinsam mit den Proteinen DE beschriebenen epididymalen Proteine B und C. Die Proteine B und C unterscheiden sich in ihrem scheinbaren Molekulargewicht und ihrem Isoelektrischen Punkt, Protein C ist saurer und größer als Protein B. Beide haben aber eine identische Aminosäuresequenz. Protein BC gehört zur Familie der  $\alpha_{2u}$ -Globuline und damit zur Superfamilie der Lipocaline. Es wird angenommen, daß Protein BC als Transportmolekül für Retinol fungiert (Brooks et al. 1986, Brooks 1987). Eine weitere Funktion in der Steuerung der Nebenhodenreifung und die Bindung an Makromoleküle des Nebenhodensekrets oder der Spermien ist aufgrund der Eigenschaften anderer Lipocaline denkbar. Lipocaline könnten demzufolge auch im Nebenhoden an CRISPs binden. Möglicherweise wird so die Assoziation der CRISPs an die Spermienmembran reguliert.

## **Ausblick**

Die Sequenzierung und Charakterisierung der equinen und porcinen CRISP-Familie bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen insbesondere der physiologischen

Funktion dieser Proteine. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß die Expression dieser Proteine speziesabhängig verschieden ist, was die Frage nach der Funktion der einzelnen Proteine noch interessanter macht. Darüberhinaus kann die Untersuchung der Genexpression in verschiedenen Organismen Einblicke in die Regulation dieser hormonabhängigen Gene geben.

Im Hinblick auf physiologische Studien bieten die in dieser Arbeit dargestellten Daten die Möglichkeit, die Funktion dieser Proteine an Modellorganismen zu studieren, deren Fortpflanzung aufgrund der kommerziellen Bedeutung sehr gut untersucht ist.

Die immunchemische Unterscheidung von CRISP-1, CRISP-2 und CRISP-3 auf Spermien und in Geweben könnte weiteren Aufschluß darüber geben, welche Rolle die einzelnen Proteine spielen. Mit der Charakterisierung der CRISPs aus Nutztieren eröffnet sich die Möglichkeit, die Mechanismen der Interaktion mit der Spermienmembran und den postulierten Rezeptoren sowohl immunchemisch als auch *anin vitro* Modellen zu untersuchen. Die immunchemische Unterscheidung der verschiedenen CRISPs erfordert den Einsatz monospezifischer, monoklonaler Antikörper. Die Kenntnis der Aminosäuresequenzen erlaubt die Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen nicht konservierte Peptide. Peptid-Antikörper haben allerdings den Nachteil, daß sie ihre Peptide oft nur denaturiert erkennen. Die Auswahl von zwischen zwei Cysteinen liegenden Peptiden scheint erfolgversprechend, da diese Bereiche wahrscheinlich zumindest teilweise exponierte Loops bilden.

Monoklonale Antikörper könnten sowohl die Isolierung und Charakterisierung der CRISPs als auch ihrer Rezeptoren erleichtern. Die Identifizierung der Rezeptoren wäre ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Funktion dieser Proteine. Durch die Charakterisierung der Bindung an den Rezeptor und der Art des Rezeptors ließe sich untersuchen, auf welche Weise CRISPs die Fusion von Spermium und Eizelle einleiten und welche anderen Proteine möglicherweise daran beteiligt sind. Die Aufklärung des Mechanismus der Gametenfusion könnte weitere Einsichten in die Kommunikation und Interaktion hochspezialisierter Zellen liefern und unter Umständen ein Modell für andere Fusionsprozesse darstellen.

Die Interaktion von equinem CRISP-3 mit einem Protein des Endometriums, welches möglicherweise eine Funktion bei der Embryonalentwicklung hat, führt die Rolle der CRISPs bei der Fortpflanzung über die Befruchtung der Eizelle hinaus. CRISP-3 wird darüberhinaus in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert, darunter

Immunzellen, Thymus, Pankreas und Colon. Die Funktion von CRISP-3 wurde in keinem Fall näher untersucht. Es ist anzunehmen, daß CRISP-3 im Gegensatz zu CRISP-1 und CRISP-2 entweder mehrere oder eine universelle Funktion erfüllt. Die Untersuchung der Interaktion mit p19 könnte Hinweise zur Klärung dieser Frage liefern.

P19 könnte sowohl als Transportprotein fungieren als auch in Analogie zu einem Lipocalin des humanen Endometriums immunsuppressiv wirken. Über eine Immunmodulation nach der Kopulation wurde bereits berichtet. Bislang wurde angenommen, daß Komponenten des Seminalplasmas als Immunsuppressiva wirken. Die Möglichkeit eines Zusammenwirkens von Seminalplasmaproteinen und Proteinen des Uterus öffnet neue Perspektiven zur Untersuchung der Immunmodulation im weiblichen Genitaltrakt. In diesem Zusammenhang ist die Expression von CRISP-3 in Neutrophilen und B-Vorläuferzellen erwähnenswert. Eine Funktion bei der Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems und der Regulation der Immunabwehr wäre denkbar und sollte in der Zukunft untersucht werden.

CRISPs sind Proteine mit einzigartigen strukturellen Eigenschaften und Funktionen. Die Untersuchung dieser Proteine, ihrer physiologischen Bedeutung und ihrer Wechselwirkungsmechanismen gibt Einblick in bisher weitgehend unbekannte Vorgänge und möglicherweise universelle Prinzipien.



## 5. Literaturverzeichnis

1. Acott T.S. und Hoskins D.D. (1978) Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 253, 6744-6750
2. Acott T.S. und Hoskins D.D. (1981) Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 24, 234-240
3. Acott T.S., Katz D.F., Hoskins D.D. (1983) Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29, 389-399
4. Adeoya-Osiguwa S.A. und Fraser L.R. (1993) A biphasic pattern of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *J. Reprod. Fert.* 99, 187-194
5. Aitken R.J. (1997) The cell biology of fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 291-299
6. Aitken R.J., Harkiss D., Knox W., Paterson M., Irvine D.S. (1998) A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J. Cell Sci.* 111, 645-656
7. Almeida E.A., Huovila A.P., Sutherland A.E., Stephens L.E., Calarco P.G., Shaw L.M., Mercurio A.M., Sonnenberg A., Primakoff P., Myles D.G. (1995) Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81, 1095-1104
8. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410
9. Arnoult C., Cardullo R.A., Lemos J.R., Florman H.M. (1996) Activation of mouse sperm T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13004-13009
10. Batalia, M.A., Monzingo, A.F., Ernst, S., Roberts, W., Robertus, J.D. (1996) The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like PR-5 protein family. *Nature struct. biol.* 3, 19-23
11. Blobel C.P., Wolfsberg T.G., Turck C.W., Myles D.G., Primakoff P., White J.M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356, 248-252

12. Brewis I. A., Clayton R., Browes C.E., Martin M., Baratt C.L., Hornby D.P., Moore H.D. (1998) Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 1136-1144
13. Brooks D.E. (1987a) Androgen-regulated epididymal secretory proteins associated with post-testicular sperm development. *Ann. NY Acad. Sci.* 513, 179-194
14. Brooks D.E. (1987b) the major androgen-regulated secretory proteins of the rat epididymis bear sequence homology with members of the  $\alpha_2\mu$ -globulin superfamily. *Biochem. Int.* 14, 235-240
15. Brooks D.E., Means A.R., Wright E.J., Singh S.P., Tiver K.K. (1986a) Molecular cloning of the cDNA for two major androgen-dependent secretory proteins of 18,5 kilodaltons synthesized by the rat epididymis. *J. Biol. Chem.* 261, 4956-4961
16. Brooks D.E., Means A.R., Wright E.J., Singh S.P., Tiver K.K. (1986b) Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur. J. Biochem.* 161, 13-18
17. Brooks D.E., Tiver K. (1983) Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 69, 651-657
18. Calvete J.J., Mann K., Sanz L., Raida M., Töpfer-Petersen E. (1996) The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett.* 399, 147-152
19. Calvete J.J., Nessau S., Mann K., Sanz L., Sieme H., Klug E., Töpfer-Petersen E. (1994) Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 411-426, 1994
20. Calvete J.J., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Töpfer-Petersen E. (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 407, 201-206
21. Calvete J.J., Varela P.F., Sanz L., Romero A., Mann K., Töpfer-Petersen, E. (1996) A procedure for the large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. *Protein. Expr. Purif.* 8, 48-56

22. Cameo M.S. und Blaquier J.A. (1976) Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocr.* 69, 47-55
23. Carrera A., Moos J., Ning X.P., Gerton G.L., Tesarik J., Kopf G.S., Moss S.B. (1996) Regulation of protein phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosin phosphorylation. *Dev. Biol.* 180, 284-296
24. Charest N.J., Joseph D.R., Wilson E.M., French F.S. (1988) Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence-homology with metalloproteins. *Mol.Endocrinol.* 2, 999-1004
25. Charest N.J., Petrusz P., Ordronneau P., Joseph D.R., Wilson E.M., French F.S. (1989) Developmental expression of an androgen-regulated epididymal protein. *Endocrinology* 125, 942-947
26. Cheng F.P., Fazeli A., Voorhout W.F., Marks A., Bevers M.M., Colenbrander B. (1996) Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Androl.* 17, 674-682
27. Cho C., O'Dell Bunch D., Faure J.-E., Goulding E.H., Eddy E.M., Primakoff P., Myles D.G. (1998) Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin $\beta$ . *Science* 281, 1857-1859
28. Cohen D.J., Munuce M.J., Cuasnicú P.S. (1996) mammalian sperm-egg fusion: the development of rat oolemma fusibility during oogenesis involves the appearance of binding sites for sperm protein "DE". *Biol. Reprod.* 55, 200-206
29. Cooper T.G. (1996) Epididymis and sperm function. *Andrologia* 28, Supp. 1, 57-59
30. Cossio G., Sanchez J.C., Golaz O., Wettstein R., Hochstrasser D.F. (1995) Spermatocytes and round spermatids of rat testis: protein patterns. *Electrophoresis* 16, 1225-1230
31. Cross N.L. (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59, 7-11
32. Cross N.L. und Razy-Faulkner P. (1997) Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* 56, 1169-1174

33. Crossett B., Allen W.R., Stewart F. (1996) A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem. J.* 320, 137-143
34. Crossett B., Suire S., Herrler A., Allen, W.R., Stewart F. (1998) Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biol. Reprod.* 59, 483-490
35. Cuasnicú P.S., Echeverria F.G., Piazza A.D., Cameo M.S., Blaquier J.A. (1984) Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J. Reprod. Fertil.* 72, 467-471
36. DasGupta S., Mills C.L., Fraser L.R. (1994) A possible role for Ca<sup>2+</sup>-ATPase in human sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 102, 107-116
37. Dobrinski I., Smith T.T., Suarez S.S., Ball B.A. (1997) Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 56, 861-869
38. Eberspaecher, U., Roosterman, D., Krätzschar, J., Haendler, B., Habenicht, U.-F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W.-D., Donner, P. (1995) Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization and expression in recombinant form. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 157-172
39. Eddy E.M. The spermatozoon. in: Knobil E. and Neill J. 2. Auflage (1994) *The physiology of reproduction.* Raven Press, Ltd., New York
40. Einspanier R., Einspanier A., Wempe F., Scheit K.H. (1991) Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 1006-10
41. Ellerman D.A., Brantúa V.S., Pérez Martínez S., Cohen D.J., Conesa D., Cuasnicú P.S. (1998) Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol. Reprod.* 59, 1029-1036
42. Ellington J.E., Ball B.A., Blue B.J., Wilker C.E. (1993) Capacitation-like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1505-1510

43. Ennslin M., Vogel T., Calvete J.J. Thole H.H., Schmidke J., Matsuda T., Töpfer-Petersen E. (1998) Molecular cloning and characterization of p47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol. Reprod.* 58, 1057-1064
44. Esch F.S., Ling N.C., Böhlen P., Ying S.Y., Guillemin R. (1983) Primary structure of PDC 109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 861-867
45. Evans J.P. und Kopf G.S. (1998) Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* 30, 297-307
46. Evans J.P., Schultz R.M., Kopf G.S. (1998) Roles of disintegrin domains of mouse fertilins  $\alpha$  and  $\beta$  in fertilization. *Biol. Reprod.* 59, 145-152
47. Fénichel P., Gharib A., Emiliozzi C., Donzeau M., Ménézo Y. (1996) Stimulation of human sperm during capacitation in vitro by an adenosine agonist with specificity for A2 receptors. *Biol. Reprod.* 54, 1405-1411
48. Florman H.M., Arnoult C., Kazam I.G., Li C., O'Toole C.M.B. (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59, 12-16
49. Flower D.R. (1994) The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett.* 354, 7-11
50. Flower D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318, 1-14
51. Foltz K.R. (1995) Sperm-binding proteins. *Int. Review Cytol.* 163, 249-303
52. Foster J.A. und Gerton G.L. (1996) Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 221-229
53. Fourie M.H., Du Toit D., Bornman M.S., Viljoen E. (1996) Changes in WGA-lectin binding sites on sperm during epididymal transit in the Chacma baboon (*Papio ursinus*) and the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Arch. Androl.* 36,89-100
54. Fournier-Delpech S., Courot M., Dubois M.P.(1985) Decreased fertility and motility of spermatozoa from rats immunized with a prealbumin epididymal-specific glycoprotein. *J. Androl.* 6, 246-250, 1985

55. Franca L.R., Ogawa T., Avarbock M.R., Brinster R.L., Russell L.D. (1998) Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59, 1371-1377
56. Fraser L.R. (1995) Ionic control of sperm function. *Reprod. Fert. Dev.* 7, 905-925
57. Fraser L.R. (1998) Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 193-202
58. Fraser L.R. und McDermott C.A. (1992)  $Ca^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Reprod. Fert.* 96, 363-377
59. Frohmann M.A., Dush M.K., and Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8998-9002
60. Galantino-Homer H.L., Visconti P.E., Kopf G.S. (1997) regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56, 707-719
61. 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, 3415-3421
62. Gong X., Dubois D.H., Miller D.J., Shur B.D. (1995) Activation of a G protein complex by aggregation of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269, 1718-1721
63. Haendler B., Krätzschar J., Theurig F., Schleuning W.D. (1993) Transcripts for Cystein-Rich Secretory Protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* 133, 192-198
64. Hardy D.M. und Garbers D.L. (1995) A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 270, 26025-26028
65. Hardy D.M., Huang T.T.F., Driscoll W.J., Tung K.S.K. Wild G.C. (1988) Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 38, 423-437

66. Hayashi M., Fujimoto S., Takano H., Ushiki T., Abe K., Ishikura H., Yoshida M.C., Kirchhoff C., Ishibashi T., Kasahara M. (1996) Characterization of a human glycoprotein with a potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEGL1). *Genomics* 32, 367-374,
67. Hinton, B.T., Palladino, M.A.: Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 30, 67-81, 1995
68. Johnston D.S., Wright W.W., Shaper J.H., Hokke C.H., Van den Eijnden D.H., Joziassse D.H. (1998) Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. *J. Biol. Chem.* 273, 1888-1895
69. Jones R. und Williams R.M. (1990) Identification of zona- and fucoidan-binding proteins in guinea-pig spermatozoa and mechanism of recognition. *Development* 109, 41-50
70. Kasahara M., Gutknecht J., Brew K., Spurr N., Goodfellow P.N. (1989) Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5, 527-534
71. Kasahara M., Hayashi M., Yoshida M.C., Nadeau J.H., Fujimoto S., Ishibashi T. (1995) Mapping of acidic epididymal glycoprotein (Aeg) genes to mouse chromosome 17. *Mamm. Genome* 6, 52-54
72. Kirchhoff C., Pera I., Derr P., Yeung C.H., Cooper T. (1997) The molecular biology of the sperm surface: Post-testicular membrane remodelling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 221-232
73. Kjeldsen L., Cowland J.B., Johnsen A.H., Borregaard N. (1996) SGP 28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and to a rodent sperm-coating glycoprotein. *FEBS Lett.* 380, 246-250
74. Krätzschar J., Haendler B., Eberspaecher U., Roosterman D., Donner P., Schleuning W.-D. (1996) The human cyteine-rich secretory protein (CRISP) family: Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur. J. Biochem.* 236, 827-836

75. Kudo K., Yonezawa N., Katsumata T., Aoki H., Nakano M. (1998) Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 252, 492-499
76. Laemmli UK (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 680-685
77. Lea O.A., Petrusz P., French F.S.(1978) Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): a sperm coating protein secreted by the rat epididymis. *Int. J. Androl. Suppl.* 2, 592-605
78. Lee J. K. und Lentz B.R. (1998) Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9274-9279
79. Lefebvre R., Lo M.C., Suarez S.S. (1997) Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol. Reprod.* 56, 1198-1204
80. Linder B., Bammer S., Heinlein U.A. (1995) Delayed translation and posttranslational processing of cyritestin, an integral transmembrane protein of the mouse acrosome. *Exp. Cell Res.* 221, 66-72
81. Loeser C.R. und Tulsiani D.R. (1999) The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 60, 94-101
82. Maeda T., Sakashika M., Ohba Y., Nakanishi Y. (1998) Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and sertoli cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 248, 140-146
83. Majunder G.C., Dey C.S., Hldar S., Barua M. (1990) Biochemical parameters of initiation and regulation of sperm motility. *Arch. Androl.* 24, 287-303
84. Martin I., Epand R.M., Ruyschaert J.-M. (1998) Structural properties of the putative fusion peptide of fertilin, a protein active in sperm-egg-fusion, upon interaction with the lipid bilayer. *Biochemistry* 37, 17030-17039
85. Martinez S.P., Conesa D., Cuasnicù P.S.. Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J. Reprod. Immunol.* 29, 31-45, 1995



86. Medeiros C.M.O. und Parrish J.J. (1996) Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 525-532
87. Mei X., Singh I.S., Erlichman J., Orr G.A. (1997) Cloning and characterization of a testis-specific, developmentally regulated A-kinase-anchoring protein (TAKAP-80) present on the fibrous sheath of rat sperm. *Eur. J. Biochem.* 246, 425-432
88. Miller D.J., Gong X., Decker G., Shur B.D. (1993) Egg corticle granule N-acetylglucosaminidase id required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.* 123, 1431-1440
89. Mizuki N., Kasahara M. (1992a) Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89, 25-32
90. Mizuki N., Sarapata D.E., Garcia-Sanz J.A., Kasahara M. (1992b) The mouse male germ cell-specific gene Tpx-1: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm. Genome* 3, 274-280
91. Mochca-Morales J., Martin B.M., and Possani L.D. (1990) Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Helederma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. *Toxicon* 28, 299-309
92. Moller C.C. und Wassarman P. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mopuse eggs. *Dev. Biol.* 132, 103-112
93. Moos J., Peknicova J., Geussova G., Philimonenko V., Hozak P. (1998) Association of protein kinase A type I with detergent-resistant structures of mammalian sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 50, 79-85
94. Morel L., Dufaure J.-P., Depeiges A. (1993) LESP, an androgen-regulated lizard epididymal secretory protein family idetified as a new member of the lipocalin superfamily. *J. Biol. Chem.* 268, 10274-19281
95. Morrisette J., Krätzschar J., Haendler B., El-Hayek R., Mochca-Morales J., Martin B.M., Patel J.R., Moss R.L., Schleuning W.-D., Coronado R., Possan L.D. (1995) Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. *Biophys. J.* 68, 1995

96. Myles D. (1998) Functions of ADAMs and mechanism of sperm egg-fusion. 8<sup>th</sup> International Symposium on Spermatology, Montreal, Canada
97. Myles D.G. (1993) Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev. Biol.* 158, 35-45
98. Naz R. K. (1996) Protein tyrosine phosphorylation and signal transduction during capacitation-acrosome reaction and zona pellucida binding in human sperm. *Arch. Androl.* 37, 47-55
99. Parrington J., Swann K., Shevchenko V.I., Sesay A.K., Lai F.A. (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364-368
100. Pearson W.R., Lipman D.J.(1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2444-2448
101. Perez Martinez S., Conesa D., Cuasnicú P.S. (1995) Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J. Reprod. Immunol.* 29, 31-45
102. Pfisterer P., König H., Hess J., Lipowsky G., Haendler B., Schleuning W.-D., Wirth T. CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells under the control of Oct2. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6160-6168, 1996
103. Pratt J.C.und Gaulton G.N. (1993) Multifunctional roles of glycosylphosphatidylinositol lipids. *DNA Cell Biol.* 12, 861-869
104. Rankin T.L., Tsuruta K.J., Holland M.K., Griswold M.D. (1992) Isolation, immunolocalization, and sperm-association of three proteins of 18, 25, and 29 kilodaltons secreted by the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 46, 747-766
105. Ridgen J., and Coutts R. (1988) Pathogenesis-related proteins in plants. *Trends Genet.* 4, 87-89
106. Rochwerger L., Cohen D.J., Cuasnicú P.S. (1992) Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev. Biol.* 153, 83-90
107. Rochwerger L., Cuasnicú P.S. (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 34-41

108. Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467
109. Scheidt K.H., Kemme M., Aumüller G., Seitz J., Hagendorff G., Zimmer M. (1988) The major protein of bull seminal plasma: Biosynthesis and biological function. *Biosci. Reports* 8, 589-608
110. Schroter S., Kirchhoff C., Yeung C.H., Cooper T., Meyer B. (1997) Purification and structural analysis of sperm CD52, a GPI-anchored membrane protein. *Adv Exp Med Biol*, 424:233-4
111. Seidah N.G., Manjunath P., Rochemont J., Sairam M.R., Chrétien M. (1987) Complete amino acid sequence of BSP-A<sub>3</sub> from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 243, 195-203
112. Shur B.D. (1998) Is sperm galactosyltransferase a signalling subunit of a multimeric gamete receptor? *Biochem. Biophys. Res. Com.* 250, 537-543
113. Sivaprasadarao A., Boudjelal M., Findlay J.B.C. (1993) Lipocalin structure and function. *Bioch. Soc. Trans.* 21, 619-622
114. Spungin B. und Breitbart H. (1996) Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J. Cell Sci.* 109, 1947-1955
115. Srivastava A. und Olson G.E. (1991) Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 357-364
116. Suarez S.S. (1998) The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol. Reprod.* 58, 1105-1107
117. Suarez S.S., Revah I., Lo M., Kolle S. (1998) Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol. Reprod.* 59(1), 39-44
118. Sullivan R. (1998) Interaction between sperm and epididymal secretory proteins. <sup>8</sup> International Symposium on Spermatology, Montreal, Canada
119. Tanphaichitr N., Moase C., Taylor T., Surewicz K., Hansen C., Namking M., Berube B., Kamolvarin N., Lingwood C.A., Sulliva R., Rattanachaiyanont M., White D. (1998) isolation of antiSLIP1-reactive boar sperm p68/62 and its binding to mammalian zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 203-216

120. Taylor J.A., Walsh K.A., and Johnson R.S. (1996) Sherpa: a Macintosh-based expert system for the interpretation of electrospray ionization LC/MS and MS/MS data from protein digests. *Rapid Comm. Mass Spectr.* 10, 679-687
121. Thaler C.D. und Cardullo R.A. (1996) Defining oligosaccharide specificity for initial sperm-zona pellucida adhesion in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 535-546
122. Thomas P.G.A., Ball B.A., Ignatz G.G., Dobrinski I., Parks J.E., Currie W.B. (1997) Antibody directed against plasma membrane components of equine spermatozoa inhibits adhesion of spermatozoa to oviduct epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.* 56, 720-730
123. Töpfer-Petersen E. und Calvete J.J. (1995a) Molecular mechanism of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. *Int. J. Androl.* 18, Suppl. 2, 20-26
124. Töpfer-Petersen E., Calvete J.J., Sanz L., Sinowatz F. (1995b) Carbohydrate- and heparin-binding proteins in mammalian fertilization. *Andrologia* 27, 303-324
125. Töpfer-Petersen E., Dostalova Z., Calvete J.J. (1997) The role of carbohydrates in sperm-egg interaction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 301-310
126. Töpfer-Petersen E., Romero A., Varela P.F., Ekhlesi-Hundrieser M., Dostalova Z., Sanz L., Calvete J.J. (1998) Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30, 217-224
127. Varner D.D., Bowen J.A., Johnson L. (1992) Capacitation and acrosome reaction of equine spermatozoa by heparin. *Mol. Androl.* 5, 81-100
128. Varner D.D., Ward C.R., Storey B.T., Kenney R.M. (1987) Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1383-1389
129. Visconti P.E. und Kopf G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59, 1-6
130. Visconti P.E., Galantino-Homer H., Moore G.D., Bailey J.L., Ning X., Fornes M., Kopf G.S. (1998) The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19, 242-8
131. Visconti P.E., Johnson L.R., Oyaski M., Fornés M., Moss S.B., Gerton G.L., Kopf G.S. (1997) Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 192, 351-361

132. Vreeburg J.T.M., Holland M.K., Orgebin-Christ M.-C. (1992) Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo. *Biol.Reprod.* 47, 588-597
133. Wassarman P.M. (1992) Mouse gamet adhesion molecules. *Biol. Reprod.* 46, 186-191
134. Wassarman P.M. (1995) Mammalian fertilization: egg and sperm (glyco)proteins that support gamete adhesion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33, 253-258
135. Wassarman P.M. (1995) Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 658-564
136. Wassarman P.M. The mammalian ovum. in: Knobil E. and Neill J. 2. Auflage (1994) *The physiology of reproduction.* Raven Press, Ltd., New York
137. Wassarman P.M. und Litscher E.S. (1995) Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30, 1-19
138. Wassarman P.M., Liu C., Litscher E.S. (1996) Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J. Cell Sci.* 109, 2001-2004
139. Weis W.I. und Drickamer K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 441-473
140. Wempe F., Einspanier R., Scheit K.H. (1992) Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 232-237
141. Wickens M. (1990) How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 15, 277-281
142. Wickens M., and Stephenson P. (1984) Role of the conserved AUAAA sequence: four AUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science* 226, 1045-1051
143. Xu W., Ensrud K.M., Hamilton D.W.. The 26kD protein recognized on rat cauda epididymal sperm by monoclonal antibody 4E9 has internal peptide sequence that is identical to the secreted form of epididymal protein E. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 377-382, 1997
144. Xu W., Hamilton D.W. (1996) Identification of the rat epididymis-secreted 4E9 antigen as Protein E. further biochemical characterization of the highly homologous epididymal secretory proteins D and E. *Mol. Reprod. Dev.* 43. 347-357

145. Yanagamachi R. Mammalian Fertilization. in: Knobil E. und Neill J. 2. Auflage (1994) The physiology of reproduction. Raven Press, Ltd., New York
146. Yurewicz E.C., Sacco A.G., Gupta S.K., Xu N., Gage D.A. (1998) Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. J. Biol. Chem. 273, 7488-7494
147. Zarintash R.J. und Cross N.L. (1996) Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. Biol. Reprod. 55, 19-24

## 6. Anhang

### A-equis caballus CRISP-3 mRNA

```
GAGACCTTTC TTCTTCCTAC AAGTAAAGCA GATGCTTCAC CTTGCTCTGA      50
GAACCAACAT GGCATTATTA CCAGTGTGTC TGTTTCTGGC TGCCGTGTTG      100
CTTCCATTCT TTCCTGCAAG TGGACAGGAT CCAGGTTTTG CTGCTTTGTC      150
AATCACCAAA AGCGAAGTCC AAAAAGAGAT TGTAATAAAA CACAATGACC      200
TAAGGAGAAC AGTCTCTCCA CTTGCCAGTA ACATGCTAAA GATGCAATGG      250
GACAGCAAGA CAGCAACAAA TGCCCAAAAC TGGGCCAACA AGTGCCTTCT      300
CCAACACAGT AAAGCAGAAG ATCGCGCAGT CGGTACAATG AAATGTGGTG      350
AGAATCTCTT TATGTCGAGT ATACCTAATT CCTGGTCAGA TGCAATCCAA      400
AATTGGCATG ATGAGGTCCA TGATTTTAAA TACGGCGTGG GCCCAAAGAC      450
TCCCAATGCA GTAGTTGGAC ATTATACCCA GGTTGTTTGG TACTCATCTT      500
ACCGTGTTGG ATGTGGAATA GCCTATTGTC CCAAACAAGG AACTCTAAAA      550
TACTACTATG TTTGCCAATA TTGTCCTGCT GGTAATTATG TGAATAAAAT      600
AAATACTCCT TATGAACAAG GAACACCTTG TGCCCGTTGC CCTGGTAACT      650
GTGACAATGG ACTATGCACC AATAGCTGCG AGTATGAAGA TCTCGTTAGT      700
AACTGTGATT CCTTGAAGAA AATAGCTGGC TGTGAACATG AATTGCTCAA      750
GGAAAAC TGC AAGACTACTT GTCAATGTGA AAACAAAATT TACTGAAGTT      800
CCAGTGTGCA TTGCGCAATA CAAAGTGGAG AAGGGCTGCA TCCTTTTGT      850
GACACATACC AGAGGGAAAT TATAGGCATG CTAGTTGCAA AGCTGATTCC      900
AAACCGTAAT GCATCTTTTC TCTTGATCTT TACAGAAATC TCTTCCACAC      950
AATGATTTAC AAAGCAGAGT AGTCTGTGAT GACAACTTTG GCTTTGATAT     1000
AAATTTGGTA CTTTAAATGT AATAAATTGA ATCAATTGGA GATTTTGAAA     1050
GTTGTATAAC CATAAGACTT AGGTCCCTAG AACTTTGGAT TAAAACGAAG     1100
AATTACATGT TTCTGAAACA ACATGCCCCC CCAAATTTTA CAGACTAACA     1150
AATCATTGTT ATTCCTAATA CATGATTTTT TACCTGTATA AAGAATGAAT     1200
TCAAAGATTG CAATGTACCT TTCTCTTATG GCCTCCTCTT TAAACAAAAG     1250
TAATCAGTAA GAATAAAGAA CTTACCTAAG CAAAAAAAAA AAAAA          1295
```

EMBL AJ001400

## B-equs caballu CRISP-1 mRNA

GTAGAGAAAT TTTCTGTAG GGGCTGTTCG AAGGCATTAG CACACTATCT 50  
AGCCAAAGAT CTGGGTCTCA TCGGGACACT GAACTTTACA AATTGTGTGA 100  
ACTTGGAGAT GACAATGAAA CACTTCTTGT TTTTGGCTGC TGCTGCTGCT 150  
GGCTTCCTGC CTGTTGTGAT CATAAGAGCT AAACCAGCTA GCGTTCATA 200  
TCATACGCTT CTCACTGAGT TGGCAACTGT CCAAGAAGAA ATTGTTACTG 250  
TACATAATAC TCTCAGAAGA GGAGTAGTTC CGCCAGCCAG CAACATGCTG 300  
AAGATGAATT GGAGTGAAGA AGCTGCACAA AACGCCAGAA GGTGTCCGC 350  
GCAGTGTGAA TTGATAGAGA GCAAGGCAGT TGAGAGGAGA ATTACAAATA 400  
CCTTTTGTGG AGAAAATATG CATCTGACAT CTTATCCTAT CTCATGGTCA 450  
AATGTAATTG GAATCTGGTT CAGTGAGTCT AAATATTTCA AGTATGGGCA 500  
ATGGATATCA ACAGATGATG AAGTAATAAT TGAGCATTAT ACTCAGCTTG 550  
TTTGGGCCAC TTCTTACCTC ATTGGCTGTG GGATATCATC ATGCTCCAAA 600  
AGAAGGTCAA CTCAGTATCT CTACGTTTGT CACTACTGTC ATGAGGGAAA 650  
TGATCCCGAC AAAAAGAACG TGCCTTATAA TATGGGAACT CCGTGTAAAG 700  
ACTGTCCAAA TGACTGTGAA GATAGACTTT GTACTAACCC CTGCCTCTAC 750  
TATGATGAAT CCAATAAGTG TAAGACACAA AAAGAAGCTC TTGGATGTAG 800  
CCTTGTGCA GTTAAACTGT TCTGCAAAGC TACTTGTCTG TGTGACACTG 850  
AGATAAAATA ACCTTTGTTA TTAGCAACTG TAATGTGATG TTGGGGAAAC 900  
GTCTACTAGA TTATATCTTT TACTTTACTT GCTTCAGTAG ATTATGATGA 950  
ATTTCTTTTG GTTTTAATTG CACTCAAAT CCTAATTTTC ACTAATCATC 1000  
TATGGGCATT CAGATATTTA CATCAATGCC CCCAACTTCT GTCCTGATAC 1050  
ATCCTCATGT AAAGTCTTAA ACTTTCTTCC TGCTGGAGTG AAAGATCCAT 1100  
TTCAACACCT TTCTCATCTT TAAATGATGT GCCTTGTCGT GCATAAGTTG 1150  
TCATAACTCA ACTGATGGTA TGACGGGGCC CCTCAAGAAC CACCTGTGCT 1200  
GGGGGAGGGT CTTCCATGTT TAACTCCTCC CTCTGCTCTC CTGTGTCTCC 1250  
AGCCACCCTG ATATTTGTCT TCCCTGCCAC AACTTACATG CACTAGCAAT 1300  
TCTTCACTTC TTAACCTTGC TTCTATTTTA GATCAATCAT AAAATAATCC 1350  
ACAAAGCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1379

EMBL AJ006631



## C-equis caballus CRISP-2 mRNA

GTAGGAGGGG AGAGTAGCCG TTAGTCCTCT GCTCCGGCCC GCAGCAGGAA 50  
GATTTGCAGC TGAGCCAGGT ATGAAACCAT ACACCATCCT CTTCTGTAG 100  
ATGCCCTGGA GACCCATGTT ATCCTGGCCT TAAAACACCT GTAAGAAAGG 150  
GCACTTTTCC ATTACTGAAG CAGATTCTTC ATCCTGCTCT GAGAACCAAC 200  
ACAATGGCTT TCCTCCCAGT GGTGATGTTT TTGGCTGCTG TGCTACTTCC 250  
ATCTTTACCC ACAGAAGGAA AGGATCCAGC TTTTTCTGCT TTGTTAACCA 300  
CTCAAACCCA AGTCCAAAGA GAGATTGTAA ATAAACACAA TGAACTAAGG 350  
AAATCAAGTT CTCCACCTGC CAGCAACATG CTAAAGATGG AATGGAGCAG 400  
AGAAGCAACA GCAAATGCAA AAAGATGGGC AAACAAGTGC ACTTTAGAAC 450  
ACAGTAGTGC AGATGACCGG AAAACCAGTA CGAGATGTGG TGAGAATATC 500  
TATATGTCAA GCGACCCTAC TCCCTGGTCA GATGCAATCC AAAGCTGGTA 550  
TGATGAGAGC CTTGACTTTA CCTATGGTGT AGGACCAAAG AGTGCCGGTT 600  
CAGTAGTTGG ACATTACACT CAGGCTGTTT GGTACTCATC TTTCCGTGTT 650  
GGATGTGGAA TTGCCTACTG TCCAATCAA GAAAGCCTAA AATACTACTA 700  
TGTTTGCCAA TATTGTCCTG TTGGTAATAA TGTGAATAAA AAGAACACCC 750  
CTTACCAGCA AGGAACACCT TGTGCCAGTT GCCCTGGTAA CTGTGACAAT 800  
GGACTATGCA CCAATAGCTG CGAGTATGAA GATCTCCTTA GTAACGTGTA 850  
TTCCTTGAAG AAAACAGCTG GCTGTGAACA TGAATTGCTC AAGGAAAAGT 900  
GCAAGGCTAC TTGTCGATGT GAAAGCAAAA TTTACTGAAG TTCCATGTGC 950  
TTGCGCGGCC TAGAACTTTG GATTAAAATG AACAATTACG TGTTTCCTGA 1000  
AACAACATGC AACAAAAACC AAAAACACTG TAATATCAAT GTCATTCCTA 1050  
CTGCATGATT TTTAACATGT ATAAAGAATG AATTCAAAGA TTGACATCTA 1100  
CCTTTGTCTC ATGGCCTCAT CTTTCAACAA AAGTTATAAG TAAGAATAAA 1150  
GAACTTACTA CCTGAGCAAC CACAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 1195

EMBL AJ006632

## D-sus scrofa CRISP-1 mRNA

```
CATAACACTT TCAGGAGAGG AGTATCTCCA CCGGCCAGCA ACAGTCTGAA      50
AATGAACGGT AGCGAAGAAG CTGCACAAAA TGCCAGAATG TTGCTAAAGG      100
ATTGTGAATT GCTAGAGAGC AATGCGCTTA AGAGGAGAAT TACAAATACT      150
TTTTGTGGAG AAAATAGGTA TTTGACAACT GATCCAGTCT CATGGTCAAA      200
TGTCATCAGA ATCTGGTACA GTGAGTCCAA ATATTTCAAG TATGGGGAAT      250
GGACGTTAAC AGACGATGAT GTGACAGTTG AGCATTACAC TCAGATTGTT      300
TGGGCTACTT CTTACCTCAT TGGCTGTGGC CTATCGTCAT GTGGTAAAGG      350
AAAGTCAGCT CATTATCTCT ACATCTGTCA CTATTGTCAT GAGGGAAATG      400
ATCCTAACAA AAAGAATGAA CCTTATCGTA GGGGAACTCC ATGTGGAGAC      450
TGCCCAGACT ACTGTGAAGA TAAACTTTGT ACGAACCCCT GCCTCTACTA      500
TGATGAGTAC AGCAACTGTA AGGCACAAAC ACGAGGTCCT GGATGCAGCC      550
ACGTGTCAGT CCAACAGCTC TGCAAAGCTA GCTGTCTGTG TCACACCGAA      600
ATAAAATAGA TCCAAC TGAA GAATGGATTC AGTAACCTGG GCTGCAAGAC      650
AGTCTTCCTC TGCTTTCTCT GCTTTTCCAG GCCTCCTACT GCCCTGACGG      700
TTGCCTTCGC CACACAATTT ACATGCACAA ATAATTCTGC ATTTCTTTAT      750
TTCGATCTGA AACCAACCAA TAAAATATCC ACCAAGCAAA AAAAAAAAAA      800
```

EMBL AJ006633

## E-sus scrofa CRISP-2 mRNA

```
GTGGTACACT CACTTGGAGG AGGGAGGAAG AGCAGCGGTC TCTGGCTCCT      50
GCTCTCCAGC AGGAAAATCT GGGCTCTGGA GTTAGGACTA TGAAACCATA      100
AACCAGGCTT TTCCTGTACC CCTCCACCCC AGGAAGAACC ATGACATCCT      150
GGTCTTAAAA CACCTGCAAA AAAGGGACAC TGTGCTTTTC CATTAAAACA      200
ACGCAGTTAC TTCATCCAGC TTTGAAAACC AACACAATGG CTTTACTCCC      250
AATGGTGCTG TTTCTGGCTG CTGTGCTGCT ACCATCTTTT CCCACTGAAG      300
GAAAGGATCC ATGTTTTACT GCCCTGTAA CCTCTCAACC ACAAATCCAA      350
AAAGAGATTG TAGCTAAACA CAATGAACTA AGGAGATCAG TCTCTCCACC      400
TGCCAGCAAC ATGCTAAAGA TGGAATGGAG CAGAGAAACA TCAGCGAATG      450
CTCAGAAGTG GGCAAACAAA TGCACTTTAG AACACAGTAA TCCAGATGAC      500
CGAAAAACTA GTACAAAATG TGGTGAGAAT CTCTACATGT CCAGTGACCC      550
TGCTGCCTGG TCAGATGCAA TCCAAAGCTG GTTTGACGAG CGCCACGATT      600
TTGTCTACGG TGCAGGGCCG AAGAGTTCCA GTGCGGTTGT TGGGCATTAT      650
ACCCAGCTTG TTTGGTACTC ATCTTACCGC GTTGGATGTG GAATCGCCTA      700
TTGTCCCAAT CAAGAGAACC TAAAATACTA CTATGTTTGC CAATACTGTC      750
CTGCTCCTAA TAATGTGAGT AAAAAGAATA CCCCTTACAA AGAAGGAACA      800
CCTTGTGCCA GTTGCCCTGG TGACTIONGAC GATGGACTAT GCACCAATAC      850
TTGCCAGTAT GAAGATCTCC TTAGTAACTG TGATTCCTTG AAGAAAACAG      900
CCGGCTGTGG ACATGAACTG CTTAAGGAAA AGTGCAAGGC TACTTGCTTA     1000
TGTGAAGGCA AAATCTACTG A                                     1021
```

EMBL AJ006634

## **F-Primersequenzen**

### ***Standard-Primer***

RACE 1	GAATTCAACGTTCCCGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
RACE 2	GACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG
ssp CRISP	GTGGTTGGACATTATACACAGGTTGTTTGG
Actin 1	ACCCACACTGTGCCCATCTAC
Actin 2	CTTCATGGTGCTAGGAGCCAG
GAPDH 1	GGCGTCTTCACCACCATGGAG
GAPDH 2	GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG

### ***equines CRISP-1***

eC1-1	ATGACAGTAGTGACAA
eC1-2	ACAGTAGTGACAAACGTA
eC1-3	GGAGCATGATGATATCCC
eC1-4	GAGTTGACCTTCTTTTGGAGC
eC1-5	CCATGAGATAGGATAAGA
eC1-6	CTCTTGGATGTAGCCACTTGT
eC1-7	TTATGCACGACAAGGCTCATC
eC1-8	GCAATGGATATCAACAGATGATGAAGT
eC1-9	GCAGAACAGTTTAACTGACAAGTGGC

### ***equines CRISP-2***

eC2-1	TTGGCAAACATAGTAGTA
eC2-2	ACATCCAACACGGAAAGATGAGTACCA
eC2-3	ATGGCTTTCCTCCCAGTG
eC2-4	CATATAGATATTCTCACCACA
eC2-5	GCTGCGAGTATGAAGATC
eC2-6	ATCATGCAGTAGGAATGAC

***equines CRISP-3***

eC3-2      ATTACCTGCAGGA  
eC3-3      TTGGCAAACATAGTAGTA  
eC3-4      GCTGCTAGTATGAAG  
eC3-5      AGAGGAGGCCATAAG  
eC3-6      TCAGTAAATTTTGTTCACATTGAC  
eC3-7      CAGGATCCAGGTTTTGCTGCT

***porcines CRISP-1***

sC1-1      GACAATAGTGACAGATGTAG  
sC1-2      CTTTCCTTTACCACATGACGA  
sC1-3      TGTGGAGACTGCCCAGACTACTGT  
sC1-4      GCCAGCAACAGTCTGAA  
sC1-5      GACAATAGTGACAGATGTAGAG  
sC1-6      TGTGCAGCTTCTTCGCTACC

***porcines CRISP-2***

eC2-1      TTGGCAAACATAGTAGTA  
eC2-2      ACATCCAACACGGAAAGATGAGTACCA  
sC2-3      GAAACATCAGCGAATGCTCA  
sC2-4      GACAGTATTGGCAAACATAGTA  
sC2-5      ATGGCTTTACTCCCAATGGTGCTG  
sC2-6      CTACTATGTTTTGCCAATACTGTCC

Teile der Ergebnisse wurden aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht:

Magdaleno L., Gasset M., Varea J., Schambony A., Urbanke C., Raida M., Töpfer-Petersen E., and Calvete J.J. (1997) Biochemical and conformational characterization of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. FEBS Lett. 420, 179-185

Schambony A., Hess O., Calvete J.J., Neumann U., and Töpfer-Petersen E. (1997) Horse seminal plasma protein 3: Isolation, biochemical characterization, immunohistological localization and sperm coating characteristics. Reprod. Dom. Anim. 32, 46

Schambony A., Gentzel M., Töpfer-Petersen E., Müller H.-J. (1997) Cycle Sequencing-Neue Möglichkeiten durch Enzymmischungen. Biospektrum 6, 66-67, 1997

Töpfer-Petersen E., Waberski D., Hess O., Bellair S., Schambony A., Ekhlasi-Hundrieser M., Gentzel M., Reineke A. (1998) Bedeutung des Seminalplasmas für die Befruchtung. Tierärztl. Umschau 53, 447-454

Schambony A., Gentzel M., Wolfes H., Raida M., Neumann U., Töpfer-Petersen E. (1998) Equine CRISP-3: Primary structure and expression in the male genital tract. Biochim. Biophys. Acta 1387, 206-216

Schambony A., Hess O., Gentzel M., Töpfer-Petersen E. (1998) Expression of CRISP-proteins in the equine male genital tract. J. Reprod. Fert., in press

## **Lebenslauf**

Name	Schambony
Vorname	Alexandra
Geburtsdatum	10.12.1970
Geburtsort	Fulda

### **Schulbildung**

1977-1981	Grundschule, Don-Bosco-Schule Künzell
1981-1990	Gymnasium, Marienschule Fulda Abitur am 11.06.1990

### **Studium**

1990-1996	Diplomstudiengang Biochemie
Juli 1995 bis Januar 1996	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie
April 1996 bis März 1999	Doktorarbeit am Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover