

**Das Glykom und Proteom des porcinen Eileiters:  
Charakterisierung der  
an der Spermatozoen-Eileiter-Interaktion  
beteiligten Kandidaten-Glykoproteine**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Magister Miroslava Tsoлова  
geboren am 20.11.1974 in Vratsa, Bulgarien

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferentin: Prof. Dr. Dr. Edda Töpfer-Petersen

Tag der Promotion: 05.09.2007

## Zusammenfassung

Das biochemische Milieu der Säugetiereileiter stellt eine spezifische Mikroumgebung dar, die essenziell für die Kontrolle und die Synchronisierung des Gametentransports und der Gametenfunktion ist, wodurch eine erfolgreiche Befruchtung gesichert wird. Nach der Insemination binden die Spermatozoen an die apikale Oberfläche der Epithelzellen im kaudalen Isthmus-Bereich des Eileiters. Das so gebildete funktionelle Spermienreservoir dient zur Selektion einer befruchtungsfähigen Spermienpopulation, zum Erhalt der Vitalität der Spermatozoen und zur Unterdrückung einer frühzeitigen Kapazitation bis zum Zeitpunkt der Ovulation. Der erste Kontakt zwischen den Spermatozoen und dem Eileiterepithel wird über Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt, wobei lektinähnliche Moleküle auf der Spermienoberfläche Oligosaccharid-Strukturen des Eileiterepithels spezifisch erkennen. Die Spermatozoen-Eileiter-Bindung ist ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung wichtiger biologischer Vorgänge wie Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen und der Rolle post-translationaler Modifikationen (z.B. Proteinglykosylierung). Beim Schwein konnte gezeigt werden, dass Oligomannosyl-Typ Glykane des Eileiters die Schlüsselrolle bei dieser Interaktion spielen. Als mannosebindender Kandidaten-Rezeptor auf der Spermienoberfläche wurde das Spermadhäsion AQN-1 identifiziert. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine Glyko-Proteom-Analyse der mannosereichen Glykoproteine des porcinen Oviduktepithels, die potenzielle Bindungspartner für die Spermatozoen darstellen, durchgeführt werden. Durch Affinitätschromatographie mit dem mannosespezifischen Lektin Galantus Nivalis Agglutinin (GNA) konnten diese Glykoproteine aus der oviduktalen apikalen Membranfraktion und aus der Oviduktflüssigkeit isoliert werden. Zunächst wurde eine N-Glykom-Analyse beider GNA-bindenden Fraktionen vorgenommen, indem die N-Glykane mit N-Glykosidase F enzymatisch gespalten und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert wurden. Die Untersuchung zeigte, dass sowohl auf der epithelialen Membranoberfläche als auch in der flüssigen Fraktion mannosereiche Glykoproteine exprimiert werden, die Oligomannosyl-Typ N-Glykane mit unterschiedlicher Anzahl von Mannoseresten  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  tragen. Zahlreiche sialylierte komplexe oder hybride N-Glykane, von denen viele zusätzliche terminale  $\alpha$ -Galactosereste besitzen, wurden ebenfalls detektiert. Nach elektrophoretischer Trennung, in-Gel Spaltung mit Trypsin und anschließender massenspektrometrischen Analyse konnten einige hochmolekulare membranassoziierte oder sekretorische GNA-bindende Glykoproteine identifiziert werden. Dabei handelt es sich um *lysosome-associated membrane glycoproteins* 1 und 2 (LAMP-1/2), *150kDa oxygen-regulated glycoprotein* (ORP150), Aminopeptidase N,  $\alpha$ -2-Makroglobulin, *angiotensin-converting enzyme* (ACE), *heat shock protein 90* (HSP90) und *oviduct specific glycoprotein* (Oviduktin). Die N-Glykan-Profile aller Proteine weisen sowohl Oligomannosyl- als auch komplexe oder hybride

Strukturen auf. Diese Daten zeigen, dass sowohl in der apikalen Membranfraktion als auch in der oviduktalen Flüssigkeit ausreichend mannosereiche Bindungspartner für die Spermatozoen existieren, und dass die zahlreichen Zucker-Liganden die Voraussetzung für eine multivalente hochaffine Lektin-Ligand-Bindung bieten. Die Proteine der GNA-bindenden Fraktion der oviduktalen apikalen Membran wurden nach Biotin-Markierung in einem Bindungstest als Spermien-Liganden getestet. Es konnte durch Protein-Blot und Fluoreszenzmikroskopie demonstriert werden, dass die membranassoziierten Proteine LAMP1/2 und ORP150 an der periakrosomalen Spermienoberfläche angereichert werden. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass bei der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion ein direkter Kontakt zwischen den Spermatozoen und den Epithelzellen notwendig ist und demzufolge membranassoziierte Glykoproteine wahrscheinlich die bevorzugten Bindungspartner sind.

Das Oviduktin, das in der GNA-bindenden Fraktion der Oviduktflüssigkeit gefunden wurde, ist ein nur für den Eileiter typisches sekretorisches Glykoprotein, das eine entscheidende Rolle während der Befruchtungsprozesse zu spielen scheint. In dieser Arbeit wurde massenspektrometrisch die N-Glykosylierung des porcinen Oviduktins charakterisiert. Das N-Glykan-Profil weist neben den drei dominanten mehrfach fucosylierten bi-antennären komplexen Glykanen  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_2+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_3+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  auch eine große Heterogenität von anderen komplexen und hybriden Strukturen mit geringer Signalintensität auf. Nur schwache Signale von vier Oligomannosyl-Glykane ( $\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2$ ) konnten detektiert werden. Die N-Glykosylierungsstellen des porcinen Oviduktins wurden durch den Vergleich der MS-Muster des mit Trypsin gespaltenen Proteins vor und nach Deglykosylierung untersucht. Die Lokalisierung der drei dominanten komplexen N-Glykanstrukturen an allen drei Asparagin-Positionen  $\text{N}_{62}$ ,  $\text{N}_{402}$  und  $\text{N}_{441}$  zeigte, dass die drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen tatsächlich mit Glykansenketten besetzt sind. Da die Oligomannosyl-Strukturen nicht die dominanten N-Glykane des Oviduktins sind, ist eine über Mannosereste vermittelte Rezeptor-Funktion des Oviduktins unwahrscheinlich. Das Oviduktin kann eine Rolle bei der Stimulierung und der Kontrolle der Spermienfunktion während der Kapazitation und der Interaktion mit der Eizelle spielen.

Die vorliegenden Untersuchungen liefern neue Erkenntnisse über das Glykom und Proteom des porcinen Ovidukts und sind die Basis für die Aufklärung des Rezeptorsystems, das an der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion beim Schwein beteiligt ist.

Schlagwörter: Oviduktglykoproteine, N-Glykane, MALDI-TOF-MS

## Summary

The mammalian oviduct provides a biochemical environment that is crucial for the control and synchronization of gamete transport and function. This is an important event for successful fertilization. After insemination the sperm attach to the epithelium in the isthmus region of the oviduct, which is designated as a functional sperm reservoir. This serves to selection of a fertile sperm population, to maintenance of the sperm viability and suppression of early capacitation steps until ovulation occurs. The initial contact between sperm and oviductal epithelium is mediated by carbohydrate-protein interactions as lectin-like sperm molecules recognize oligosaccharide residues exposed on the epithelial cell surface. The sperm-oviduct binding is a suitable model system to study a fundamental biological process such as a carbohydrate-protein interaction and to understand the role of the protein glycosylation as a post-translational modification. In the pig, the carbohydrate recognition system has been shown to involve oligomannosyl structures exposed by the oviduct and the spermadhesin AQN-1 was identified as a mannose recognizing receptor on the sperm surface. In the present study a glyco-proteom analysis of the mannose rich oviductal glycoproteins was performed. Lectin affinity chromatography with mannose-specific *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) was undertaken in order to separate these proteins from the oviductal apical membrane fraction and the oviductal fluid.

Glycan profiling of the GNA-binding proteins by MALDI-TOF MS and MS/MS following deglycosylation with N-glycosidase F indicates that high-mannose type N-glycans  $\text{Man}_5\text{-}_9\text{GlcNAc}_2$  were expressed both in the apical membrane fraction and in the oviductal fluid. Also numerous sialylated complex or hybrid type N-glycans with accessory terminal  $\alpha$ -galactosyl residues were detected. Furthermore, the dominant GNA-binding glycoproteins were analysed by mass spectrometry after SDS-electrophoresis and in-gel trypsin digestion. Some membrane associated or secretory glycoproteins were identified: lysosome-associated membrane glycoproteins 1 and 2 (LAMP-1/2), 150kDa oxygen-regulated glycoprotein (ORP150), aminopeptidase N,  $\alpha$ -2-macroglobulin, angiotensin-converting enzyme (ACE), heat shock protein 90 (HSP90) and oviduct specific glycoprotein (oviductin). The N-glycan profiles of all proteins show high-mannose as well as complex and hybrid type structures. These data indicate that enough sperm binding partners exist both in the apical membrane fraction and in the oviductal fluid. The various sugar ligands on the epithelial surface are an assumption for a multivalent high-affinity lectin-ligand binding. In addition, sperm were incubated with the biotinylated GNA-binding glycoprotein fraction of the oviductal apical membrane. By means of fluorescence microscopy and protein blot analysis was demonstrated that LAMP-1/2 and ORP150 associate with the periacrosomal sperm surface. These findings confirm the assumption that a direct contact between spermatozoa and the

apical membrane of the oviductal epithelial cells is important for maintaining the sperm viability and as a result membrane associated proteins can be preferred sperm binding partner.

Oviductin is a secretory glycoprotein typical for the oviductal tissue that plays an important role in the fertilization processes. It was identified in the GNA-binding fraction of the oviductal fluid. N-glycosylation of the porcine oviductin was characterized herein by MALDI-TOF-MS. Glycan profiling shows a wide heterogeneity of low-abundant signals of complex and hybrid type glycans. Only three dominant polyfucosylated bi-antennary complex N-glycans were observed HexNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>1</sub>+Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, HexNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>2</sub>+Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and HexNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>3</sub>+Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Furthermore, low abundant signals of four high-mannosyl structures Man<sub>5-8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> were also detected. The N-glycosylation sites of the porcine oviductin were investigated by comparison of the MS peptide profiles of the tryptic digested protein before and after deglycosylation with N-glycosidase F. The localization of the three dominant complex glycans at all three asparagin positions N<sub>62</sub>, N<sub>402</sub> und N<sub>441</sub> demonstrates that glycan structures are linked to all three potential N-glycosylation sites. As the high-mannosyl glycans are not dominantly expressed, a receptor role of the oviductin involving mannose residues is not assumed. This protein can be involved in the stimulation and controlling of the sperm function during the capacitation and the sperm-egg interaction. The present data will increase our knowledge about the glycom and proteom of the porcine oviduct and are the basis to clarify the receptor system involved in sperm-oviduct interaction in pig.

Keywords: oviduct glycoproteins, N-glycans, MALDI-TOF-MS

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Proteom und Glykom .....	1
1.2 Proteinglykosylierung .....	2
1.2.1 N- und O-Glykosylierung .....	2
1.2.1.1 Aufbau der N-Glykane .....	3
1.2.1.2 Aufbau der O-Glykane .....	4
1.2.2 Biologische Rolle der Glykosylierung .....	5
1.3 Kohlenhydrat-Protein-Interaktion .....	6
1.3.1 Kohlenhydratbindende Proteine .....	7
1.3.2 Gameteninteraktion bei den Säugetieren .....	10
1.3.3 Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion .....	13
1.3.3.1 Etablierung und Funktion des Spermienreservoirs des Eileiters .....	13
1.3.3.2 Kohlenhydrat-Protein-Interaktion bei der Etablierung des Spermienreservoirs beim Säugetier .....	15
1.3.3.3 Das Rezeptorsystem beim Schwein .....	16
1.4 Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Gewinnung und Aufarbeitung des biologischen Materials.....	19
2.1.1 Isolierung der apikalen Membran aus porcinen Oviduktepithelzellen .....	19
2.1.1.1 Reinheitskontrolle der apikalen Membranfraktion.....	20
2.1.1.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	20
2.1.1.1.2 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Test .....	21
2.1.1.2 Solubilisierung der Membranproteine .....	22
2.1.2 Gewinnung der Oviduktflüssigkeit aus porcinem Ovidukt.....	22
2.2 Analytische Methoden.....	23
2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford .....	23
2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	24
2.2.2.1 Coomassie Brilliant Blue-Färbung .....	25
2.2.2.2 Modifizierte Coomassie-Färbung.....	25
2.2.3 Lektin-Blotting.....	26
2.2.4 Lektin-Affinitätschromatographie mit GNA.....	27
2.2.5 Affinitätschromatographie mit Heparin.....	28
2.2.6 Biotinylierung .....	28

2.2.7 Enzymatischer Verdau .....	29
2.2.7.1 In-Gel Spaltung mit Trypsin .....	29
2.2.7.2 In-Gel Deglykosylierung mit N-Glykosidase F .....	31
2.2.7.3 In-Gel Spaltung nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F .....	32
2.2.7.4 On-Blot Deglykosylierung mit N-Glykosidase F .....	32
2.2.7.5 Deglykosylierung der tryptischen Glykopeptide .....	33
2.2.7.6 Desialylierung der N-Glykanen .....	33
2.2.7.7 On-MALDI-Target Deglykosylierung .....	33
2.2.7.8 Entsalzen der N-Glykane .....	34
2.2.8 Massenspektrometrie .....	34
2.2.8.1 Erstellen der Glykan-Profile mit MALDI-TOF MS .....	34
2.2.8.2 Peptid- und Glykopeptid-Analyse mit MALDI-TOF MS und MS/MS .....	35
2.2.8.3 ESI-MS .....	36
2.2.8.4 Auswertung der MS-Spektren .....	37
2.2.9 Bindungstest mit Spermatozoen .....	37
2.2.9.1 Vorbereitung des Samens .....	37
2.2.9.2 Bindungstest .....	38
2.2.9.3 Elektrophoretische Analyse .....	38
2.2.9.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse .....	39
3. Ergebnisse .....	40
3.1 Anreicherung der apikalen Membranfraktion aus Oviduktepithelzellen .....	40
3.2 Isolierung der GNA-bindenden Glykoproteine .....	41
3.3 Elektrophoretische und lektinologische Analyse der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine .....	42
3.4 N-Glykan-Profile .....	43
3.4.1 Anmerkung zu den massenspektrometrischen Messungen .....	43
3.4.2 Analyse der N-Glykane der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine der OAMF und OF mit MALDI-TOF-MS .....	43
3.4.2.1 MALDI-TOF-MS-Analyse der neutralen N-Glykanfraktion .....	44
3.4.2.1.1 Tandem-MS (MS/MS) der Oligomannosyl-N-Glykane .....	47
3.4.2.1.2 Analyse der Oligomannosyl-Strukturen mit $\alpha$ -Mannosidase .....	50
3.4.2.1.3 Tandem-MS (MS/MS) der komplexen N-Glykane .....	51
3.4.2.1.4 Analyse der komplexen N-Glykane mit $\alpha$ -Galactosidase .....	53
3.4.2.2 MALDI-TOF-MS-Analyse der sauren N-Glykanfraktion .....	56

3.4.2.3 N-Glykane der OAMF und OF .....	59
3.5 Identifizierung der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine.....	65
3.5.1 Glykan-Profile der GNA-bindenden Glykoproteine der OAMF und OF .....	67
3.6 Glyko-Proteom-Analyse des porcinen Oviduktins .....	70
3.6.1 Isolierung von Oviduktin aus Oviduktflüssigkeit.....	70
3.6.2 MALDI-TOF-MS- und MS/MS-Analyse.....	71
3.6.3 Lektinologische Analyse .....	73
3.6.4 N-Glykan-Profil .....	74
3.6.4.1 MALDI-TOF-MS-Analyse der neutralen N-Glykanfraktion .....	74
3.6.4.2 MALDI-TOF-MS-Analyse der sauren N-Glykanfraktion .....	78
3.6.5 N-Glykosylierungsstellen .....	81
3.6.6 N-Glykosylierungsmuster .....	86
3.7 Bindungstest mit Spermatozoen .....	88
4. Diskussion .....	90
4.1 GNA-bindende Glykoproteine der OAMF und OF .....	93
4.2 N-Glykom des Oviduktins.....	101
4.2.1 Biologische Rolle des Oviduktins.....	101
4.2.2 Glykosylierung des Oviduktins.....	102
4.2.3 N-Glykosylierung des porcinen Oviduktins .....	106
4.3 Schlussfolgerung.....	108
5. Literatur .....	109
Danksagung .....	121
Lebenslauf.....	122

## Abkürzungen

AAA	Aleuria Aurantia Agglutinin
ACA	Amaranthus Caudatus Agglutinin
APS	Ammoniumpersulfat
AQN	Spermadhäsine mit N-Terminus AQN
AP	Alkalische Phosphatase
ATT	6-aza-2-thiothymine
AWN	Spermadhäsine mit N-Terminus AWN
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CAM	Carbamidomethylierung
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
dest.	destilliert
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GNA	Galantus Nivalis Agglutinin
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethan
Hex	Hexose
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HexNAc	N-Acetylhexosamin
MALDI-ToF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionisation-Time of Flight-</i>

	<i>Mass Spectrometry</i>
Man	Mannose
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MS/MS (MS <sup>n</sup> )	Tandem-Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
m/z	<i>mass/charge</i>
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
NeuGc/Ac	N-Glycolylneuraminsäure/N-Acetylneuraminsäure
OAMF	Oviduktale apikale Membranfraktion
OF	Oviduktflüssigkeit
OGP	n-Octyl-β-D-glycosid
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PAM	Polyakrylamidylierung
PAS	<i>Periodic acid-Schiff stain</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSP	Porcine Seminalplasmaproteine
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RI	Relative Intensität
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SNA	Sambucus Nigra Agglutinin
T	tryptisches Peptid
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
THAP	2,4,6-Trihydroxy-acetophenone Monohydrat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü/N	über Nacht
ZP	Zona pellucida

Die englischen Begriffe sind im Text *kursiv* gedruckt.

## Aminosäuren-Code

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

# 1. Einleitung

## 1.1 Proteom und Glykom

Am Ende der 20-ten Jahrhundert wurden die Begriffe Proteom und Glykom analog zu dem Begriff Genom in der modernen „*life sciences*“ Forschung eingeführt. Das gesamte genetische Material eines Organismus wird als Genom bezeichnet. Als Proteom und Glykom wird der gesamte Satz von Proteinen, beziehungsweise Kohlenhydratstrukturen, die in einem Organismus exprimiert werden, definiert. Die Entschlüsselung des Genoms des Menschen und einigen anderen Modellorganismen und die großen Fortschritte in den Genomprojekten weiterer Tierarten lieferten umfangreiche DNA-Sequenzinformationen, wobei die Funktion vieler Gene noch ungeklärt ist. Die Genexpression kann mittels molekularbiologischer Methoden auf mRNA-Ebene untersucht werden. Aus der Quantität einer mRNA kann man jedoch nicht auf die Menge des entsprechenden translatierten Genprodukts schließen. Die Übertragung der in der DNA kodierten Information ist mit ihrer Translation von der mRNA in ein Protein nicht beendet. Die Proteine werden durch post-translationales Prozessieren und Modifizieren strukturell verändert, wodurch ihre biologische Funktion moduliert wird. Zusätzlich ist sowohl die Expression der Proteine als auch ihre Aktivität zahlreichen internen und externen biochemischen und physiologischen Regulationsmechanismen unterworfen. (Lottspeich, 1999, Anderson und Anderson, 1998). Daher kann das Proteom als ein dynamisches System definiert werden, bei dem die Kenntnis der post-translationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung essenziell für seine Charakterisierung ist. Dank der Entwicklung der 2-D-Elektrophorese, der verschiedenen Auftrennungstechniken (HPLC, CE) und die Etablierung der Massenspektrometrie (MALDI- und ESI-MS) als einer der sensitivsten und zuverlässigsten analytischen Methoden hat sich nach der *Genomics*-Ära die *Proteomics*-Ära entwickelt. Die Proteomanalyse (auch *Proteomics* genannt) umfasst die qualitative und quantitative Charakterisierung der Proteinausstattung eines biologischen Systems (einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus) in einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten physiologischen Zustand durch Identifizierung der einzelnen Proteine sowie ihrer post-translationalen Modifikationen (Lottspeich, 1999).

Die Kohlenhydrate und konkret die Proteinglykosylierung als die bedeutendste posttranslationale Modifikation sind in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten und spannendsten Forschungsobjekte geworden. Dies hat zu der Entstehung einer neuen Ära geführt, die als Glykomforschung (*Glycomics*) bezeichnet wird. Sie ist ein unzertrennlicher Teil der Proteomforschung geworden. Die Kohlenhydrate werden nach den Nukleinsäuren und Proteinen als die dritte Art bio-informativer Makromoleküle betrachtet (Hirabayashi et al, 2000, Gabius, 2001). Hirabayashi et al. (2000, 2002) begründen die Wichtigkeit der Glykomforschung so: I. Alle Zellen in allen Organismen sind von Kohlenhydratstrukturen bedeckt, deren Zusammensetzung für jeden Zell- und Gewebetyp und für jedes Entwicklungsstadium spezifisch ist. Dabei sind die Glykane nicht nur ein Merkmal für die strukturelle Differenzierung der verschiedenen Zelltypen, sondern sie sind auch an vielen Erkennungs- und Kommunikationsprozessen beteiligt, die entscheidend für die einheitliche Existenz eines mehrzelligen Organismus sind. II. Die Glykane haben ein viel größeres Potenzial als Proteine und Nukleinsäuren mit wenigen Bausteinen strukturelle Diversität zu bilden und dadurch Information zu übertragen. Das beruht auf der Vielfalt der glykosidischen Bindung, die unzählige Verzweigungsmöglichkeiten erlaubt. Man spricht daher auch von dem „*glyco-code*“. III. Die ersten zwei Aspekte weisen auf eine evolutionäre Rolle der Kohlenhydrate hin. Trotz der großen strukturellen Heterogenität und funktionellen Komplexität verläuft die Biosynthese der Glykane in allen eukaryotischen Zellen nach einem relativ konservativen Mechanismus.

Die Analyse der zahlreichen Kohlenhydratstrukturen und die Aufklärung des „*glyco-code*“ und seiner Bedeutung für die Proteinfunktion stellen eine große Herausforderung für die Zukunft dar. Als Basisverfahren haben sich die Lektin-Affinitätschromatographie und die Massenspektrometrie in der Glykomforschung etabliert.

## **1.2 Proteinglykosylierung**

### **1.2.1 N- und O-Glykosylierung**

Hinsichtlich der Kohlenhydratseitenketten und der Aminosäuremotive, an der die Kohlenhydrate kovalent gebunden werden, lassen sich zwei Glykosylierungstypen unterscheiden: N- und O-Glykosylierung. Dementsprechend werden auch die Glykanstrukturen N- und O-Glykane genannt. Jedes Glykoprotein kann mehrere N- und O-Glykosylierungsstellen besitzen, wobei jede mit unterschiedlichen

Glykanstrukturen besetzt sein kann. Weiterhin können an einer Glykosylierungsstelle verschiedene Oligosaccharidketten gebunden werden. Das bedeutet, dass jedes Glykoprotein als eine Mischung aus verschiedenen Glykoformen vorliegt. Sie besitzen die gleiche genetisch vorgegebene Aminosäuresequenz, aber unterscheiden sich in der Anzahl und Sequenz der Glykanstrukturen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Mikroheterogenität (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Glykosylierung ist Protein-, Zell-, Gewebe-, Organ- und Spezies-spezifisch. Außerdem variiert sie in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Zelle (bei der Embryogenese oder in differenzierten Zellen) und unter verschiedenen biochemischen und physiologischen Bedingungen (normale gesunde Zellen, mit metabolischen Störungen oder bei Krankheiten).

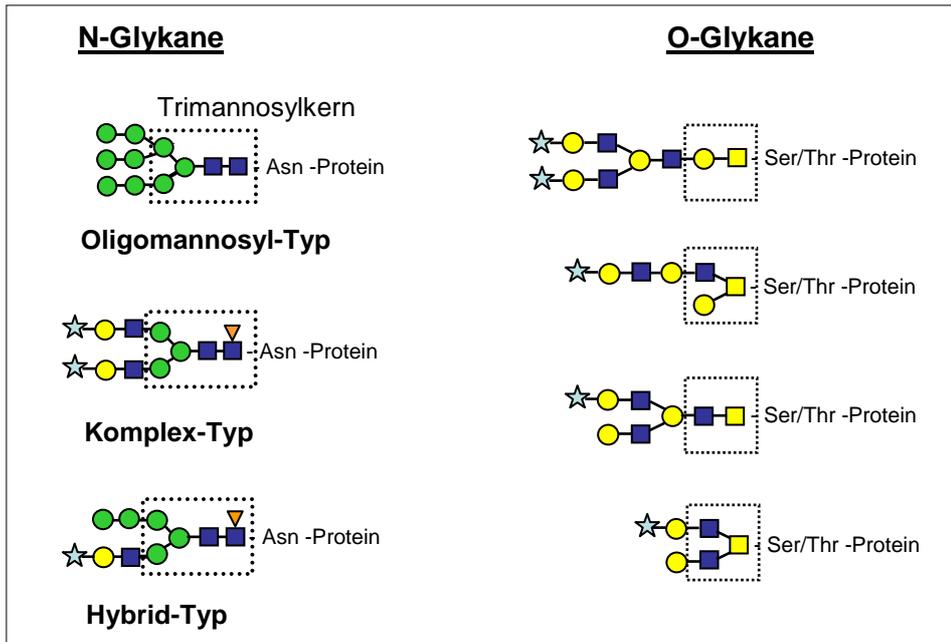
### 1.2.1.1 Aufbau der N-Glykane

Die N-Glykane sind immer über N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin an dem Amidstickstoff eines L-Asparaginrestes gebunden. Für den Beginn einer N-Glykosylierung ist die Signalsequenz Asn-Xxx-Ser/Thr erforderlich, wobei Xxx jede andere Aminosäure außer Prolin und Asparaginsäure sein kann. Alle eukaryotischen Zellen produzieren N-Glykanstrukturen und ihre Synthese verläuft in den frühen Stadien nach einem einheitlichen konservativen Mechanismus. Die Synthese beginnt in dem Zytosol mit dem Aufbau eines Oligosaccharid-Vorläufers, das über ein Lipid (Dolichol) an der ER-Membran gebunden ist. Dieses Vorläufermolekül wird im  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-Dol}$ -Stadium in das ER-Lumen übertragen und wird dort durch Verknüpfung von weiteren aktivierten Monosacchariden bis zum  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Dol}$  aufgebaut. Das fertige Oligosaccharidmolekül kann in dieser Form an den Asparaginrest des Sequons N-X-S/T der naszierenden Polypeptidkette übertragen werden. Die weitere Prozessierung der Kohlenhydratseitenkette fängt im ER an und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt (Varki et al., 1999). Hierfür hat sich im Laufe der Evolution bei den Säugetieren ein Satz von hochspezifischen Glykosyltransferasen und Glykosidasen herausselektiert, die eine für die Säugerzellen spezifische Glykosylierung bewirkt (Lottspeich und Zorbas, 1998). Alle N-Glykane besitzen den gleichen Trimannosylkern, der unterschiedlich verlängert und verzweigt sein kann. Daraufhin unterscheiden man drei Strukturtypen: den Oligomannosyl-, den Komplex- und den Hybrid-Typ. Die Antennen des Oligomannosyl-Typ Glykans bestehen nur aus einer unterschiedlichen Anzahl von Mannoseresten –  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ . Dieser Strukturtyp wird noch im ER

durch die Entfernung der drei Glucosereste durch die Enzyme Glucosidase I und II gebildet. Im Golgi-Apparat liegen mehrere  $\alpha$ -Mannosidasen vor, die sequenziell terminale Mannosereste von der Oligomannosyl-Struktur bis  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  oder  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  abspalten (Varki et al., 1999). Von diesen beiden Grundstrukturen werden durch verschiedenen Glykosyltransferasen die komplexen und die hybriden Strukturen aufgebaut. Bei dem komplexen Typ ist der Trimannosylkern durch N-Acetylglucosamin, gefolgt von Galactose verlängert. Diese so genannte N-Acetylglucosamineinheit kann in jeder Antenne mehrmals wiederholt werden. Der hybride Typ ist eine Mischung aus Strukturen des Oligomannosyl-Typs und komplexen Typs (Abb.1). Die große Vielfalt der N-Glykane ergibt sich dadurch, dass sie bi- tri- und tetrantennär sein können, und dass sowohl die komplexen als auch die hybriden Strukturen vollständig oder unvollständig sialyliert und mit oder ohne proximale Fucose vorliegen können. Eine zusätzliche Fucosylierung der Antennen und ein Kern mit einem sogenannten *bisecting* GlcNAc kommen ebenfalls vor (Lottspeich und Zorbas, 1998). Schon aus dieser kurzen Beschreibung ist die enorme Vielfalt der N-glykosidisch gebundenen Glykane zu ersehen.

### 1.2.1.2 Aufbau der O-Glykane

Die O-Glykane sind über N-Acetyl- $\beta$ -D-Galactosamin mit der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin verknüpft. Eine Signalsequenz, wie sie für die N-Glykosylierung beobachtet wird, ist für die O-Glykosylierung bis jetzt nicht bekannt. Im Unterschied zu den N-Glykanen ist bei der Synthese der O-Glykane kein Lipid-gebundenes Vorläufermolekül erforderlich. Der Aufbau beginnt im Golgi-Apparat mit der Verknüpfung des Monosaccharids GalNAc an einen sterisch günstigen Serin- oder Threoninrest – ein Vorgang, der von dem Enzym Polypeptid-GalNAc-Transferase katalysiert wird. Die O-Glykane sind meistens biantennäre, unterschiedlich lange Strukturen. Sie weisen eine große Heterogenität auf und können anders als die N-Glykane nicht eindeutig klassifiziert werden. Sie besitzen keine einheitliche Kern-Struktur, sondern lassen sich vier Haupttypen einteilen, die unterschiedlich verlängert sein können (Abb. 1). Die Antennen können durch Sialylierung und Fucosylierung terminal modifiziert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998).



**Abb. 1: Aufbau der N- und O-Glykane**

- - Mannose, ● - Galactose, ▼ - Fucose, ■ - N-Acetylglucosamin,
- - N-Acetylgalactosamin, ☆ - Sialsäure

### 1.2.2 Biologische Rolle der Glykosylierung

Mit der Glykosylierung von Proteinen werden zwei wesentliche physiologische Funktionen erreicht: I. Eine strukturelle und modulatorische Rolle und II. Bei Adhäsions- und Erkennungsreaktionen mit endogenen und exogenen Molekülen (Varki et al., 1999). Oligosaccharidstrukturen, die an Membranproteine gebunden sind und auf der Zelloberfläche exprimiert werden, sind an der Bildung der Glykokalyx beteiligt. Diese Struktur stellt eine physikalische Barriere dar und ist für die Stabilität und Integrität eines Gewebes verantwortlich. Die Glykanseitenketten bieten Schutz vor Proteasen und verhindern die Bindung von Antikörpern. Sie sind für die korrekte Faltung der neu synthetisierten Proteine in dem ER wichtig und können die Proteinfunktion modulieren – so ist beispielsweise die Aktivität einiger Peptidhormone von dem Vorhandensein einer Glykosylierung und dem Typ der Glykosylierung abhängig. Genetische Defekte des Glykosylierungssystems können zu einem Verlust der biologischen Funktion des Glykoproteins führen (Varki et al., 1999).

Glykane sind an vielen Erkennungsmechanismen beteiligt. Diese Vorgänge werden meistens über Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt, wobei kohlenhydrat-bindende Proteine (Lektine) als Rezeptoren für spezifische Oligosaccharidstrukturen

dienen. Viele Toxine oder pathogene Organismen wie Viren, Bakterien und Parasiten nutzen Oligosaccharide als Rezeptoren, um in die infizierten Zellen eindringen zu können. Andererseits kann die Erkennung der Glykanstrukturen des Pathogens durch endogene Lektine das Signal zum Einschalten der Immunabwehr des Organismus geben. In einigen Fällen können Glykane als körpereigene Antigene wirken und zu Autoimmunreaktionen führen. Tumorzellen weisen ein verändertes atypisches Glykosylierungsmuster auf; dies dient als Marker für ihr Proliferations- und Metastasenstadium. Eine sehr wichtige Rolle spielen die Kohlenhydrate bei den Prozessen der Zell-Adhäsion. So wird beispielsweise die Interaktion zwischen den Lymphozyten und dem vaskulären Endothel und ihre Migration zu dem Entzündungsort durch kohlenhydratbindende Adhäsionsmoleküle (Selektine) unterstützt (Varki et al., 1999, Sharon, 2004,2007). Ein weiteres Beispiel für Zell-Zell-Erkennungsprozess ist die Gameteninteraktion. Lektin-ähnliche Moleküle auf der Spermienoberfläche erkennen spezifisch Oligosaccharidstrukturen der Zona pellucida der Eizelle, wodurch die Akrosomreaktion und die nachfolgende Gametenfusion initiiert werden (Abschnitt 1.3.2).

### **1.3 Kohlenhydrat-Protein-Interaktion**

Alle eukaryotischen Zellen synthetisieren kohlenhydratbindende Proteine, und in allen Organismen werden zahlreiche biologische Prozesse über Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt. Die Bindung zwischen den kohlenhydratbindenden Proteinen und den Glykanmolekülen kommt durch schwache nicht-kovalente chemische Interaktionen zustande. Dabei spielt die Bildung von Wasserstoffbrücken (durch die zahlreichen Hydroxylgruppen der Kohlenhydratmoleküle) eine besondere Rolle; van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen oder ionische Bindungen mit Beteiligung von bivalenten Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) unterstützen den Bindungsprozess. Eine Glykanbindungsstelle in der Polypeptidkette kontaktiert nur mit 1 bis 3 meistens terminalen Monosaccharidresten in einem Oligosaccharid. Die Bindungsaffinität zu größeren Oligosaccharidstrukturen ist stärker als zu Monosacchariden; demzufolge sind Monosaccharide häufig schlechte Inhibitoren der Kohlenhydrat-Protein-Bindung. Die Stabilität und die Affinität der Kohlenhydrat-Protein-Bindung werden durch ihre Multivalenz erhöht. Die Multivalenz wird durch eine multimere Proteinstruktur (die meisten pflanzliche Lektine bestehen aus zwei bis vier Untereinheiten) oder durch Cluster-Bildung auf der Zelloberfläche (Varki et al.,

1999, Ambrosi et al., 2005, Lee, 1992), die die Bindung mit mehreren Oligosaccharidketten erlaubt, gewährleistet. Die Sequenz und die Position der Bindungsstellen und die dreidimensionale Struktur vieler kohlenhydratbindenden Proteine und ihrer Liganden sind mittels Röntgen-Kristallographie und NMR aufgeklärt worden. Zur Untersuchung von Spezifität und Kinetik einer Kohlenhydrat-Protein-Bindungsreaktion werden weitere biochemische und biophysikalische Methoden angewendet: Affinitätschromatographie, ELISA (*Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*),  $IC_{50}$ -Hapten-Inhibition, Präzipitation, Titrationskalorimetrie und SPR (*Surface Plasmon Resonans*) (Varki et al., 1999, Ambrosi et al., 2005).

### 1.3.1 Kohlenhydratbindende Proteine

Die größte Gruppe kohlenhydratbindender Proteine, neben Enzymen und Antikörpern, sind die Lektine. Sie sind pflanzlicher oder tierischer Herkunft und besitzen die Fähigkeit eine bestimmte kleine Oligosaccharidsequenz spezifisch zu erkennen. Von großer Bedeutung für die Proteom- und Glykom-Analytik sind die pflanzlichen Lektine. Es steht heute eine Vielfalt von pflanzlichen Lektinen zur Verfügung, die ganz unterschiedliche Struktureinheiten in den tierischen N- und O-Glykanen erkennen und daher für die lektinologische Analyse löslicher Glykoproteine (*Enzyme-Linked-Lectin-Assay*) oder elektrophoretisch getrennter Proteine (Lektin-Blot-Analyse), in histochemischen Analysen und als Liganden in der Affinitätschromatographie für die selektive Isolierung von Glykoproteinen, Glykopeptiden und freien Glykanen eingesetzt werden. Historisch gesehen war die erste Anwendung von Lektinen die Blutgruppenbestimmung durch die spezifische Erkennung der Blutgruppenantigene. Andere Lektin-Eigenschaften, die Anwendung in der immunologischen und klinischen Analytik gefunden haben, sind die Agglutination von Tumorzellen (WGA, PSA) und ihre mitogene Wirkung auf Lymphozyten (ConA, PHA-L) (Varki et al., 1999, Sharon, 2004, 2007).

Die meisten Lektine, die analytische Anwendung gefunden haben, sind aus drei botanischen Familien isoliert worden: Leguminosae (Hülsenfrüchte), Gramineae (Süßgräser) und Solanaceae (Nachtschattengewächse). Hinsichtlich ihrer Kohlenhydratspezifität können die Lektine nach Goldstein und Poretz (1986) in fünf Gruppen klassifiziert werden:

1. Glucose und N-Acetylglucosamin (GlcNAc)-bindende Lektine (DSL, WGA, GSL-II, STL);

2. Galactose und N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-bindende Lektine (ACL, GSL-I, Jacalin, RCA-I, PNA, VVL);
3. Fucose-bindende Lektine (UEA-I);
4. Mannose-bindende Lektine (ConA, LCA, PSA);
5. Oligosaccharid- und Sialsäure-bindende Lektine (PHA-E, PHA-L).

Über die biologische Rolle der Lektine in den Pflanzen ist wenig bekannt. Lektine sind für die Spezifität der symbiotischen Verhältnisse gegenüber bestimmten rhizobialen Bakterien bei der Knollenbildung verantwortlich (Varki et al., 1999). Einige Lektine wirken toxisch auf Schädlinge (GNA, WGA, PNA, SBA) und dank ihrer insektiziden, fungiziden und bakteriziden Wirkung an der pflanzlichen Abwehr beteiligt (Sharon, 2004). Die kodierenden Gene dieser Lektine werden oft in transgene Pflanzen eingefügt, um deren Resistenz gegen Krankheiten zu stärken.

Während die pflanzlichen Lektine schon vor ca.100 Jahren entdeckt wurden (ConA ist von J.Sumner in 1919 charakterisiert worden), wurden Lektine in Vertebraten erst in den 60-er Jahren identifiziert. Die Klassifikation der tierischen Lektinen erfolgt auf der Basis der Homologie in den kohlenhydratbindenden Domänen (*carbohydrate recognition domain* CRD) (Drickamer, 1988, Varki et al., 1999, Kilpatrick, 2002):

1. C-Typ-Lektine - benötigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für die Glykan-Bindung (Selektine, Kollektine); weisen variable Glykanspezifität auf;
2. S-Typ-Lektine - benötigen Thiol-Gruppen für die Glykan-Bindung (Galektine); binden spezifisch  $\beta$ -Galactose und Polylactosamineinheiten;
3. P-Typ-Lektine - erkennen Man-6-Phosphat in High-Mannose-Typ N-Glykanen;
4. I-Typ-Lektine - besitzen eine immunoglobulin-ähnliche Domäne (Siglecs-Familie); sie erkennen Sialsäure und andere Kohlenhydratreste;
5. Hyaluronan-bindende Lektine;
6. Lektine der Frosch-Eizelle - erkennen Galactose, Sialsäure, Heparin.

Zusätzlich sind weitere tierische Lektinmoleküle, die keine homologen Sequenzen aufweisen, charakterisiert worden – u.a. Glycosaminoglykan-bindende Proteine und Gangliosid-bindende Proteine.

Lektine können Membran- oder sekretorische Proteine sein. Die Membranproteine sind meistens auf der Zelloberfläche exprimiert und sind an den Prozessen der Endozytose, der Zelladhäsion und der Zell-Zell-Erkennung beteiligt. Die sekretorischen Lektine können durch freie Diffusion in die extrazelluläre Matrix und das benachbarte Gewebe oder in die Blutzirkulation eindringen und dadurch die

Migration der Zellen oder die Signaltransduktion initiieren (Varki et al., 1999). Es sollen hier einige typische Beispiele erwähnt werden, die die vielfältigen Funktionen der Lektine darstellen. Das R1-Lektin ist an der Erkennung und der Kommunikation zwischen den Nervenzellen beteiligt und CSL (*cerebellar soluble lectin*) vermittelt die Adhäsion und die Bildung von festen Bindungen zwischen verschiedenen normalen Zellen oder Tumorzellen (Zanetta et al., 1992). Die Siglecs-Lektine (I-Typ-Lektine) sind in der Signaltransduktion und Zell-Zell-Interaktionen des Immun- und Nervensystems und in der Hämatopoese involviert (Crocker, 2002). Einige C-Typ-Lektine, die auf der Immunzelloberfläche (ICAM-3) exprimiert sind, spielen eine Rolle sowohl als Adhäsionsmoleküle als auch als Pathogen-erkennende Rezeptoren (Cambi et al., 2005). Selektine (C-Typ-Lektine) sind für das Rollen und die Adhäsion der Lymphozyten an das vaskuläre Endothel und deren anschließenden Influx in das entzündete Gewebe verantwortlich (McEver et al., 1995, Sharon 2007). Die Macrophagen-Lektine MR (*mannose receptor*) und CR3 (*complement receptor three*) initiieren die mikrobielle Phagozytose (Linehan et al., 2000).

Zu den kohlenhydratbindenden Proteinen gehören auch einige Enzyme und Antikörper. Beispielsweise entfalten die Enzyme des Glykan-Metabolismus oder die Enzyme, die bei bakteriellen Infektionen Glykanstrukturen der Zellwand der Bakterien verdauen, ihre Wirkung über ihre Kohlenhydratbindungsdomäne. Antikörper, die missgebildete Glykanstrukturen oder missgebildete Proteine durch ihre Glykanketten erkennen oder solche, die Glykanstrukturen bei Autoimmunreaktionen als Antigene attackieren, erfüllen ihre Funktion ebenfalls durch ihre kohlenhydratbindende Domäne.

Neben den normalen physiologischen Vorgängen im Organismus werden auch viele pathologische Prozesse durch Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt. Die Kenntnis der molekularen Mechanismen dieser Interaktionen ist ein wichtiger Schritt bei der Suche nach Wegen für die Heilung vieler Krankheiten. Rekombinante pflanzliche und tierische Lektine können erfolgreich bei der Diagnostik und der Entwicklung neuer therapeutischer Mittel und Strategien eingesetzt werden.

Die Lektine sind ein wichtiges Werkzeug der Glykominforschung insbesondere zur Decodierung des „glyco-code“ und zum Verstehen zahlreicher biologischer Prozesse (Gabijs, 2001, Ambrosi et al., 2005).

### 1.3.2 Gameteninteraktion bei den Säugetieren

Die Gametenerkennung ist ein essentielles Ereignis in der Befruchtungskaskade und gehört zu den ersten Zelladhäsionssystemen, die gut untersucht wurden. Beim Säuger bindet das Spermatozoon an die extrazelluläre Matrix, die die Eizelle umhüllt und die als Zona pellucida (ZP) bezeichnet wird. Die Erkennung und Bindung sowie die anschließende Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida wird durch Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt oder unterstützt. Kohlenhydrat-bindende Proteine des Spermatozoons erkennen bestimmte Oligosaccharid-seitenketten der ZP-Proteine (Takasaki et al., 1999, Töpfer-Petersen et al., 2000). Dieser Prozess verläuft in drei Schritten: I. Bindung von akrosomintakten Spermatozoen an ZP über oberflächenassoziierte Lektin-ähnliche Moleküle (primäre Bindung). II. Bindung von akrosomreagierenden oder akrosomreagierten Spermatozoen an ZP über kohlenhydratbindende Proteine des Akrosoms (sekundäre Bindung). III. Penetration der ZP von akrosomreagierten Spermatozoen (Yanagimachi, 1994). Obwohl zahlreiche Informationen über die ZP-Struktur und ihren Glykosylierung vorliegen und viele Kandidaten-ZP-Rezeptoren des Spermatozoons bei verschiedenen Säugetieren untersucht worden sind, bleiben die molekularen Mechanismen dieser Interaktion immer noch weitgehend ungeklärt. Im Hinblick auf Gameteninteraktion zählen Maus und Schwein zu den am besten erforschten Modellspezies.

Die ZP besteht aus drei Glykoproteinen, die von drei ZP-Genen (ZPA, ZPB und ZPC) kodiert werden und evolutionär eine konservative Aminosäuresequenz aufweisen. Ihre Speziesspezifität beruht auf unterschiedlichen post-translationalen Prozessierungs- und Glykosylierungsreaktionen. Die drei Glykoproteine bilden eine nicht-kovalent verbundene komplexe fibrogranuläre Struktur, die die Eizelle umhüllt und zahlreiche heterogene N- und O-Glykanstrukturen trägt (Töpfer-Petersen et al., 2000).

Bei der Maus wurde gezeigt, dass O-gebundene Oligosaccharide des ZP3(ZPC)-Proteins für die primäre Spermienbindung verantwortlich sind. Hierbei wurden verschiedene Rezeptorsysteme vorgeschlagen. So berichten Bleil und Wassarman (1988, 1990) und Cheng et al., (1994), dass terminale  $\alpha$ -Galactosylreste der O-Glykane mit dem sp56-Protein auf der Spermienoberfläche interagieren. Ebenfalls bei der Maus wurde eine  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase des Spermienakrosoms, die über terminale N-Acetylglucosaminreste der O-Glykane der ZP3 die Bindung vermittelt, identifiziert (Miller et al., 1992). Fucose- und  $\beta$ -Galactose-Bindungsstellen

wurden ebenso auf der Spermienoberfläche detektiert (Johnston et al., 1998). Als sekundärer Spermienrezeptor bei der Maus wird das ZP2(ZPA)-Protein angenommen, dessen Bindungspartner die Spermien-Protease Proakrosin/Akrosin ist (Howes et al., 2001). Die Bindung kommt durch ionische Interaktionen zwischen Proakrosin/Akrosin und sulfatierten Glykanen der ZP2 zustande (Howes und Jones, 2002). Ensslin et al. (2003) und Shur et al., (2004) berichten über ein ZP-bindendes Protein SED1, das die Gameten-Bindung bei der Maus hemmt und in vitro Bindungsaffinität gegenüber ZP2 und ZP3 aufweist. Die Rolle des SED1 wurde durch eine *Knock-out*-Maus, die infertil ist, demonstriert. Für die biologische Aktivität dieses Proteins scheint eine Discoidin F5/8C-Domäne verantwortlich zu sein, die terminale Sialsäure, Galactose und N-Acetylglucosamin binden kann.

Beim Schwein konnte gezeigt werden, dass O-Glykane (Yurewicz et al., 1991) und komplexe N-Glykane (Yonezawa et al., 1995) des ZPB/ZPC-Proteingemisches die Spermatozoen-Eizelle-Bindung hemmen. Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass tri- und tetraantennäre polyactosaminierte komplexe N-Glykanstrukturen mit terminalen  $\beta$ -Galactoseresten an der Position Asn<sub>220</sub> des ZPB-Proteins für eine hochaffine Bindung beider Gameten verantwortlich sind (Yonezawa et al., 2005).

Auf der Spermienenseite wurden beim Schwein zahlreiche ZP-bindende Proteine beschrieben. Hierzu gehören unter anderen die Spermadhäsine, die eine neue Klasse tierischer Lektine repräsentieren: AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I und PSP-II. AQN-1, AQN-3 und AWN zeigen Bindungsaffinität gegenüber N- und O-Glykanstrukturen, die die Sequenzen Gal $\beta$ 1,3GalNAc und Gal $\beta$ 1,4GlcNAc tragen. PSP-II hingegen weist Mannose-6-Phosphat-Bindungsaffinität auf (Töpfer-Petersen, 1999a, Jansen et al., 2001, Töpfer-Petersen et al., 2005). Ekhlesi-Hundrieser et al. (2005) zeigten, dass AQN-1 zusätzlich Mannose-Bindungseigenschaft besitzt. Das oberflächenassoziierte Spermienprotein P47 ist homolog zu dem SED1 der Maus und konnte ebenfalls als ZP-bindendes Protein charakterisiert werden (Ensslin et al., 1998). Zonadhäsin ist ein weiteres ZP-bindendes Protein, das auf der periakrosomalen Spermienoberfläche aller Säugetiere lokalisiert ist (Töpfer-Petersen, 1999a). Die molekularen Mechanismen seiner ZP-Bindung sind noch ungeklärt. Proakrosin/Akrosin ist eine intraakrosomale Serinprotease, die an der sekundären Spermatozoen-ZP-Bindung und an der limitierten Hydrolyse der ZP während der Penetration des Spermatozoons beteiligt ist. Wie bei der Maus interagieren Cluster von basischen Aminosäuren des Akrosin-Moleküls mit Sulfat-Gruppen der

polylactosaminierten N- und O-Glykanstrukturen der ZP (Töpfer-Petersen, 1999a, Jansen et al., 2001). Das bedeutet, dass die Mechanismen der sekundären Gametenbindung bei Maus und Schwein konserviert sind.

Über das Rezeptorsystem bei anderen Tierarten existieren nur wenige Daten. Beim Rind konnte durch Hemmungsversuche die essentielle Rezeptorrolle von  $\alpha$ -Mannosylresten der N-gebundenen Oligosaccharidketten der ZP demonstriert werden (Amari et al., 2001).

Dem ZPB-Protein des Kaninchens wurde Spermatozoen-bindende Funktion zugeteilt, und das ZP-bindende Spermienprotein sp17 (aus der RSA-Familie – *rabbit sperm autoantigen*) weist hohe Bindungsaffinität gegenüber sulfatierte Kohlenhydrate auf und besitzt darüber hinaus eine potentielle Galactose-Bindungsdomäne (Benoff, 1997a).

Auf der periakrosomalen Oberfläche humaner Spermatozoen sind Bindungsstellen für Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin (Benoff, 1997a,b, Mori et al., 1989), für selektinähnlichen Liganden wie Sialyl-Lewis<sup>x(a)</sup> und fucosylierte und sialylierte GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc (LacdiNAc)-Antennen von Glycodelin A (Oehninger et al., 1998) detektiert worden.

Chiu et al. (2004) zeigten, dass Glycodelin A und Glycodelin F (sekretorische Glykoproteine, die unter Östrogen-Kontrolle vom Endometrium exprimiert werden) die Spermatozoen-ZP-Bindung hemmen, indem sie lektinähnliche Bindungsstellen auf der Spermienoberfläche blockieren. Dies ist auf die Mannose- und Fucosereste des Glycodelins A und die Mannose-, Fucose- und N-Acetylglucosaminreste des Glycodelins F zurückzuführen. Vermutlich verläuft die Gameteninteraktion beim Menschen nach einem selektinähnlichen Mechanismus.

Die Daten, die beschrieben wurden, deuten darauf hin, dass bei der Gametenerkennung multimere Rezeptorsysteme beteiligt sind, die wahrscheinlich nach einem hierarchischen Mechanismus funktionieren. Die primäre Kohlenhydrat-Protein-Bindung kann Konformationsänderungen in der Spermienmembran hervorrufen, die zu der Induktion der Akrosomreaktion und der anschließenden ZP-Penetration führen. Dieses Phänomen könnte von sekundären Protein-Protein-Interaktionen unterstützt werden (Töpfer-Petersen, 1999a,b).

### 1.3.3 Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion

#### 1.3.3.1 Etablierung und Funktion des Spermienreservoirs des Eileiters

Während der Insemination werden Millionen von Spermatozoen in dem weiblichen Genitaltrakt deponiert. Nur einige Tausend davon gelangen in die Eileiter und nur ein Spermatozoon befruchtet schließlich die Eizelle. Die Spermien sind hochspezialisierte Zellen, deren Leben relativ kurz ist. Andererseits besteht zwischen der Besamung und der Befruchtung oft eine lange Zeitspanne, die die Spermatozoen überleben müssen. Um das Treffen zwischen dem Spermatozoon und der Eizelle zum richtigen Zeitpunkt zu gewährleisten, wird die Spermienfunktion von dem Eileiter und der Eizelle kontrolliert (Töpfer-Petersen, 1999a,b). Zu diesem Zweck hat sich im Laufe der Evolution in dem Genitaltrakt des weiblichen Tieres ein Spermienreservoir entwickelt. Diese alte und erfolgreiche Fortpflanzungsstrategie ist in dem gesamten Tierreich sehr verbreitet. Bei verschiedenen Tierarten wie Insekten, Reptilien und Vögeln sind spezielle anatomische Strukturen vorhanden, die zur Spermienlagerung über Tage, Wochen und Monate dienen. Bei vielen Insekten werden beispielsweise Spermatophoren (sackartige Strukturen im weiblichen Tier) gebildet, die über einen Gang mit dem Genitaltrakt verbunden sind. Ausbuchtungen der Vagina oder des Infundibulums bei Reptilien und lange Tubuli im Epithel des Eileiters bei Vögeln haben sich für die Speicherung von Spermatozoen spezialisiert. In diesen Gebilden können die Spermatozoen sehr lange überleben, bevor durch kontrollierte Aktivierung die Befruchtung ermöglicht wird. Diese Strategie bietet viele Vorteile: die Zeit der Paarung muss nicht mit der Zeit der Ovulation übereinstimmen, in Folge dessen können unterschiedliche ökologische Nischen besetzt werden; die Paarungshäufigkeit nimmt ab und auch die damit verbundenen Gefahren. Durch eine einzige Paarung können die Eizellen aufeinander folgender Ovulationen befruchtet werden (Töpfer-Petersen et al., 2003).

Mit Ausnahme von den primitiven Beuteltieren (Marsupialia), bei denen die Spermatozoen in Krypten der Schleimhaut des Eileiters unbeweglich liegen, sind bei den hoch entwickelten placentaren Säugetieren keine anatomischen Strukturen zur Spermienlagerung vorhanden. Hier werden die Spermatozoen in dem kaudalen Isthmus des Eileiters meistens nur für kurze Zeit (wenige Stunden) gelagert, indem sie an das oviduktale Epithelium binden.

Das Spermienreservoir beim Säuger erfüllt die folgenden Funktionen:

1. Selektion einer befruchtungsfähigen Spermienpopulation;
2. Erhalt der Vitalität der Spermien bis zum Zeitpunkt der Ovulation;
3. Modulation der Kapazitation;
4. Verhinderung der Polyspermie durch Regulation des Spermientransports und Begrenzung der Spermienanzahl am Ort der Befruchtung (Töpfer-Petersen et al., 2002, 2003).

Man spricht daher von einem funktionellen Spermienreservoir des Eileiters.

Nachdem die Spermatozoen über die uterotubale Verbindung den Eileiter erreichen, werden sie von der präovulatorisch ödematisierten Mukosa und dem dadurch entstandenen sehr engen Lumen im Isthmusbereich des Eileiters gehalten (Suarez, 1998a, 2002, Hunter, 2002). So wird der Kontakt zwischen den Spermatozoen und der epithelialen Mukosa erleichtert, wobei nur die intakten motilen, nichkapazitierten Spermatozoen binden können. Die Zellen, die in dem Lumen des Eileiters bleiben, sind meistens entweder frühzeitig kapazitiert oder weisen morphologische Defekte auf und werden von der Bindung ausgeschlossen (Suarez, 1998a, 2002, Fazeli et al., 1999, Töpfer-Petersen et al., 2002, 2003, Petrunkina et al., 2001a, Rodriguez-Martinez et al., 2005). Bei verschiedenen Tierarten (Hamster, Schwein, Pferd, Rind, Kaninchen) konnte in vitro durch Co-Inkubation von nichtkapazitierten Spermatozoen mit frisch präparierten kleinen Gewebestückchen aus dem Eileiterepithel (Ovidukt-Explantate) oder epithelialen Membranpräparation festgestellt werden, dass in Anwesenheit von Oviduktepithelzellen das Leben der Spermatozoen deutlich verlängert wird und ihre Befruchtungsfähigkeit länger erhalten bleibt (Suarez, 2001, Töpfer-Petersen et al., 2002). Um den Kontakt mit der Eizelle, die Akrosomreaktion und die anschließende Fusion zu ermöglichen, unterliegen die Spermatozoen einem Aktivierungsprozess, den man als Kapazitation bezeichnet. Kapazitation ist mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, Tyrosin-Phosphorylierung und Reorganisation der Zelloberfläche und allgemein mit einer kontrollierten Destabilisierung der Plasmamembran durch Cholesterol-Efflux verbunden (Yanagimachi, 1994). Kapazitierte Spermatozoen sind daher nur für eine kurze Zeitspanne befruchtungsfähig. Überschreiten sie dieses Zeitfenster dann erleiden sie zwangsweise den Zelltod. Durch die Bindung der Spermatozoen an das Oviduktepithel wird eine vorzeitige Kapazitation verhindert und die Lebensfähigkeit der Spermatozoen erhöht, so dass das Treffen der beiden

Gameten zum richtigen Zeitpunkt ermöglicht wird (Petrunkina et al., 2001b, Töpfer-Petersen et al., 2002, 2003, Hunter und Rodriguez-Martinez, 2004).

Die Loslösung von dem Epithel ist mit der Induktion der Kapazitation und der Hyperaktivierung der Spermatozoen verbunden (Yanagimachi, 1994). Die Hyperaktivierung bedeutet eine Veränderung des Bewegungsmusters der Spermatozoen, die ihre Entfernung von dem Oviduktepithel und die Bewegung in die Richtung der ovulierten Eizelle unterstützt. Die Signalwege, die diese Phänomene induzieren und kontrollieren sind noch unbekannt. Erste Hinweise sprechen dafür, dass chemotaktische Signale der Eizelle eine wichtige Rolle bei der Navigation der Spermatozoen spielen (Eisenbach, 1999). Über die chemotaktische Wirkung der follikularen Flüssigkeit auf die Spermatozoen wurde bei Maus (Oliveira et al., 1999), Kaninchen (Fabro et al., 2002) und Mensch (Sun et al., 2005) berichtet. Es wurde beobachtet, dass nicht alle Spermatozoen auf die chemotaktischen Signale antworten, sondern nur kleine Populationen von kapazitierten Spermatozoen sich von dem Oviduktepithel lösen und in Richtung Eizelle schwimmen (Eisenbach, 1999, 2004). Dadurch geschieht eine weitere Selektion von vitalen befruchtungsfähigen Spermatozoen.

### **1.3.3.2 Kohlenhydrat-Protein-Interaktion bei der Etablierung des Spermienreservoirs beim Säugetier**

Ähnlich wie bei der Gameteninteraktion spielen bei der Etablierung des Spermienreservoirs im Eileiter Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen eine Rolle. Hier sind ebenfalls kohlenhydratbindende Proteine der Spermienoberfläche für die Erkennung von spezifischen Kohlenhydratstrukturen verantwortlich, die von dem Oviduktepithel exprimiert werden. Die physiologische Bedeutung dieses Erkennungsystems ist schon weitgehend beschrieben. Im Gegensatz dazu sind die molekularen Mechanismen und die daran beteiligten Proteine noch unbekannt.

Zum ersten Mal konnte die Beteiligung von Kohlenhydratstrukturen an der Spermatozoen-Ovidukt-Bindung beim Hamster nachgewiesen werden. De Mott et al. (1995) zeigten, dass Fetuin die Bindung der Spermatozoen an das Oviduktepithel inhibiert, und dass offensichtlich Sialsäurereste bei dieser Interaktion involviert sind. Es konnten ebenfalls auf der Spermienoberfläche Sialsäurebindungsstellen detektiert werden, wobei bei den hyperaktivierten, sich lösenden Spermatozoen eine Abnahme der Bindungsstellen beobachtet wurde (De Mott et al., 1995).

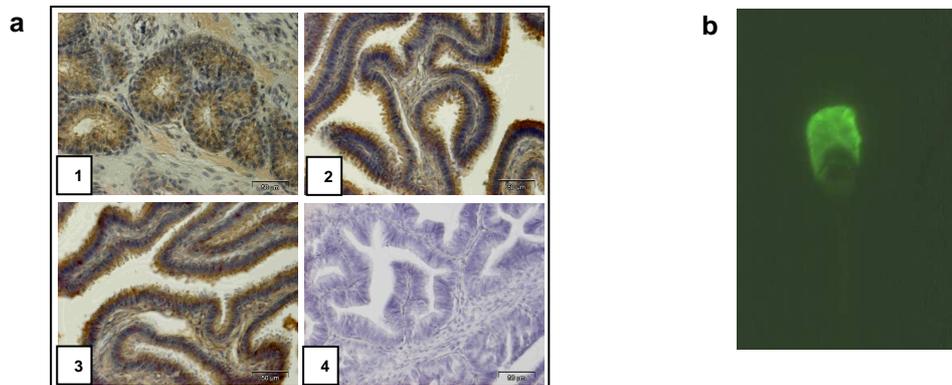
Asialofetuin hemmt über seine terminalen Galactosereste die Spermatozoen-Ovidukt-Bindung beim Pferd (Dobrinski et al., 1996). Cortes et al. (2004) konnten Sialsäureresten auf der epithelialen Oberfläche des Eileiters und Sialsäure-bindende Spermienproteine bei der Ratte nachweisen.

Am besten sind die Rezeptorsysteme von Rind und Schwein untersucht. Inhibitionsversuche beim Rind haben gezeigt, dass Fuc $\alpha$ 1,4Gal $\beta$ 1,3GlcNAc (Lewis<sup>a</sup>-Trisaccharid) den effizientesten Hemmstoff der Spermatozoen-Ovidukt-Bindung darstellt (Lefebvre et al., 1997, Suarez et al., 1998b). Die gleichen Autoren konnten lektinhistochemisch Fucosereste auf der Epitheloberfläche des Eileiters nachweisen. Das Seminalplasmaprotein PDC-109, das die Oberfläche nichtkapazitierter boviner Spermatozoen besetzt, konnte als Rezeptor für die fucosylierten Glykanstrukturen des Ovidukts identifiziert werden (Ignoltz et al., 2001, Gwathmey et al. 2003).

### 1.3.3.3 Das Rezeptorsystem beim Schwein

Das Rezeptorsystem beim Schwein wurde zuerst an Hand von in vitro Ovidukt-Explant-Assays (OEA) untersucht (Gehlhaar, 1999). Bei diesem Test werden kleine Gewebestückchen aus den epithelialen Falten des kaudalen Isthmus des Eileiters frisch gewonnen und mit Spermatozoen inkubiert. Die Methode erlaubt die Beobachtung der Spermatozoen-Ovidukt-Bindung unter in-vivo-nahen Bedingungen. Bei den Inhibitionsversuchen mit verschiedenen Glykoproteinen hatte nur Ovalbumin eine hemmende Wirkung auf die Spermatozoen-Epithel-Bindung (Gehlhaar et al., 2000). Wagner et al. (2002) konnten zeigen, dass die Oligomannosyl- und Hybrid-Typ N-Glykane des Ovalbumins und Mannopentaose (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) mit großer Effizienz die Bindung hemmen. Asialofetuin mit terminalen Galactoseresten weist eine schwache Inhibition auf. Als potenzieller Kohlenhydrat-Rezeptor auf der Spermienseite wurde das Spermadhäsin AQN-1 vorgeschlagen (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005). Dieses Protein weist eine große Bindungsaffinität gegenüber Man $\alpha$ 1,3(Man $\alpha$ 1,6)Man und Gal $\beta$ 1,3GalNAc und eine schwache Affinität gegenüber Gal $\alpha$ 1,3GalNAc auf. Außerdem inhibiert AQN-1 die Bindung der Spermatozoen an das Oviduktepithel. Die gleichen Autoren konnten durch lektinhistochemische Analyse des Eileiterepithels und durch SDS-PAGE/Lektin-Blot der epithelialen apikalen Membranfraktion nachweisen, dass Oligomannosyl-Strukturen auf der Epithelschicht des Eileiters exprimiert werden. Mannose-Bindungsstellen auf der periakrosomalen Spermienoberfläche wurden ebenfalls detektiert (Abb. 2). Zusätzlich

konnte demonstriert werden, dass unter Kapazitationsbedingungen sowohl die Mannose-Bindungsstellen als auch die Bindungskapazität der Spermatozoen an das Oviduktepithel mit der Inkubationszeit progressiv abnehmen. Diese Daten zeigen, dass für die Bildung des Spermienreservoirs beim Schwein Oligomannosyl-N-Glykane die entscheidende Rolle spielen.



**Abb. 2:** (a) Lektin histochemischer Nachweis der Oligomannosylstrukturen im Oviduktepithel mit dem mannosenspezifischen Lektin GNA; (1) uterotubale Verbindung, (2) Isthmus, (3) Ampulla, (4) Hemmung der Lektinbindung mit  $\alpha$ -Methylmannopyranosid; (b) Nachweis der Mannose-Bindungsstellen auf der Spermienoberfläche mit Mannotriose-PA-FITC; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005

Beobachtungen bei Schwein (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005), Rind (Ignoltz et al., 2001, Suarez, 2002) und Hamster (De Mott et al., 1995) zeigten, dass kapazitierte und hyperaktivierte Spermatozoen sehr wenig oder überhaupt nicht an das Oviduktepithel binden. Eine zeitabhängige Abnahme der Kohlenhydrat-Bindungsstellen auf der Spermienoberfläche während der Kapazitation wurde ebenfalls demonstriert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Induktion der Kapazitation mit dem Verlust der kohlenhydratbindenden Rezeptoren auf dem Spermienkopf verbunden ist. Dieses Ereignis kann die Loslösung der Spermatozoen von dem Epithel und ihre funktionelle Vorbereitung für das Treffen mit der Eizelle bewirken.

## 1.4 Zielsetzung

Die Etablierung eines Spermienreservoirs im weiblichen Genitaltrakt ist ein sehr wichtiges Ereignis für die Fortpflanzung der Säugetiere. Dadurch werden die Selektion einer befruchtungskompetenten Spermienpopulation und ihre Bereitstellung zum Zeitpunkt der Ovulation gewährleistet. Es konnte an verschiedenen Tierarten demonstriert werden, dass für die Kommunikation zwischen den Spermatozoen und dem Eileiter kohlenhydratvermittelte Prozesse eine Schlüsselrolle spielen. Daher ist die Spermatozoen-Ovidukt-Bindung ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung wichtiger biologischer Vorgänge wie Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen und der Rolle post-translationaler Modifikationen (z.B. Proteinglykosylierung).

Erste Untersuchungen beim Schwein demonstrierten die Beteiligung von Oligomannosyl-Strukturen des Oviduktepithels an der Spermatozoen-Eileiter-Interaktion. Als Kandidaten-Rezeptor auf der Spermienseite konnte das mannosebindende Spermadhäsin AQN-1 identifiziert werden. Das Eileiterepithel exprimiert zahlreiche Glykoproteine, deren Identität und Funktion bei den Prozessen der Befruchtung bis jetzt weitgehend unbekannt sind. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Kenntnisse über die Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion beim Schwein sollen in dieser Arbeit mannosereiche Glykoproteine aus der epithelialen Membranoberfläche des Eileiters und aus der Oviduktflüssigkeit isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Mittels eines massenspektrometrischen Ansatzes soll die N-Glykosylierung dieser Proteine untersucht werden, wobei Glykan-analytische Methoden etabliert und optimiert werden sollen. Zusätzlich soll die mögliche Rolle der mannosereichen Oviduktglykoproteine als Spermienliganden *in vitro* getestet werden.

Diese Untersuchungen können neue Erkenntnisse über das Glykom und Proteom des porcinen Ovidukts bringen, und sind die Basis für die Aufklärung des Rezeptorsystems, das an der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion beim Schwein beteiligt ist.

## 2. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in Analysenqualität von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

### 2.1 Gewinnung und Aufarbeitung des biologischen Materials

#### 2.1.1 Isolierung der apikalen Membran aus porcinen Oviduktepithelzellen

Die Isolierung der oviduktalen apikalen Membranfraktion (im Folgenden auch OAMF genannt) erfolgte nach der Methode von Fazeli et al. (2003). Die Eileiter wurden in kaltem PBS von dem Schlachthof transportiert und gleich weiterverarbeitet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Eileiter wurden mit einer kleinen Schere longitudinal geöffnet und in einer Petri-Schale fixiert. Die Epithelschicht von je 10 Eileitern wurde mittels eines Objektträgers abgestrichen und in 20ml kaltem PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation (5min bei 200x g) wurden die sedimentierten Epithelzellen in 20ml Homogenisationsmedium A resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bei -160°C schockgefroren. In diesem Zustand können die Zellen bis zur späteren Isolierung der apikalen Membranfraktion bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Isolierung der apikalen Membran geschah schrittweise durch MgCl<sub>2</sub>-Extraktion und differentiale Zentrifugation nach dem folgenden Schema:

Die Epithelzellen von 10 Eileitern wurden nach Auftauen bei RT in 20ml Homogenisationsmedium A mittels eines Ultra-Turrax T25-Homogenisator (IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH&Co KG, Staufen, Deutschland) 1min bei 24 000 upm homogenisiert. Es wurde 200µl 1M MgCl<sub>2</sub> dazu gegeben und das Homogenat 30min inkubiert. Zur Entfernung der groben Zelltrümmer und Organellen wurde für 5min bei 3000x g (Sorvall RC 5C Plus, Du Pont, USA) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und durch Zentrifugation für 30min bei 90 000x g (OTD Combi Sorvall UZ, Du Pont, USA) die Membranfraktion sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20ml Homogenisationsmedium B aufgenommen und mit 10 Schlägen in einem Potter 412 S (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert. Es folgte eine zweite Extraktion mit 200µl 1M MgCl<sub>2</sub> für 30 min und

eine Zentrifugation für 15 min bei 3000x g. Der Überstand wurde entnommen und die apikale Membran bei 90 000x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 20ml PBS, pH 7,4 gewaschen, mit 10 Schlägen homogenisiert und bei 90 000x g zentrifugiert. Das Sediment, das die apikale Membran enthält wurde direkt in 500-1000µl Solubilisierungspuffer aufgenommen und durch eine 0,9x70mm Sterican Nadel resuspendiert.

Homogenisationsmedium A:

60mM Mannitol  
5mM EGTA  
3µM PMSF  
in TBS, pH 7,4

Homogenisationsmedium B:

60mM Mannitol  
7mM EGTA  
3µM PMSF  
in TBS, pH 7,4

TBS:

50mM Tris-HCl  
150mM NaCl  
pH 7,4

PBS:

150 mM NaCl  
9,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,49 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4

### **2.1.1.1 Reinheitskontrolle der apikalen Membranfraktion**

#### **2.1.1.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die Reinheit der isolierten Membranfraktion wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Anatomie an der Universität Göttingen kontrolliert. Zu diesem Zweck wurde eine Portion der isolierten apikalen Membran nach der letzten Sedimentation in 500µl Fixationslösung aufgenommen und durch eine 0,9x70mm Sterican Nadel resuspendiert, wodurch sich die typischen Membranmikrovesikel bildeten. Die

weitere Vorbehandlung folgte der Standardprozedur für die TEM: Nachfixierung mit 1% OsO<sub>4</sub>, Entwässerung schrittweise in Acetonlösungen mit ansteigender Konzentration (30-100%), Einbettung in Spurr-Medium und Anfertigung von Ultradünnschnitte.

Fixationslösung:

- 50ml 0,2M Phosphatpuffer
- 6ml 25% Paraformaldehyd
- 6ml 25% Glutharaldehyd
- 38ml dest.H<sub>2</sub>O

**2.1.1.1.2  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Test**

Das Enzym  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ist ein spezifischer Marker für die epitheliale apikale Membran. Durch die Messung der Enzymaktivität am Anfang und am Ende der Isolierungsprozedur wurde die Anreicherung der apikalen Membran in der isolierten Membranfraktion kontrolliert. Der Test wurde mit dem  $\gamma$ -GT Diagnostic Kit (Randox Laboratories GmbH, Krefeld, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers ausgeführt. Die Reaktion läuft nach dem folgenden Prinzip:



Jeweils 100 $\mu$ l des Ausgangshomogenats der Epithelzellen und der isolierten apikalen Membranfraktion wurden mit 1ml  $\gamma$ -GT-Reagenz gemischt und bei 37°C inkubiert. A<sub>405</sub> wurde nach 0, 1, 2 und 3min in einer Plastikmikroküvette mit 1cm Schichtdicke an Hand eines Genova-Tischphotometers (Jenway Ltd., U.K.) gemessen. Das gelbfarbige Reaktionsprodukt p-Nitroaniline hat ein Absorptionsmaximum bei 405nm und die Änderung der A<sub>405</sub> im Laufe der Enzymreaktion ist proportional der Aktivität der  $\gamma$ -GT.

Die Ausrechnung der Enzymaktivität erfolgte an Hand folgender Formel:

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times \text{Assayvolumen}(\text{ml}) \times 1000}{E \times \text{Schichtdicke} \times \text{Probenvolumen}(\text{ml})} = \text{U/L } \gamma\text{-GT}$$

$$E = 9,9\text{cm}^2/\mu\text{mol bei } 405\text{nm für p-Nitroaniline}$$

### **2.1.1.2 Solubilisierung der Membranproteine**

Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte durch eine Detergenz-Extraktion mit 1% OGP in PBS, pH 7,4 unter Proteasen-Schutz durch EDTA, Benzamidin und PMSF (jeweils 1mM). Die OAMF aus 10 Eileitern wurde mit 1ml Extraktionspuffer versetzt und bei 4°C für 6h bis ü/N mit zweimaligem Pufferwechsel (jeweils 600µl) inkubiert. Die solubilisierten Membranproteine wurden vor jedem Pufferwechsel für 30min bei 14 000x g abzentrifugiert und entnommen. Die Proteinkonzentration in den Extrakten wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

#### Solubilisierungspuffer:

- 1% OGP
- 1mM EDTA
- 1mM Benzamidine
- 1mM PMSF
- in PBS, pH 7,4

### **2.1.2 Gewinnung der Oviduktflüssigkeit aus porcinem Ovidukt**

Die Oviduktflüssigkeit (im Folgenden auch OF genannt) wurde nach der Methode von Bui et al. (1990) isoliert. Die Eileiter wurden in kaltem PBS von dem Schlachthof transportiert und gleich weiterverarbeitet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Jeder Eileiter wurde mit 10ml 0,15M NaCl gespült. Die Manipulation wurde mittels einer 1.20 x 50mm Sterican Nadel mit abgeschnittener Spitze, um das Gewebe nicht zu verletzen, ausgeführt. Durch Zentrifugation für 10min bei 2200x g (Sorvall RC 5C Plus, Du Pont, USA) wurden die Zellreste entfernt und der Überstand dialysiert. Die Dialyse erfolgte in einer Spectra/Por Dialysemembran mit 32mm Breite und 6-8kDa MWCO (Spectrum Laboratories, Inc., Canada) wie folgt: 24h gegen 10mM Tris, pH 8,2 mit zweimaligem Pufferwechsel und anschließend 24h gegen bidest. H<sub>2</sub>O mit zweimaligem Wechsel unter leichtem Rühren. Die Oviduktflüssigkeit wurde portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

## 2.2 Analytische Methoden

### 2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Methode (Bradford, 1976) basiert auf der Reaktion der basischen Aminosäuren mit dem Farbstoff Coomassie-Blue. Dabei ergibt sich für das Addukt ein Absorptionsmaximum von 595nm. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge lässt sich die Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung einfach bestimmen, nachdem eine Eichkurve erstellt wurde. Als international anerkannter Eichungsstandard hat sich Rinder-Serum-Albumin (BSA) durchgesetzt. Für die Erstellung der Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe aus der Eichlösung (0,5mg/ml BSA) hergestellt (Tab. 1).

**Tabelle 1: Herstellung einer Verdünnungsreihe aus der Eichlösung**

Protein,mg/ml	0,5	0,25	0,1	0.075	0,05	0,025	0,01	0,007	0,005
Eichlösung, µl	100	250	100	75	50	25	10	7,5	5
H <sub>2</sub> O/Puffer,µl	0	250	400	425	450	475	490	492,5	495

#### Coomassie-Reagenz:

20mg Coomassie-Blue G250

25ml 96% Ethanol

50ml 85% o-Phosphorsäure

bis 500ml dest.H<sub>2</sub>O

Filtrieren

Für den Test wird 100µl Proteinlösung mit 1ml Coomassie-Reagenz gut gemischt, genau 2 min bei RT inkubiert und  $A_{595}$  gemessen. Die Messung erfolgte in einer Plastikmikroküvette mit 1cm Schichtdicke mit einem eines Genova-Tischphotometer (Jenway Ltd., U.K.). Als negative Kontrolle wird anstatt der Proteinlösung 100µl Puffer (oder dest.H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Die unbekanntem Proteinprobe muss so verdünnt werden, dass die Messwerte in dem linearen Bereich der Eichkurve liegen.

## 2.2.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970) in eine Mini-Protean II- Gelkammer (Bio-Rad, München, Deutschland). Als Trenngel wurde eine 8%-tige Acrylamid-Bisacrylamidlösung angesetzt, die nach Zugabe von Polymerisationsinitiator (TEMED) und –katalysator (APS) zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und zum Erhalt einer glatten Geloberkante vorsichtig mit dest. H<sub>2</sub>O überschichtet wurde. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit dem 5%-tigen Sammelgel überschichtet. Die zu analysierenden Proben wurden im Volumenverhältnis 5:1 mit 5x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Übergang der Proben vom Sammel- zum Trenngel bei konstanter Spannung von 100 V und wurde anschließend bei 200 V fortgesetzt. Sie wurde beendet, wenn der Frontmarker Bromphenolblau an der Gelunterkante austrat. Als Molekulargewichtsmarker wurden Page Ruler™ Prestained Protein Ladder 10-180kDa (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und Biotinylierter Broad Molecular Weight- (BMW) Standard (Bio-Rad, München, Deutschland) eingesetzt.

### Zusammensetzung eines 8%-tigen Trenngels:

- 2,3ml dest.H<sub>2</sub>O
- 1,3ml 29,2%Acryl-/0,8%Bisacrylamid-Mix (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 1,3ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8
- 50µl 10% SDS
- 50µl 10% APS
- 3µl TEMED

### Zusammensetzung eines 5%-tigen Sammelgels:

- 1,4ml dest.H<sub>2</sub>O
- 330µl 29,2%Acryl-/0,8%Bisacrylamid-Mix
- 250µl 1M Tris-HCl, pH 6,8
- 20µl 10% SDS
- 20µl 10% APS
- 2µl TEMED

5x Auftragspuffer:

250mM Tris-HCl  
10% SDS  
50% Glycerin  
Bromphenolblau  
pH 6,8

Laufpuffer:

25 mM Tris-HCl  
192 mM Glycin  
0,1% SDS, pH 8,3

### **2.2.2.1 Coomassie Brilliant Blue-Färbung**

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln in CBB-Färbelösung (Empfindlichkeitsgrenze etwa 200-400ng/Bande) gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel drei- bis viermal 30-60 min in Entfärbelösung und zum Schluss in dest.H<sub>2</sub>O gewaschen.

Coomassie Brilliant Blue- (CBB) Färbelösung:

0,2% Coomassie Brilliant Blue R250  
0,05% Coomassie Brilliant Blue G250  
40,9% Ethanol  
5% Methanol  
10% Essigsäure

Entfärbelösung:

20% Methanol  
10% Essigsäure

### **2.2.2.2 Modifizierte Coomassie-Färbung**

Da das herkömmliche Coomassie-Färbungsprotokoll die Nutzung von organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Essigsäure erfordert, die die Proteine stark im Gel fixieren und die anschließende massenspektrometrische Analyse negativ beeinflussen können, wurden die Gele alternativ mit modifizierter Coomassie-Färbung auf Wasserbasis gefärbt (PageBlue Protein Stain, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; Empfindlichkeitsgrenze etwa 5 ng/Bande). Die Gele wurden zunächst

mit dest.H<sub>2</sub>O (3 x 10min) gewaschen, um SDS zu entfernen. Danach wurden sie für 2h bis ü/N in 25ml Färbelösung inkubiert. Das Entfärben erfolgte durch zweidreimaliges Waschen in dest.H<sub>2</sub>O. Die Proteinbanden von Interesse wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und für die anschließende enzymatische Spaltung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.3 Lektin-Blotting

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Semi-Dry-Methode (Semi-Dry-Blotter; Biometra, Göttingen, Deutschland) auf PVDF-Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland) transferiert (Towbin et al., 1979).

Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol befeuchtet, mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend - ebenso wie das Gel sowie sechs auf Gelgröße zugeschnittene Lagen Blotpapier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) - in Blotpuffer äquilibriert. Das Blotsandwich bestand, ausgehend von der Anode, aus drei Lagen Blotpapier, der PVDF-Membran, dem Gel und drei weiteren Lagen Blotpapier. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup>. Die Qualität des Transfers wurde durch eine fünfminütige reversible Färbung der Membran in Ponceau S-Färbelösung und anschließender Entfärbung in dest. H<sub>2</sub>O überprüft. Die von der Proteinprobe unbesetzten Membranbindungsstellen wurden ü/N mit Blockierlösung blockiert.

Für die Analyse der immobilisierten Oviduktproteine wurden die folgenden biotinylierten Lektine in eine Konzentration von 1µg/ml eingesetzt: Galantus Nivalis Agglutinin (GNA), Concanavalin A (ConA), Aleuria Aurantia Agglutinin (AAA), Sambucus Nigra Agglutinin (SNA) und Amaranthus Caudatus Agglutinin (ACA), (Vector Laboratories Ltd., Canada). Die Bindung erfolgte für 1h bei RT unter Schütteln. Das ungebundene Lektin wurde durch Inkubation im Waschpuffer entfernt (3 x 10min) und die Membran 30min bei RT unter Schütteln mit AP-Streptavidin (Verdünnung 1:100 000 in Waschpuffer; Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Das überschüssige Streptavidin wurde durch intensives Waschen (8 x 5min) unter Schütteln entfernt und die Membran 2 x 5min in Detektionspuffer äquilibriert. Die Detektion erfolgte mit frisch angesetzter Substratlösung im Dunkeln bis die typische lila Färbung auftrat. Als negative Kontrolle wurde parallel eine Proteinprobe nur mit Streptavidin-AP 30min behandelt und anschließend zusammen mit der Probe entwickelt. Die Spezifität der Lektinbindung wurde auf einer dritten Probe durch

kompetitive Hemmung mit 200mM  $\alpha$ -Methylmannopyranoside (für GNA und ConA), 200mM Fucose (für AAA), 500mM Lactose (für SNA) und 1mg/ml Asialofetuin (für ACA) kontrolliert. Hierbei wurden die Membranstreifen 5min in Hapten-Lösung vorinkubiert und anschließend die Lektinbindung in der Anwesenheit der hemmenden Substanz durchgeführt. Die Waschgänge und die Detektion erfolgten wie oben beschrieben.

Blottingpuffer:

39 mM Glycin  
48 mM Tris-HCl  
0,0375% SDS  
20% Methanol

Blockierungslösung:

3% BSA  
0,05% Tween 20  
in TBS, pH 7,4

Ponceau S-Färbelösung:

0,5% Ponceau S in 1% Essigsäure

Waschpuffer:

TBS, pH 7,4  
1% Tween 20

Detektionspuffer:

0,1M Tris-HCl  
0,1M NaCl  
pH, 9,5

Substratlösung:

50 $\mu$ l NBT (75mg/ml in 70% DMF)  
40 $\mu$ l BCIP (50mg/ml in 100% DMF)  
20ml Detektionspuffer

## **2.2.4 Lektin-Affinitätschromatographie mit GNA**

Die mannosereichen Oviduktglykoproteine wurden durch Lektin-Affinitätschromatographie aus dem gesamten Proteingemisch isoliert und angereichert. Die AffiSep-GNA-Säulen 0,75ml und die Arbeitspuffer wurden von Firma Galab

Technologies GmbH (Geesthacht, Deutschland) bezogen und manuell nach Angaben des Herstellers betrieben. Das Proteingemisch (ca. 5mg OF-Proteine oder OAMF-Proteine) wurde in 3ml Adsorptionspuffer (PBS, pH 7,2) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde erneut auf die Säule appliziert, um eine vollständige Bindung der Proteine zu gewährleisten. Die ungebundenen Proteine wurden mit mindestens 3ml Adsorptionspuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Glykoproteine erfolgte mit 3ml Elutionspuffer (200mM  $\alpha$ -Methylmannose in PBS, pH 7,2). Die Säule wurde mit 10ml Adsorptionspuffer regeneriert und konnte erneut eingesetzt werden. Der Lauf der Säule wurde UV-photometrisch bei 280nm kontrolliert. Die GNA-bindende Fraktion wurde mittels eines VivaSpin2 Konzentratoren, 10kDa MWCO (Viva Science, Hannover, Deutschland) auf 100 $\mu$ l konzentriert.

### **2.2.5 Affinitätschromatographie mit Heparin**

Über Heparin-Affinitätschromatographie wurde aus der OF Oviduktin in ausreichenden Mengen isoliert. Heparin-Sapharose<sup>TM</sup> CL-6B (0,5g, Amersham Biosciences AB, Schweden) wurde ü/N in dest.H<sub>2</sub>O gequollen und anschließend in eine 2ml Säule gepackt. Das Säulenmaterial wurde mit 50ml dest.H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 6ml PBS äquilibriert. Ca. 4,5g lyophilisierte OF-Proteine wurden in 4ml PBS gelöst und über die Säule gegeben. Nach zweimaligem Binden der Probe und Waschen der Säule mit 6ml PBS, wurden die Heparin-bindenden Proteine mit 6ml 1M NaCl eluiert. Die Säule wurde mit dest.H<sub>2</sub>O für 24h regeneriert. Das Eluat wurde mittels eines VivaSpin2-Konzentratoren, 10kDa MWCO (Viva Science, Hannover, Deutschland) auf 100 $\mu$ l konzentriert.

### **2.2.6 Biotinylierung**

GNA-bindende OAMF-Glykoproteine (100 $\mu$ g/400 $\mu$ l in PBS, pH 7,4) wurden mit der doppelten Menge EZ-Link NHS Biotin (Pierce, Rockford, USA) versetzt und 30min bei RT unter Schütteln inkubiert. Das Biotin wurde zunächst als eine Stammlösung (1mg in 50 $\mu$ l DMF) vorbereitet und 10 $\mu$ l davon zu der Proteinprobe gegeben. Dabei ist es zu beachten, dass die DMF-Endkonzentration nicht 10% überschreiten darf, um die Proteinstruktur nicht zu beschädigen. Das überschüssige Biotin wurde durch viermaliges Waschen mit PBS, pH 7,4 über VivaSpin2-Konzentratoren, 10kDa MWCO (Viva Science, Hannover, Deutschland) entfernt. Zur Überprüfung der Biotinylierung wurden 3 $\mu$ g Protein auf SDS-PAGE aufgetragen und anschließend ein Protein-Blot

mit Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran ü/N bei 4°C mit Blockierungslösung blockiert. Anschließend wurde die Membran für 1h mit HRPO-Streptavidin (1:50 000; Dianova, Hamburg, Deutschland) im Waschpuffer inkubiert. Nach achtmaligem Waschen je 5min wurde die Biotinylierung durch Inkubation für 1min in 2ml Arbeitspuffer des Uptilight HRPO Blot Chemilumineszenz-Substrates (Interchim, Mannheim, Deutschland) visualisiert. Auf die Membran wurde in einer Dunkelkammer bei Rotlicht 2-10s ein Röntgenfilm (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) exponiert. Dieser wurde anschließend 30s im Entwicklungsbad (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) geschwenkt, 1min fixiert (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und nach fünfminütigem Waschen mit dest.H<sub>2</sub>O getrocknet.

Waschpuffer:

TBS, pH 7,4  
1% Tween 20

Blockierungslösung:

3% BSA  
0,05% Tween 20  
in TBS, pH 7,4

## **2.2.7 Enzymatischer Verdau**

Alle Enzymreaktionen und die nachfolgende Vorbereitung der Glykan- und Peptidproben für die massenspektrometrische Analyse erfolgten in silikonisierten Reaktionsgefäßen (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland).

### **2.2.7.1 In-Gel Spaltung mit Trypsin**

In-Gel Spaltung mit Trypsin wurde modifiziert nach dem Protokoll von Jensen et al. (1997) durchgeführt. Die Oviduktglykoproteine der GNA-bindenden Fraktion wurden auf einer 8%-tigen SDS-PAGE aufgetrennt, mit modifizierter Coomassie-Färbung detektiert und die dominanten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden in 1mm<sup>2</sup>-große Stückchen zerkleinert, 2 x 30min in 500µl Waschpuffer gewaschen und im SpeedVac getrocknet. Zur Reduktion der Proteine wurden die Gelstückchen in 300µl Reduktionspuffer aufgenommen und 30min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT und Abnahme des Reduktionspuffers wurden sie in 100% Acetonitril dehydriert und getrocknet. Die Carbamidomethylierung wurde

durch Zugabe von 300µl Jodacetamid-Puffer für 30min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Nach Abnahme der Flüssigkeit folgten 4 Waschschrirte (je 15min mit jeweils 500µl Waschpuffer) unter intensivem Schütteln. Danach wurden die Gelstückchen in 100 % Acetonitril dehydriert. Anschließend wurde das Acetonitril abgenommen, und das Gel in 100µl 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5 rehydriert. Nach 10 min wurde das gleiche Volumen an 100% Acetonitril hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde nach 15 minütiger Inkubation entfernt, und das Gel im SpeedVac getrocknet. Die Gelstückchen wurden mit 20 - 25µl Spaltpuffer bedeckt und, um das Enzym hineindifundieren zu lassen, 30min auf Eis inkubiert. Nachdem das Gel die Spaltflüssigkeit aufgenommen hat, wurde zusätzlich 100µl Spaltpuffer ohne Enzym zugegeben. Die Spaltung wurde ü/N bei 37°C durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde eine leere Gelprobe gleicher Größe entnommen und auf dieselbe Weise wie die Proteinbande behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Spaltflüssigkeit abgenommen. Die Extraktion der Peptide aus dem Gel erfolgte zuerst durch eine zehnminütige Inkubation mit 50µl dest.H<sub>2</sub>O und anschließend 2 x 60min mit jeweils 50µl Extraktionspuffer. Jeder Extraktionsschritt wurde von einer fünfminütigen Ultraschallbehandlung befolgt. Alle Inkubationsflüssigkeiten wurden vereinigt, für 5 min auf 95°C erhitzt und im SpeedVac getrocknet. Nach Entsalzen über ZipTipC18 (Millipore, Eschborn, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers wurden die Peptide für die MALDI-TOF-MS-Analyse eingesetzt.

Waschpuffer:

50% Acetonitril  
in 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5

Reduktionspuffer:

10mM DTT  
in 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5

Carbamidomethylierungspuffer:

55mM Iodacetamid  
in 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5

Spaltpuffer:

0,02µg/µl Trypsin-Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega, Mannheim, Deutschland)  
10% Acetonitril  
in 40mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5

### 2.2.7.2 In-Gel Deglykosylierung mit N-Glykosidase F

Die in-Gel Deglykosylierung wurde nach Küster et al. (1997) durchgeführt. Die Oviduktglykoproteine der GNA-bindenden Fraktion wurden auf einer 8%-tigen SDS-PAGE aufgetrennt, mit modifizierter Coomassie-Färbung detektiert und die dominanten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden in 1mm<sup>2</sup>-große Stückchen zerkleinert und in 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,0 gewaschen (2 x 30 min). Zur Reduktion der Proteine wurden die Gelstückchen in 300µl 20mM NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen, 20ml 45mM DTT hinzugegeben und 30min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurde die Carbamidomethylierung durch Zugabe von 20µl 100mM Iodacetamid für 30min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Nach Abnahme der Flüssigkeit folgten 4 Waschschrte (je 15min mit jeweils 500µl Waschpuffer) unter intensivem Schütteln. Danach wurden die Gelstückchen in 100 % Acetonitril dehydriert. Anschließend wurde Acetonitril abgenommen, und das Gel in 100µl 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,0 rehydriert. Nach 10 min wurde das gleiche Volumen an 100% Acetonitril hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde nach 15 minütiger Inkubation entfernt, und das Gel im SpeedVac getrocknet. Die Gelstückchen wurden mit 20 - 25µl Spaltpuffer bedeckt und, um das Enzym hereindifundieren zu lassen, 30min auf Eis inkubiert. Nachdem das Gel die Spaltflüssigkeit aufgenommen hat, wurden zusätzlich 100µl Spaltpuffer ohne Enzym zugegeben. Die Spaltung wurde ü/N bei 37°C durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde eine leere Gelprobe gleicher Größe entnommen und auf dieselbe Weise wie die Proteinbande behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Spaltflüssigkeit abgenommen. Die Extraktion der N-Glykane aus dem Gel erfolgte durch 3 x 30min Inkubation mit jeweils 50µl dest. H<sub>2</sub>O in einem Ultraschallbad. Alle Inkubationsflüssigkeiten wurden vereinigt und im SpeedVac getrocknet. Nach Entsalzen über eine Carbograph-Säule wurden die N-Glykane mit MALDI-TOF-MS und MS/MS analysiert.

#### Waschpuffer:

50% Acetonitril  
in 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,0

#### Spaltpuffer:

100U/ml N-Glykosidase F, rekombinant (Roche, Mannheim, Deutschland)  
in 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,0

### **2.2.7.3 In-Gel Spaltung nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F**

Die Deglykosylierung erfolgte wie in 2.2.7.2 beschrieben. Anschließend wurden die Gelstückchen in 50% Acetonitril/100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5 gewaschen (2 x 15min) und in 100 % Acetonitril dehydriert. Nach Abnahme von Acetonitril wurden sie in 100 $\mu\text{l}$  100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5 rehydriert. Nach 10 min wurde das gleiche Volumen 100% Acetonitril hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde nach 15 minütiger Inkubation entfernt, und das Gel im SpeedVac getrocknet. Die Trypsinspaltung wurde wie in 2.2.7.1 angesetzt.

### **2.2.7.4 On-Blot Deglykosylierung mit N-Glykosidase F**

Die on-Blot Deglykosylierung erfolgte modifiziert nach Zhou et al. (2004) und Küster et al. (1998). Die GNA-bindende Oviduktglykoproteine wurden auf einem ca. 60  $\text{mm}^2$  großes in Methanol und Blotpuffer äquilibriertes PVDF-Membranstück immobilisiert. Die Membran wurde bei RT getrocknet, mit Methanol befeuchtet und in 1  $\text{mm}^2$  Stückchen geschnitten. Anschließend wurden sie zweimal für 15 min in 20mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,0 gewaschen. Die Proteine wurden in 300 $\mu\text{l}$  Denaturierungspuffer und 20 $\mu\text{l}$  45mM DTT für 30 min bei 60°C denaturiert und reduziert. Nach Abkühlung auf RT wurden sie durch Zugabe von 20 $\mu\text{l}$  100 mM Jodacetamid für 30 min bei RT im Dunkeln carbamidomethyliert. Es folgten Waschschrte (4 x 15min) und 1h Inkubation in 1% PVP/50% Methanol zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen. Nach drei weiteren Waschschrten (je 15 min) erfolgte die Deglykosylierung ü/N bei 37°C. Der Inkubationspuffer wurde anschließend abgenommen, und die Glykane zusätzlich 10 min im Ultraschallbad in dest.H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Vereinigung der Extrakte erfolgte die Trocknung der Glykane für die anschließende Entsalzung.

#### Denaturierungspuffer:

6 M Guanidinhydrochlorid in 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,0

#### Waschpuffer:

50% Acetonitril in 20mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,0

#### Spaltpuffer:

60U/ml N-Glykosidase F, rekombinant (Roche, Mannheim, Deutschland)  
in 20mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,0

### **2.2.7.5 Deglykosylierung der tryptischen Glykopeptide**

Die massenspektrometrisch identifizierten Glykopeptide wurden in 5 bis 10µl 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,0, 50U/ml N-Glykosidase-F aufgenommen und ü/N bei 37°C deglykosyliert. Nach Entsalzung über ZipTipC18 wurden sie mit MALDI-TOF-MS und MS/MS analysiert.

### **2.2.7.6 Desialylierung der N-Glykanen**

Die Desialylierung der N-Glykane erfolgte mit Neuraminidase (Roche, Mannheim, Deutschland). Das Enzym wurde zusammen mit N-Glykosidase-F in eine Konzentration von 1U/ml für In-Gel Spaltung und 0,25U/ml für On-Blot Spaltung eingesetzt.

### **2.2.7.7 On-MALDI-Target Deglykosylierung**

Die Exoglykosidase-Spaltung der N-Glykane am MALDI-Target wurde modifiziert nach der Methode von Geyer et al. (1999) durchgeführt. Die Exoglykosidasen  $\alpha$ -Mannosidase aus Jack Beans,  $\alpha$ -Galaktosidase aus Green Coffee Beans und  $\alpha$ -1,3(4)-Fucosidase aus *Xanthomonas manihotis* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden wegen des Erhalts ihrer Stabilität in einer hochkonzentrierten Salzlösung geliefert, die aber die nachfolgende massenspektrometrische Analyse negativ beeinflussen könnte. Deswegen wurden die Enzyme vor der Anwendung gegen 25mM NH<sub>4</sub>-Acetat (für  $\alpha$ -Mannosidase und  $\alpha$ -Fucosidase pH 5,0 und für  $\alpha$ -Galaktosidase pH 6,0) in einer Mini-Dialysekassette All Slide-A-Lyser 10kDa, 0,1-0,5ml (Pierce, Rockford, USA) ü/N dialysiert. Neuraminidase (Roche, Mannheim, Deutschland) wurde in 25mM NH<sub>4</sub>-Acetat, pH 5,0 aufgenommen. Die  $\alpha$ -1,3(4)-Fucosidase wurde in Konzentration von 0,2mU/µl und die anderen 3 Enzyme in einer Konzentration von 2mU/µl verwendet.

#### Probenvorbereitung und On-MALDI-Target-Spaltung:

Die entsalzten Glykane wurden in 2-10µl dest.H<sub>2</sub>O aufgenommen. 1µl Probe wurde mit 1µl Matrix auf dem Target gemischt und bei RT auskristallisiert. Die Kristalle wurden mit 3µl von dem jeweiligen Enzym gelöst und gut gemischt. Das Target wurde in einer aus 50ml Falcon-Röhrchen mit entsprechendem Spaltpuffer vorbereiteten feuchten Kammer ü/N bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Tropfen bei RT wieder auskristallisiert und die gespaltenen Glykane mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

Matrix:

6-aza-2-thiothymine (ATT) 5mg/ml in dest.H<sub>2</sub>O

**2.2.7.8 Entsalzen der N-Glykane**

Die nach in-Gel oder on-Blot Deglykosylierung extrahierten N-Glykane (2.2.5.3 und 2.2.5.4) wurden modifiziert nach der Methode von Packer et al. (1998) und Wheeler und Harvey (2001) entsalzt. Hierfür wurde eine Minisäule mit 5-10 µl graphitisierendem Kohlenstoff (Alltech, Unterhaching, Deutschland) in einer ZipTip<sub>C18</sub>-Pipettenspitze (Millipore, Eschborn, Deutschland) hergestellt. Alle Beladungs-, Wasch- sowie Elutionsschritte erfolgten durch einminütige Zentrifugation des Säulenmaterials bei 14000 x g. Die Säule wurde vor dem Gebrauch sequentiell dreimal mit dreifachem Säulenvolumen 1 M NaOH, dest.H<sub>2</sub>O, 80% Acetonitril/0,1% TFA, 25% Acetonitril/0,05% TFA, 25% Acetonitril und viermal mit dest.H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Glykane wurden in 30 µl dest.H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend über die Minisäule gegeben. Salze wurden durch das dreimalige Waschen der Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen dest.H<sub>2</sub>O entfernt. Die neutralen und die sauren N-Glykane wurden durch Elution mit dreifachem Säulenvolumen von jeweils 25% Acetonitril (neutral) und 25% Acetonitril/0,05% TFA (sauer) getrennt. Die entsalzten N-Glykane wurden getrocknet und für die anschließende MALDI-TOF-MS-Analyse in 2 bis 5µl dest.H<sub>2</sub>O gelöst.

**2.2.8 Massenspektrometrie****2.2.8.1 Erstellen der Glykan-Profile mit MALDI-TOF MS**

MS-Spektren von N-Glykanen wurden auf einem Kompact MALDI-2 PE (*pulsed extraktion*)(V 5.2; Kratos Analytical, Manchester, England) im positiven oder im negativen linearen Modus aufgenommen. Es wurden 50 Laserpulse pro Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit Glykanstandards im Bereich von 800-2500 Da.

Zusätzlich wurden MS- und MS/MS-Spektren von N-Glykanen auf einem Ultraflex-MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) im positiven Reflektor-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV aufgenommen. Die MS/MS-Messungen erfolgten im LIFT-Modus. Das Mutter-Ion wurde im normalen Reflektor-Modus durch Sammeln von ca. 200 Laserpulsen detektiert. Nach Umschalten in LIFT-Modus wurden die Tochter-Ionen durch PSD

(*post source decay*) oder CID (*collision induced dissociation*) generiert. Es wurden bis zu 1500 Laserpulse pro LIFT-Spektrum akkumuliert. Das Gerät wurde mit Glykanstandards im Bereich von 800-2500 Da kalibriert.

Probenvorbereitung:

Die entsalzten Glykane wurden in 2-10µl dest.H<sub>2</sub>O aufgenommen und 0,5µl Probe mit 0,5µl Matrix auf dem Target gemischt. Die Kristallisation erfolgte bei RT. Die Kristalle wurden mit 1µl 100% Ethanol gelöst und wieder bei RT getrocknet.

Matrix für neutrale Glykane:

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 7mg/ml in Acetonitril/dest.H<sub>2</sub>O (70:30)

Matrix für saure Glykane:

2,4,6-Trihydroxy-acetophenone Monohydrat (THAP), (Fluka, Deutschland) 1mg/ml in Acetonitril/20mM NH<sub>4</sub>-citrat (50:50)

Neutrale Glykanstandards:

α3-, α6-Mannopentaose, Mannopentaose-Di-(N-Acetyl)-D-Glucosamin, Mannopentaose-Di-(N-Acetyl-D-Glucosamin)-Asparagin, Mannooctaose-Di-(N-Acetyl)-D-Glucosamin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Sialylierte Glykanstandards:

Mono-sialylated Bi-antennary Complex-Typ N-Glycan A1, Di-sialylated, Core-fucosylated Bi-antennary Complex-Typ N-Glycan A2F und Tri-sialylated, Tri-antennary Complex-Typ N-Glycan A3 (Ludger Glycotechnology Ltd., Oxford, UK)

### **2.2.8.2 Peptid- und Glykopeptid-Analyse mit MALDI-TOF MS und MS/MS**

MS- und MS/MS-Spektren von tryptischen Peptiden wurden auf einem Ultraflex-MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) im positiven Reflektor-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV aufgenommen. Die MS/MS-Messungen erfolgten im LIFT-Modus. Das Mutter-Ion wurde im normalen Reflektor-Modus durch Sammeln von ca. 200 Laserpulsen detektiert. Nach Umschalten in LIFT-Modus wurden die Tochter-Ionen durch PSD (*post source decay*) oder CID (*collision induced dissociation*) generiert. Es wurden bis zu 1500 Laserpulse pro LIFT-Spektrum akkumuliert. Das Gerät wurde mit Peptidstandards im Bereich von 700-5500 Da kalibriert.

MS-Spektren von tryptischen Glykopeptiden sowie Peptiden nach N-Glykosidase F- und Trypsin-Spaltung wurden auf einem Compact MALDI-2 PE (V 5.2; Kratos Analytical, Manchester, England) im positiven linearen Modus aufgenommen. Es wurden 50 Laserpulse pro Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit Peptidstandards im Bereich von 700-5500 Da.

Probenvorbereitung:

Die Probenvorbereitung erfolgte modifiziert nach der *dried-droplet*-Methode (Jensen, 1997). Die über ZipTip<sub>C18</sub> gereinigten tryptischen Peptide und Glykopeptide wurden in 2-5µl 0,1% TFA aufgenommen. 0,5µl Probe und 0,5µl Matrix wurden auf dem MALDI-Target gemixt und unter Rotlichtbestrahlung getrocknet. Die Kristalle wurden mit 1µl 100% Ethanol gelöst und bei RT wieder getrocknet.

Matrix:

- α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 10mg/ml in Acetonitril/0,1% TFA (70/30)
- Sinapinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 10mg/ml in Acetonitril/0,1% TFA (70/30)

Peptidstandards:

Bradykinin - Fragment 1-7, Angiotensin 2 (human), P<sub>14</sub>R (synthetisches Peptid), ACTH – Fragment 18-39 (human), *Insulin oxidized B chain* (bovine), Insulin (bovine) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

### **2.2.8.3 ESI-MS**

Alternativ zur MALDI-TOF-MS und MS/MS wurden einige Proteinbanden nach in-Gel Spaltung mit Trypsin durch Kapillar-Elektrophorese(CE)-gekoppelte ESI-MS und MS/MS untersucht. Die tryptischen Peptide wurden in CE-Puffer (0,5M Ameisensäure, 10% Acetonitril) gelöst und in die Glasskapillare des CE-Geräts (CE, PACE-System, Beckman Coulter) wie folgt gespritzt: 30nl 1,5M NH<sub>3</sub>, 300nl Probe und 20nl CE-Puffer. Die Trennung erfolgte bei 30kV für ca.30min. Von der CE-Kapillare wurden die Peptide direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers (IT-MS, Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) eingeführt. Die Ionisierung der Probe erfolgte bei Hochspannung von 4500V. Die Peptidsignale wurden in MS- und MS/MS-Modus detektiert.

#### 2.2.8.4 Auswertung der MS-Spektren

Die Auswertung der MS-Glykanspektren erfolgte mit Expasy GlycoMod und EuroCarbDB Glyco-Peakfinder (<http://www.eurocarbdb.org>). Die MS/MS-Glykanspektren wurden mit EuroCarbDB Glyco-Peakfinder und mit Hilfe der Nomenklatur für Fragmentierung der N-Glykane von Domon und Costello (1988) und der von Harvey identifizierten Fragmente (1999, 2000b, 2005) ausgewertet. Die Glykanstrukturen wurden von Glycosciences-DB (<http://www.glycosciences.de>) ermittelt und mit EuroCarbDB Glyco-Workbench gezeichnet.

Die MS und MS/MS-Peptidspektren wurden mit dem BioTools-Software (Bruker Daltonics) und dem Mascot-Software (Matrix Science Ltd., London, UK) ausgewertet.

#### 2.2.9 Bindungstest mit Spermatozoen

Die über Affinitätschromatographie isolierten GNA-bindenden OAMF-Glykoproteine wurden mit Biotin markiert und in einem Bindungstest als Spermienliganden getestet.

##### 2.2.9.1 Vorbereitung des Samens

Der Samen wurde von Ebern aus eigenem Institutsbestand gewonnen und frisch für den Versuch eingesetzt. Es wurden nur Samen angesetzt, die den Mindestanforderungen entsprachen (Motilität 80% und Akrosomintegrität 80%). Zu Entfernung des Seminalplasmas und Gewinnung der motilen Fraktion wurden die Spermatozoen nach der *swim-up*-Methode gewaschen. Hierfür wurde 1ml unverdünnter Samen in 9ml auf 37°C vorgewärmten Androhep-Puffer unterschichtet und 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation schwimmen die motilen Spermatozoen in die Pufferflüssigkeit auf. Die so gebildete Wolke wurde abgenommen und die Spermatozoen durch schonende Zentrifugation für 5min bei 700 x g aufkonzentriert. Nach Resuspendieren in 1ml Androhep wurde die Spermiedichte mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

Mit einer Propidiumiodid-Färbung wurde die Vitalität der Spermatozoen untersucht. Der membranimpermeable Fluoreszenzfarbstoff bindet an die DNA geschädigter und toter Zellen und zeigt dabei eine rote Fluoreszenz (Absorptionsmaximum bei 536nm und Emissionsmaximum bei 617nm). Die Spermatozoen ( $3 \times 10^6$  Zellen) wurden in 150µl Androhep aufgenommen und nach Zugabe von 5µl PI-Lösung (0,5mg/ml in dest.H<sub>2</sub>O) für 5min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde

ein Tropfen der Suspension auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckglas zugedeckt und gleich ausgewertet. Die Beobachtung der roten Fluoreszenz erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops Axioskop (Zeiss, Deutschland) mit einem LP 520nm Filter. Zur Auswertung wurden 100 Spermatozoen ausgezählt.

Androhep-Puffer:

144mM Glucose  
27,2mM Natriumcitrat  
14,3mM NaHCO<sub>3</sub>  
37,8mM Hepes  
0,04mM BSA  
pH 7,4, 290 mOsm/kg

### **2.2.9.2 Bindungstest**

Vor dem Versuch wurden alle Reagenzien und Arbeitsutensilien auf 37°C vorgewärmt. Die motile Spermienfraktion ( $3 \times 10^6$  Zellen) wurde in 150µl Androhep aufgenommen, mit 25µg biotinierten OAMF-Proteinen versetzt und bei 37°C 10min inkubiert. Parallel wurde als Kontrolle der gleiche Ansatz ohne OAMF-Proteine eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden mikroskopisch im Tropfen die Gesamtmotilität, der Akrosomzustand und die Vitalität mittels PI-Färbung beurteilt. Es wurden 100 Spermatozoen ausgezählt. Zusätzlich wurden von der Probe und der Kontrolle jeweils 2 Ausstriche angefertigt und Luft-getrocknet. Die restlichen Spermatozoen in der Suspension wurden von den nicht-gebundenen Oviduktproteinen befreit (Waschen 3 Mal mit jeweils 1ml Androhep) und für die elektrophoretische Analyse vorbereitet.

### **2.2.9.3 Elektrophoretische Analyse**

Die gewaschenen und sedimentierten Spermatozoen (3min bei 700 x g) wurden in 50µl Elektrophorese-Auftragspuffer (2% SDS) resuspendiert und 1h bei RT unter Schütteln extrahiert. Nach dreißigminütigen Zentrifugation bei 14 000 x g wurde der Überstand abgenommen und die Spermatozoen-gebundenen Ovidukproteine auf eine SDS-PAGE (10µl/Spur) getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membran transferiert und mit AP-Streptavidin 1:20 000 (Dianova, Hamburg, Deutschland) visualisiert.

#### **2.2.9.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse**

Die Luft-getrockneten Ausstriche wurden für 10min mit Fixierungslösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1M Glycin gestoppt und die Ausstriche 10min mit PBS gewaschen. Die Blockierung der unbesetzten Bindungsstellen erfolgte ü/N mit 5% BSA in PBS in einer feuchten Kammer bei 4°C. Um die an der Spermienoberfläche gebundenen OAMF-Proteine zu visualisieren, wurden die Ausstriche 30min im Dunkel bei 37°C in einer feuchten Kammer mit Streptavidin-FITC 1:1000 (Dianova, Hamburg, Deutschland) in PBS/1% BSA inkubiert. Nach 3 Waschschritten (jeweils 10min) mit PBS wurden die Präparate mit SlowFade Antifade Kit (Molecular Probes, USA) beschichtet und eingedeckelt. Bis zur Auswertung wurden die Präparate im Dunkel bei 4°C aufbewahrt. Die Spermatozoen wurden bei 100-facher Vergrößerung sowohl im Hellfeld als auch im Fluoreszenzlicht mit einem Axioskop (Speziallichtquelle HBO 50, Filtersatz 15, Anregungsbereich grün, Erregungsfiler BP 546/12, Farbteiler 580, Sperfilter 590, Zeiss, Deutschland) mit integrierter Digitalkamera (Olimpus DP 50-CU, Olympus Optical Co. Ltd., USA) betrachtet. Es wurden 100 Spermien in verschiedenen Blickfeldern ausgezählt und die Lokalisation und die Intensität der Fluoreszenz beurteilt.

##### Fixierungslösung:

2% Paraformaldehyd

0,2% Glutharaldehyd, in PBS, pH 7,4

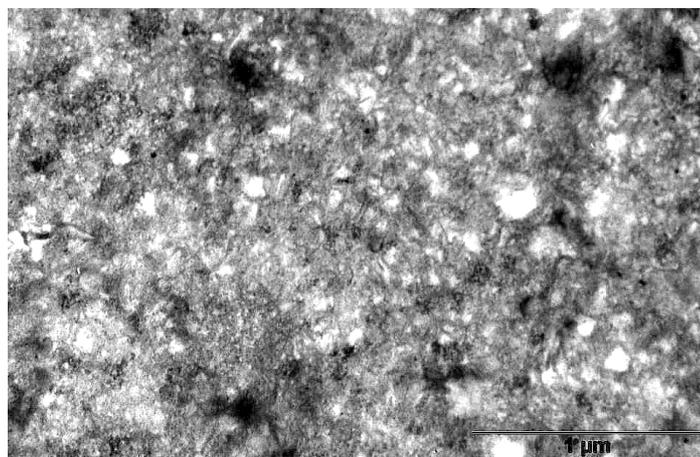
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Anreicherung der apikalen Membranfraktion aus Oviduktepithelzellen

Die Methode zur Isolierung der epithelialen apikalen Membran basiert auf der Tatsache, dass die polaren Epithelzellen eine sialsäurereiche Glycocalix besitzen (Booth und Kenny, 1974, Smith und Nothnick, 1997, Fazeli et al. 2003). Nach der Homogenisation werden die Sialsäurereste durch Zugabe von  $Mg^{2+}$ -Ionen vernetzt, wobei Inter- oder Intramembranaggregate gebildet werden können. Die intrazellulären Membranen besitzen wenige Sialsäurereste und bilden Intermembranaggregate, die aufgrund ihrer Größe durch leichte Zentrifugation sedimentiert und entfernt werden können. Die Sialsäurereste der apikalen Membranen werden mit  $Mg^{2+}$  gesättigt, bilden keine Aggregate und bleiben im Überstand. Sie können anschließend durch Ultrazentrifugation bei 90 000 x g sedimentiert werden.

Die Reinheit der isolierten apikalen Membran wurde durch zwei verschiedene Verfahren überprüft – durch Elektronenmikroskopie und mittels eines Enzymmarker-Tests.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von der oviduktalen apikalen Membranfraktion (OAMF) zeigen das typische Bild einer Plasmamembranpräparation, die sich als kleine Membranvesikel darstellt (Abb. 3).



**Abb. 3: TEM-Aufnahme der apikalen Membranfraktion (OAMF).**

Als zweite Kontrolle wurde ein  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Test durchgeführt. Diese Hydrolase ist ein typischer Enzymmarker für die apikale Membran. Die Erhöhung ihrer Aktivität in der Endmembranpräparation im Vergleich zu dem Ausgangshomogenat ist ein Zeichen für die Anreicherung der apikalen Membran. Der Test wurde mit einem diagnostischen Kit durchgeführt, mit dessen Hilfe die Konzentration von  $\gamma$ -GT pro mg Protein ermittelt wurde. Der Vergleich zwischen dem Ausgangshomogenat (0,006U/mg  $\gamma$ -GT) und der OAMF (0,07U/mg  $\gamma$ -GT) hat eine 11,7-fache Erhöhung der  $\gamma$ -GT-Konzentration gezeigt.

### 3.2 Isolierung der GNA-bindenden Glykoproteine

Zur Isolierung der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine wurde die folgende Strategie entworfen: Aus porcinen Eileitern wurden zuerst zwei Ausgangsmaterialien gewonnen – die Oviduktflüssigkeit (OF) und die apikale Membranfraktion (OAMF). Über Lektin-Affinitätschromatographie mit Galantus Nivalis Agglutinin (GNA) konnten die mannosereichen Glykoproteine aus den beiden Fraktionen getrennt und angereichert werden (Abb. 4).

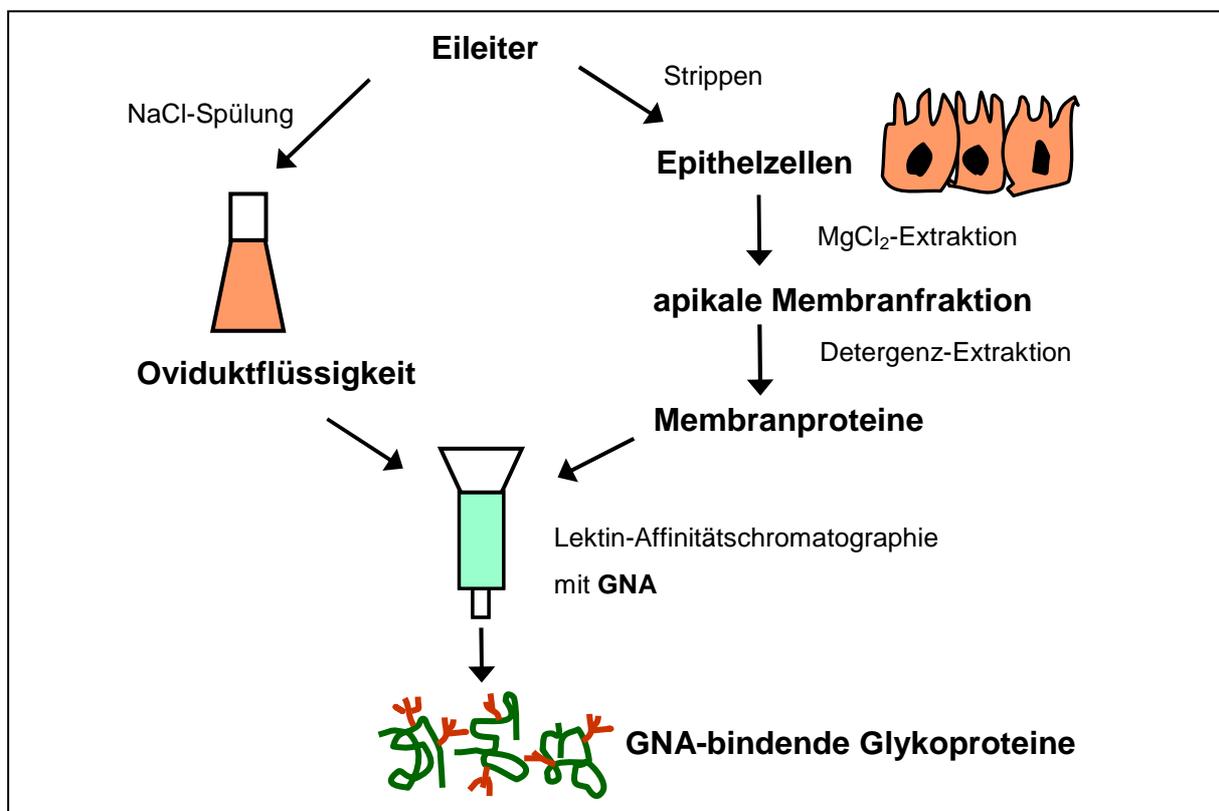
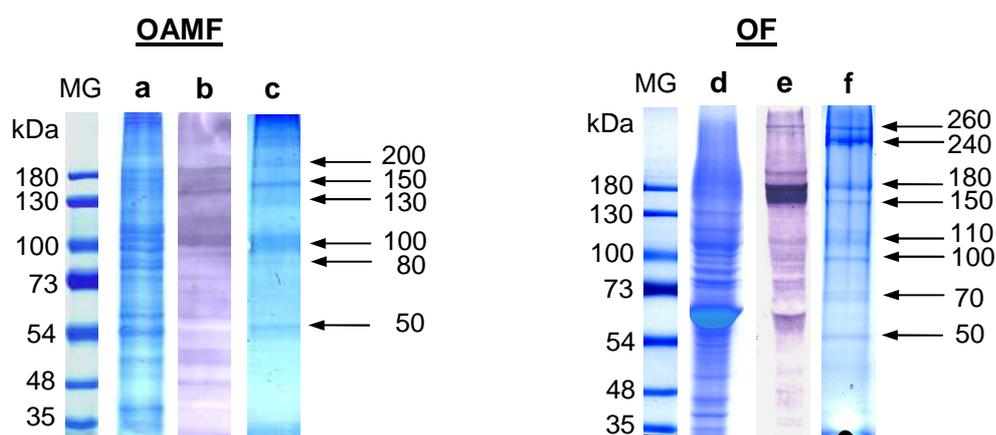


Abb. 4: Strategie zur Isolierung der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine

Das Galantus Nivalis Agglutinin (GNA) gehört zusammen mit ConA und LCA zu der Familie der mannospezifischen Lektine (Shibuya et al., 1988). In dieser Arbeit wurde GNA vorgezogen, da es eine höhere Spezifität gegen  $\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Man}$  und  $\text{Man}\alpha 1\text{-}6\text{Man}$  glykosidische Bindungen aufweist. Außerdem ist es leichter zu hanhaben, denn es ist kein Metalloprotein und ist bei Temperaturen bis  $70^{\circ}\text{C}$  und im pH-Bereich 4,0 - 8,0 stabil.

### 3.3 Elektrophoretische und lektinologische Analyse der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine

Die solubilisierte OAMF und die OF wurden elektrophoretisch getrennt. Nach Blot-Transfer konnten die mannosehaltigen Glykoproteinen mit dem Lektin GNA detektiert werden (Abb. 5).



**Abb. 5: Elektrophoretische und lektinologische Analyse der GNA- bindenden Oviduktglykoproteine. (a) OAMF, (d) OF, 8% SDS- PAGE, Coomassie-Färbung; (b), (e) Lektin-Blot mit GNA-Biotin, Detektion mit Streptavidin-AP; (c), (f) GNA-bindende Fraktionen nach Lektin-Affinitätschromatographie, 8% SDS-PAGE, Coomassie-Färbung.**

Die GNA-Blot-Analyse der OAMF und der OF weist ein ähnliches Muster auf. Vorwiegend hochmolekulare Proteine mit MG zwischen 50 und 300kDa beider Fraktionen reagieren positiv mit GNA (Abb. 5b, 5e). Die Spezifität der Bindung konnte durch Hemmung mit  $\alpha$ -Methylmannopyranosid und durch die negative Reaktion der Proteinprobe nur mit Streptavidin-AP bestätigt werden.

Abbildungen 5c und 5f zeigen die GNA-bindenden Fraktionen der OAMF und der OF. In OAMF sind eine deutliche Doppelbande bei 100kDa und eine schwache Bande bei

80kDa zu erkennen. Im hochmolekularen Bereich befinden sich Proteinbanden bei 130, 150 und 200kDa. Das elektrophoretische Muster von OF weist ebenfalls Proteinbanden im gleichen molekularen Bereich mit MG 100kDa, 150kDa und 180kDa auf. Zusätzlich sind zwei starke Banden bei 240 und 260kDa und Doppelbanden bei 110kDa und 70kDa zu beobachten. In dem mittleren molekularen Bereich ist in den beiden Fraktionen eine schwache Bande bei 50kDa zu erkennen.

### 3.4 N-Glykan-Profile

#### 3.4.1 Anmerkung zu den massenspektrometrischen Messungen

Die meisten Messungen wurden an einem Kompact MALDI-2 PE (V 5.2; 1996; Kratos Analytical, Manchester, England) durchgeführt. Bei diesem Gerät sind Massenabweichungen bis zu +/- 3m/z (2500ppm) möglich. Zur Kontrolle wurden exemplarisch auch Proben an einem Ultraflex-MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) mit einer höheren Massengenauigkeit (Abweichung bis zu 100ppm) gemessen.

In der folgenden Tabelle ist ein Beispiel dargestellt:

Glykanstruktur	m/z <sub>kalk</sub>	m/z <sub>exp</sub> (Bruker)	m/z <sub>exp1</sub> (Kratos)	m/z <sub>exp2</sub> (Kratos)
Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>	1809,6	1809,3	1807,1	1810,1
Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>	1971,7	1971,2	1971,9	1968,9

#### 3.4.2 Analyse der N-Glykane der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine der OAMF und OF mit MALDI-TOF-MS

Um einen Überblick über die Strukturen der N-Glykane zu bekommen, wurde zuerst ein N-Glykan-Pool jeweils aus der OAMF und aus der OF nach GNA-Affinitätschromatographie isoliert und analysiert. Die N-Glykane wurden On-Blot mit N-Glykosidase F abgespalten. Durch Chromatographie an Carbograph konnten die neutralen und die sauren N-Glykanfraktionen getrennt werden. Dieses Vorgehen ermöglicht eine ausführliche Analyse der Glykanstrukturen.

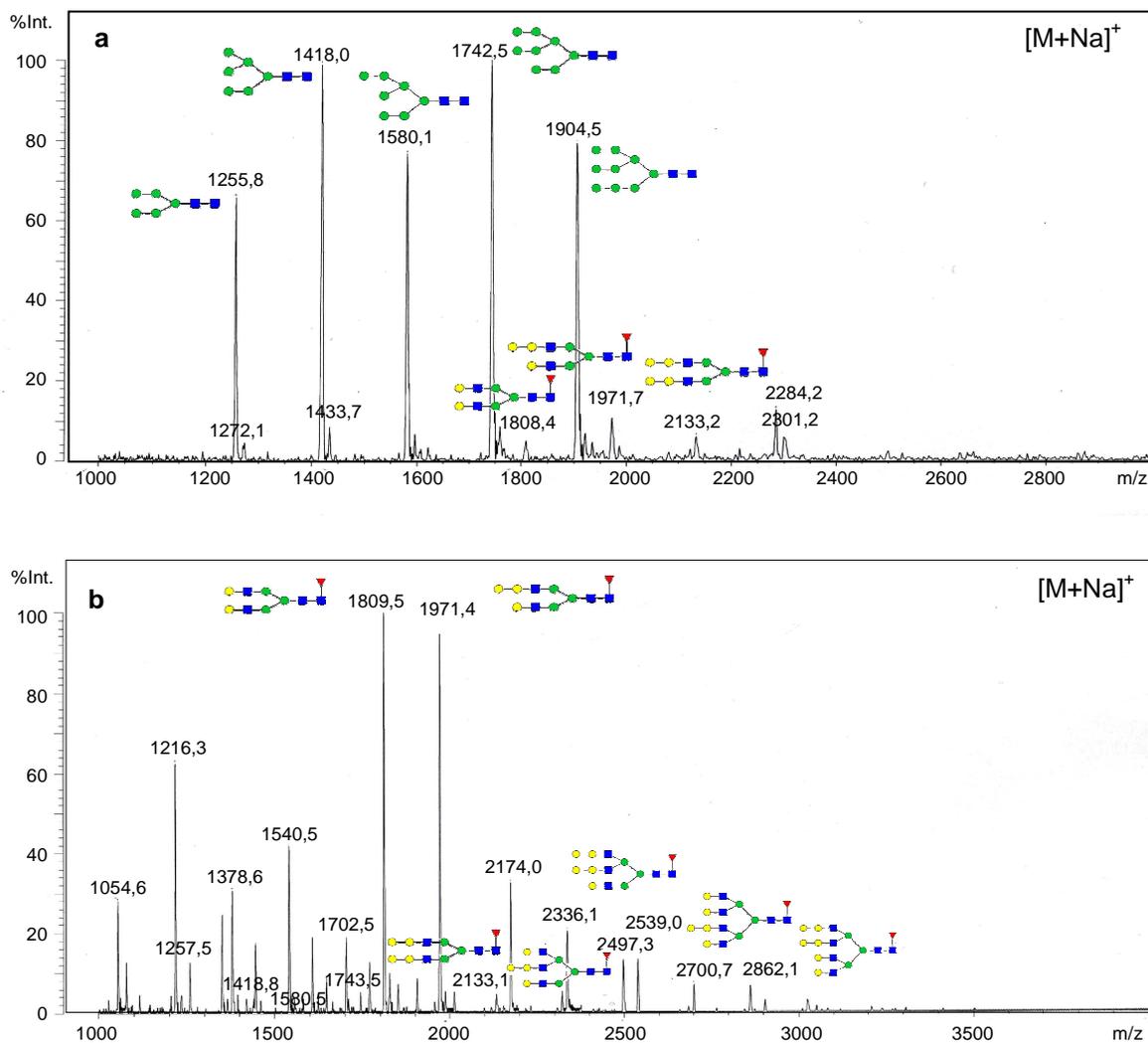
### 3.4.2.1 MALDI-TOF-MS-Analyse der neutralen N-Glykanfraktion

Es wurden zwei Ansätze für die Isolierung der neutralen Glykane vorbereitet: I. Isolierung der nativen neutralen N-Glykane mittels N-Glykosidase F und II. Isolierung der neutralen N-Glykane nach Desialylierung. Der erste Ansatz ermöglicht die Detektion vorwiegend der N-Glykane vom Oligomannosyl-Typ, während bei dem zweiten Ansatz auch komplexe und hybride Strukturen erfasst werden, die sialyliert vorliegen können.

Die Profile der neutralen N-Glykanfraktionen der OAMF und der OF sind in Abb. 6 und 7 dargestellt. Die dominanten Signale in den Spektren 6a und 7a entsprechen den  $\text{Na}^+$ -Addukten von Oligomannosyl-Typ Glykanen mit unterschiedlicher Anzahl von Mannoseresten -  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  [ $m/z$  1255,8(OAMF)/1256,1(OF), 1418,0, 1580,1/1579,8, 1742,5/1741,6, 1904,5]. Die Signale bei  $m/z$  1272,1, 1433,7 und 1595,6 (Abb. 6a) entsprechen den  $\text{K}^+$ -Addukten von den Signalen bei  $m/z$  1255,8, 1418,0 und 1580,1.

Zusätzlich konnten einige bi- und triantennäre komplexe oder hybride Strukturen detektiert werden -  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  [ $m/z$  1808,4 (OAMF)/1807,3 (OF)],  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  ( $m/z$  1971,7/1969,5),  $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  ( $m/z$  2133,2/2131,4),  $\text{Hex}_6\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  [ $m/z$  2658,2 (OF)],  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_1\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  [ $m/z$  1604,4 (OF)],  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  [ $m/z$  1620,8 (OAMF)].

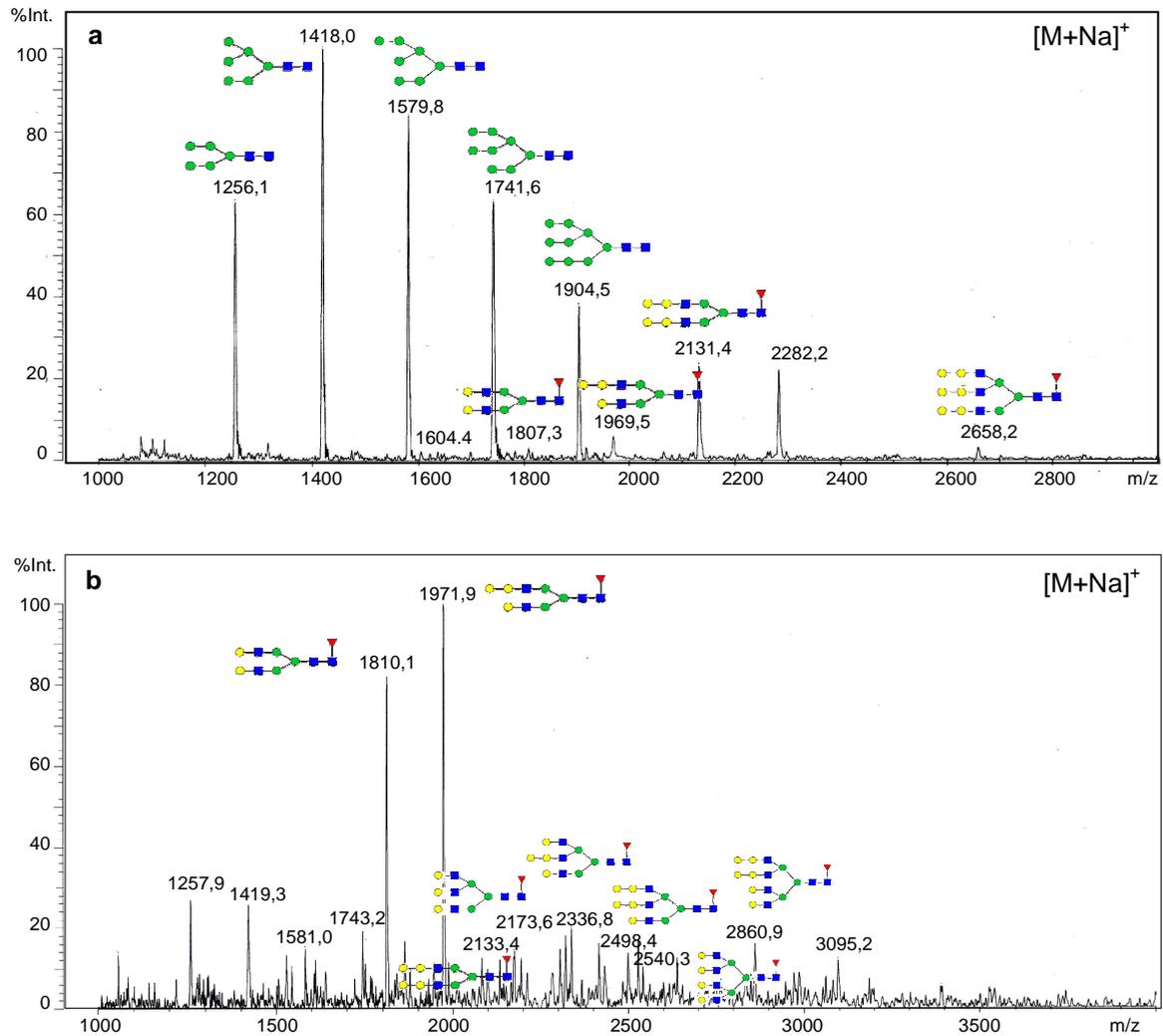
In Abb. 6b und 7b sind die neutralen N-Glykane nach Desialylierung dargestellt. Die Oligomannosyl-Strukturen sind wieder zu erkennen, allerdings mit einer viel schwächeren Intensität. Die Signale der komplexen Strukturen ( $m/z$  1809,5/1810,1 und 1971,4/1971,9) erscheinen hingegen als dominante Peaks. Zusätzlich sind zahlreiche Signale im Bereich  $m/z$  1000-4000 entstanden. Die meisten konnten als bi-, tri- und tetraantennäre komplexe Strukturen identifiziert werden, einige davon mit zusätzlichen terminalen Galactoseresten. Die deutliche Zunahme der Intensität der komplexen Strukturen in der desialylierten Fraktion im Vergleich zu der nativen Fraktion spricht dafür, dass diese vorwiegend in ihrer sialylierten Form vorkommen. Das konnte auch später bei der Analyse der sauren Glykanfraktion nachgewiesen werden.



**Abb. 6: MALDI-TOF-MS-Profil der neutralen N-Glykane der OAMF.**

**(a)** native neutrale N-Glykane, **(b)** neutrale N-Glykane nach Desialylierung. Die Spektren sind im positiven linearen Modus als [M+Na]<sup>+</sup> mit DHB als Matrix aufgenommen.

● - Mannose, ● - Galactose, ■ - N-Acetylglucosamin, ▲ - Fucose.

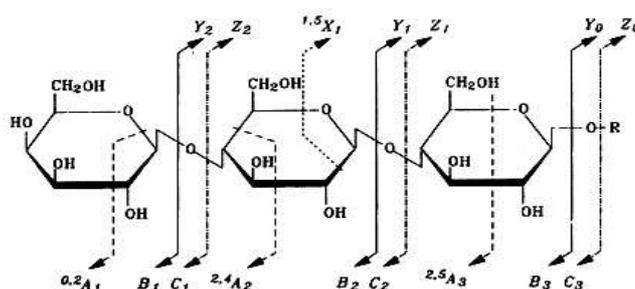


**Abb. 7: MALDI-TOF-MS-Profil der neutralen N-Glykane der OF.**

**(a)** native neutrale N-Glykane, **(b)** neutrale N-Glykane nach Desialylierung. Die Spektren sind im positiven linearen Modus als  $[M+Na]^+$  mit DHB als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ● - Galactose, ■ - N-Acetylglucosamin, ▲ - Fucose.

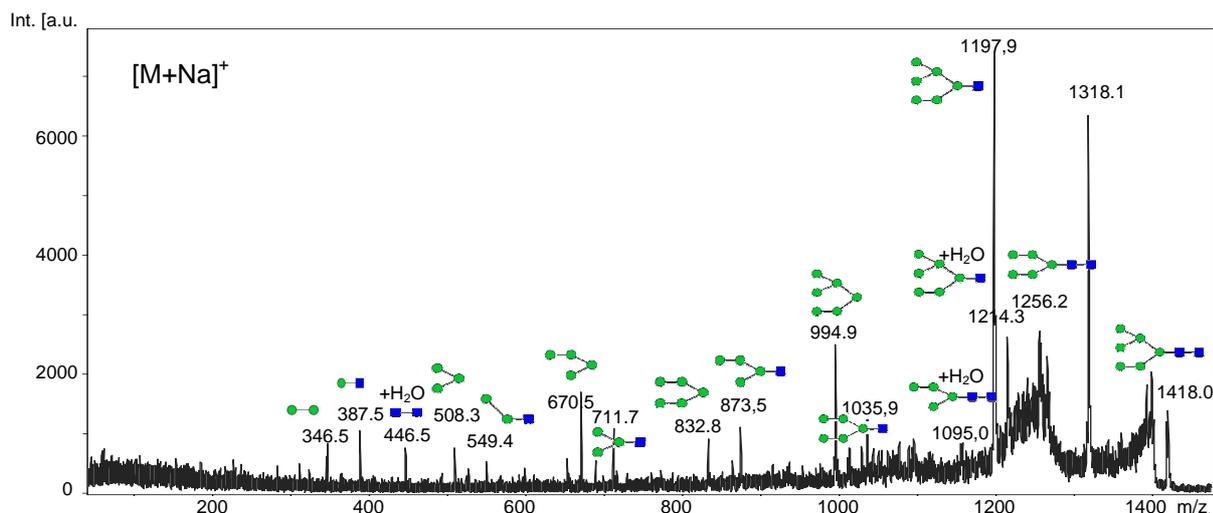
### 3.4.2.1.1 Tandem-MS (MS/MS) der Oligomannosyl-N-Glykane

Die Strukturen der Oligomannosyl-N-Glykane konnten durch MALDI-TOF-MS/MS bestätigt werden. Die Auswertung des Fragmentierungsmusters erfolgte nach der Nomenklatur von Domon und Costello (1988) (Abb. 8). Nach glykosidischer Spaltung von dem nichtreduzierenden Ende entstehen B-(C-) Ionen und von dem reduzierenden Ende Y-(Z-) Ionen. Zusätzlich ist *cross-ring*-Fragmentierung möglich, wobei A- und X-Ionen gebildet werden



**Abb. 8: Kohlenhydrat-Fragmentierung nach Domon und Costello (1988).**

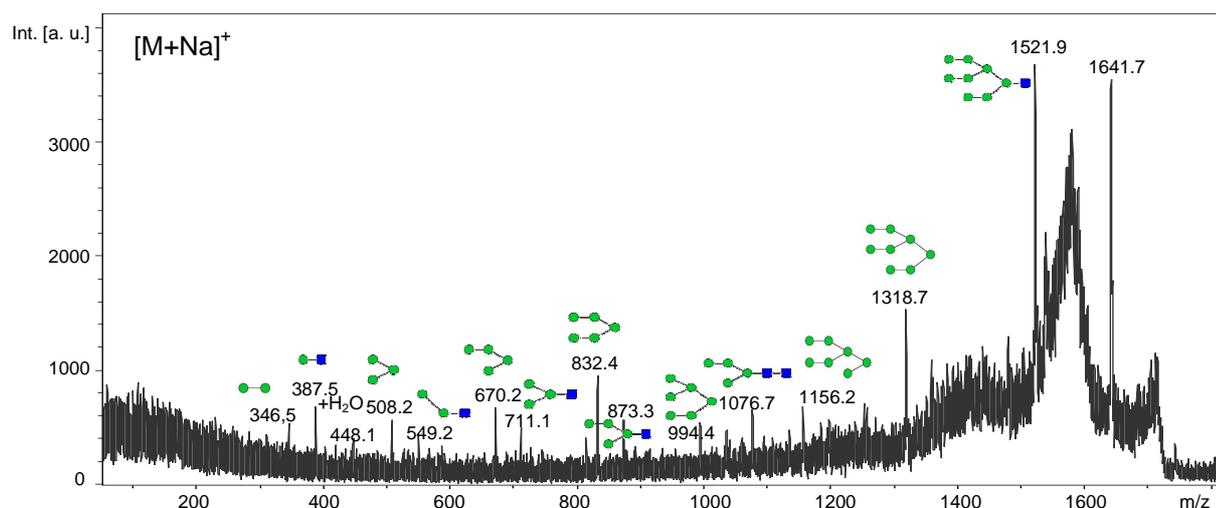
Als Beispiel (Abb. 9 und 10) sind die Fragmentierungsmuster der Signale bei  $m/z$  1418,0 (OAMF) und 1742,5 (OAMF) dargestellt. Die Zuordnung der Fragmente erfolgte an Hand des Programms Glyco-Peakfinder (Tab. 2 und 3); die Glykanstrukturen wurden beispielhaft mit dem Programm Glyco-Workbench (EuroCarbDB) gezeichnet. Es konnte insbesondere eine Reihe von B- Ionen, entstanden nach sukzessiver glykosidischer Abspaltung von Mannoseresten von dem nichtreduzierenden Ende der Glykanstruktur, identifiziert werden. Die Ionen bei  $m/z$  1318,1 (Abb.9) und 1641,7 (Abb.10) konnten nicht als B- oder Y-Ionen zugeordnet werden. Es handelt sich um zwei  $^{0,2}A$ -Ionen, entstanden bei *cross-ring*-Fragmentierung des N-Acetylglucosamins am reduzierenden Ende. Einige Ionen treten als  $H_2O$ -Addukte auf ( $m/z$  446,5, 1095,0, 1214,3, Abb. 9). Die Fragmentierungsmuster bestätigen die Oligomannosyl-Strukturen der beiden Glykane -  $Man_6GlcNAc_2$  ( $m/z$  1418,0) und  $Man_8GlcNAc_2$  ( $m/z$  1742,5).



**Abb. 9: MALDI-TOF-MS/MS des Signals bei  $m/z$  1418,0 mit Summenformel  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ .** Das Spektrum ist im positiven Lift-Modus als  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  mit DHB als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin.

Mass	Composition	Charged Ions	Ion type	Mass calculated
387.525	Hex1HexNac1	Na+	B	388.12142
446.562	HexNac2	Na+	Y	447.15853
508.295	Hex3	Na+	B	509.14769
549.444	Hex2HexNac1	Na+	B	550.17424
670.557	Hex4	Na+	B	671.20051
711.748	Hex3HexNac1	Na+	B	712.22706
832.779	Hex5	Na+	B	833.25334
873.570	Hex4HexNac1	Na+	B	874.27989
994.958	Hex6	Na+	B	995.30616
1035.882	Hex5HexNac1	Na+	B	1036.33271
1095.020	Hex4HexNac2	Na+	Y	1095.36982
1197.984	Hex6HexNac1	Na+	B	1198.38553
1214.525	Hex6HexNac1	Na+	Y	1216.39610
1256.206	Hex5HexNac2	Na+	Y	1257.42264

**Tabelle 2: Glyco-Peakfinder (EuroCarbDB) – Zuordnung der B- und Y-Ionen entstanden bei der Fragmentierung des Glykans  $\text{Hex}_6\text{GlcNAc}_2$  ( $m/z$  1418,0).**



**Abb. 10: MALDI-TOF-MS/MS des Signals bei m/z 1742,5 mit Summenformel  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ .** Das Spektrum ist im positiven Lift-Modus als  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  mit DHB als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin.

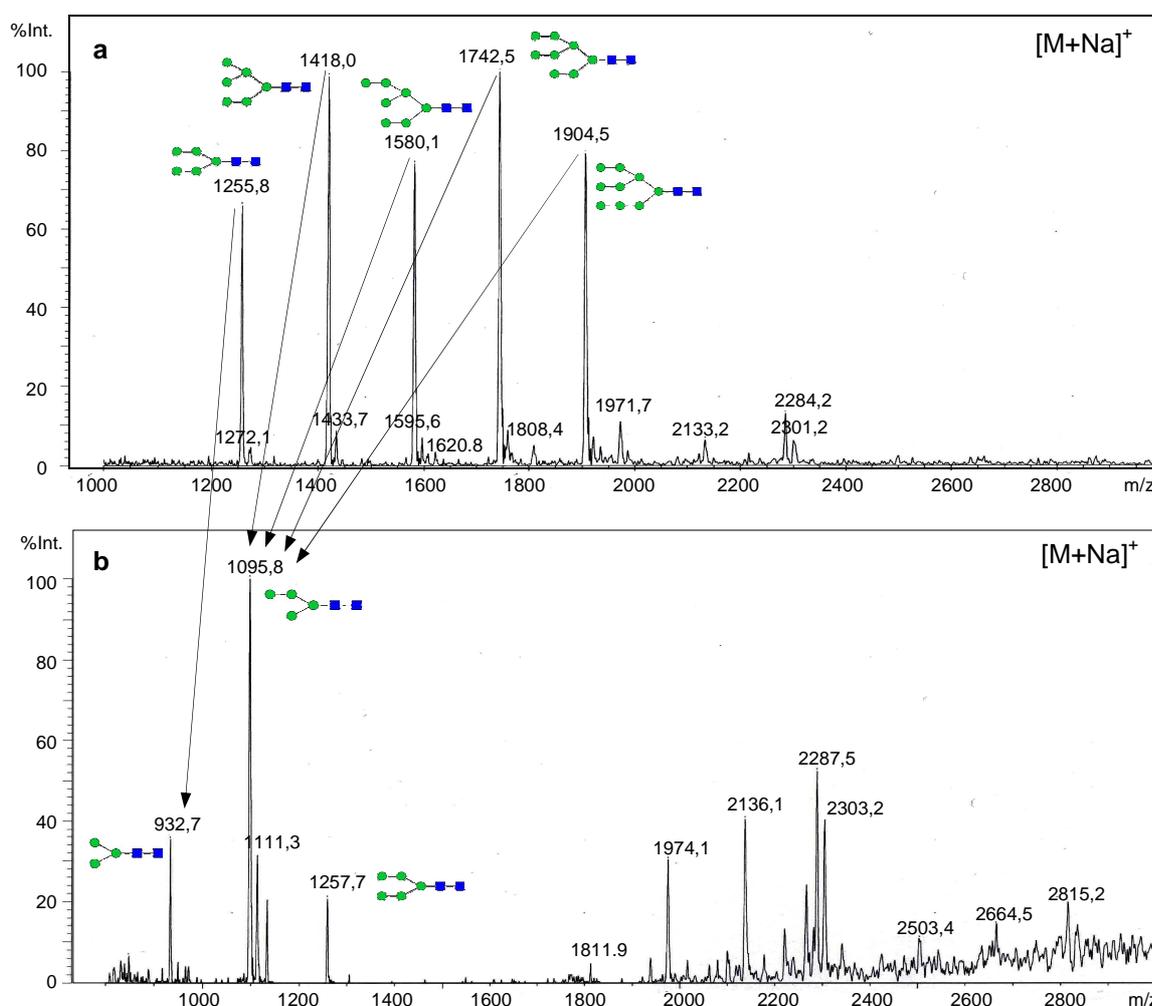
Mass	Composition	Charged ions	Ion type	Mass calculated
346.514	Hex2	Na+	B	347.09487
387.515	Hex1HexNac1	Na+	B	388.12142
508.228	Hex3	Na+	B	509.14769
549.165	Hex2HexNac1	Na+	B	550.17424
670.191	Hex4	Na+	B	671.20051
711.060	Hex3HexNac1	Na+	B	712.22706
832.455	Hex5	Na+	B	833.25334
873.282	Hex4HexNac1	Na+	B	874.27989
994.403	Hex6	Na+	B	995.30616
1076.751	Hex4HexNac2	Na+	B	1077.35926
1156.215	Hex7	Na+	B	1157.35898
1318.733	Hex8	Na+	B	1319.41181
1521.905	Hex8HexNac1	Na+	B	1522.49118

**Tabelle 3: Glyco-Peakfinder (EuroCarbDB) – Zuordnung der B- und Y-Ionen entstanden bei der Fragmentierung des Glykans  $\text{Hex}_8\text{GlcNAc}_2$  (m/z 1742,5).**

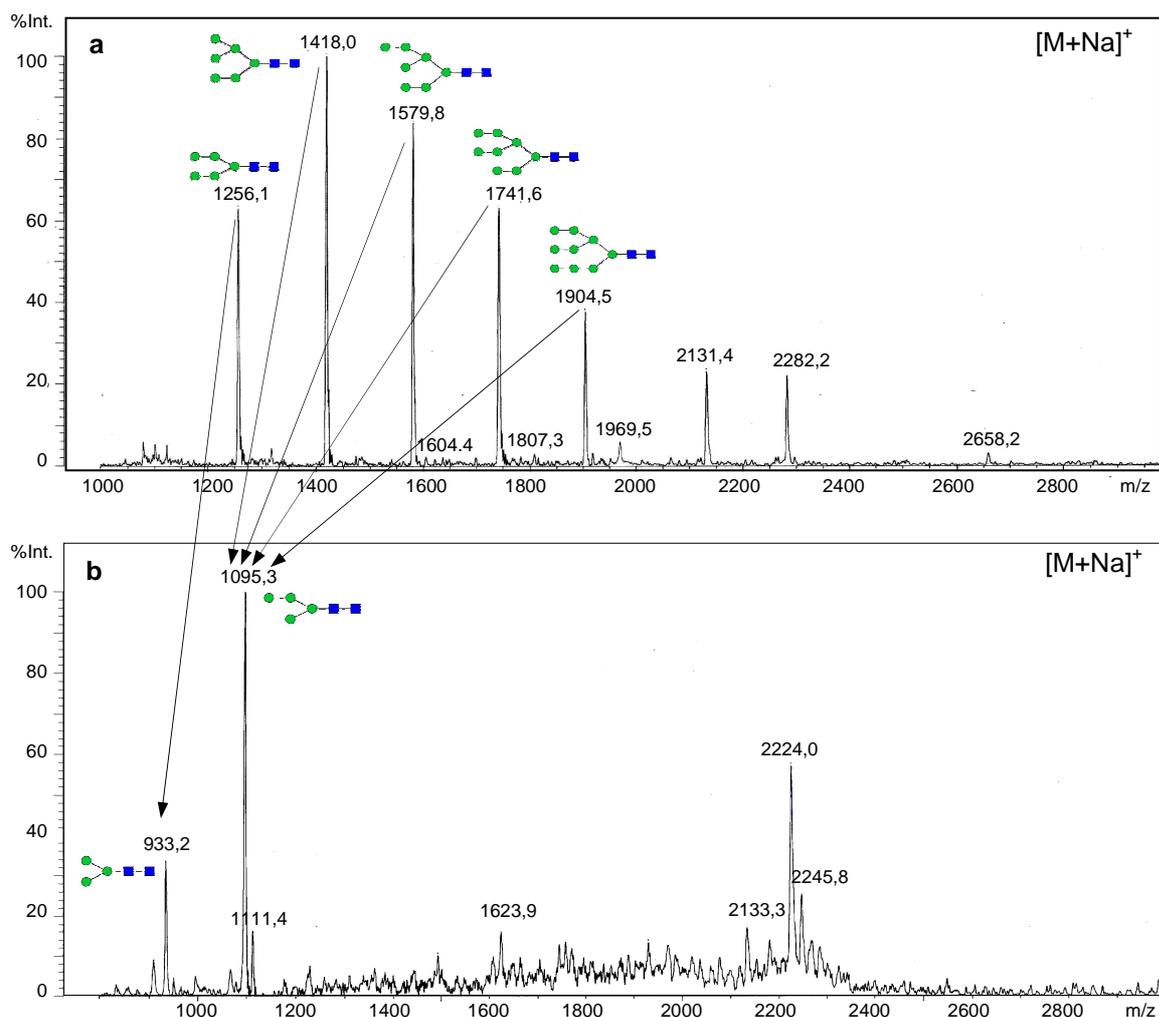
In vergleichbarer Weise konnten die anderen Oligomannosyl-Strukturen in den beiden Spektren (OAMF und OF) bestätigt werden.

### 3.4.2.1.2 Analyse der Oligomannosyl-Strukturen mit $\alpha$ -Mannosidase

Das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase ist eine Exoglykosidase, die terminale  $\alpha$ -D-Mannosereste von dem nichtreduzierenden Ende einer Glykanstruktur abspaltet. Durch die Anwendung dieses Enzyms am MALDI-Target konnten die Oligomannosyl-Strukturen ergänzend zu der MS-Analyse nachgewiesen werden. In Abb. 11 und 12 ist zu erkennen, dass die Signale bei  $m/z$  1255,8(OAMF)/1256,1(OF), 1418,0, 1580,1/1579,8, 1742,5/1741,6 und 1904,5 nach der Behandlung mit  $\alpha$ -Mannosidase verschwinden. An ihrer Stelle entstehen neue Signale bei  $m/z$  992,7/933,2 und 1095,8/1095,3 die einer Kern-Struktur und einer Kern-Struktur mit einer terminalen Mannose entsprechen. Das Signal bei  $m/z$  1111,3/1111,4 entspricht einem  $K^+$ -Addukt des Signals bei  $m/z$  1095,8/1095,3. Die Exoglykosidase-Spaltung bestätigt, dass es sich bei allen fünf Signalen um Oligomannosyl-Typ N-Glykane handelt.



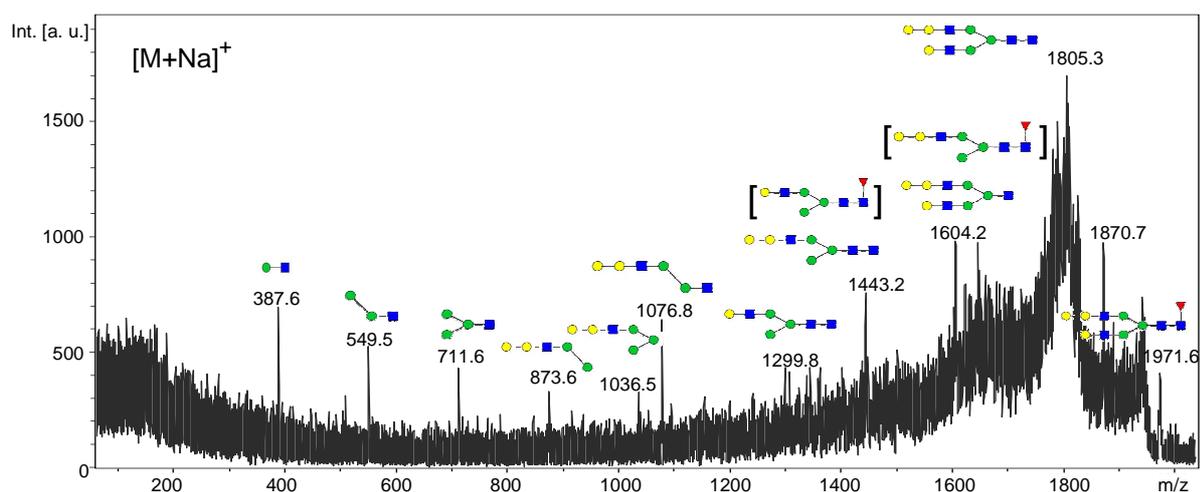
**Abb. 11: Native neutrale N-Glykane der OAMF vor (a) und nach (b)  $\alpha$ -Mannosidase-Behandlung am MALDI-Target.** Die Spektren sind im positiven linearen Modus als  $[M+Na]^+$  mit ATT als Matrix aufgenommen. ● -Mannose, ■ -N-Acetylglucosamin.



**Abb. 12: Native neutrale N-Glykane der OF vor (a) und nach (b)  $\alpha$ -Mannosidase-Behandlung am MALDI-Target.** Die Spektren sind im positiven linearen Modus als  $[M+Na]^+$  mit ATT als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin.

### 3.4.2.1.3 Tandem-MS (MS/MS) der komplexen N-Glykane

Von den dominanten Signalen der desialylierten N-Glykanfraktion der OAMF ( $m/z$  1809,5 und 1971,4) und OF ( $m/z$  1810,1 und 1971,9) konnten MS/MS-Spektren aufgenommen werden. Exemplarisch ist das MS/MS-Spektrum des Signals bei  $m/z$  1971,4 dargestellt, das einer Summenformel  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  entspricht (Abb. 13).



**Abb. 13: MALDI-TOF-MS/MS des Signals bei m/z 1971,4 und Summenformel  $\text{Hex}_3\text{HexNac}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$ .** Das Spektrum ist im positiven Lift-Modus als  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  mit DHB als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin.

Mass	Composition	Charged Ions	Ion type	Mass calculated
387.589	Hex1HexNac1	Na+	B	388.12142
549.551	Hex2HexNac1	Na+	B	550.17424
711.618	Hex3HexNac1	Na+	B	712.22706
873.565	Hex4HexNac1	Na+	B	874.27989
1036.510	Hex5HexNac1	Na+	B	1036.33271
	Hex4HexNac1dHex1	Na+	Y	1038.34836
1076.827	Hex4HexNac2	Na+	B	1077.35926
1240.703	Hex5HexNac2	Na+	B	1239.41208
	Hex4HexNac2dHex1	Na+	Y	1241.42773
1299.808	Hex4HexNac3	Na+	Y	1298.44919
1361.773	Hex6HexNac1dHex1	Na+	Y	1362.45400
1443.180	Hex5HexNac3	Na+	B	1442.49145
	Hex4HexNac3dHex1	Na+	Y	1444.50710
1604.223	Hex6HexNac3	Na+	B	1604.54428
	Hex5HexNac3dHex1	Na+	Y	1606.55993
1805.535	Hex6HexNac4	Na+	B	1807.62365
1971.567	Hex6HexNac4dHex1	Na+	Y	1971.69212

**Tabelle 4: Glyco-Peakfinder (EuroCarbDB) – Zuordnung der B- und Y-Ionen entstanden bei der Fragmentierung des Glykans  $\text{Hex}_3\text{HexNac}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$  (m/z 1971,4).**

Es konnten mehrere B- und Y-Ionen und ein  $^{0,2}\text{A}$ -Ion zugeordnet werden ( $m/z$  1870,7) (Tab. 4). Das Fragmentierungsmuster deutet auf eine fucosylierte komplexe Struktur mit einem zusätzlichen Galactoserest hin.

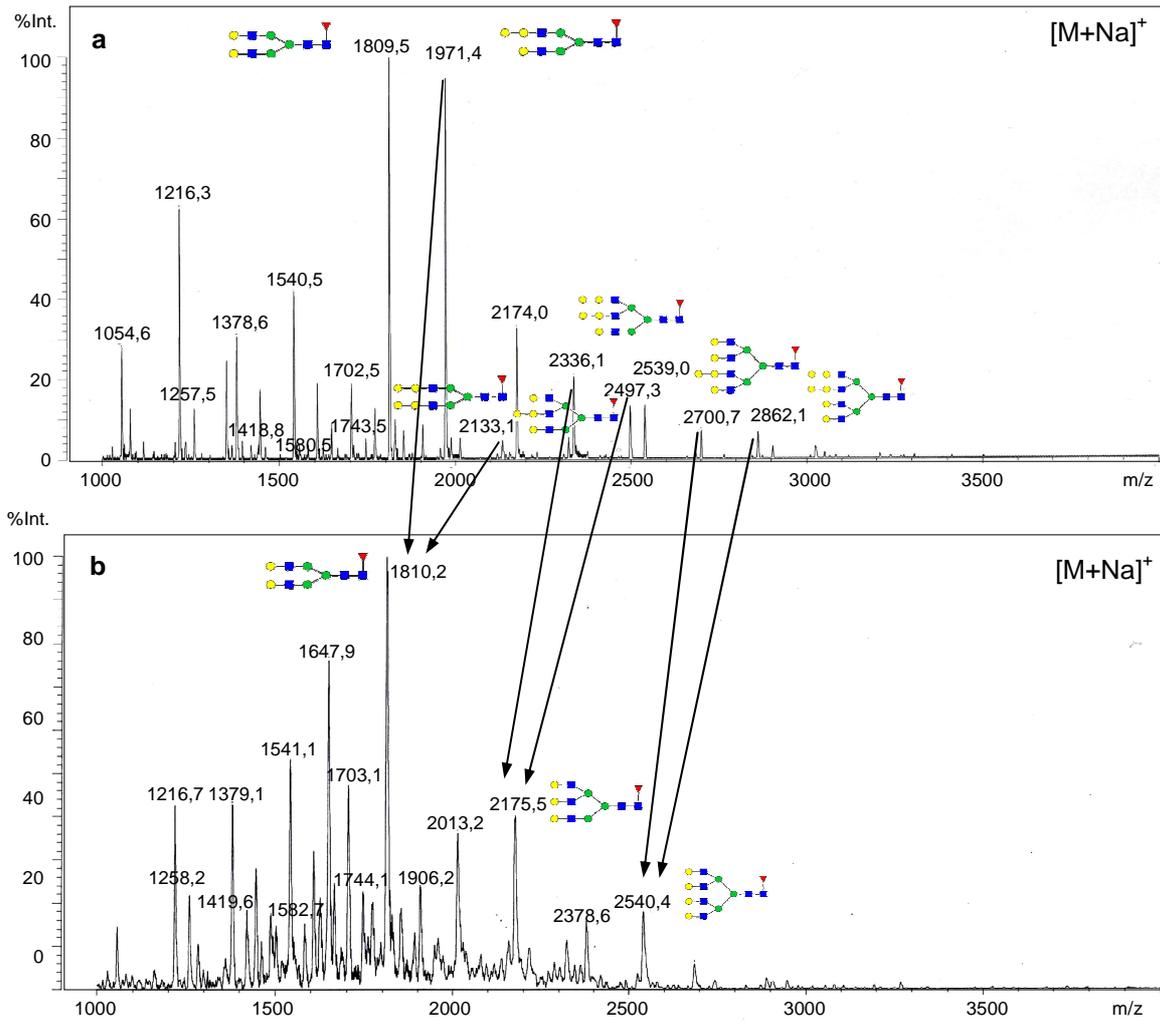
Bei der MS-Analyse können die Hexosen Mannose und Galactose nicht unterschieden werden. Das Vorhanden eines terminalen  $\alpha$ -Galactoserests bei diesem Glykan wurde durch die nachfolgende enzymatische Analyse bestätigt.

#### **3.4.2.1.4 Analyse der komplexen N-Glykane mit $\alpha$ -Galactosidase**

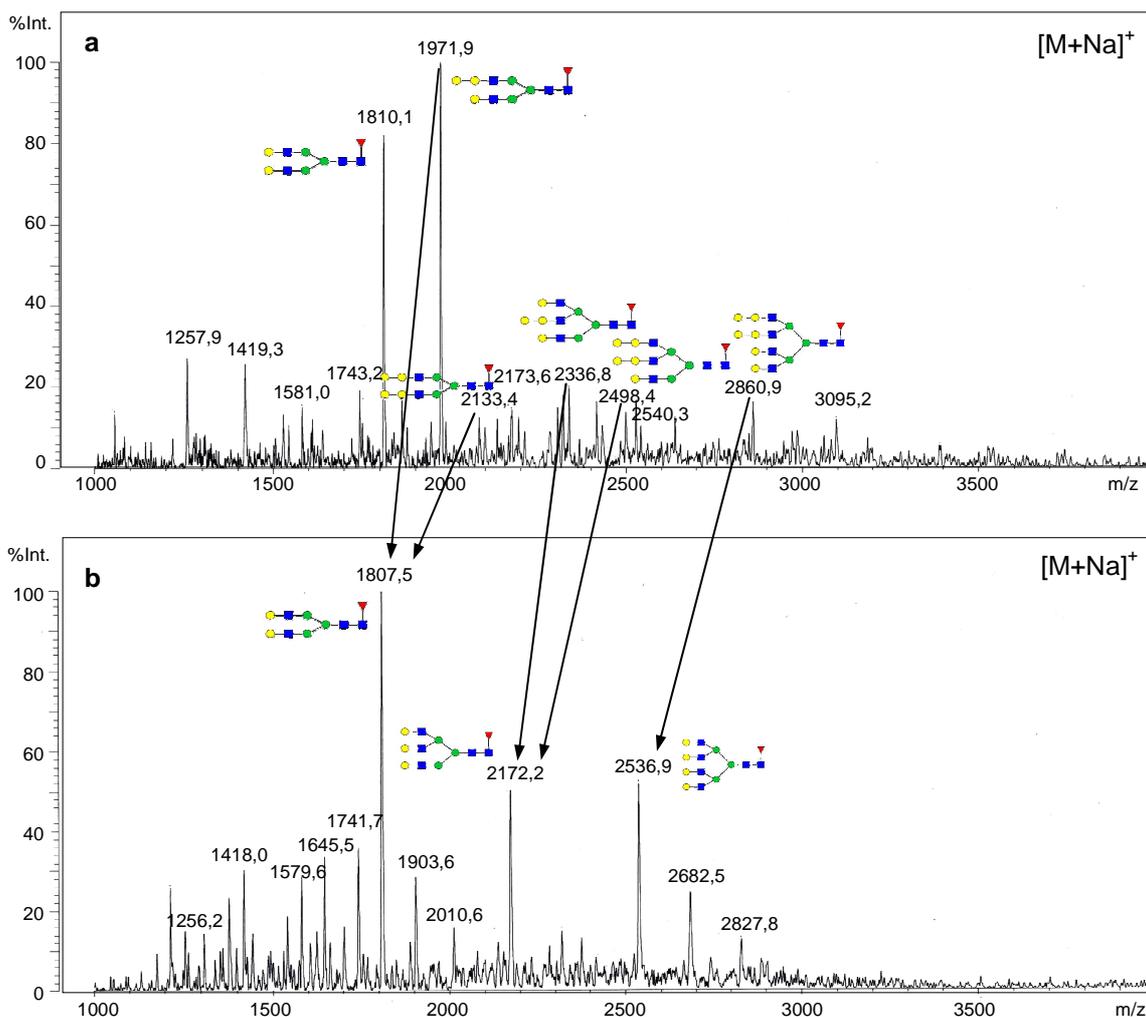
Das Vorkommen von terminalen  $\alpha$ -Galactoseresten in komplexen N-Glykanstrukturen ist typisch für das Schwein. Einige Signale in den Glykan-Profilen der OAMF und OF konnten fucosylierten komplexen N-Glykanen mit zusätzlichen terminalen Galactoseresten zugeordnet werden ( $m/z$  1971,4 (OAMF)/1971,9 (OF), 2133,2/2131,4, 2336,1/2336,8, 2497,3/2498,0, 2660,5/2658,2, 2700,7 (OAMF), 2862,1/2860,9). Um die Struktur dieser Glykane zu klären, wurde eine enzymatische Spaltung mit  $\alpha$ -Galactosidase am MALDI-Target durchgeführt. Dieses Enzym spaltet die terminalen  $\alpha$ -1,3-gebundenen Galactosereste von dem nichtreduzierenden Ende einer Glykanstruktur ab.

In den beiden Fraktionen (OAMF und OF) ist ein ähnliches Glykanmuster zu erkennen (Abb. 14 und 15). Die Signale bei  $m/z$  1971,4/1971,9 und 2133,1/2133,4 (Abb. 14a, 15a) repräsentieren fucosylierte, komplexe biantennäre Strukturen mit einem und mit zwei  $\alpha$ -Galactoseresten, die nach der Behandlung mit  $\alpha$ -Galactosidase verschwinden. Das dabei entstehende biantennäre Glykan ( $\text{Hex}_2\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) führt zu einer Erhöhung der Intensität des Signals bei  $m/z$  1810,2/1807,5 (Abb. 14b, 15b).

Noch zwei solche Gruppen konnten detektiert werden (Abb. 14a, 15a): die erste Gruppe sind die Signale bei  $m/z$  2336,1/2336,8, 2497,3/2498,4 und 2660,5/2658,2, die fucosylierten triantennären Strukturen mit einer, zwei und drei  $\alpha$ -Galactosen entsprechen. Die zweite Gruppe sind die Signale bei  $m/z$  2700,7 (OAMF) und 2862,1/2860,9, die fucosylierten tetraantennären Strukturen mit einer und mit zwei  $\alpha$ -Galactosen repräsentieren. Das Verschwinden dieser Signale und der Zuwachs der Signale bei  $m/z$  2175,5/2172,2 und 2540,4/2536,9 nach der Spaltung bestätigt die Strukturen (Abb. 14b, 15b).



**Abb. 14: Desialylierte neutrale N-Glykane der OAMF vor (a) und nach (b)  $\alpha$ -Galaktosidase-Behandlung am MALDI-Target.** Die Spektren sind im positiven linearen Modus als  $[M+Na]^+$  mit ATT als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ -N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose.



**Abb. 15: Desialylierte neutrale N-Glykane der OF vor (a) und nach (b)  $\alpha$ -Galaktosidase-Behandlung am MALDI-Target.** Die Spektren sind im positiven linearen Modus als  $[M+Na]^+$  mit ATT als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose.

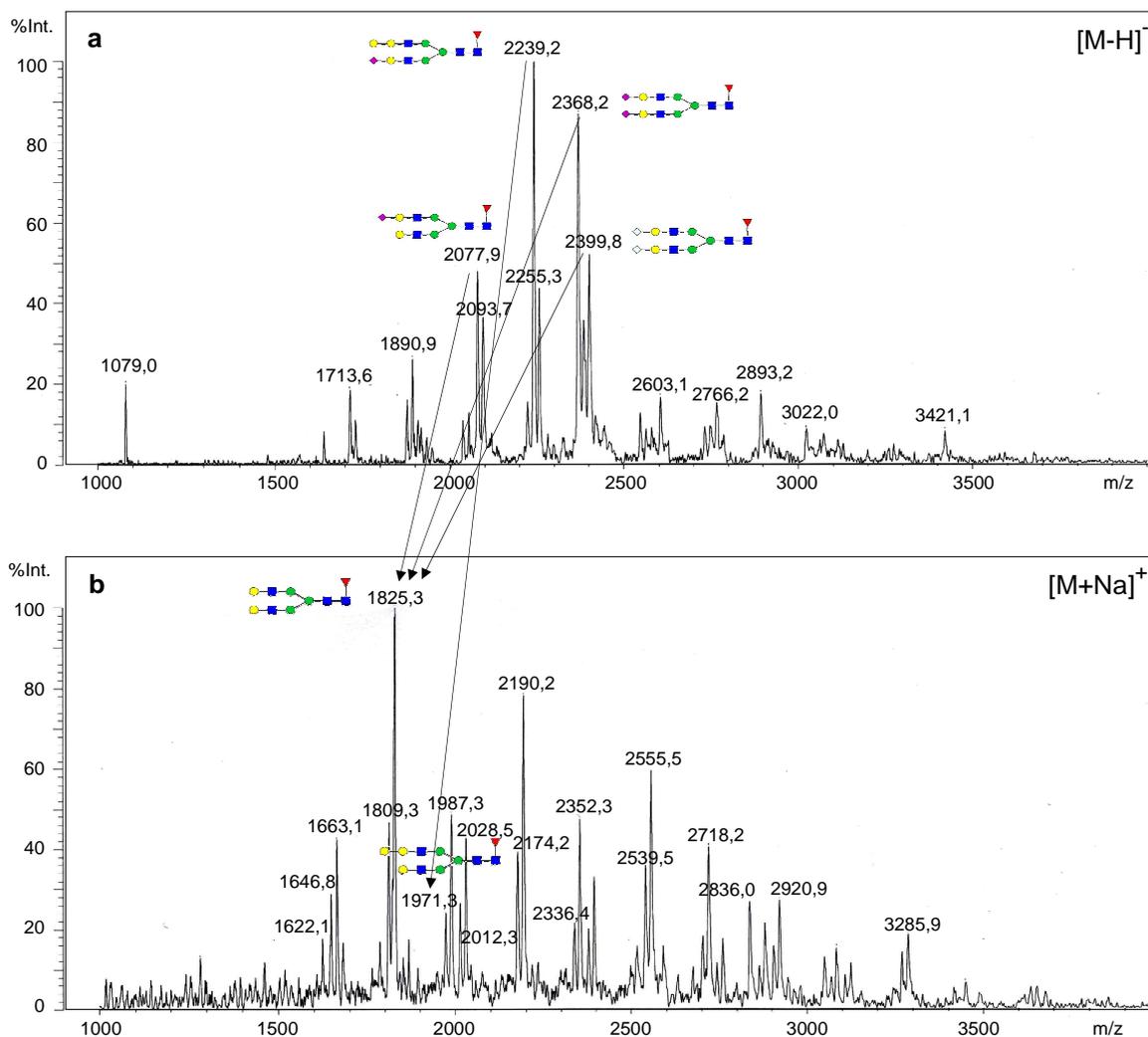
Eine zusammenfassende Darstellung aller detektierten nativen und desialylierten neutralen N-Glykane der beiden Ausgangsmaterialien (OAMF und OF) ist in Abschnitt 3.4.2.3 und in Tab. 5 und 6 dargestellt.

### 3.4.2.2 MALDI-TOF-MS-Analyse der sauren N-Glykanfraktion

MS-Spektren von den sauren N-Glykanfraktionen der OAMF und OF konnten im linearen negativen Modus mit THAP als Matrix ohne zusätzliche Modifizierung der Sialsäure aufgenommen werden (Papac et al., 1996, Harvey, 1999). Die meisten Signale konnten als bi-, tri- und tetraantennäre komplexe Strukturen mit einer oder zwei N-Acetylneuraminsäureresten oder mit N-Glycolylneuraminsäureresten zugeordnet werden. Desialylierung mit Neuraminidase am MALDI-Target mit ATT als Matrix bestätigte das Vorkommen der sialylierten Strukturen, da bei der anschließenden Messung im positiven Modus die entsprechenden neutralen komplexen Strukturen beobachtet werden konnten.

Das Signal bei  $m/z$  2239,2 (OAMF)/2238,8 (OF) ist in den beiden Glykanfraktionen dominant (Abb. 16a, 17a) und entspricht der monosialylierten Form des Glykans  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Nach der Neuraminidase-Behandlung entsteht seine desialylierte Form bei  $m/z$  1971,3/1968,2 (Abb. 16b, 17b). Die Signale bei  $m/z$  2077,9, 2093,7, 2368,2, 2399,8 (OAMF, Abb. 16a) und 2076,7, 2092,8, 2368,0 (OF, Abb. 17a) konnten als verschiedene Sialylierungsformen des biantennären komplexen Glykans  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  zugeordnet werden. Nach der Desialylierung resultieren alle diese Signale in dem dominanten Signal bei  $m/z$  1809,3 (OAMF)/1806,1 (OF) in den Spektren 16b und 17b. Im Spektrum 16b weist das  $\text{K}^+$ -Addukt dieser Struktur stärkere Intensität bei  $m/z$  1825,3 als das  $\text{Na}^+$ -Addukt auf.

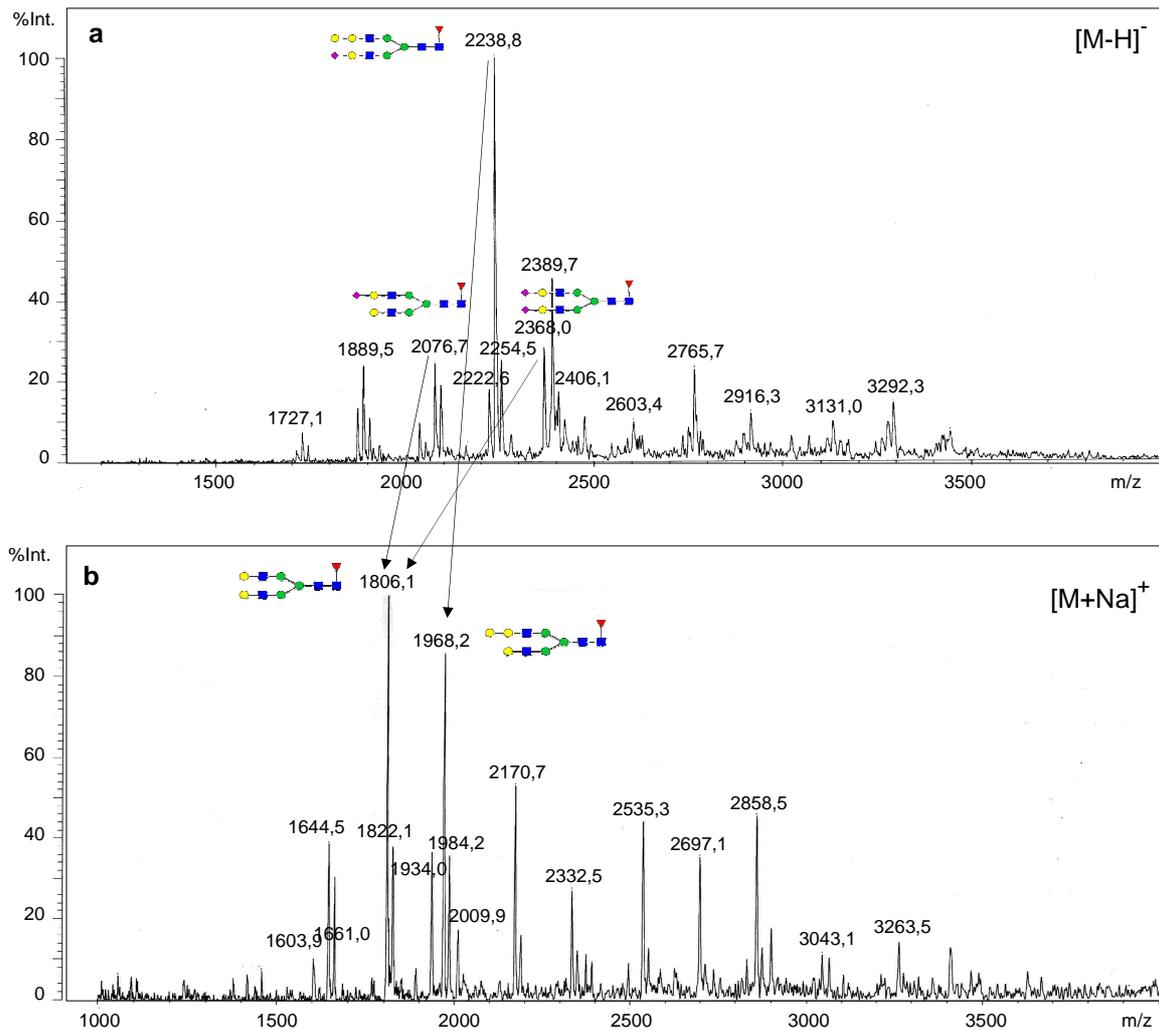
Eine Zusammenfassung der sialylierten Strukturen der OAMF und OF, die identifiziert werden konnten, ist in Tab. 7 und 8 in Abschnitt 3.4.2.3 dargestellt.



**Abb. 16: MALDI-TOF-MS-Analyse der sialylierten N-Glykanfraktion der OAMF.**

(a) native saure N-Glykane, (b) neutrale N-Glykane nach Neuraminidase-Behandlung. Spektrum (a) ist im linearen negativen Modus als  $[M-H]^-$  mit THAP als Matrix aufgenommen und Spektrum (b) ist im linearen positiven Modus als  $[M+Na]^+$  mit ATT als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ◆ - N-Acetylneuraminsäure, ◇ - N-Glycolylneuraminsäure.

Bei der Aufnahme 16b wiesen die  $K^+$ -Addukte der meisten Strukturen eine stärkere Intensität als die  $Na^+$ -Addukte auf, z. B. 1809,3  $[M+Na]^+$ /1825,3  $[M+K]^+$ , 1971,3  $[M+Na]^+$ /1987,3  $[M+K]^+$  (Tab. 7).



**Abb. 17: MALDI-TOF-MS-Analyse der sialylierten N-Glykanfraktion der OF.**

**(a)** native saure N-Glykane, **(b)** neutrale N-Glykane nach Neuraminidase-Behandlung. Spektrum **(a)** ist im linearen negativen Modus als  $[M-H]^-$  mit THAP als Matrix aufgenommen und Spektrum **(b)** ist im linearen positiven Modus als  $[M+Na]^+$  mit ATT als Matrix aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ◆ - N-Acetylneuraminsäure, ◇ - N-Glycolylneuraminsäure.

### 3.4.2.3 N-Glykane der OAMF und OF

Die fünf Oligomannosyl-Strukturen mit jeweils fünf, sechs, sieben, acht und neun Mannoseresten kommen als dominante Signale in der nativen Fraktion der beiden N-Glykan-Pools vor. Ihr Verschwinden nach der  $\alpha$ -Mannosidase-Spaltung bestätigt die Strukturen. Sehr schwache Signale geben in dieser Fraktion die fucosylierten komplexen Glykane mit oder ohne  $\alpha$ -Galactoseresten [m/z 1971,4 (OAMF)/1971,9 (OF), 2133,2/2131,4, 2497,3 (OAMF), 2660,5/2658,2] und einige hybriden Strukturen (m/z 1606,0, 1620,8/1621,5, 1767,8/1766,9).

Nach Desialylierung ist eine große Heterogenität von fucosylierten und nichtfucosylierten bi-, tri- und tetraantennären komplexen N-Glykanen zu beobachten. Hier treten sowohl in der OAMF als auch in der OF die fucosylierten biantennären komplexen Glykane  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (m/z 1809,5/1810,1) und  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (m/z 1971,4/1971,9) als dominante Peaks auf. Die bi-, tri- und tetraantennären fucosylierten N-Glykane mit einem, zwei oder drei terminalen  $\alpha$ -Galactoseresten konnten in dieser Glykanfraktion deutlicher detektiert und bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass alle diese Strukturen vorwiegend in ihrer sialylierten Form vorliegen. Durch die Analyse der sauren Glykanfraktion konnte diese Tatsache ebenfalls bestätigt werden. Fast alle komplexen Strukturen konnten mit einer oder zwei Sialsäureresten detektiert werden. Die detektierten N-Glykane der OAMF und OF sind in Tab. 5, 6, 7 und 8 zusammengefasst. Die möglichen Glykanstrukturen sind über Glycosciences-Datenbanken ermittelt und beispielhaft an Hand des Programms GlycoWorkbench (EuroCarbDB) gezeichnet worden.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der neutralen N-Glykan-Fraktion der OAMF.**

**(Nativ)** native neutrale nicht enzymatisch-behandelte Glykane, **( $\alpha$ -Mann)** native neutrale Glykane nach  $\alpha$ -Mannosidase-Behandlung, **(desial.)** desialylierte neutrale Glykane, **( $\alpha$ -Gal)** desialylierte neutrale Glykane nach  $\alpha$ -Galaktosidase-Behandlung. Die relative Intensität (RI) der Signale ist mit + dargestellt: **(+)** - 0-5%, **+** - 5-20%, **++** - 20-40%, **+++** - 40-60%, **++++** - 60-80%, **+++++** - 80-100%. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose.

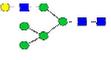
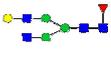
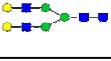
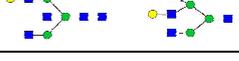
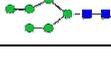
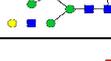
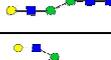
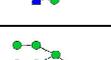
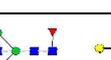
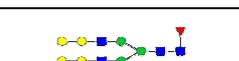
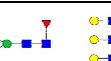
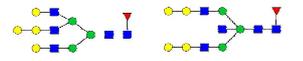
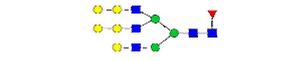
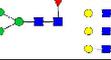
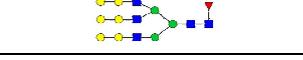
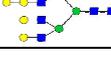
m/z <sub>exp</sub> [M+Na] <sup>+</sup>	Zusammensetzung	Struktur	RI			
			Nativ	$\alpha$ -Mann	Desial.	$\alpha$ -Gal
932,7	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	++	-	-
1093,7	Hex <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	+++++	-	-
1255,8	Hex <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++++	+	+	++
1418,0	Hex <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++++	-	(+)	++
1444,4	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	+	++
1502,0	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	-	+
1580,1	Hex <sub>4</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++++	-	(+)	+
1606,0	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	+	++
1620,8	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	(+)	+
1646,8	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	(+)	++++
1664,8	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	(+)	+
1702,5	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	+	++
1742,5	Hex <sub>5</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++++	-	(+)	+
1767,8	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	+	+
1809,5	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	+++++	+++++
1849,6	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	(+)	+
1904,5	Hex <sub>6</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++++	-	+	++
1971,4	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	++	+++++	-

2010,3	Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	(+)	++
2133,2	Hex <sub>4</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		+	++	(+)	-
2174,0	Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	++	+++
2336,1	Hex <sub>4</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	+	-
2497,3	Hex <sub>5</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	+	-
2539,0	Hex <sub>4</sub> HexNAC <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	++
2660,5	Hex <sub>6</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	+	-	-
2700,7	Hex <sub>5</sub> HexNAC <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	-
2862,1	Hex <sub>6</sub> HexNAC <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	-

**Tabelle 6: Zusammensetzung der neutralen N-Glykanfraktion der OF.**

**(Nativ)** neutrale nicht enzymatisch-behandelte Glykane, **( $\alpha$ -Mann)** native neutrale Glykane nach  $\alpha$ -Mannosidase-Behandlung, **(desial.)** desialylierte neutrale Glykane, **( $\alpha$ -Gal)** desialylierte neutrale Glykane nach  $\alpha$ -Galaktosidase-Behandlung. Die relative Intensität (RI) der Signale ist mit + dargestellt: **(+)** - 0-5%, **+** - 5-20%, **++** - 20-40%, **+++** - 40-60%, **++++** - 60-80%, **+++++** - 80-100%. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose.

m/z <sub>exp</sub> [M+Na] <sup>+</sup>	Zusammensetzung	Struktur	RI			
			Nativ	$\alpha$ -Mann	Desial.	$\alpha$ -Gal
933,2	Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	++	-	-
1095,3	Hex <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	+++++	-	-
1256,1	Hex <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		++++	(+)	++	+
1418,0	Hex <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		+++++	-	++	++
1442,5	Hex <sub>1</sub> HexNAC <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	(+)	+
1579,8	Hex <sub>4</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		+++++	-	+	++
1606,0	Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	+	+

1621,5	Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	+	-	+
1648,2	Hex <sub>1</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	-	++
1663,8	Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	(+)	+
1700,6	Hex <sub>1</sub> HexNAC <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	-	+
1742,5	Hex <sub>5</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		++++	(+)	+	++
1766,9	Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	(+)	+
1810,1	Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	++++	+++++
1860,6	Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	(+)
1903,5	Hex <sub>6</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		++	-	(+)	++
1971,9	Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	+++++	-
2010,3	Hex <sub>2</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	(+)	(+)	+
2131,4	Hex <sub>4</sub> HexNAC <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		+	+	+	(+)
2173,6	Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	+++
2336,8	Hex <sub>4</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	-
2498,0	Hex <sub>5</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	-
2540,3	Hex <sub>4</sub> HexNAC <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	+++
2658,2	Hex <sub>6</sub> HexNAC <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)	-
2860,9	Hex <sub>6</sub> HexNAC <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAC <sub>2</sub>		-	-	+	-

**Tabelle 7: Zusammensetzung der sialylierten N-Glykanfraktion der OAMF.**

**(Nativ)** sialylierte nicht enzymatisch-behandelte Glykane, **(desial.)** desialylierte neutrale Glykane nach Neuraminidase-Behandlung. Die relative Intensität (RI) der Signale ist mit + dargestellt: **(+)** - 0-5%, **+** - 5-20%, **++** - 20-40%, **+++** - 40-60%, **++++** - 60-80%, **+++++** - 80-100%. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ◆ - N-Acetylneuraminsäure, ◇ - N-Glycolylneuraminsäure, (-) - die entsprechende Struktur ist in den Datenbanken nicht vorhanden.

$m/z_{exp}$ Nativ [M-H] <sup>-</sup>	RI	Zusammensetzung	Struktur	$m/z_{exp}$ Desial. [M+Na] <sup>+</sup> ([M+K] <sup>+</sup> )	RI	Struktur
1729,0	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1460,2	+	
1890,9	++	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1622,1	+	
1915,5	+	Hex <sub>1</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1646,8 (1663,1)	++ ++	
2077,9	+++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1809,3 (1825,3)	+++ +++++	
2093,7	++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1809,3 (1825,3)	+++ +++++	
2239,2	+++++	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1971,3 (1987,3)	++ +++	
2255,3	+++	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1971,3 (1987,3)	++ +++	
2280,3	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2012,3 (2028,5)	++ +++	
2368,2	+++++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1809,3 (1825,3)	+++ +++++	
2383,9	++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1809,3 (1825,3)	+++ +++++	
2399,8	+++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1809,3 (1825,3)	+++ +++++	
2444,1	+	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2174,2 (2190,2)	+++ ++++	
2603,1	+	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2336,4 (2352,3)	+ +++	
2766,2	+	Hex <sub>5</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2498,2 (2515,2)	(+) +	
2893,2	+	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2336,4 (2352,3)	+ +++	
3112,5	(+)	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2539,5 (2555,5)	++ +++	
3421,1	+	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> NeuGc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2539,5 (2555,5)	++ +++	

**Tabelle 8: Zusammensetzung der sialylierten N-Glykanfraktion der OF.**

**(Nativ)** sialylierte nicht enzymatisch-behandelte Glykane, **(desial.)** desialylierte neutrale Glykane nach Neuraminidase-Behandlung. Die relative Intensität (RI) der Signale ist mit + dargestellt: **(+)** - 0-5%, **+** - 5-20%, **++** - 20-40%, **+++** - 40-60%, **++++** - 60-80%, **+++++** - 80-100%. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ◆ - N-Acetylneuraminsäure, ◇ - N-Glycolylneuraminsäure, (-) - die entsprechende Struktur ist in den Datenbanken nicht vorhanden.

m/z <sub>exp</sub> Nativ [M-H] <sup>-</sup>	RI	Zusammensetzung	Struktur	m/z <sub>exp</sub> Desial. [M+Na] <sup>+</sup> ([M+K] <sup>+</sup> )	RI	Struktur
1727,1	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1457,3	+	
1874,2	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1603,9	+	
1889,5	++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1603,9	+	
1930,5	(+)	Hex <sub>1</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1644,5 (1661,0)	++ ++	
2076,7	++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1806,1 (1822,1)	+++++ ++	
2092,8	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1806,1 (1822,1)	+++++ ++	
2238,8	+++++	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1968,2 (1984,2)	+++++ ++	
2254,5	++	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1968,2 (1984,2)	+++++ ++	
2280,0	(+)	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2009,9 (2025,4)	+	
2368,0	++	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1806,1 (1822,1)	+++++ ++	
2603,4	+	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2332,5 (2348,1)	++ +	
2733,9	(+)	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2170,7 (2187,2)	+++ +	
2765,7	++	Hex <sub>5</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2494,4	+	
2896,8	(+)	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2332,5 (2348,1)	++ +	
3115,2	(+)	Hex <sub>4</sub> HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2535,3 (2551,0)	+++ +	
3131,0	+	Hex <sub>6</sub> HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2858,5 (2873,6)	+++ +	
3292,3	+	Hex <sub>5</sub> HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2697,1 (2712,7)	++ (+)	
3278,3	+	Hex <sub>5</sub> HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	2697,1 (2712,7)	++ (+)	

### 3.5 Identifizierung der GNA-bindenden Oviduktglykoproteine

Die Identifizierung der GNA-bindenden Glykoproteine der OAMF und OF erfolgte durch N-terminale Sequenzierung (TopLab, München, Deutschland) oder durch MALDI- und ESI-MS-Analyse. Die 150kDa und 100kDa-Proteinbanden (Abb. 18a) konnten erfolgreich sequenziert werden. Durch eindeutige Sequenzen konnte nach Suche in NCBI-BLAST die Identität von drei Proteinen bestimmt werden. Die N-terminale Sequenz der 150kDa-Bande zeigte große Homologie mit dem *oxygen-regulated glycoprotein* (ORP150) von Mensch, Maus, Ratte und Hund. Die Primärstruktur des entsprechenden porcinen Proteins steht in den Datenbanken nicht zur Verfügung. Da die bekannten N-terminalen Sequenzen eine Homologie von 100% aufweisen, kann angenommen werden, dass es sich bei der 150kDa-Bande um das porcine *oxygen-regulated glycoprotein* (ORP 150) handelt. In der 100kDa-Bande wurden zwei Proteine gefunden – *lysosome-associated membrane glycoprotein* 1 und 2 (LAMP-1 und LAMP-2), wobei nur die Sequenz vom porcinen LAMP-1 in den Datenbanken vorliegt. Die zweite Sequenz ist homolog zu LAMP-2 aus Mensch.

Die OF-Proteine wurden nach in-Gel Trypsin-Spaltung massenspektrometrisch untersucht. Die Auswertung der MALDI- oder ESI-MS und MS/MS-Daten erfolgte mit dem Programm BioTools (Bruker Daltonik) und Homologiesuche in den Datenbanken mit der MASCOT-Software (Matrix Science). Es wurden  $\alpha$ -2-Makroglobulin (240kDa), Aminopeptidase N (150kDa), *oviduct-specific glycoprotein* (110kDa), LAMP-1(100kDa) und *heat shock protein HSP90-alpha* (100kDa) vom Schwein identifiziert (Abb. 18b). Das Protein mit MG 180kDa zeigte Homologie mit dem *angiotensin-converting enzyme* von Maus und Ratte. In der 150kDa-Bande wurde ein zweites Protein detektiert, das Homologie mit dem humanen *oxygen-regulated glycoprotein* (ORP 150) aufweist.

Die Proteinbanden mit MG 200kDa, 130kDa, 80kDa und 50kDa der OAMF und 260kDa, 70kDa und 50kDa der OF konnten nicht identifiziert werden.

Alle identifizierten Proteine der GNA-bindenden Fraktionen von OAMF und OF und die übereinstimmenden Peptidsequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt.

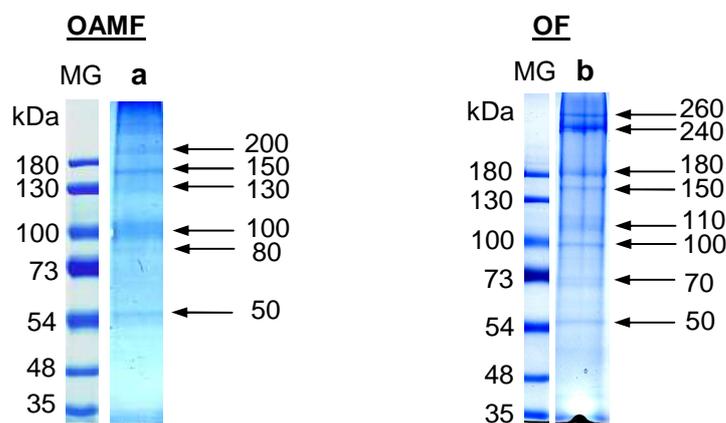


Abb. 18: Elektrophoretische Trennung der GNA-bindenden Glykoproteinfraktionen der OAMF (a) und OF (b).

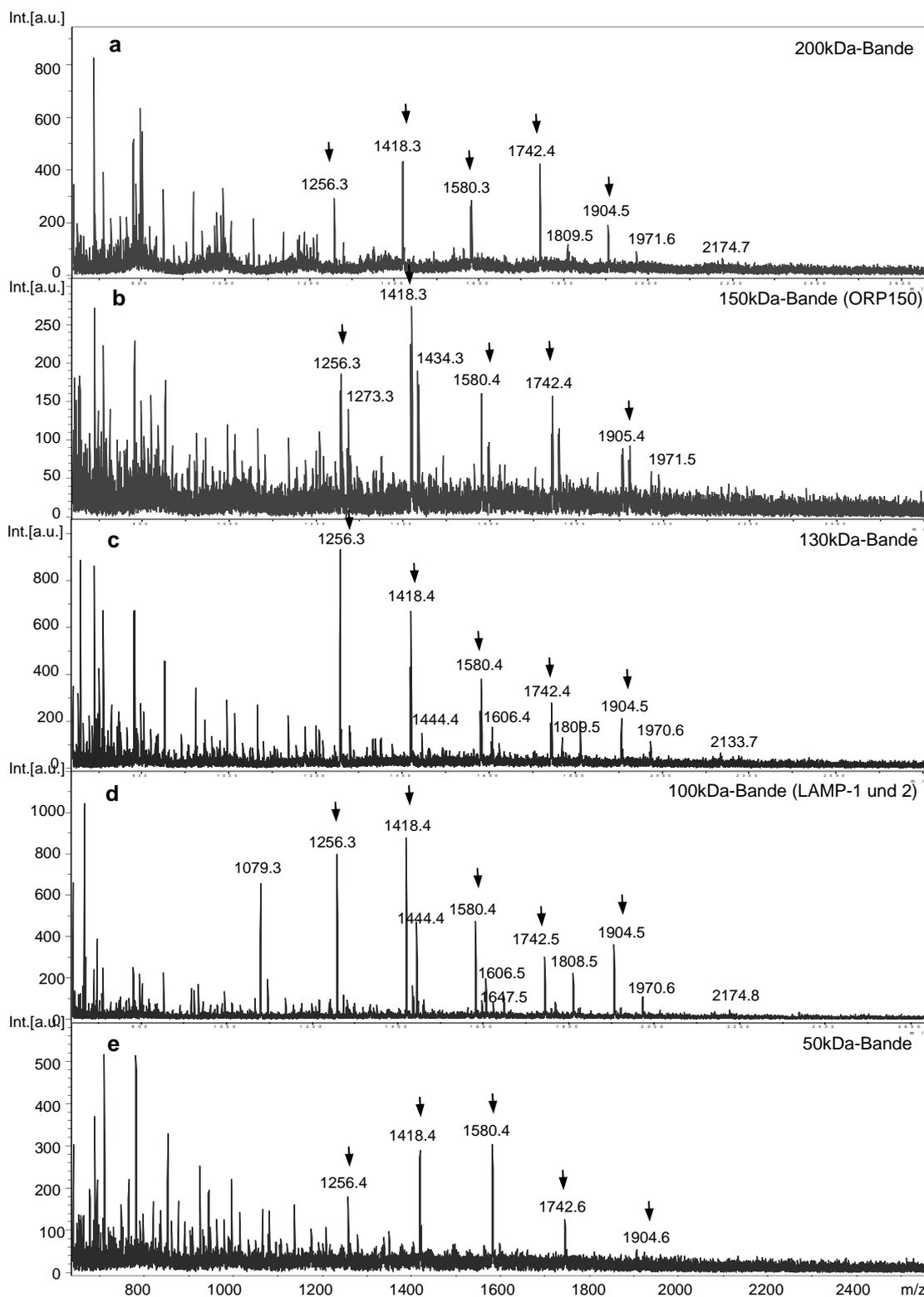
Tabelle 9: GNA-bindende Glykoproteine der OAMF und OF

OAMF				
Swiss-Prot Acc. Nr.	Protein	MG, kDa	Identif. Peptidsequenzen/ Position (N-Terminus)	-
Q9Y4L1 Homo sapiens	150kDa oxygen-regulated glycoprotein (ORP150)	150	LAVMSVDLGSE 33-43	-
Q5K4G2 Sus scrofa	lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1)	100	VFVVS DGNNGTA 28-38	-
Q99534 Homo sapiens	lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP-2)	100	LELNLT DSENAT 29-40	-
OF				
Swiss-Prot Acc. Nr.	Protein	MG, kDa	Identif. Peptidsequenzen/ Position	Mascot-Score
Q6R6N0 Sus scrofa	$\alpha$ -2-Makroglobulin	240	KYSNPSTCFGGESQATCEK 65-83 XSGELNSQGCFSQSVETK 84-101 RQEFEMK 107-113 IKEEGTEVELT 120-132	80
Q6GTS2 Mus musculus	angiotensin-converting enzyme, somatische Isoform	180	ENYNQEWWSLR 1089-1099 GPQFGSEVELR 1300-1310	89
Q29242 Sus scrofa	Aminopeptidase N	150	SDQIALPDFNAGAM 336-358 SALACSNEVMLLNLR 827-840 YLG YTLNPD LIR 841-852 FSSEFELQQLQFK 906-920	227
Q9Y4L1 Homo sapiens	150kDa oxygen-regulated glycoprotein (ORP150)	150	FPEHELGFDPQR 120-131 DAVIYPILVEFTR 439-451	121
Q28990 Sus scrofa	oviduct-specific glycoprotein (oviduktin)	110	DESIFYPEFNQLK 70-85 FTTMLSTFTNR 107-117 SSAYTMNYWR 238-247 LLMGFPTYGR 256-265	89
Q5K4G2 Sus scrofa	lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1)	100	TTFGGSCSAQLVTLELQGESLR 259-280 LQVTEAFALNVFQVR 340-354	68
O02705 Sus scrofa	heat shock protein HSP90-alpha	100	ELTSNSSDALDKIR 47-60 TLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAK 88-112 GVV DSEDLPLNISR 388-401	209

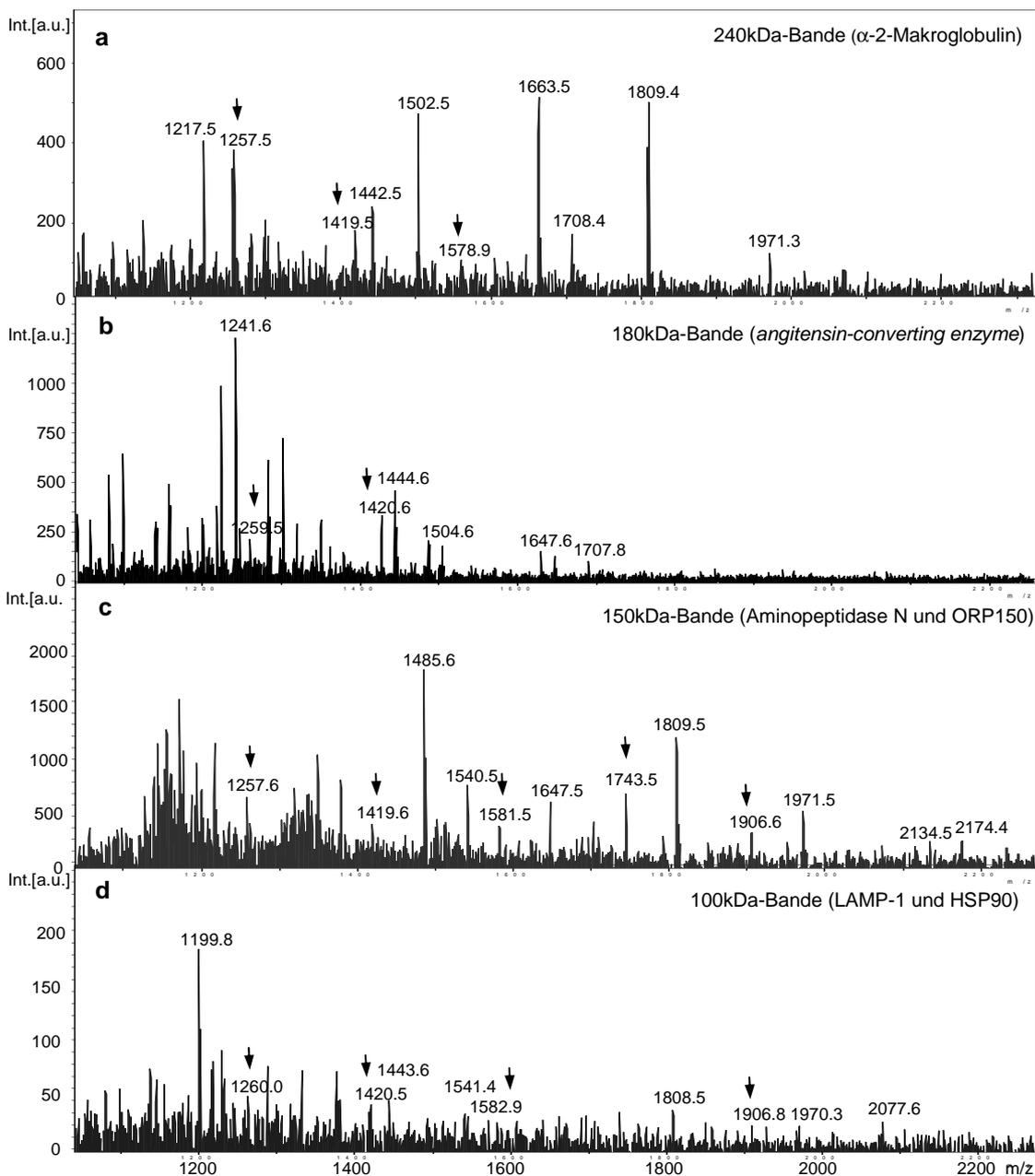
### 3.5.1 Glykan-Profile der GNA-bindenden Glykoproteine der OAMF und OF

Nach Aufklärung der dominanten Oligosaccharid-Strukturen der N-Glykane der OAMF und OF sollten diese Strukturen den einzelnen Proteinbanden zugeordnet werden. Die GNA-bindenden Fraktionen der OAMF und OF wurden elektrophoretisch getrennt und die dominanten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Die N-Glykane konnten in-Gel mit N-Glykosidase-F abgespalten werden. Gleichzeitig wurden sie mit Neuraminidase desialyliert, um in einem Schritt alle Glykanstrukturen erfassen zu können. Nach Carbograph-Reinigung wurden die N-Glykane massenspektrometrisch untersucht.

Die Proteinbanden aus OAMF und OF wurden in Abschnitt 3.5 analysiert und die meisten konnten als Glykoproteine mit mehreren potenziellen N-Glykosylierungstellen identifiziert werden. Viele von diesen Proteinbanden erwiesen sich jedoch als ein Gemisch aus zwei Proteinen. Daher konnten einige Glykanstrukturen nur annähernd zugeordnet werden. Abb. 19b stellt das Glykan-Profil der 150kDa-Bande der OAMF dar, die als ORP150 identifiziert wurde. Fünf Oligomannosyl-Strukturen ( $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ) sind in diesem Profil detektiert worden ( $m/z$  1256,3, 1418,3, 1580,4, 1742,4 und 1905,4). Das Profil in Abb. 19d ist ein Gemisch aus den N-Glykanstrukturen von LAMP-1 und LAMP-2. Neben den fünf Oligomannosyl-Glykane sind noch biantennäre komplexe und hybride Strukturen zu beobachten ( $m/z$  1444,4, 1606,5, 1808,5, 1970,6). Aus der OF wurde die 240kDa-Bande als  $\alpha$ -2-Makroglobulin identifiziert. Das entsprechende Glykan-Profil (Abb. 20a) weist komplexe ( $m/z$  1442,5, 1502,5, 1663,5, 1809,4) und Oligomannosyl-Strukturen ( $m/z$  1257,5, 1419,5, 1578, 9) auf. Von der 180kDa-Bande (*angiotensin-converting enzyme*) konnten nur wenige Glykansignale mit geringer Intensität detektiert werden (Abb 20b). Die Profile in Abb. 20c und 20d sind wahrscheinlich ein Gemisch aus den N-Glykanen von Aminopeptidase N und ORP150 (150kDa-Bande), beziehungsweise von LAMP-1 und HSP90 (100kDa-Bande). In den beiden Spektren sind sowohl komplexe als auch Oligomannosyl-Glykane nachgewiesen worden. Alle detektierten Signale konnten auch in dem jeweiligen N-Glykan-Pool (OAMF oder OF) gefunden werden.



**Abb. 19: MALDI-TOF-MS-Glykan-Profile der GNA-bindenden Glykoproteine der OAMF.** (a) 200kDa-Bande, (b) 150kDa-Bande, (c) 130kDa-Bande, (d) 100kDa-Bande, (e) 50kDa-Bande (Abb. 18a). Die Signale sind im positiven Reflektor-Modus als  $[M+Na]^+$  aufgenommen. Die Pfeile zeigen die Oligomannosyl-Typ Strukturen.



**Abb. 20: MALDI-TOF-MS-Glykan-Profile der GNA-bindenden Glykoproteine der OF.**

**(a)** 240kDa-Bande, **(b)** 180kDa-Bande, **(c)** 150kDa-Bande, **(d)** 100kDa-Bande (Abb. 18b).

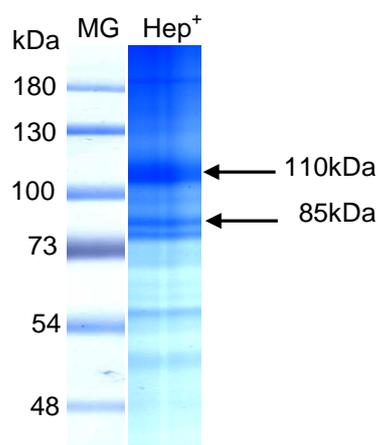
Die Signale sind im positiven Reflektor-Modus als  $[M+Na]^+$  aufgenommen. Die Pfeile zeigen die Oligomannosyl-Typ Strukturen.

### 3.6 Glyko-Proteom-Analyse des porcinen Oviduktins

Die Proteinbande mit MG 110kDa der GNA-bindenden Fraktion der OF (Abb. 18b) konnte als Oviduktin identifiziert werden. Die Struktur dieses Proteins und einige Aspekte seiner Beteiligung an den Prozessen der Befruchtung sind bekannt. Die Expression von Oviduktin und seiner Isoformen ist zyklusabhängig (Buhi et al., 1990) und variiert in den verschiedenen Eileiterabschnitten (Isthmus und Ampulla). In dieser Arbeit wird eine erste Charakterisierung der N-Glykosylierung des porcinen Oviduktins präpuberaler Sauen vorgestellt.

#### 3.6.1 Isolierung von Oviduktin aus Oviduktflüssigkeit

Die Bande mit MG 110kDa in der GNA-bindenden Fraktion der OF ist relativ schwach und ist dicht neben der 100kDa Bande (LAMP1) positioniert (Abb.18b). Da dies die Analyse des Proteins erschweren könnte, wurde Oviduktin nach der Methode von Buhi et al. (1990) als relativ saubere Fraktion und in größeren Mengen isoliert. Das Protein besitzt eine Heparin-Bindungsstelle und kann über Affinitätschromatographie mit Heparin aus der OF getrennt werden. Abb. 21 zeigt die elektrophoretische Trennung der Heparin-bindenden Fraktion der OF. Das Oviduktin liegt in verschiedenen Isoformen vor (Buhi et al., 1990,1996). Zwei Hauptisoformen mit MG 110 und 85kDa wurden hier massenspektrometrisch identifiziert. Für die weiteren Analysen wurde die dominante 110kDa-Bande ausgewählt.



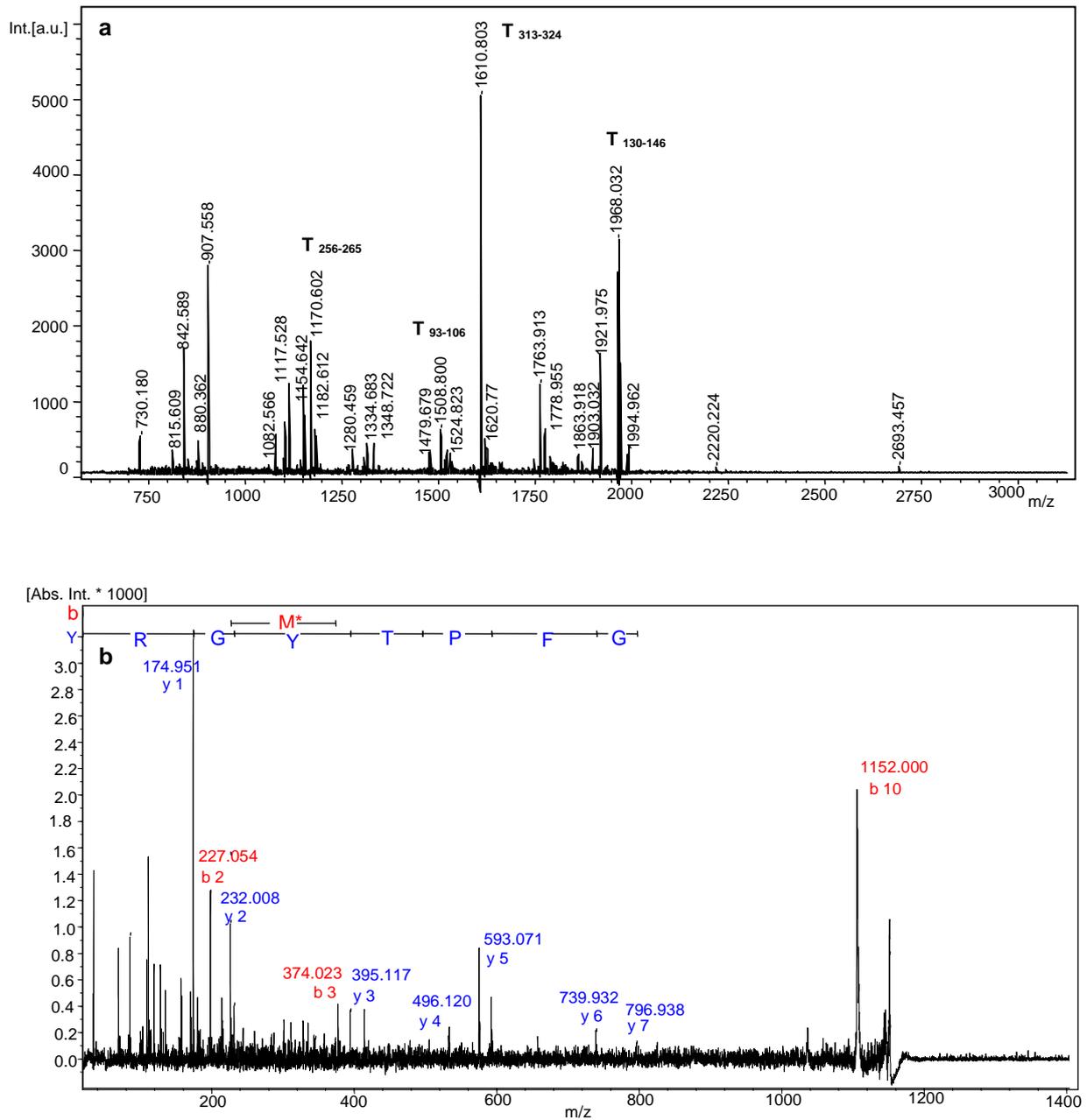
**Abb. 21: 8% SDS-PAGE der Heparin-bindenden Fraktion (Hep+) der OF.**

Die Pfeile zeigen die Position der zwei Isoformen des Oviduktins mit MG 110kDa und 85kDa.

### 3.6.2 MALDI-TOF-MS- und MS/MS-Analyse

Um die Identität des Proteins zu bestätigen, wurden die 110kDa- und 85kDa-Banden in-Gel enzymatisch mit Trypsin verdaut. Die Peptide wurden mit MALDI-TOF-MS und MS/MS analysiert. Nach Erstellung eines Fragment-Musters des tryptischen Peptidgemisches, wurden einige Peptidsignale im LIFT-Modus fragmentiert. Die Auswertung wurde an Hand des Programms BioTools (Bruker Daltonik) durchgeführt. Die Identifizierung des Proteins als Oviduktin (Swiss-Prot Accession Nr.: Q28990) erfolgte durch Kombination der MS- und MS/MS-Daten und anschließende Datenbanksuche. Die dominante 110kDa-Bande wurde mit einer MASCOT-Score von 151 identifiziert. Das Peptid-Muster ist in Abb. 22a dargestellt. Es wurden 4 übereinstimmenden Peptidsequenzen gefunden: T<sub>93-106</sub> (m/z 1508,8), T<sub>130-146</sub> (m/z 1968,0), T<sub>256-265</sub> (m/z 1170,6) und T<sub>313-324</sub> (m/z 1610,8). Abb. 22b zeigt beispielsweise die Fragmentierung des Peptids bei m/z 1170,6 und Sequenz LLMGFPTYGR (T<sub>256-265</sub>).

In dem MS-Spektrum der schwächeren 85kDa-Oviduktinbande konnte ein Peptidsignal fragmentiert werden: T<sub>313-324</sub> (m/z 1610,8). Die Identität des Proteins wurde mit MASCOT-Score 45 bestätigt.



**Abb. 22: MALDI-TOF-MS-Analyse des porcinen Oviduktins.**

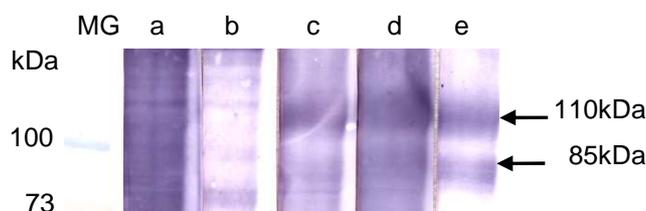
**(a)** Peptid-Muster, **(b)** MS/MS des Peptids bei m/z 1170 und Sequenz LLMGFPTYGR

(T<sub>256-265</sub>). Die Spektren sind im positiven Reflektor-Modus **(a)** und im positiven LIFT-Modus **(b)** als [M+H]<sup>+</sup> mit HCCA als Matrix aufgenommen.

### 3.6.3 Lektinologische Analyse

Die Zusammensetzung der Glykanstrukturen des Oviduktins wurde nach elektrophoretischer Trennung lektinologisch am Protein-Blot untersucht. Die Zuckerspezifität der verwendeten Lektine ist in der Tabelle 10 dargestellt.

Die Lektin-Blot-Analyse zeigte eine deutliche Reaktion der Oviduktinbanden bei 110kDa und 85kDa mit SNA und AAA (Abb. 23c, d). Das ist Zeichen für einen hohen Gehalt von sialylierten (SNA) und fucosylierten (AAA) Oligosaccharid-Strukturen. Die sehr schwachen Banden von ConA und GNA (Abb. 23a, b) zeigen das Vorhanden von Oligomannosyl-Typ N-Glykanen, allerdings in sehr geringen Mengen. Die deutlichen ACA-Banden (Abb. 23e) weisen auf eine reichliche O-Glykosylierung hin. Eine negative Kontrolle mit Streptavidin-AP und Inhibition mit dem entsprechenden Hapten für jedes Lektin bestätigten die Spezifität der Bindung.



**Abb. 23: Lektinologische Analyse des porcinen Oviduktins.**

(a) ConA, (b) GNA, (c) SNA, (d) AAA, (e) ACA (jeweils 1µg/ml); Detektion mit Streptavidin-AP; Die Pfeile rechts zeigen die Position des Oviduktins bei 110kDa und 85kDa.

**Tab.10: Kohlenhydratspezifität der verwendeten Lektine**

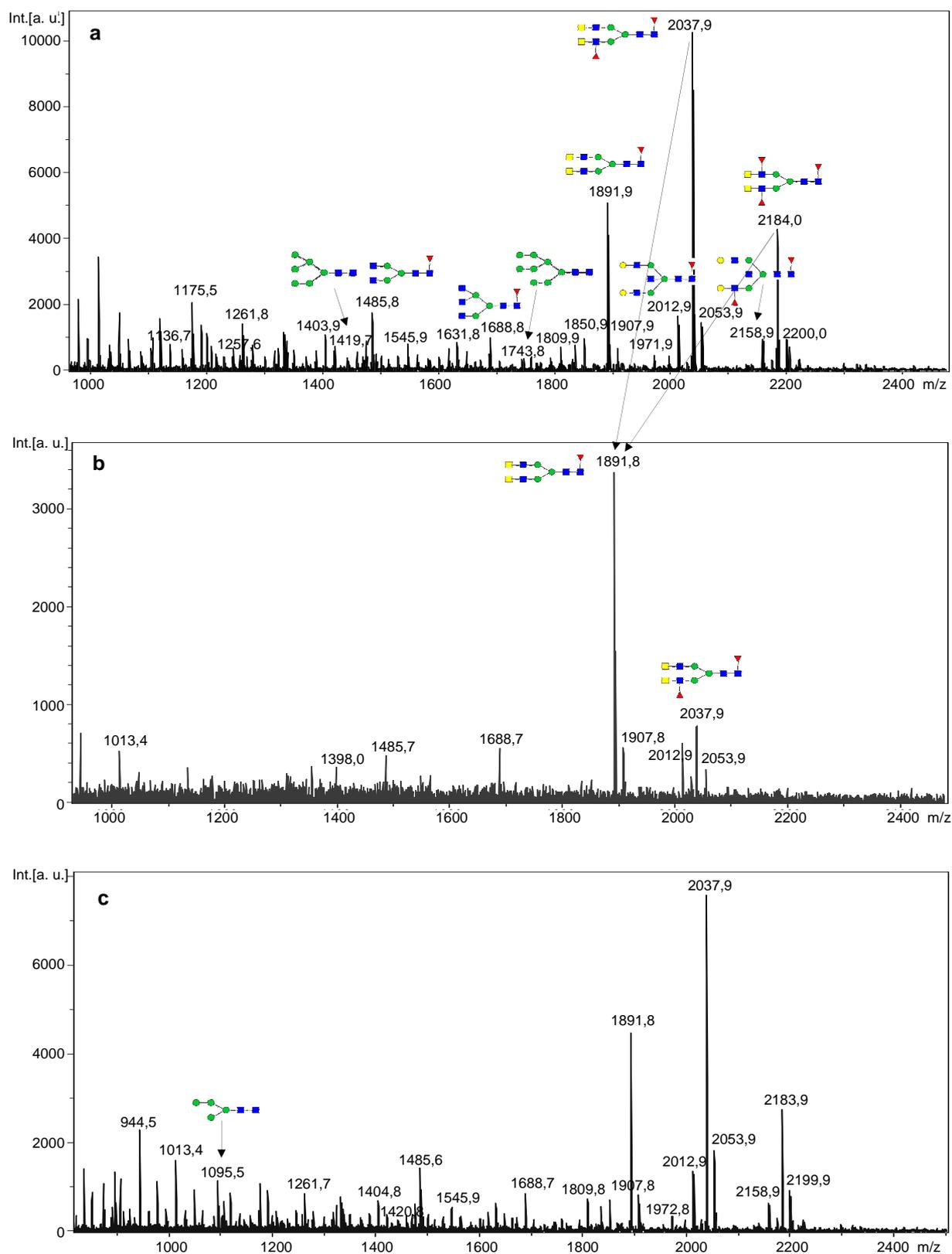
Lektin	Kohlenhydratspezifität	Hapten
GNA	Oligomannosyl-Typ Strukturen mit $\alpha$ 1-3 und $\alpha$ 1-6 glykosidische Bindung	$\alpha$ -Methylmannopyranosid
ConA	verzweigte $\alpha$ -Mannosyl-Strukturen; Oligomannosyl-Typ, Hybrid-Typ und bi-antennäre Complex-Typ N-Glykane	$\alpha$ -Methylmannopyranosid
AAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3/4)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc; GlcNAc $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-6)GlcNAc-Asn	L-Fucose
SNA	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal(GalNAc)	L-Galactose
ACA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (T-Antigen von O-Glykanen)	Asialofetuin

### 3.6.4 N-Glykan-Profil

Das N-Glykan-Profil von Oviduktin (110kDa Bande) wurde mittels in-Gel Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse erstellt.

#### 3.6.4.1 MALDI-TOF-MS-Analyse der neutralen N-Glykanfraktion

Die lektinologische Analyse des Oviduktins hat eine starke Reaktion mit dem Lektin AAA gezeigt, was auf zahlreiche fucosylierte Strukturen hindeutet. Das Profil der neutralen N-Glykanfraktion weist tatsächlich vorwiegend bi- und triantennäre fucosylierte komplexe Strukturen auf. Die drei dominanten Signale in Abb. 24a können komplexe N-Glykane mit einer Kern-Fucosylierung ( $m/z$  1891,9) und zusätzlich mit einem ( $m/z$  2037,7) und mit zwei ( $m/z$  2184,0)  $\alpha$ -1,3-gebundenen Fucoseresten an dem nichtreduzierenden Ende der Glykanstruktur repräsentieren. Zum Nachweis dieser Strukturen wurde eine Exoglykosidase-Spaltung mit  $\alpha$ -1,3-Fucosidase am MALDI-Target durchgeführt. Das Signal bei  $m/z$  2184,0 ist nach der Spaltung nicht mehr detektierbar und das vorher stärkste Signal bei  $m/z$  2037,7 zeigt eine deutlich geringere Intensität. Die Intensität des Signals bei  $m/z$  1891,9 hat sich verdoppelt, da durch Abspaltung der antennären Fucosereste eine Kern-fucosylierte biantennäre Struktur entstanden ist (Abb. 24b). Die Signale bei  $m/z$  1793,8, 1996,9, 2158,9 und 2322,0 können ebenfalls als bi-fucosylierte Strukturen mit einer Kern- und mit einer antennären Fucose zugeordnet werden. Bei den Signalen bei  $m/z$  1907,9, 2053,9 und 2200,0 handelt es sich wahrscheinlich um  $[M+K]^+$ -Addukte von  $m/z$  1891,9, 2037,7 und 2184,0 oder um andere mono- und bi-fucosylierten Strukturen (Tab. 11). Eine exakte Bestimmung ist in diesem Fall ohne weitere Analysen nicht möglich. Einige schwache Signale von Oligomannosyl-Strukturen ( $m/z$  1257,6, 1419,7, 1581,7, 1743,8) wurden detektiert und an Hand  $\alpha$ -Mannosidase-Spaltung am MALDI-Target bestätigt (Abb. 24c). Die Struktur mit  $m/z$  1095,5 ist das Resultat der sequenziellen Abspaltung der terminalen Mannoseresten von dem nichtreduzierenden Ende der Oligomannosyl-Strukturen. Das Signal bei  $m/z$  1907,9 könnte auch ein Oligomannosyl-Glykan repräsentieren. Da es nach der  $\alpha$ -Mannosidase-Behandlung unverändert ist, kann es einem nicht-fucosylierten komplexen Glykan mit Zusammensetzung  $\text{Hex}_1\text{HexNAc}_4+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  oder als  $[M+K]^+$ -Addukt von  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  ( $m/z$  1891,9) zugeordnet werden.



**Abb. 24: MALDI-TOF-MS-Profil der neutralen N-Glykanfraktion des Oviduktins.**

**(a)** native N-Glykane, **(b)** nach Behandlung mit  $\alpha$ -1,3-Fucosidase am MALDI-Target, **(c)** nach Behandlung mit  $\alpha$ -Mannosidase am MALDI-Target. ● - Mannose, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ■ - N-Acetylglucosamin, ■ - N-Acetylgalactosamin.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der neutralen N-Glykan-Fraktion des Oviduktins.**

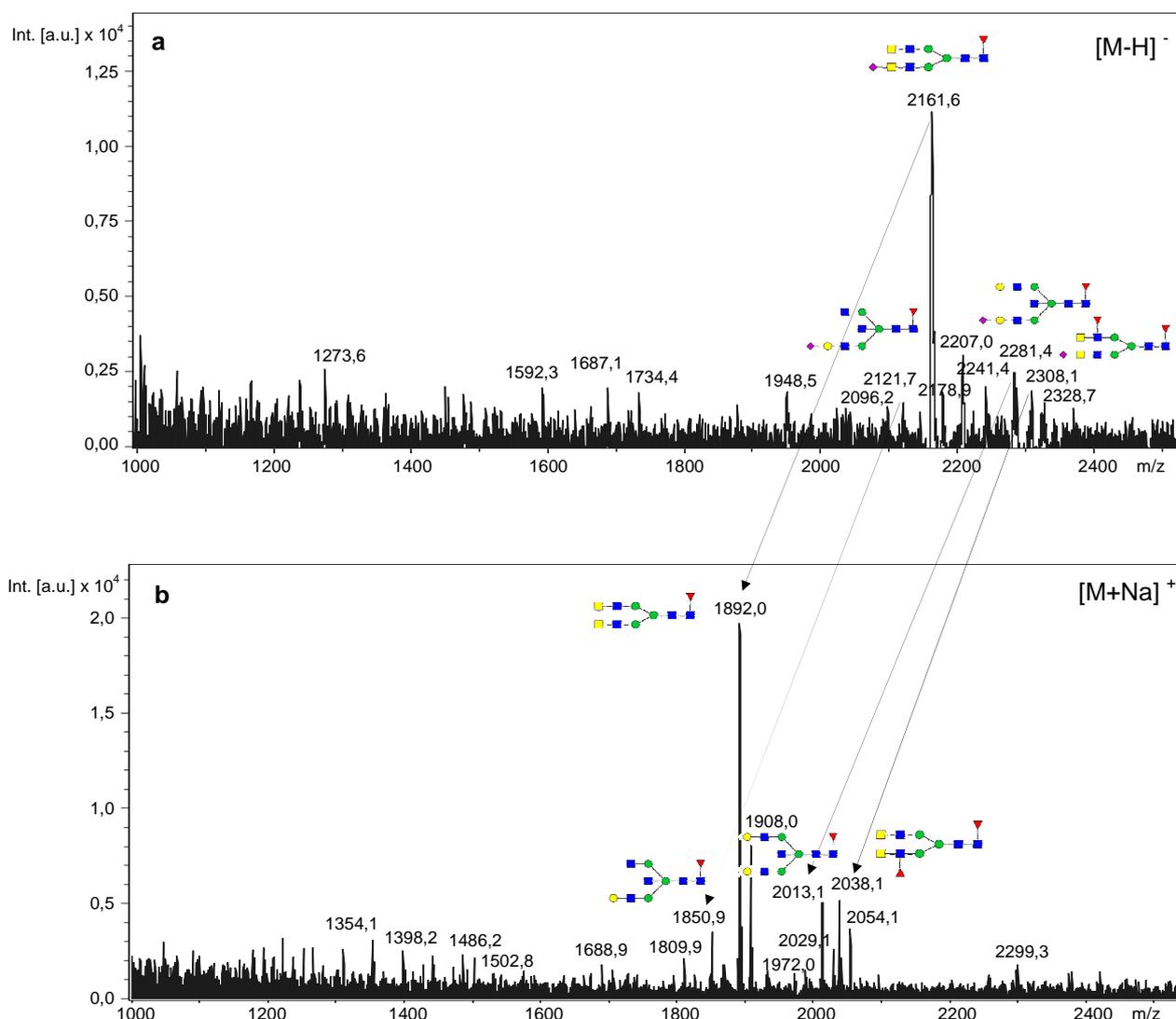
**(Nativ)** neutrale nicht enzymatisch-behandelte Glykane, **( $\alpha$ -1,3Fuc)** neutrale Glykane nach  $\alpha$ -1,3-Fucosidase-Behandlung, **( $\alpha$ -Mann)** neutrale Glykane nach  $\alpha$ -Mannosidase-Behandlung. Die relative Intensität (RI) der Signale ist mit + dargestellt: **(+)** - 0-5%, **+** - 5-20%, **++** - 20-40%, **+++** - 40-60%, **++++** - 60-80%, **+++++** - 80-100%. ● - Mannose, ■ - N-Acetyl-glucosamin, ■ - N-Acetylgalactosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose.

m/z <sub>exp</sub> [M+Na] <sup>+</sup> ([M+K] <sup>+</sup> )	Zusammensetzung	Struktur	RI		
			Nativ	$\alpha$ -1,3Fuc	$\alpha$ -Mann
1136,7	HexNAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	(+)	(+)
1095,5	Hex <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		-	-	+
1257,6	Hex <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	-
1299,8 (1316,9)	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1337,6	HexNAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	-	+
1403,9	Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	+	+
1419,7	Hex <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	-	(+)
1441,9	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1458,9 (1474,9)	Hex <sub>2</sub> GlcNAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1485,7 (1501,7)	HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		++	+	++
1501,7	Hex <sub>1</sub> GlcNAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1581,7	Hex <sub>4</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	-
1647,8 (1663,8)	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1663,8	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1688,7 (1705,1)	HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	+	+
1705,1	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1743,8 (1760,1)	Hex <sub>5</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	-
1769,8	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	-

1793,8	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	-
1809,9	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	+	+
1850,9	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	(+)	+
1891,9 (1907,9)	HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++	+++++	+++
1907,9	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>4</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	+	+
1971,9	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
1996,9 (2012,9)	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	(+)	(+)
2012,9 (2028,9)	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		++	+	++
2028,9	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	-
2037,9 (2053,9)	HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++++	+	+++++
2053,9	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		++	+	++
2158,7	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	-	+
2175,0	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	(+)
2184,0 (2200,0)	HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+++	-	++
2200,0	Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		+	-	+
2299,1	HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	-
2322,0	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	-
2337,0	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		(+)	-	-

### 3.6.4.2 MALDI-TOF-MS-Analyse der sauren N-Glykanfraktion

Das MS-Glykan-Profil der sauren N-Glykanfraktion des Oviduktins wurde im negativen Modus mit THAP als Matrix aufgenommen (Abb. 25a). Desialylierung mit Neuraminidase am MALDI-Target und anschließende Messung im positiven Modus (Abb. 25b) ermöglichte die Erfassung der sialylierten Strukturen.



**Abb. 25: MALDI-TOF-MS-Profil der sauren N-Glykanfraktion des Oviduktins.**

**(a)** native saure N-Glykane, **(b)** neutrale N-Glykane nach Desialylierung mit Neuraminidase am MALDI-Target. Die Spektren sind im negativen Reflektor-Modus mit THAP als Matrix **(a)** und im positiven Reflektor-Modus mit ATT als Matrix **(b)** aufgenommen. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ■ - N-Acetylgalactosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ◆ - N-Acetylneuraminsäure.

Durch diesen Ansatz konnte die Sialylierung der drei dominanten mono-, bi- und tri-fucosylierten komplexen Glykanstrukturen, die in der nativen neutralen Fraktion zu beobachten sind (Abb. 24a), untersucht werden.

Das mono-fucosylierte biantennäre komplexe Glykan  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  erscheint in der sauren N-Glykanfraktion als dominante Struktur in seinen sialylierten Formen: mit einer N-Acetylneuraminsäure ( $m/z$  2161,6) und mit einer N-Glycolylneuraminsäure ( $m/z$  2178,9) (Abb. 25a). Nach Desialylierung resultieren diese zwei Signale in einem Signal bei  $m/z$  1892,0 (Abb. 25b).

Die bi-fucosylierte Struktur  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_2+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  liegt auch sialyliert ( $m/z$  2308,1) (Abb. 25a) vor, allerdings zeigt es eine deutlich schwächere Intensität. Die entsprechende desialylierte Struktur liegt bei  $m/z$  2038,1 (Abb. 25b). In der nativen neutralen Glykanfraktion ist dieses Signal dominant (Abb. 24a, Tab. 11). Das ist ein Hinweis, dass dieses Glykan vorwiegend in seinem nichtsialylierten neutralen Zustand vorkommt.

Sialylierung des tri-fucosylierten Glykans  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_3+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  wurde in der sauren Fraktion nicht detektiert. Es existiert wahrscheinlich nur in einer neutralen Form und ist nur in der nativen neutralen Glykanfraktion zu beobachten ( $m/z$  2184,0, Abb. 24a).

Zusätzlich konnten noch einige sialylierte Strukturen mit geringerer Intensität identifiziert werden. Die Signale bei  $m/z$  2121,7 und 2281,4 (Abb. 25a) repräsentieren die komplexen fucosylierten N-Glykane  $\text{Hex}_1\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  ( $m/z$  1850,9) und  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  ( $m/z$  2013,1) (Abb. 25b) mit jeweils einer N-Acetylneuraminsäure (Tab. 12).

**Tabelle 12: Zusammensetzung der sialylierten N-Glykanfraktion des Oviduktins.**

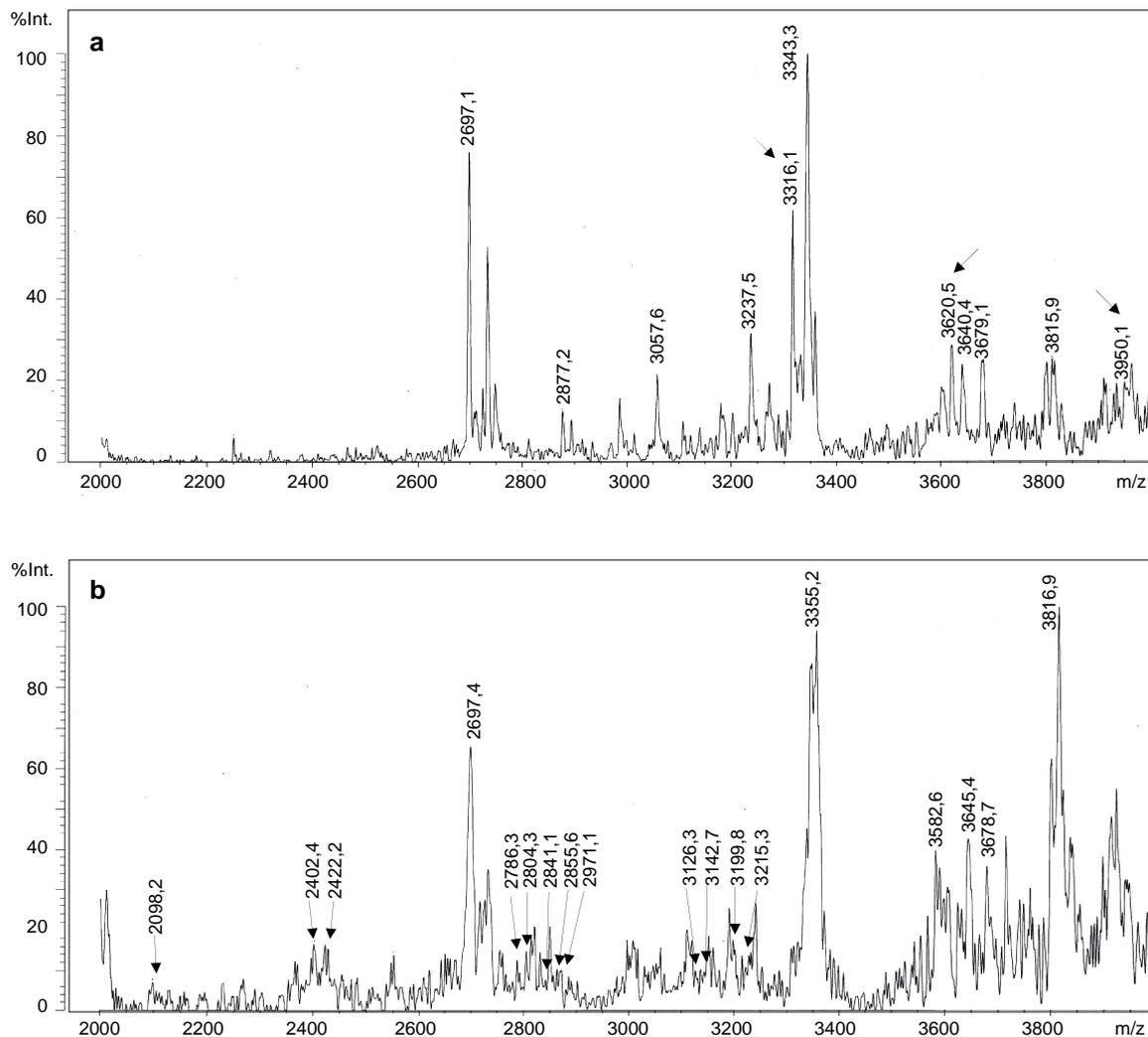
**(Nativ)** sialylierte nicht enzymatisch-behandelte Glykane, **(desial.)** desialylierte neutrale Glykane entstanden nach Neuraminidase-Behandlung. Die relative Intensität (RI) der Signale ist mit + dargestellt: (+) - 0-10%, + - 10-20%, ++ - 20-40%, +++ - 40-60%, ++++ - 60-80%, +++++ - 80-100%. ● - Mannose, ■ - N-Acetylglucosamin, ■ - N-Acetylgalactosamin, ● - Galactose, ▲ - Fucose, ◇ - N-Acetylneuraminsäure, ◆ - N-Glycolylneuraminsäure.

m/z <sub>exp</sub> Nativ [M-H] <sup>-</sup>	RI	Zusammensetzung	Struktur	m/z <sub>exp</sub> Desial. [M+Na] <sup>+</sup> ([M+K] <sup>+</sup> )	RI	Struktur
1948,5	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1663,1	(+)	
2096,2	(+)	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1809,9 (1825,9)	(+) (+)	
2121,7	(+)	Hex <sub>1</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1850,9 (1867,9)	+ (+)	
2161,6	+++++	HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1892,0 (1908,0)	+++++	
2178,9	+	HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>	-	1892,0 (1908,0)	+++++	
2241,4	+	Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		1972,0 (1988,0)	(+) (+)	
2281,4	+	Hex <sub>2</sub> HexNac <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2013,1 (2029,0)	++ (+)	
2308,1	+	HexNac <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> NeuAc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub>		2038,1 (2054,1)	++ +	

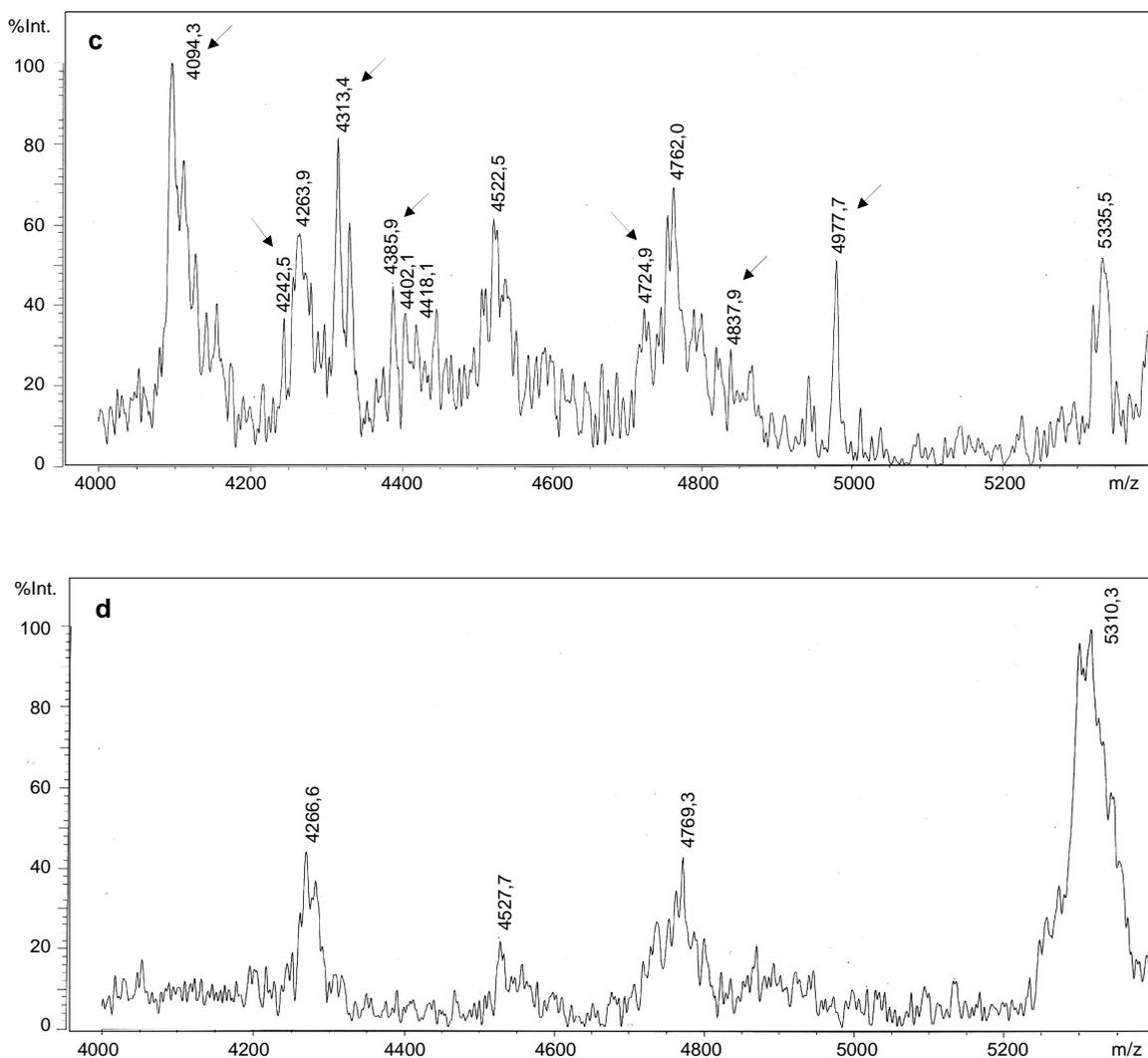
### 3.6.5 N-Glykosylierungsstellen

Die Aminosäuresequenz des Oviduktins deutet auf drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N<sub>62</sub>, N<sub>402</sub> und N<sub>441</sub> mit der Konsensussequenz N-X-S/T, wobei X jede Aminosäure außer Prolin oder Asparaginsäure sein kann. An Hand MALDI-TOF-MS nach in-Gel Spaltung mit Trypsin der Hauptbande wurden die N-Glykosylierungsstellen des Oviduktins analysiert. Dazu wurden die MS-Peptidprofile der 110kDa-Bande vor und nach Abspaltung der N-Glykane mit N-Glykosidase F miteinander verglichen. Das Verschwinden der Glykopeptidsignale und das Auftreten neuer Signale, die die deglykosylierten Peptide repräsentieren, erlauben sowohl die Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen als auch der Glykosylierungsmuster. Die Auswertung der MS-Daten erfolgte mit dem Programm ExpasyGlycoMode. Aus allen berechneten Möglichkeiten wurden nur die Glykopeptide ausgewählt, mit denen eine experimentell detektierte Peptidmasse und eine experimentell bestätigte Glykanstruktur übereinstimmte. Es wurden sowohl Peptide ohne Modifizierung als auch mit carbamidomethylierten oder akrylamidylierten Cystein, oxydierten Methionin und Peptide mit bis zu einer *missed cleavage* berücksichtigt.

Die MS-Spektren in Abb. 26a und 26c repräsentieren das native tryptische Peptidgemisch des Oviduktins im hochmolekularen Bereich zwischen m/z 2000 und 5500. Die Peptid-Muster in Abb. 26b und 26d sind nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F aufgenommen. Die Signale bei m/z 3316,1, 3620,5 (Abb. 26a) und 4242,5, 4724,9, 4837,9 und die Signalgruppen mit dominanten m/z 4094,3, 4313,4, 4385,9 und 4977,7 (Abb. 26c) sind nach der Behandlung mit N-Glykosidase F (Abb. 26b und 26d) nicht mehr detektierbar. Dies deutet auf eine N-Glykosylierung hin. Die Peptidsignale bei m/z 2098,2, 2402,2, 2422,2, 2786,3, 2841,1, 2855,6, 2871,1, 3126,3, 3199,8 und 3215,3 (Abb. 26b) sind erst nach Deglykosylierung aufgetreten und konnten an Hand der Aminosäuresequenz den Peptiden, die die drei N-Glykosylierungsstellen enthalten, zugeordnet werden.



**Abb. 26: MALDI-TOF-MS-Profil der tryptischen Peptiden des Oviduktins im Bereich  $m/z$  2000-4000. (a) glykosyliert; die Pfeile kennzeichnen die detektierten N-Glykopeptide. (b) deglykosyliert; die Pfeile kennzeichnen die deglykosylierten Peptide. Die Spektren sind im linearen positiven Modus als  $[M+H]^+$  mit HCCA als Matrix aufgenommen.**



**Abb. 26 (Fortsetzung): MALDI-TOF-MS-Profil der tryptischen Peptiden des Oviduktins im Bereich  $m/z$  4000-5500. (c) glykosyliert; die Pfeile kennzeichnen die detektierten N-Glykopeptide. (d) deglykosyliert; Die Spektren sind im linearen positiven Modus als  $[M+H]^+$  mit HCCA als Matrix aufgenommen.**

Das Vorkommen von Peptiden mit fast gleichem MG aber mit unterschiedlicher Glykosylierungsposition erschwerte die genaue Zuordnung der experimentellen Daten (Tabelle 13). Für einige Peptide ( $m/z_{\text{exp}}$  3126,3, 3199,8, 3215,3) sowie ihre glykosylierten Formen können rechnerisch mehrere Glyko-/Peptide mit unterschiedlicher Glykosylierungsposition ermittelt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Peptide trotz der unterschiedlichen Aminosäuresequenz, in Folge von verschiedenen Modifikationen oder *missed cleavage*, MS-Signale mit fast gleichem  $m/z$ -Wert produzieren.

Das Signal bei  $m/z$  3126,3 könnte dem Peptid mit MG 3126,6 ( $T_{45-72}$  mit MC) oder dem Peptid mit MG 3128,5 ( $T_{385-415}$  mit MC) entsprechen. Das Signal bei  $m/z$  3199,8 könnte ein der drei Peptide mit MG 3199,6 ( $T_{45-72}$  mit MC, MSO und Cys\_CAM), 3199,5 ( $T_{385-415}$  mit MC und Cys\_PAM) oder 3200,7 ( $T_{439-470}$  mit MC) repräsentieren. Bei  $m/z$  2855,6 handelt es sich um das Peptid mit MG 2855,3 ( $T_{45-69}$  mit Cys\_PAM) oder 2857,3 ( $T_{45-69}$  mit MSO und Cys\_CAM) und bei  $m/z$  3215,3 um das Peptid mit MG 3213,6 ( $T_{45-72}$  mit MC, MSO und Cys\_CAM) oder MG 3216,7 ( $T_{439-470}$  mit MC und MSO). Aus diesem Grund können viele Glykopeptide nicht eindeutig zugeordnet werden. Ihr Verschwinden nach enzymatischer Deglykosylierung spricht aber prinzipiell dafür, dass alle drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen auch mit Kohlenhydratseitenketten besetzt sind.

**Tabelle 13: N-Glykosylierungsstellen des porcinen Oviduktins.**

**(MSO)** oxydiertes Methionin, **(Cys\_CAM)** carbamidomethyliertes Cystein, **(Cys\_PAM)** akrylamidylierten Cystein, **(MC)** missed cleavage. Die Peptidmassen, die nicht eindeutig zugeordnet werden können, sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Peptid	Sequenz	N-Glykosylierungs- stelle	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>	Modifi- zierung
T <sub>45-69</sub>	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAK	N <sub>62</sub>	2786,3	2784,2	-
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAK	N <sub>62</sub>	2804,3	2800,2	MSO
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAK	N <sub>62</sub>	2841,1	2841,3	Cys_CAM
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAK	N <sub>62</sub>	2855,6*	2855,3	Cys_PAM
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAK	N <sub>62</sub>	2855,6*	2857,3	MSO Cys_CAM
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAK	N <sub>62</sub>	2871,1	2871,3	MSO Cys_PAM
T <sub>45-72</sub>	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAKDAR	N <sub>62</sub>	3126,3**	3126,6	MC -
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAKDAR	N <sub>62</sub>	3142,7	3142,6	MC MSO
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAKDAR	N <sub>62</sub>	3199,8***	3199,6	MC, MSO, Cys_CAM
	DLDPFLC <sup>H</sup> TLVFAFAS <b>MNDS</b> QIVAKDAR	N <sub>62</sub>	3215,3****	3213,6	MC, MSO, Cys_PAM
T <sub>385-405</sub>	AEVSSTLSPGFGLSTTV <b>NSS</b> R	N <sub>402</sub>	2098,2	2098,3	-
T <sub>385-415</sub>	AEVSSTLSPGFGLSTTV <b>NSS</b> R <sup>T</sup> CPESLAVTK	N <sub>402</sub>	3126,3**	3128,5	MC -
	AEVSSTLSPGFGLSTTV <b>NSS</b> R <sup>T</sup> CPESLAVTK	N <sub>402</sub>	3199,8***	3199,5	MC Cys_PAM
T <sub>439-462</sub>	<b>SDNMT</b> VTPGGGLVAPTRPTL SFGK	N <sub>441</sub>	2402,4	2404,7	-
	<b>SDNMT</b> VTPGGGLVAPTRPTL SFGK	N <sub>441</sub>	2422,2	2420,7	MSO
T <sub>439-470</sub>	<b>SDNMT</b> VTPGGGLVAPTRPTLSFGKLTVAPEGK	N <sub>441</sub>	3199,8***	3200,7	MC -
	<b>SDNMT</b> VTPGGGLVAPTRPTLSFGKLTVAPEGK	N <sub>441</sub>	3215,3****	3216,7	MC, MSO

### 3.6.6 N-Glykosylierungsmuster

Durch die vergleichende Analyse der Peptid-Muster vor und nach Deglykosylierung und des Glykan-Profiles kann ein Glykosylierungsmuster eines Proteins erstellt werden. Wegen der heterogenen Derivatisierung der Peptide nach in-Gel Spaltung und des heterogenen Glykan-Musters (Abschnitt 3.6.4.1) können jedoch ohne weitere Untersuchungen nicht alle Glykopeptidstrukturen ermittelt werden. Durch die Untersuchung des N-Glykan-Profiles konnte gezeigt werden, dass die dominanten Glykanstrukturen des hochmolekularen Oviduktins (110kDa) drei unterschiedlich fucosylierte komplexe biantennäre Strukturen sind. Andere komplexe Strukturen oder Oligomannosyl-Typ N-Glykane können nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Dies wird auch durch die lektinologische Analyse bestätigt. Infolgedessen hat sich die Analyse des N-Glykosylierungsmusters des Oviduktins auf die Zuordnung der drei dominanten Glykanstrukturen beschränkt.

Alle drei N-Glykane mit Summenformeln  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (m/z 1891,9),  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_2+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (m/z 2037,9) und  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_3+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (m/z 2184,0) (Abb. 24a) können an dem Asparaginrest an der Position N<sub>402</sub> lokalisiert werden. Die dazu passenden Glykopeptide befinden sich bei m/z 3950,1, 4094,3 und 4242,5. Nach Deglykosylierung entsteht das Peptid bei m/z 2098,2 (Tab. 14). Die mono- und die bi-fucosylierten Strukturen können auch der Asparaginposition N<sub>62</sub> zugeordnet werden. Die dafür sprechenden Glykopeptide wurden bei m/z 4724,9, 4837,9 und 4977,6 detektiert. Die Signale der deglykosylierten Peptide sind bei m/z 2871,1, 2841,1 und 3126,3 zu beobachten. Das Peptid bei m/z 3126,6 könnte außerdem der Position N<sub>402</sub> mit einer höheren Massendifferenz zugeordnet werden (Tab. 13). Die bi-fucosylierte Glykanstruktur konnte zusätzlich an der Asparagin-Position N<sub>441</sub> lokalisiert werden. Die darauf deutenden Glykopeptidsignale befinden sich bei m/z 4402,1 und 4418,1. Die Signale bei m/z 2402,2 und 2422,2 repräsentieren den Peptidanteil diesen zwei Strukturen. Für einige Glykopeptidsignale (m/z 4977,6, 4837,9, 4402,1, 4418,1) bestehen noch weitere theoretische Zusammensetzungsmöglichkeiten mit verschiedenen Glykanstrukturen und unterschiedlich modifizierten Peptiden. Die Glykopeptidstrukturen, die die hier analysierten drei komplexen Glykanen beinhalten, wurden aufgrund des dominanten Auftretens dieser Glykane als wahrscheinlich angenommen.

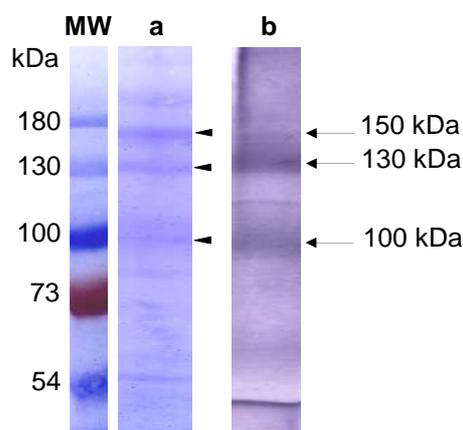
Die Lokalisierung der dominanten Glykanstrukturen an alle drei potenziellen Glykosylierungsstellen N<sub>62</sub>, N<sub>402</sub> und N<sub>441</sub> bestätigt die N-Glykosylierung der drei Asparaginreste.

**Tabelle 14: Glykosylierungsmuster des Oviduktins – Zuordnung der drei dominanten fucosylierten komplexen Glykanstrukturen.** Die relative Intensität (RI) der Glykopeptidsignale ist mit + dargestellt: + - bis 10%, ++ - 20-40%, +++ - 40-60%, ++++ - 60-80%, +++++ - 80-100%. \* - Diese Signale können gleichzeitig zu zwei verschiedenen Glykosylierungsstellen zugeordnet werden.

Position N <sub>62</sub>					
Glykanstruktur	Glykopeptid			Peptid	
	RI	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	++	4724,9	4723,0	2871,1	2871,3
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	+++	4977,6*	4978,3	3126,3*	3126,6
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	++	4837,9	4839,1	2841,1	2841,3
Position N <sub>402</sub>					
Glykanstruktur	Glykopeptid			Peptid	
	RI	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	+	3950,1	3950,0	2098,2	2098,3
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	+++	4977,6*	4979,5	3126,3*	3128,5
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	+++++	4094,3	4096,1	2098,2	2098,3
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>3</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	++	4242,5	4242,3	2098,2	2098,3
Position N <sub>441</sub>					
Glykanstruktur	Glykopeptid			Peptid	
	RI	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>exp</sub> [M+H] <sup>+</sup>	m/z <sub>kalk</sub> [M+H] <sup>+</sup>
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	++	4402,1	4402,6	2402,2	2404,7
HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>2</sub> +Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	++	4418,1	4418,6	2422,2	2420,7

### 3.7 Bindungstest mit Spermatozoen

Die GNA-bindenden OAMF-Proteine wurden mit Biotin markiert und als Liganden für Spermatozoen getestet. Dafür wurde eine intakte motile Spermienpopulation selektiert (ca. 80% Gesamtmotilität und ca. 80 bis 90% Akrosomintegrität, beziehungsweise 10 bis 20% PI-positive Zellen) und mit den markierten OAMF-Proteinen inkubiert. Nach Extraktion und anschließender elektrophoretischer Trennung und Blot-Transfer, konnten die an der Spermienoberfläche gebundenen Oviduktglykoproteine detektiert werden (Abb. 27). Zwei deutliche Proteinbanden mit MG 130kDa und 100kDa und eine schwache Bande mit MG 150kDa sind zu erkennen (Abb. 27b). Bei dem Vergleich mit der nativen GNA-bindenden OAMF (Abb. 27a) konnten zwei von diesen Proteinbanden zugeordnet werden: die 150kDa-Bande als *oxigen-regulated glycoprotein* (ORP150) und die 100kDa-Bande als *lysosome-associated glycoproteins* (LAMP-1 und 2) (Abschnitt 3.5). Die Identität des Proteins mit MG 130kDa konnte nicht bestimmt werden.



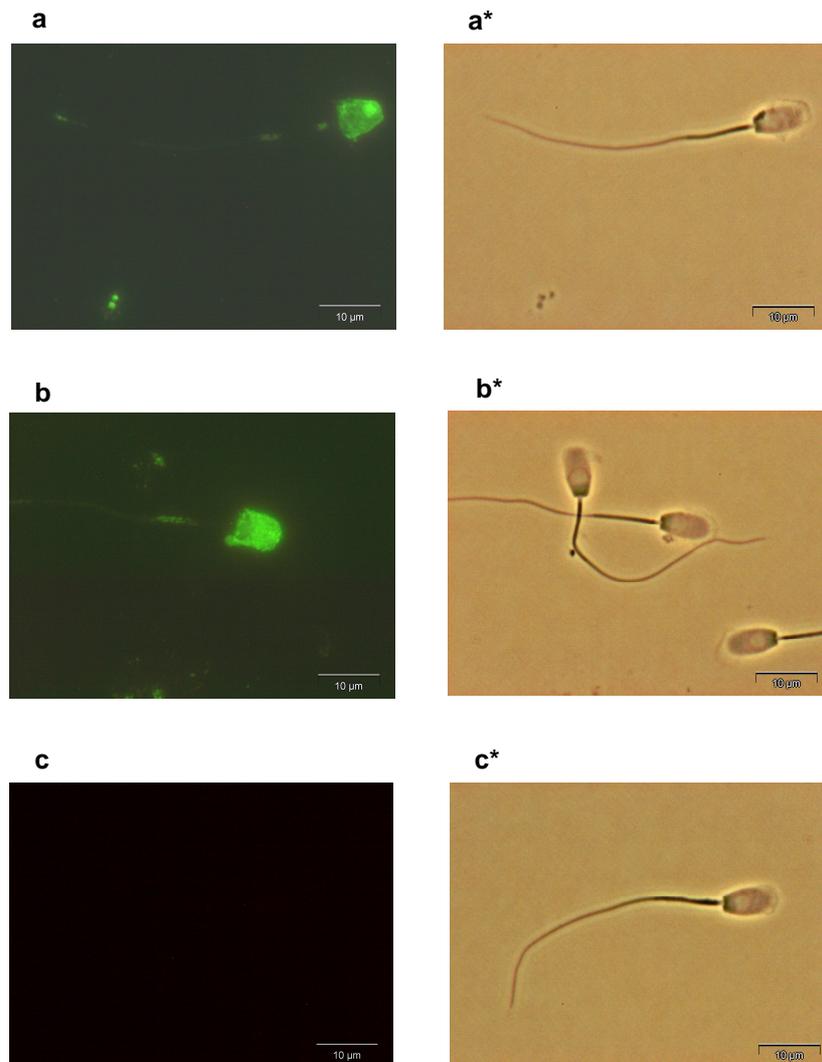
**Abb. 27: Bindungstest mit Spermatozoen.**

**(a)** native mannosehaltige OAMF; SDS-PAGE, Coomassie-Färbung; **(b)** mannosereiche OAMF-Glykoproteine gebunden an Spermienoberfläche; Protein-Blot, Detektion mit Streptavidin-AP.

Parallel zu dem biochemischen Nachweis wurde die Bindung der OAMF-Glykoproteine an die Spermienoberfläche auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Auf den angefertigten Spermienausstrichen wurden die gebundenen Oviduktglykoproteine mit Streptavidin-FITC visualisiert. Ca. 40 bis 50% der Spermatozoen wiesen eine deutliche grüne Fluoreszenz im akrosomalen Bereich

des Spermienkopfes auf (Abb. 28a, b). Die Zellen mit abgelösten Akrosomen zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 28b, b\*).

Unmittelbar nach Ende der Inkubationszeit wurde die Vitalität der Spermatozoen kontrolliert. Ca. 60% der Spermatozoen waren motil und 30% waren PI-gefärbt. In dem Kontroll-Ansatz (ohne Oviduktproteine) waren die beweglichen Zellen ca. 70% und die PI-gefärbte ca. 20%.



**Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Bindung der mannosereichen OAMF-Glykoproteine an der Spermienoberfläche. (a, a\*) und (b, b\*) Bindung, (c, c\*) negative Kontrolle; (a, b, c) Fluoreszenz, (a\*, b\*, c\*) Hellfeld.**

Die Akrosome der Spermatozoen in den beiden Ansätzen (Bindung und Kontrolle) waren am Versuchsende (Inkubation 10min bei 37°C) stark geschwollen oder in Ablösung. Diese Beobachtung lässt sich mit der prinzipiell geringen Stabilität und Überlebensfähigkeit der Spermatozoen des eigenen Tierbestandes erklären.

## 4. Diskussion

Bei den Säugetieren werden die Spermatozoen nach der Insemination den mechanischen, physikochemischen und immunologischen Barrieren des weiblichen Genitaltrakts, die sie unter Erhalt ihrer Befruchtungsfähigkeit überwinden müssen, ausgesetzt. Als hochspezialisierte Zellen verfügen die Spermatozoen über begrenzte Energiereserven, die geschont werden müssen, um eine frühe metabolische Erschöpfung und den Zelltod zu vermeiden. Die Bildung eines funktionellen Spermienreservoirs im kaudalen Isthmus des Säugetiereileiters ist essenziell für das Überleben der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt und die erfolgreiche Überbrückung der Zeitspanne zwischen der Insemination und der Befruchtung. Durch die Adhäsion der Spermatozoen an die oviduktale Epitheloberfläche wird eine vitale befruchtungsfähige Spermienpopulation selektiert, deren Funktion durch Modulation der Kapazitation und gezielte Loslösung kontrolliert und mit der Ovulation synchronisiert wird.

Um die Rolle des direkten Kontakts zwischen den Spermatozoen und den Oviduktepithelzellen zu demonstrieren, entwickelten Smith und Nothnick (1997) eine Methode zur Isolierung der apikalen Membran der Epithelzellen des Eileiters. Die Autoren konnten beobachten, dass beim Kaninchen die isolierten oviduktalen Membranvesikel an die periakrosomale Spermienoberfläche binden und dass die Spermienvitalität in ihrer Anwesenheit länger erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu zeigte die apikale Membranpräparation aus Nieren keine positive Wirkung auf die Spermatozoen. Ähnliche Versuche bei Pferd (Dobrinski et al., 1997), Rind (Boilard et al., 2002) und Schwein (Fazeli et al., 2003) konnten bestätigen, dass durch die Inkubation mit der oviduktalen apikalen Membran die Vitalität der Spermatozoen verlängert wird. Membranpräparation nicht oviduktaler Herkunft vermittelte keinen Effekt auf die Vitalität der Spermatozoen. Somit wurde demonstriert, dass tatsächlich der direkte Kontakt zwischen den Spermatozoen und den Oviduktepithelzellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Spermienfunktion spielt. Fazeli et al. (2003) und Holt et al. (2005) führten detaillierte Untersuchungen beim Schwein durch, indem sie durch zusätzliche NaCl-Extraktion von der isolierten oviduktalen apikalen Membran eine lösliche Proteinfraction trennen konnten. Die Inkubation der Spermatozoen mit beiden Präparationen zeigte, dass die Fähigkeit der löslichen Fraktion, die Vitalität

der Spermatozoen zu unterstützen, deutlich stärker war als die der Membranfraktion. Dies deutet darauf hin, dass die peripheren membranassoziierten Proteine biologisch aktiv sind und wahrscheinlich die entscheidende Rolle bei der Interaktion mit den Spermatozoen spielen.

Die sekretorischen Epithelzellen des Eileiters produzieren zahlreiche Glykoproteine, die eine Mucosaschicht auf der Oberfläche bilden. Diese Glykoproteine stellen zusammen mit der luminalen Oviduktflüssigkeit eine spezifische Mikroumgebung dar, in der die Gameten unter physiologischer Kontrolle ihre komplette Befruchtungskompetenz entwickeln (Hunter, 1994, 2002). Laut Hunter (1994, 2002) und Suarez et al. (1997, 1998a) ist die aus Oviduktglykoproteinen gebildete dicke viskose Mucosa für die Haftung der Spermatozoen im Isthmus-Bereich des Eileiters und dadurch für die Etablierung des Spermienreservoirs verantwortlich. In der Ampulla ist der luminale Inhalt wässriger als im Isthmus, was auf eine spezifische Sekretion in den beiden Regionen hindeutet. Der so gebildete Mucosa-Gradient im Eileiter beeinflusst möglicherweise den Spermientransport und die Motilität (Hunter, 1994). Die Oviduktflüssigkeit ist ebenfalls an der Modulation der Spermienfunktion beteiligt. Zum Beispiel zeigten in vitro Untersuchungen beim Rind die Wirkung der Oviduktflüssigkeit auf Spermatozoen (McNutt et al., 1991, Killian, 2004). Die Funktion der ejakulierten bovinen Spermatozoen wurde in der Anwesenheit der Oviduktflüssigkeit entweder aus Isthmus- oder aus Ampulla-Bereich des Eileiters untersucht. Die Isthmus-Flüssigkeit konnte besser als die Ampulla-Flüssigkeit die Motilität der Spermatozoen unterdrücken, die Kapazitation induzieren und die ZP-Bindung stimulieren. Nach Inkubation der Spermatozoen in der ampullaren Flüssigkeit war die ZP-Penetrationsrate deutlich höher als nach Inkubation in Isthmus-Flüssigkeit. Die beim Rind beobachteten topographischen Unterschiede in der Auswirkung der Oviduktsekretion auf die Spermatozoen zeigen, dass der Effekt der Isthmus-Sekretion mit der Funktion des Spermienreservoirs übereinstimmt. Die an der periakrosomalen Spermienmembran assoziierten Oviduktglykoproteine können eine schützende Rolle spielen, indem sie die Spermienmembran stabilisieren und Immunreaktionen verhindern (Hunter, 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des porcinen Oviduktepithels nach Insemination (Hunter, 1987, 1994) zeigen die Spermatozoen im direkten Kontakt mit den Zilien-tragenden Zellen; sie sind jedoch gleichzeitig dicht von zahlreichen sekretorischen Vesikeln umgeben.

Der Einfluss der einzelnen Eileiter-Bereiche (Isthmus und Ampulla) und des Zyklusstadiums der Tiere auf die Spermatozoen-Eileiter-Bindung konnte an Hand eines Ovidukt-Explant-Assays *in vitro* untersucht werden. Bei den verschiedenen Spezies wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht. So wurde bei Pferd (Thomas et al., 1994) und Mensch (Baillie et al., 1997) gezeigt, dass signifikant mehr Spermatozoen im Isthmus-Bereich des Eileiters binden als im Ampulla-Bereich. Außerdem war die Bindung intensiver während der folliculären Phase als während der postovulatorischen Phase. Untersuchungen beim Schwein von verschiedenen Arbeitsgruppen (Petrunkina et al., 2001a, Fazeli et al., 2003) zeigten hingegen keinen Unterschied zwischen den Isthmus- und Ampulla-Bereichen des Eileiters bezüglich der Spermienbindungsaffinität und der positiven Wirkung auf die Spermienfunktion. Die gleichen Autoren fanden auch, dass das Zyklusstadium der Tiere ebenfalls keinen Einfluss auf die Spermatozoen-Ovidukt-Bindung aufweist.

Die bis hier diskutierten Daten zeigen, dass die epitheliale apikale Membran und die Flüssigkeit des Eileiters funktionell nicht von einander zu trennen sind, und dass sie eine sehr wichtige Rolle für den Erhalt der Spermienvitalität und die Kontrolle der Spermienfunktion spielen, was Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation ist. An der Interaktion zwischen den Spermatozoen und der oviduktalen Mucosa können sowohl membranassoziierte Proteine, die einen direkten Kontakt der Spermatozoen mit der apikalen Membran ermöglichen, als auch lösliche sekretorische Proteine, die entweder als Bestandteil der Mucosa oder frei in dem luminalen Fluss vorliegen, beteiligt sein.

Die Spermatozoen-Oviduktepithel-Interaktion wird über typische Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt. Dieses Phänomen konnte bei vielen Modeltierarten *in vitro* beobachtet und durch Inhibitionsversuche mit Monosacchariden und Glykoproteinen die Spezifität der daran beteiligten Kohlenhydratstrukturen ermittelt werden (Suarez, 2001). Die Kenntnis des Glykoms und Proteoms des Eileiters ist von großer Bedeutung, um die an diesen Prozessen beteiligten Rezeptorsysteme und ihre physiologischen Funktionen untersuchen zu können. Da bisher nur wenig über die Membran- und sekretorischen Glykoproteine des porcinen Eileiters bekannt ist, sollte sich diese Arbeit mit der Glyko-Proteom-Analyse des Ovidukts befassen. Auf Grund der Schlüsselrolle der Oligomannosyl-Typ Glykane in dem porcinen System wurde die Analyse schwerpunktmässig mit der Untersuchung der mannosereichen Glykoproteine begonnen. Es wurden sowohl die Membran-fraktion

als auch die Oviduktflüssigkeit aus den gesamten Eileitern präpuberaler Tieren untersucht.

#### **4.1 GNA-bindende Glykoproteine der OAMF und OF**

Die Glykoproteinexpression in den Epithelzellen boviner (Suarez et al., 1997) und porciner Eileiter (Walter und Bavder, 1997) konnte zuerst durch die Kohlenhydrat-spezifische PAS-Färbung demonstriert werden. Die intensive Färbung der apikalen Glykokalyx und der Golgi-Region in dem gesamten Eileiter deutete auf eine reichliche Kohlenhydratproduktion hin. Zusätzliche lektinhistochemische Analysen des porcinen Eileiterepithels (Walter und Bavder, 1997, Wagner, 2001) lieferten Hinweise auf terminale Monosaccharidreste der exprimierten Glykanstrukturen, wie  $\alpha$ -D-Mannose,  $\alpha$ -D-Glucose, D-N-Acetylglucosamin, D-N-Acetylgalactosamin,  $\beta$ -D-Galactose und  $\alpha$ -L-Fucose. Dies spricht für eine strukturelle Vielfalt der vorhandenen Glykoproteine bezüglich ihrer Glykanseitenketten. Detaillierte Untersuchungen demonstrierten, dass die Oligomannosyl-Typ N-Glykane die effizientesten Inhibitoren der Spermien-Eileiter-Bindung beim Schwein sind (Wagner et al., 2002). Ekhlas-Hundrieser et al. (2005) bestätigten die Expression der Oligomannosyl-Strukturen im Eileiterepithel und detektierten mannosebindende lektinähnliche Moleküle auf der periakrosomalen Spermienmembran, dabei wurde das Spermadhäsin AQN1 als mannosebindendes Spermienprotein identifiziert. Diese Feststellungen waren der Ausgangspunkt für die vorgestellte Studie und deshalb hat sich die durchgeführte Glyko-Proteom-Analyse des porcinen Eileiters auf die Untersuchung der mannosereichen Glykoproteine konzentriert. Das Mannose-spezifische Lektin GNA erwies sich als geeignetes Handwerkszeug zur Isolierung dieser Glykoproteine. Durch Affinitätschromatographie wurden aus der oviduktalen apikalen Membranfraktion (OAMF) und aus der Oviduktflüssigkeit (OF) die GNA-bindenden Glykoproteinfraktionen gewonnen. Zunächst wurden die Glykananteile der jeweiligen GNA-bindenden Fraktion in ihrer Gesamtheit untersucht. Dieses Vorgehen stellte sicher, dass ausreichend Material für die massenspektrometrischen und enzymatischen Untersuchungen zu Verfügung stand und eine detaillierte Analyse der Kohlenhydratstrukturen ermöglichte.

Um alle Glykanstrukturen zu erfassen, wurden von den beiden GNA-bindenden Proteinfraktionen die neutralen und sauren Glykanprofile vor und nach Desialylierung erstellt. Die in erster Linie gesuchten Oligomannosyl-Strukturen konnten in beiden

neutralen Profilen (nativ und desialyliert) nachgewiesen werden (Abb. 6 und 7 in Abschnitt 3.4.2.1). Dabei waren sie in den nativen neutralen OAMF- und OF-Glykanfraktionen die herausragenden dominanten Strukturen. Die enzymatische und die MS-Analyse konnten fünf verschiedene Oligomannosyl-Glykane mit jeweils fünf, sechs, sieben, acht und neun Mannoseresten nachweisen. An Hand der prozentuellen Intensität der Signale in den MS-Spektren kann eine annähernd quantitative Analyse vorgenommen werden. Die beiden GNA-bindenden Fraktionen beinhalten vorwiegend die Struktur  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ . In der OAMF erscheint mit ebenso großer Intensität das Glykan  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , während in der OF die Struktur mit sieben Mannoseresten  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  dominanter ist. Das Glykan  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  ist in der OAMF deutlicher präsentiert als in der OF, in der diese Struktur ein schwächeres Signal aufweist. Die kleinste Struktur  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  erscheint in den beiden Profilen mit der gleichen mittleren Intensität. Ein gut untersuchtes Modellprotein, das hauptsächlich Oligomannosyl- und Hybrid-Typ N-Glykane besitzt, ist Ovalbumin. Das neutrale N-Glykanprofil dieses Proteins weist zwei dominante Strukturen mit der Zusammensetzung  $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$  und ein schwaches Signal mit  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  auf. Als dominante hybride Struktur erscheint  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_4$  (Küster et al., 1997, Harvey et al., 2000a). Wagner et al. (2002) setzten die N-Glykopeptide und die N-Glykane des Ovalbumins zur kompetitiven Hemmung der Spermatozoen-Eileiter-Bindung beim Schwein ein. Die Analyse zeigte, dass die Bindung bis zu 84% von den Oligomannosylketten-tragenden Glykopeptiden und bis zur 81% von der N-Glykanfraktion inhibiert wird, was die Rolle der Oligomannosyl-Glykane in diesem Prozess bestätigt. Außer  $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$ , die von Wagner et al. (2002) als effizienteste Inhibitoren der Spermatozoen-Eileiter-Bindung bestimmt worden sind, wurden in den Glykan-Profilen der GNA-bindenden OAMF- und OF-Fraktionen Strukturen ( $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ ) mit einem höheren Mannosegehalt detektiert. Das bedeutet, dass im Eileiter noch größere und verzweigte Zucker-Liganden für die Spermatozoen zu Verfügung stehen, was Voraussetzung für multivalente *High-Affinity*-Bindungen ist. Darüberhinaus werden diese Liganden sowohl von den Proteinen der apikalen Membran als auch von den sekretorischen Proteinen, die in der Mukosa oder in der oviduktalen Flüssigkeit zu finden sind, präsentiert. Das ist ein Hinweis, dass in beiden Fraktionen ausreichend potenzielle Bindungspartner für die Spermatozoen existieren.

Die desialylierten neutralen N-Glykanprofile der OAMF und OF weisen eine große Heterogenität von komplexen oder hybriden Strukturen auf. Zwei bi-antennäre komplexe Glykane  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , deren Strukturen durch MS/MS bestätigt werden konnten, treten dominant in den beiden MS-Spektren auf. Sowohl in der OAMF als auch in der OF konnten bi-, tri- und tetra-antennäre fucosylierte komplexe Strukturen sowohl mit  $\beta$ - als auch mit einem, zwei oder drei zusätzlichen  $\alpha$ -Galactoseresten nachgewiesen werden (Abb. 14 und 15 in Abschnitt 3.4.2.1.4). Das Auftreten dieser Glykane erst nach Desialylierung in der neutralen Glykanprofil spricht dafür, dass sie normalerweise in ihren sialylierten Formen vorliegen. Dies konnte durch die MS-Analyse der sauren Glykanfraktionen der OAMF und OF ebenfalls bestätigt werden. Die gleichen komplexen Strukturen wurden mit einer und mit zwei N-Acetyl- oder N-Glycolylneuraminsäureresten detektiert. Das Vorhandensein von hochsialylierten Glykoproteinen ist ein typisches Merkmal der Glykokalyx auf der apikalen Oberfläche des Epithels aller Schleimhäute. Es scheint aber, dass beim Schwein die Sialinsäurereste keine Rolle in der Spermatozoen-Ovidukt-Bindung spielen (Gehlhaar et al. 2000). Wagner et al. (2002), Gehlhaar et al. (2000) und Ekhlesi-Hundrieser et al. (2005) konnten bei ihren Untersuchungen der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion neben den *High-Affinity*-Liganden für Mannose auch *Low-Affinity*-Liganden für Galactose und auch entsprechende Rezeptoren auf dem Spermienkopf nachweisen. Obwohl die vorliegenden Untersuchungen nicht das gesamte Glykom des porcinen Eileiters erfassen, sondern nur die GNA-bindende Fraktion, ist zu erkennen, dass das Eileiterepithel neben dem Oligomannosyl-Typ auch zahlreiche komplexe oder hybride N-Glykanstrukturen mit terminalen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galactoseresten exprimiert (Tabellen 5 und 6 in Abschnitt 3.4.2.3). Die Vielfalt der N-Glykane, auch ohne Berücksichtigung der wahrscheinlich genau so heterogenen O-Glykane, bietet die Voraussetzung für eine multivalente stabile Lektin-Ligand-Bindung. Die Affinität und die Spezifität dieser Bindung können von der Art und der anomerischen Konfiguration der benachbarten Zuckerreste abhängig sein. Als passender Spermienrezeptor für die Zucker-Liganden des Eileiters konnte das oberflächenassoziierte Spermadhäsin AQN-1 identifiziert werden. Die Analyse der Zucker-Bindungsspezifität des AQN-1 stellte neben der hohen Mannose-Bindungsaffinität auch eine schwächere Affinität zu Strukturen mit terminalen

Galactoseresten fest (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005). So können über AQN-1 sowohl Interaktionen mit hoher als auch mit niedriger Affinität vermittelt werden.

Die elektrophoretische Trennung der GNA-bindenden Fraktionen der OAMF und OF ergab ähnliche Muster – es konnten hochmolekulare Proteine im MG-Bereich 50-300kDa detektiert werden (Abb. 18 in Abschnitt 3.5). Von allen deutlichen Proteinbanden wurden massenspektrometrisch neutrale N-Glykan-Profile nach Desialylierung erstellt. In den OAMF-Glykanspektren sind vorwiegend Oligomannosyl-Strukturen ( $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ) mit unterschiedlicher Intensität zu beobachten. Aus der OF konnten weniger deutliche Glykan-Muster aufgenommen werden, was mit den geringen Probenmengen zu erklären ist. Neben den Oligomannosyl-Strukturen wurden auch Signale von komplexen oder hybriden Glykane detektiert. Die N-Glykan-Profile der analysierten Proteinbanden aus OAMF und OF bestätigen, dass es sich bei allen um mannosereiche Glykoproteine handelt, und dass die GNA-Affinitätschromatographie eine zuverlässige Methode zur Isolierung solcher Glykoproteine ist. Die Zuordnung der Glykan-Profile zu bestimmten Proteinen ist nur annähernd, da manche Gelbanden sich als Mischung aus zwei Proteinen erwiesen haben. Außerdem konnte auf Grund fehlender Sequenzinformation in den Datenbanken die Identität einiger Proteine nicht ermittelt werden.

In der GNA-bindenden Proteinfraction der OAMF wurden das *150kDa oxygen-regulated glycoprotein* (ORP150) und die *lysosome-associated membrane glycoproteins 1 und 2* (LAMP-1/2) identifiziert. LAMP-1 und ORP150 konnten in der GNA-bindenden Fraktion der OF ebenfalls gefunden werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich um zwei membranassoziierte Glykoproteine handelt, die unter bestimmten Bedingungen auch in der löslichen Proteinfraction zu finden sind.

LAMP-1 und 2 sind die Hauptglykoproteine der lysosomalen Membran; kleine Mengen werden auch auf der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran vieler Zellen exprimiert. Große Sequenzübereinstimmung wurde sowohl zwischen homologen LAMP-1 und LAMP-2 als auch zwischen LAMP-1, beziehungsweise LAMP-2 aus verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Huhn) beobachtet. Die LAMPs besitzen mehrere N- (16-20) und O-Glykosylierungsstellen, wobei die Glykane etwa 55-65% des Molekulargewichts der Proteine ausmachen. Es ist bekannt, dass die LAMPs, wahrscheinlich auf Grund ihrer reichen Glykosylierung, sehr beständig gegen Protease-Verdau sind. Deshalb wird angenommen, dass sie eine schützende Rolle für die Zellmembranen erfüllen (Fukuda, 1991). Viele N-

Glykosylierungsstellen sind mit fucosylierten Poly-N-Acetyllactosamin-Glykane, die ein terminales Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Antigen tragen, besetzt. Da dieses Antigen von tierischen E-, P- und S-Lektinen erkannt wird, sind die LAMPs in Prozessen der Zell-Zell-Interaktionen und Zelladhäsion involviert (Carlsson et al., 1988, Kannan et al., 1996, Do et al., 1990, Chang et al., 2004). Die gleichen Autoren zeigen, dass beide Glykoproteine auf der Oberfläche der peripheren mononuklearen Blutzellen lokalisiert und verantwortlich für ihre Adhäsion an das vaskuläre Endothel sind. Viele Studien zeigen, dass LAMPs in den Tumorzellen überexprimiert werden und die Migration und die Metastasierung der Zellen vermitteln (Fukuda, 1991, Krishnan et al., 2005). Chang et al. (2004) berichten über zwei Formen von LAMP-1: I. Die Membran-Form, die aus einer großen luminalen hochglykosylierten Domäne, einem Membran-Anker und einem kleinen zytoplasmatischen Teil besteht. II. Die lösliche Form, bei der der Membran-Anker und die zytoplasmatische Domäne verloren gegangen sind, und die frei in der Zirkulation zu finden ist. Die Funktion des zirkulatorischen LAMP-1 ist noch unbekannt.

Das dritte Glykoprotein, das in den beiden GNA-bindenden Fraktionen (OAMF und OF) detektiert wurde, ist ORP150. Dieses Protein gehört zu der großen Familie der molekularen Chaperone, die für die richtige Faltung der neusynthetisierten Proteine im ER verantwortlich sind. Sie werden bei zellulärem Stress (z. B. Hypoxia oder *heat shock*) hochexprimiert und sind an den Schutzmechanismen der Zelle beteiligt. Das Expressionsmuster und die Funktion des ORP150 sind sehr ähnlich zu denen eines anderen Proteins der gleichen Familie, GRP78 (Ikeda et al., 1997). So demonstrieren Untersuchungen von Ozawa et al. (1999), dass beide Proteine Hypoxia-bedingte Apoptosis in Modellzellen verhindern können. ORP150 wird ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimiert. Eine ganze Reihe von Chaperon-Proteinen, unter anderen auch ORP150 und GRP78, konnten in der Oolemma der Mauseizelle detektiert werden (Calvert et al., 2003). Die Funktion dieser Proteine dort ist noch ungeklärt. Über ein interessantes Phänomen berichten Boilard et al. (2004). Sie identifizierten zwei Chaperon-Proteine GRP78 und HSP60 auf der Epitheloberfläche des bovinen Eileiters und konnten in vitro mittels Bindungs-Tests mit Spermatozoen zeigen, dass unter anderen auch beide Proteine an die periakrosomale Spermienmembran binden. Die Autoren spekulieren, dass diese Proteine wahrscheinlich den Erhalt der Integrität der Spermienmembran während des Aufenthalts der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt unterstützen.

In der GNA-bindenden Fraktion der OF konnten noch weitere Glykoproteine massenspektrometrisch identifiziert werden: Aminopetidase N, *angiotensin-converting enzyme*, HSP90,  $\alpha$ -2-Makroglobulin und *oviduct-specific glycoprotein*.

Aminopeptidase N (APN) ist ein multifunktionelles Enzym, das in vielen Geweben und Zelltypen (Endothel, Epithel, Fibroblasten, Leukozyten) exprimiert wird. APN liegt sowohl als membrangebundenes als auch als lösliches Protein vor, darüber hinaus sind auch organspezifischen Isoenzym-Formen beschrieben worden. Einige der zahlreichen Funktionen von APN sind die Teilnahme an der Antigen-Präsentation, die Freisetzung von bioaktiven Peptiden und die Kontrolle der Zellproliferation (Luan und Xu, 2007). Beispielsweise wurde APN in dem humanen Eileiter als Abbau-Enzym für Interleukin-8, das an der Kontrolle der Epithelzellenproliferation und –funktion beteiligt ist, detektiert (Palter et al., 2001). Außerdem fungiert das Enzym als Rezeptor für einige humane Viren (Luan und Xu, 2007).

*Angiotensin-converting enzyme* (ACE) ist eine Komponente des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), das für die Regulation des Blutdrucks und die Elektrolyten-Homeostase verantwortlich ist. Außer dem somatischen RAS, das die gesamte körperliche Zirkulation kontrolliert und von den Nieren gesteuert wird, existiert ein unabhängiges RAS im Reproduktionstrakt, das für die lokale Produktion von Angiotensin II im Reproduktionsgewebe sorgt und dadurch an der Regulation ihrer Funktion beteiligt ist (Vinson et al., 1997). ACE weist zwei Isoformen auf: eine somatische und eine testikuläre Form, wobei die somatische Form in dem männlichen und dem weiblichen Genitaltrakt vorhanden ist, während die testikuläre nur in den Hoden und den Spermatozoen exprimiert wird. Die Funktion des ACE und des RAS im Eileiter ist mit der lokalen Kontrolle der epithelialen Proliferation, Differenzierung und Sekretion, mit der Regulation des Elektrolytenniveaus und dem tubularen Transport durch Modulation der Cilienmotilität verbunden (Vinson et al., 1997). Über die Rolle des testikulären ACE berichten Suarez und Pacey (2006). Sie zeigten, dass ACE-Knock-out-Mäuse infertil sind, da die Spermatozoen die uterotubale Verbindung nicht überwinden können. Durch ACE werden bestimmte Proteine von der Spermienoberfläche entfernt, in Folge dessen werden neue Epitope, die wahrscheinlich für die Interaktion der Spermatozoen mit dem Epithel der uterotubalen Verbindung und für ihren Transport notwendig sind, zugänglich gemacht.

Ein weiteres Chaperon-Protein konnte in der GNA-Fraktion der OF identifiziert werden, das *heat shock protein 90* (HSP90). Die Sequenz des HSP90 ist in allen untersuchten Organismen hoch konserviert (99,7% Homologie zwischen Mensch und Schwein). Einige Aspekte seiner biologischen Funktion sind die Wiederfaltung von denaturierten Proteinen, die Inaktivierung der Steroidhormonrezeptoren in Abwesenheit des Hormons, die Regulation einiger Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und Zytoskelettproteine (Huang et al., 1999, 2002).

$\alpha$ -2-Makroglobulin ist der am meisten verbreitete Metalloproteinase-Inhibitor im Plasma von Vertebraten. Die Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle für die Kommunikation der Zellen mit ihrer extrazellulären Umgebung. Deshalb ist die Regulation ihrer Aktivität für eine adäquate Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion von Bedeutung (Baker et al., 2002).  $\alpha$ -2-Makroglobulin wird in verschiedenen Gewebetypen exprimiert und ist durch seine Cytokin-Bindungseigenschaft an vielen regulatorischen und schützenden Mechanismen beteiligt (Borth, 1992).

Das *Oviduct-specific glycoprotein* ist ein sehr gut erforschtes, nur für die Eileiter typisches sekretorisches Protein, das eine entscheidende Rolle bei den Prozessen der Befruchtung spielt. Die in dieser Arbeit analysierte N-Glykosylierung dieses Proteins und seine biologische Funktion werden in Abschnitt 4.2 diskutiert.

Die GNA-bindenden Fraktionen der OAMF und OF beinhalten membranassoziierte und sekretorische Glykoproteine, die im Allgemeinen regulatorische und schützende Funktionen erfüllen. Der Eileiter, der eine entscheidende Rolle bei der Synchronisierung der Gametenfunktion spielt, und der Ort der Befruchtung ist, verfügt offensichtlich über sehr präzise regulatorische Mechanismen, wodurch der korrekte Verlauf des Fertilisationsvorgangs gesichert ist. Die Beteiligung der hier diskutierten Glykoproteine an solchen Prozessen ist nicht ausgeschlossen und schon von manchen Autoren (z.B. Boilard et al., 2004) angedeutet. Die eigenen Bindungsversuche mit Spermatozoen zeigten, dass in vitro einige Glykoproteine aus der GNA-bindenden Fraktion der OAMF mit der periakrosomalen Spermienmembran assoziieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich besonders ORP150 und LAMP-1/2 an der Spermienoberfläche anreichern. Beide kommen auch in der oviduktalen Flüssigkeit vor, was darauf hindeutet, dass sie sowohl in einer membranassoziierten als auch in einer löslichen Form vorliegen. Da während der Isolierung der OAMF einige sekretorische und periphere Membranproteine verloren gehen können, handelt es sich bei ORP150 und LAMP-1 in dieser Fraktion offensichtlich um die fest

an die Membran gebundenen Formen beider Proteine. Die wichtige Rolle des direkten Kontakts zwischen den Spermatozoen und den Oviduktepithelzellen während der Spermatozoen-Eileiter-Interaktion wurde schon von mehreren Autoren demonstriert (Smith und Yanagimachi, 1990, 1991, Smith und Nothnick, 1997, Dobrinski et al., 1997, Boilard et al., 2002, Fazeli et al., 2003). Die Assoziation der oviduktalen Spermien-Liganden mit der Membran des Epitheliums ist offensichtlich für die Zugänglichkeit und für die richtige Präsentation der Oligomannosyl-Seitenketten, die bei der Interaktion mit dem Spermatozoon involviert sind, notwendig. Die membranassoziierten Oviduktglykoproteine wie ORP150 und LAMP-1/2 können daher die bevorzugten Spermien-Bindungspartner sein. Sowohl diese als auch die anderen identifizierten OAMF- und OF-Proteine sind Glykoproteine, die wie die Glykan-Analyse zeigen konnte, Oligomannosyl-Strukturen tragen und theoretisch als potenzielle Bindungspartner für die Spermatozoen, beziehungsweise für AQN-1, in Frage kommen. Darüber hinaus ist auf Grund der oben diskutierten Informationen eine Rolle dieser Proteine als Modulatoren der Spermienfunktion oder als Stabilisatoren der Spermienmembran ebenfalls denkbar. Die hier vorgestellten Daten bestätigen, dass die peripheren Membranproteine oder sekretorischen Proteine, die an der Membran assoziieren, einen funktionellen Einfluss auf die Spermatozoen ausüben können. Auch ist ein erster Hinweis dafür gegeben, dass eine direkte Interaktion der mannosereichen membranassoziierten Oviduktglykoproteine mit Spermatozoen stattfinden kann. Die Bestätigung dieser Überlegungen benötigt allerdings weitere detaillierte Untersuchungen.

## 4.2 N-Glykom des Oviduktins

### 4.2.1 Biologische Rolle des Oviduktins

Das Ovidukt-spezifische Glykoprotein oder Oviduktin ist das Hauptprodukt der Oviduktsekretion und wird von den sekretorischen Epithelzellen des Eileiters aller Säugetiere produziert. Die Expression dieses Glykoproteins unterliegt einer hormonellen Kontrolle, wobei die höchste Produktion während der periovulatorischen Phase des Östruszyklus geschieht, wenn das Östrogenniveau dominant ist. Oviduktin konnte aus den Eileitern vieler Säugetiere (Schwein, Rind, Ziege, Schaf, Maus, Hamster, Pavian, Rhesusaffe, Baboon und Mensch) isoliert und charakterisiert werden (Buhi, 2002, Killian, 2004). Klonierung und Sequenzanalysen zeigen eine große Homologie sowohl in der DNA- als auch in der Aminosäuresequenz zwischen allen untersuchten Tierarten (Sendai et al., 1994, 1995, DeSouza et al., 1995b, Buhi et al., 1996, Donnally et al., 1991, Suzuki et al., 1995). In Folge post-translationaler Prozessierung und Modifizierung entstehen mehrere Isoformen des Oviduktins mit unterschiedlichen MG und pI – z. B. drei Hauptformen beim Schwein (Buhi et al., 1996) und sieben beim Rind (Vieira, 1999). Die häufigsten speziesspezifischen Differenzen der Aminosäuresequenz sind in der C-terminalen Region lokalisiert, wo mehrere (0 bis 15) sich wiederholende Mucin-Typ Domänen vorliegen sind. Diese Domänen sind reich an Serin- und Threonin-Resten, die zusammen mit den daran gebundenen O-Glykanen eine typische Mucin-Struktur bilden (Buhi, 2002). Die Mucine sind große Glykoproteine, die an der Bildung der Mucosa in den respiratorischen, gastrointestinalen und urogenitalen Trakten beteiligt sind. Auf Grund ihrer Größe, der reichlichen Glykosylierung und ihrer Fähigkeit eine gelartige Substanz zu bilden, erfüllen sie protektive Funktionen, indem sie die darunterliegenden Epithelzellen vor Austrocknung, proteolytischem Verdau, Immunreaktionen und bakteriellen Infektionen schützen (Perez-Vilar und Hill, 1999, Lagow et al., 1999). Die Mucine können die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen modulieren. Einerseits üben die negativ geladenen sialylierten und sulfatierten Glykanstrukturen der Mucine eine abstoßende Wirkung gegenüber anderen negativen Strukturen aus und verhindern somit die Adhäsion, andererseits werden genau diese Glykane von manchen Lektinmolekülen (Selektine) als Bindungsliganden erkannt (Lagow et al., 1999). Alle Mucine (MUC1 bis MUC8) werden im weiblichen Genitaltrakt exprimiert, wobei die Expression in den

verschiedenen Abschnitten unterschiedlich ist. Das Oviduktin wird wegen seiner Mucin-ähnlichen Natur auch als MUC9 bezeichnet und wird nur im Eileiter exprimiert (Lagow et al., 1999).

Die biologische Rolle des Oviduktins ist mit der Regulation der Gametenfunktion, der Fertilisation und den frühen Stadien der embryonalen Entwicklung verbunden. Oviduktin konnte mit immunologischen Verfahren in der ZP, im perivitellinen Raum und auf der Plasmamembran der Oozyte und des Embryos beim Schwein (Buhi et al., 1993), Rind (Wegner und Killian, 1991), Schaf (Gandolfi et al., 1991), Hamster (Kan et al., 1993, Malette und Bleau, 1993) und Pavian (Boice et al., 1990) lokalisiert werden. Es konnte eine Bindung an die periakrosomale Spermienmembran beim Rind (King et al., 1994a) und Hamster (Kan et al., 2006) demonstriert werden. Die Inkubation von Spermatozoen und Oozyten mit Oviduktin vor in vitro Fertilisation führt zur Stimulierung der Kapazitation und der Spermienmotilität, zur Erhöhung der Penetrationsrate der ZP, zur Reduktion der Polyspermie und Stimulierung der ersten Teilungen der Blastozyste (King et al., 1994b, McCauley et al., 2003, Kouba et al., 2000, Hill et al., 1996a,b). Diese Daten bestätigen, dass Oviduktin einen positiven biologischen Effekt auf beide Gameten und auf den frühen Embryo ausübt und somit eine entscheidende Rolle bei der Befruchtung der Säugetiere spielt.

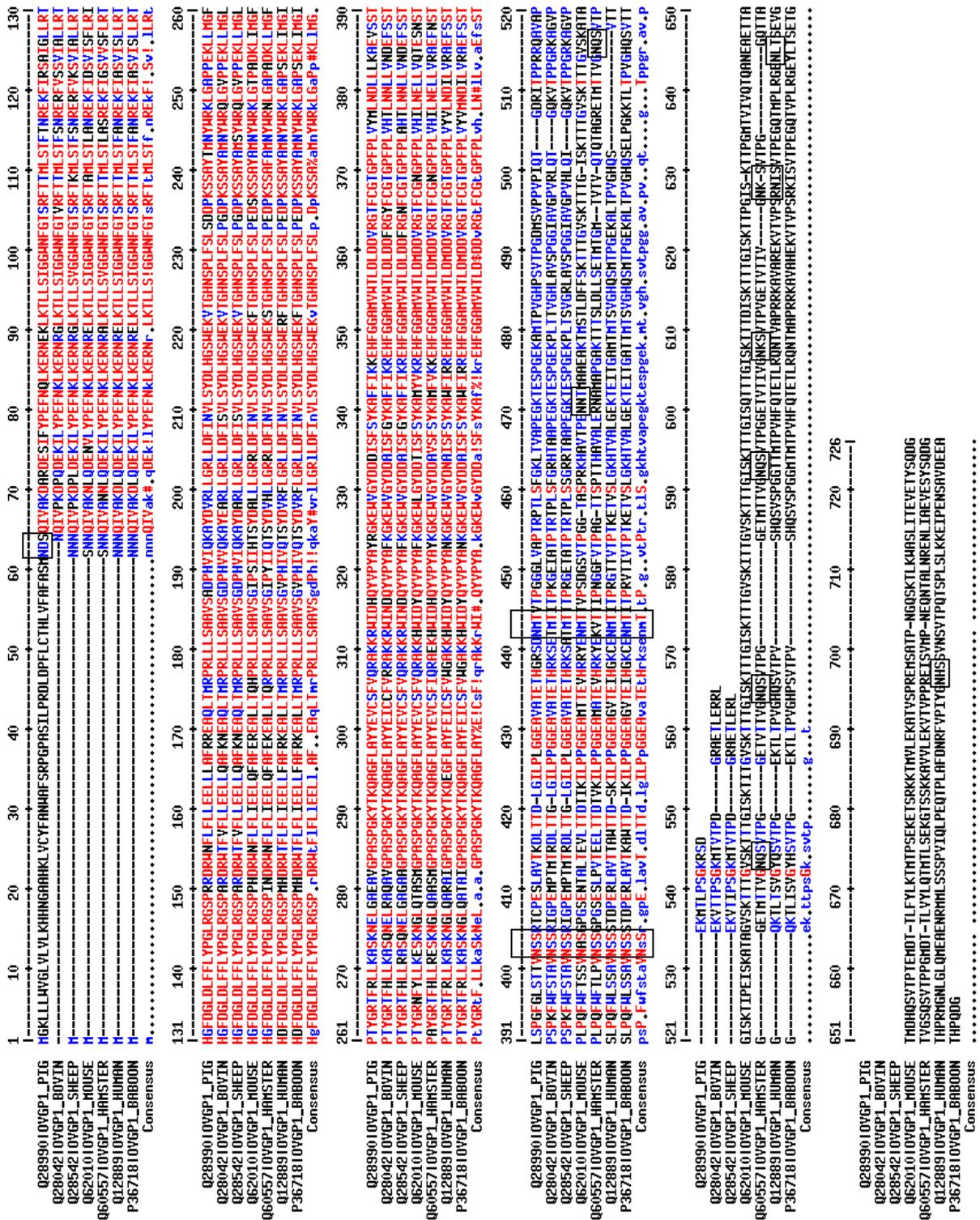
#### **4.2.2 Glykosylierung des Oviduktins**

Über die Glykosylierung des Oviduktins liegen nur wenige Daten vor. Sie scheint wichtig für die biologische Aktivität des Proteins zu sein. Satoh et al. (1995) zeigten, dass nach der Abspaltung der Sialsäure und der N-Glykane die Fähigkeit des bovinen Oviduktins, die Vitalität der Spermatozoen zu unterstützen, signifikant reduziert wird. Außerdem ist das komplett deglykosylierte Protein unlöslich. Die unterschiedliche Verteilung der Glykosylierungsstellen und der Mucin-Domänen in der Polypeptidkette und die Heterogenität von Typ und Anzahl der Glykanstrukturen kann die Spezifität der Proteinfunktion bewirken (Buhi, 2002). Die Zusammensetzung der Glykanstrukturen wurde lektinologisch bei bovinen (Satoh et al., 1995), ovinen (DeSouza und Murray, 1995a) und Hamster- (Malette und Bleau, 1993) Oviduktin untersucht. Bei Rind und Schaf konnten die Kohlenhydratreste N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin, Galactose,  $\alpha$ -Fucose, Gal $\beta$ 1,3GalNAc und  $\alpha$ 2,3(6)-gebundene Sialsäure (typisch für die Mucin-Typ Proteine) detektiert werden. Das bovine Oviduktin enthält im Unterschied zu dem ovinen Protein auch terminale

Mannosereste, jedoch in sehr kleinen Mengen. Die lektinologischen Untersuchungen des Hamster-Proteins konnten Sialsäurereste, Sulfat, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin jedoch keine Fucose und Mannose nachweisen. Andererseits wird  $^3\text{H}$ -Mannose bei de novo Synthese in das Protein eingebaut, was auf eine N-Glykosylierung hindeutet. Buhi und Alvarez (1991) zeigten in der Zellkultur, dass  $^3\text{H}$ -GlcNAc in das de novo synthetisierte Oviduktin eingebaut wird und demonstrierten somit, dass das porcine Oviduktin ebenfalls ein Glykoprotein ist. Da weder die Zusammensetzung noch der Typ der Glykan-strukturen des porcinen Oviduktins bis jetzt untersucht worden sind, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Lektin-Blot-Analyse des Proteins und anschließend eine massenspektrometrische Analyse der N-Glykane durchgeführt. Durch Lektinologie konnte, ähnlich wie bei den anderen untersuchten Spezies, terminale  $\alpha$ 2,6-Sialsäure,  $\alpha$ -Fucose und Gal $\beta$ 1,3GalNAc nachgewiesen werden. Das porcine Oviduktin (wie das bovine Oviduktin) trägt auch  $\alpha$ -Mannosereste. Die Intensität der Lektin-Bindung spricht für eine reichliche O-Glykosylierung, zahlreiche sialylierte und fucosylierte Strukturen und sehr wenig Oligomannosyl- oder Hybrid-Typ Glykane.

Ein großer Teil des Molekulargewichts des Oviduktins der untersuchten Tiere wird von den gebundenen Kohlenhydratseitenketten ausgemacht. Das aus der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht beträgt 57-66kDa. Dagegen weist das elektrophoretisch getrennte Protein ein Molekulargewicht von 85 und 116kDa auf. Die detektierten Monosaccharidreste bei allen vier Tierarten deuten sowohl auf N- als auch auf O-Glykosylierung hin. Die durchgeführten lektinologischen oder enzymatischen Analysen zeigen allerdings, dass dieser Unterschied in dem Molekulargewicht hauptsächlich von den O-Glykanen verursacht wird und dass die N-Glykosylierung sehr gering ist (Sato et al., 1995, DeSouza und Murray, 1995a, Malette und Bleau, 1993). Dies ergibt sich auch aus der Aminosäuresequenz. Die potenziellen N-Glykosylierungsstellen variieren bei den verschiedenen Tierarten von eins bis sieben, während 10 bis 20 O-Glykosylierungsstellen detektiert wurden (Buhi, 2002). Eine sterische Störung durch die zahlreichen O-Glykanen kann der Grund dafür sein (außer dem Molarverhältnis), dass die für die N-Glykane typischen Mannosereste lektinologisch sehr schwer oder überhaupt nicht detektiert werden können.

Die Aminosäuresequenz des porcinen Oviduktin deutet auf drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N<sub>62</sub>, N<sub>402</sub> und N<sub>441</sub> hin. *Multiple Alignment* der Aminosäuresequenzen von sieben Säugetieren (Schwein, Rind, Schaf, Maus, Hamster, Mensch und Baboon) zeigt, dass nur die Position N<sub>402</sub>SS (nur bei Maus NAS) bei allen Spezies konserviert ist (Abb. 27). Die Position N<sub>441</sub>MT ist bei Schwein, Maus, Mensch und Baboon gleich. Eine Glykosylierung an der N<sub>62</sub>DS ist nur beim Schwein möglich. Die Sequenzen von Maus, Hamster und Mensch besitzen weitere, jeweils eins, fünf und drei potenzielle nicht konservierte N-Glykosylierungsstellen in der C-terminalen Region der Polypeptidkette. Bei Rind und Schaf ist nur die konservierte Glykosylierungsstelle an N<sub>402</sub>SS zu finden. Die Oviduktin-Aminosäuresequenzen der verglichenen Tiere weisen bis zu 90% Homologie in dem N-Terminus und nur bis zu 50% im C-Terminus auf. Die heterogene Verteilung der meisten N-Glykosylierungsstellen in der C-terminalen Region deutet auf eine speziesspezifische N-Glykosylierung hin. In Folge dessen kann man vermuten, dass die N-Glykane (falls alle Positionen mit Glykanen besetzt sind) eine speziesspezifische Funktion des Oviduktins erfüllen.



**Abb. 27: Multiple Alignment der Aminosäuresequenzen des Ovidukts bei Schwein, Rind, Schaf, Maus, Hamster, Mensch und Baboon.**

Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind durch schwarze Kästchen und die Aminosäuren mit hoher (rot) und niedriger (blau) Übereinstimmung farblich gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit dem MultAlin-Programm (INRA, France; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) erstellt.

### 4.2.3 N-Glykosylierung des porcinen Oviduktins

Das Glykosylierungsmuster und die Struktur der N-Glykane des Oviduktins der Säugetiere sind bis jetzt noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Studie wurden die N-Glykanstrukturen und die N-Glykosylierungsstellen des porcinen Oviduktins analysiert. Mittels N-Glykosidase F konnten die N-Glykane abgespalten und anschließend massenspektrometrisch detektiert werden. Das neutrale Glykan-Profil des Oviduktins weist eine sehr heterogene Mischung aus komplexen, hybriden und Oligomannosyl-Strukturen auf (Abb. 24 und Tabelle 11 in Abschnitt 3.6.4.1). Die meisten Signale im MS-Spektrum zeigten jedoch relative Intensitäten unter 20%. Die drei herausragenden dominanten Glykansignale (RI 40-100%) konnten als mehrfach-fucosylierte bi-antennäre komplexe Glykane identifiziert werden:  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_2+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_3+\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Der hohe Fucose-Gehalt wurde auch durch die intensive Reaktion des Oviduktins mit dem Lektin AAA bestätigt. Die mono- und bifucosylierten Glykane konnten auch in ihren sialylierten Formen im sauren Glykan-Profil beobachtet werden, während die tri-fucosylierte Struktur wahrscheinlich nur neutral vorliegt. Es konnten nur sehr wenige schwache Signale anderer sialylierter Glykane detektiert werden (Abb. 25 und Tabelle 12 in Abschnitt 3.6.4.2). Dies spricht dafür, dass die starke Reaktion des Oviduktins mit dem Lektin SNA vorwiegend auf die zahlreichen sialylierten O-Glykane zurückzuführen ist.

Das Oviduktin wurde als schwache Proteinbande in der elektrophoretisch getrennten GNA-bindenden Fraktion der OF identifiziert. Deshalb waren Oligomannosyl-Typ N-Glykane im neutralen Glykanprofil zu erwarten. Strukturen mit fünf, sechs, sieben und acht Mannoseresten konnten detektiert und durch  $\alpha$ -Mannosidase-Spaltung bestätigt werden. Die sehr geringe Intensität dieser Signale und die schwache Oviduktin-Bande in der GNA-bindenden Fraktion der OF zeigten allerdings, dass die Oligomannosyl-Glykane nicht die dominanten N-Glykanstrukturen des porcinen Oviduktins darstellen. Trotzdem kann eine Mannose-vermittelte Interaktion des Oviduktins mit den Spermatozoen nicht ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wird ein Überblick der N-Glykanstrukturen des porcinen Oviduktins präpuberaler Tiere vorgestellt. Es ist jedoch bekannt, dass die Oviduktin-Expression Östrogen-abhängig ist und in den verschiedenen Eileiter-Abschnitten (Isthmus und Ampulla) variiert (Buhi et al., 1990). Da die Proteinglykosylierung ein dynamischer Prozess ist, der unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen (z. B. Zyklusstadium des

Tieres) unterschiedlich verlaufen kann, könnte das Oviduktin verschiedene topographische und Zyklus-abhängige Glykan-Muster aufweisen. Die funktionelle Rolle der N-Glykosylierung dieses Proteins muss durch weitere detaillierte biochemische und physiologische Untersuchungen geklärt werden.

Die N-Glykosylierungsstellen des porcinen Oviduktins wurden durch den Vergleich der MS-Muster des mit Trypsin gespaltenen Proteins vor und nach Deglykosylierung untersucht. Die MS-Signale der Peptide, die N-Glykosylierungsstellen beinhalten, konnten erst nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F detektiert werden. Das Auftreten aller drei Peptide (mit oder ohne Modifizierung) ist eine Bestätigung dafür, dass die drei Asparaginpositionen N<sub>62</sub>DS, N<sub>402</sub>SS und N<sub>441</sub>MT tatsächlich mit Glykanseitenketten besetzt sind. Da der Modifizierungsgrad der Peptide hoch und das N-Glykan-Profil sehr heterogen ist, ergab sich rechnerisch eine sehr große Anzahl von Glykopeptidstrukturen und Zuordnungsmöglichkeiten. Die meisten Glykansignale sind allerdings geringfügig im MS-Profil präsentiert. Um die Heterogenität der möglichen Glykopeptide zu reduzieren, hat sich die Analyse auf die Zuordnung der drei intensivsten bi-antennären komplexen fucosylierten Glykanstrukturen konzentriert (Tabelle 14 in Abschnitt 3.6.6). Das dominante bi-fucosylierte Glykan HexNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>2</sub>+Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (m/z 2037,9) konnte an den drei Glykosylierungsstellen N<sub>62</sub>, N<sub>402</sub> und N<sub>441</sub> lokalisiert werden. An den Positionen N<sub>62</sub> und N<sub>402</sub> wurde auch das Glykan HexNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>1</sub>+Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (m/z 1891,9) zugeordnet. Die tri-fucosylierte Struktur HexNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>3</sub>+Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (m/z 2184,0) konnte nur zur Position N<sub>402</sub> lokalisiert werden. Die Verteilung der drei dominanten N-Glykane an den drei Glykosylierungsstellen ist eine weitere Bestätigung für die Glykosylierung der drei Asparaginreste. Für die Erstellung eines vollständigen Glykosylierungsmuster des porcinen Oviduktins sind allerdings weitere Analysen notwendig.

### 4.3 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit durchgeführte Glyko-Proteom-Analyse zeigt, dass der porcine Eileiter eine Reihe von membranassoziierten und sekretorischen GNA-bindenden Glykoproteinen exprimiert. Auf Grund ihres Mannose-Gehaltes kommen sie als Bindungspartner für die Spermatozoen in Frage. Es scheint jedoch, dass für die Spermatozoen-Eileiter-Bindung ein direkter Kontakt zwischen den Spermatozoen und dem Oviduktepithel notwendig ist. Diese Feststellung deutet darauf hin, dass die membranassoziierten Glykoproteine bevorzugte Spermien-Bindungspartner sein können. Das konnte durch die Bindung von LAMP-1/2 und ORP150 an die periakrosomale Spermienmembran demonstriert werden. Die anderen identifizierten GNA-bindenden Glykoproteine (APN, ACE,  $\alpha$ -2-Makroglobulin, HSP90 und Oviduktin) können eine regulatorische oder schützende Funktion für die Spermatozoen erfüllen. Die detaillierte N-Glykan-Analyse des Oviduktins zeigte, dass die Oligomannosyl-Strukturen nicht die dominanten neutralen N-Glykane dieses Proteins darstellen. Deshalb ist eine über Mannoseresste vermittelte Rezeptor-Funktion des Oviduktins eher unwahrscheinlich. Dem Oviduktin kann eine Rolle bei der Stimulierung und der Kontrolle der Spermienfunktion während der Kapazitation und der Interaktion mit der Eizelle zugeteilt werden.

## 5. Literatur

Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y., Nakano, M. (2001) Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev*, 59(2), 221-226.

Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G. (2005) Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem*, 3, 1593-1608.

Anderson N. L., Anderson, N. G. (1998) Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19, 1853-1861.

Baillie, H.S., Pacey, A.A., Warren, M.A., Scudamore, I.W., Barratt C.L.R. (1997) Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod*, 12 (9), 1985–1992.

Baker, A.H., Edwards, R.D., Murphy, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, 115, 3719-3727.

Benoff, S. (1997a) Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod*, 3 (7), 599–637.

Benoff, S., Hurley, I.R., Mandel, F.S., Cooper, G.W., Herschlag, A. (1997b) Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Mol Hum Reprod*, 3, 827-837.

Bleil, J., Wassarman, P.M. (1988) Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *PNAS*, 85 (18) 6778-6782.

Bleil, J., Wassarman, P.M. (1990) Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *PNAS*, 87, 5563-5567.

Boilard, M., Bailey, J., Collin, S., Dufour, M., Sirard, M.A. (2002) Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. *Biol Reprod*, 67, 1125–1132.

Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J.L., Sirard, M.A., Leclerc, P. (2004) Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biol Reprod*, 71, 1879-1889.

Boice, M.L., McCarthy, T.J., Mavrogianis, P.A., Fazlebas, A.T., Verhage, H.G. (1990) Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons. *Biol Reprod*, 43, 340-346.

Booth, A.G., Kenny, A.J. (1974) A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem J*, 142, 575-581.

Borth, W. (1992)  $\alpha$ -2-Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J*. 6, 3345-3353.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Sudhipong, V., Dones-Smith, M.M. (1990) Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biol Reprod*, 43, 929-938.

Buhi, W.C., Alvarez, I.M. (1991) Phosphorylation and glycosylation of the 75-85 K Mr estrogen-induced oviductal secretory protein. *Biol Reprod*, 44 (Suppl. 1), 162.

Buhi, W.C., O'Brien, B., Alvarez, I.M., Erdos, G., Dubois, D. (1993) Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Bol Reprod*, 48, 1274-1283.

Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Choi, I., Cleaver, B.D., Simmen, F.A. (1996) Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod*, 55, 1305-1314.

Buhi, W.C. (2002) Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reprod*, 123, 355–362

Calvert, M.E., Digilio, L.C., Herr, J.C., Coonrod, S.A. (2003) Oolemmal proteomics – identification of highly abundant heat shock proteins and molecular chaperones in the mature mouse egg and their localization on the plasma membrane. *Reprod Biol Endocrinol*, 14 (1), 27.

Cambi, A., Koopman, M., Figdor, C.G. (2005) How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol*, 7 (4), 481-488.

Carlsson, S.R., Rothll, J., Pillerz, F., Fukuda, M. (1988) Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp- 1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J Biol Chem*, 263, (35), 18911-18919.

Chang, M.H., Hua, C.T., Isaac, E.L., Litjens, T., Hodge, G., Karageorgos, L.E., Meikle, P.J. (2004) Transthyretin interacts with the lysosome-associated membrane protein (LAMP-1) in circulation. *Biochem J*, 382 (2), 481-489.

Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L.H., Wassarman, P.M., Suzuki, F., Bleil, J.D. (1994) Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol*, 125, 867-878.

Chiu, P.C.N., Tsang, H.Y., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Lee, K.F., Yeung, W.S.B. (2004) The contribution of D-mannose, L-fucose, N-acetylglucosamine, and selectin residues on the binding of glycodelin isoforms to human spermatozoa. *Biol Reprod*, 70, 1710–1719.

Cortes, P.P., Orihuela, P.A., Zuniga, L.M., Velasquez, L.A., Croxatto, H.B. (2004) Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biol Reprod*, 71, 1262–1269.

Crocker, P.R. (2002) Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol*, 12 (5), 609-615.

DeMott, R.P., Lefebvre, R., Suarez, S.S. (1995) Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod*, 52, 1395-1403.

DeSouza, M.M., Murray, M.K. (1995a) An estrogen-dependent sheep oviductal glycoprotein has glycan linkages typical of sialomucins and does not contain chitinase activity. *Biol Reprod*, 53, 1517-1526.

DeSouza, M.M., Murray, M.K. (1995b) An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology*, 136 (6), 2485-2496.

Do, K.Y., Smith, D.F., Cummings, R.D., (1990) LAMP-1 in CHO cells is a primary carrier of poly-N-acetylactosamine chains and bound preferentially by a mammalian S-type lectin. *Biochem Biophys Res Commun*, 173 (3), 1123-1128.

Dobrinski, I., Ignatz, G.G., Thomas, P.G., Ball, B.A. (1996) Role of the carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro. *Am J Vet Res*, 57 (11), 1635-1639.

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.

Domon, B., Costello, C.E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycocojugate J*, 5, 397-409.

Donnelly, K.M., Fazleabas, A.T., Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A., Jaffe, R.C. (1991) Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Mol Endocrinol*, 5, 356-364.

Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*, 263 (20), 9557-9560.

Eisenbach, M. (1999) Sperm chemotaxis. *Rev Reprod*, 4, 56–66.

- Eisenbach, M. (2004) Towards understanding the molecular mechanism of sperm chemotaxis. *J Gen Physiol*, 124, 105–108.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E. (2005) Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod*, 73, 536–545.
- Ensslin, M., Vogel, T., Calvete, J.J., Thole, H.H., Schmidtke, 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.
- Ensslin, M.A., Shur, B.D. (2003) Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell*, 114, 405–417.
- Fabro, G., Rovasio, R.A., Civalero, S., Frenkel, A., Caplan, S.R., Eisenbach, M., Giojalas, L.C. (2002) Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod*, 67, 1565–1571.
- Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.V. (1999) Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod*, 60, 879–886.
- Fazeli, A., Elliott, R.M.A., Duncan, A.E., Moore, A., Watson, P.F., Holt, W.V. (2003) In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. *Reproduction*, 125, 509–517.
- Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, 266 (32), 21327-21330.
- Gabius, H.J. (2001) Eukaryotic glycosylation and lectins: hardware of the sugar code (glycocode) in biological information transfer. *Electr J Pathol Histol*, 7 (1), 5.
- Gandolfi, F., Modina, S., Brevini, T.A., Galli, C., Moor, R.M., Lauria, A. (1991) Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem*, 35 (4), 383-392.
- Gehlhaar, R. (1999) Etablierung eines porcinen Ovidukt-Explant-Assays zum Studium der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- Gehlhaar, R., Waberski, D., Petrunkina, A.M., Töpfer-Petersen, E. (2000) Inhibition of porcine sperm binding to oviductal explans by specific carbohydrates. *Reprod Dom Anim*, 35, 37-38.
- Geyer, H., Schmitt, S., Wuhner, M., Geyer, R. (1999) Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal Chem*, 71, 476-482.

Goldstein, I.J., Poretz, R.D. (1986) *The Lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine.* Academic Press, Orlando, Florida.

Gwathmey, T.M., Ignatz, G.G., Suarez, S.S. (2003) PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, 69, 809-815.

Harvey, D.J. (1999) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom Rev*, 18, 349-451.

Harvey, D.J., Wing, D.R., Küster, B., Wilson, I.B.H., (2000a) Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *J Am Soc Mass Spectrom*, 11, 564-571.

Harvey, D.J., Bateman, R.H., Bordoli, R.S., Tyldesley, R. (2000b) Ionisation and fragmentation of complex glycans with a quadrupole time-of-fly mass spectrometer fitted with a matrix-assisted laser desorption/ionisation ion source. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14, 2135-2142.

Harvey, D.J. (2005) Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics*, 5, 1774–1786.

Hill, J.L., Walker, S.K., Brown, G.H., Nancarrow, C.D. (1996a) The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. *Theriogenology*, 46 (8), 1367-1377.

Hill, J.L., Walker, S.K., Brown, G.H., Nancarrow, C.D. (1996b) The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the in vitro fertilization and development of ovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 46 (8), 1379-1388.

Hirabayashi, J., Kasai, K. (2000) Glycomics, coming of age! *Trends Glycosci Glycotech*, 12 (63), 1–5.

Hirabayashi, J., Kasai, K. (2002a) Separation technologies for glycomics. *J Chrom*, 771, 67–87.

Hirabayashi, J., Hashidate, T., Kasai, K. (2002b) Glyco-catch method: a lectin affinity technique for glycoproteomics. *J Biomol Tech*, 13, 205–218.

Holt, W.V., Elliott, R.M.A., Fazeli, A., Satake, N., Watson, P.F. (2005) Validation of an experimental startegy for stadying surface-exposed proteins involved in porcine sperm-ovidukt contact interactions. *Reprod Fertil Dev*, 17, 683-692.

Howes, E., Pascall, J.C., Engel, W., Jones, R. (2001) Interaction between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci*, 114, 4127-4136.

Howes, L., Jones, R. (2002) Interaction between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol*, 53 (1-2), 181-192.

- Huang, H.C., Lee, W.C., Lin, J.H., Huang, H.W., Jian, S.C., Mao, S.J.T., Yang, P.C., Huang, T.Y., Liu, Y.C. (1999) Molecular cloning and characterisation of porcine cDNA encoding a 90-kDa heat shock protein and its expression following hyperthermia. *Gene*, 226,307-315.
- Huang, H.C., Yu, J.S., Tsay, C.C., Lin, J.H., Huang, S.Y., Fang, W.T., Liu, Y.C., Tzang, B.S., Lee, W.C. (2002) Purification and characterization of porcine testis 90-kDa heat shock protein (HSP90) as a substrate for various protein kinases. *J Prot Chem*, 21 (2).
- Hunter, R.H.F., Flechon, B., Flechon, J.E. (1987) Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscopy study. *Tissue Cell*, 19, 423-436.
- Hunter, R.H.F. (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev*, 39, 176-181.
- Hunter, R.H.F. (2002) Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Dom Anim*, 37, 186–190.
- Hunter, R.H.F., Rodriguez-Martinez, H. (2004) Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the fallopian tubes. *Mol Reprod Dev*, 67, 243–250.
- Ignotz, G.G., Lo, M.C., Perez, C.L., Gwathmey, T.M., Suarez, S.S. (2001) Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, 64, 1806-1811.
- Ikeda, J., Kaneda, S., Kuwabara, K., Ogawa, S., Kobayashi, T., Matsumoto, M., Yura, T., Yanagi, H. (1997) Cloning and expression of cDNA encoding the human 150kDa oxigen-regulated protein, ORP150. *Biochem Biophys Res Commun*, 230 (1), 94-99.
- Jansen, S., Ekhlasi-Hundrieser, M., Topfer-Petersen, E. (2001) Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, 168 (1-2), 82-92.
- Jensen, O.N., Shevchenko, A., Mann, M., Creighton, T.E. (1997) Protein analysis by mass spectrometry. In Jensen, O.N., Creighton, T.E., *Protein structure – a practical approach*. European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany.
- Johnston, D.S., Wringht, 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. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped pligosaccharide. *J Biol Chem*, 273, 1888-1895.
- Kan, F.W.K., Roux, E., Bleau, G. (1993) Immunolocalization of oviductin in endocytic compartments in the blastomeres of developing embryos in the golden hamster. *Biol Reprod*, 48, 77-88.

- Kan, F.W.K., Esperanzate, P.W.B. (2006) Surface mapping of binding of oviductin to the plasma membrane of golden hamster spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*, 73, 756–766.
- Kannan, K., Steward, R.M., Bounds, W., Carlsson, S.R., Fukuda, M., Betzing, K.W., Holcombe, R.F. (1996) Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol*, 171, 10-19.
- Killian, G.J. (2004) Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 141-153.
- Kilpatrick, D.C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta*, 1572, 187– 197.
- King, R.S., Killian, G.J. (1994a) Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod*, 51, 34-42.
- King, R.S., Anderson, S. H., Killian, G.J. (1994b) Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl*, 15 (5).
- Kouba, A.J., Abeydeera, L.R., Alvarez, I.M., Day, B.N., Buhi, W.C. (2000) Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development in vitro. *Biol Reprod*, 63, 242-250.
- Krishnan, V., Bane, S.M., Kawle, P.D., Naresh, K.N., Kalraiya, R.D. (2005) Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. *Clin Exp Metastasis*, 22 (1), 11-24.
- Küster, B., Wheeler, S.F., Hunter, A.P., Dwek, R.A., Harvey, D.J. (1997) Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 250, 82-101.
- Küster, B., Hunter, A.P., Wheeler, S.F., Dwek, R.A., Harvey, D.J. (1998) Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specific glycosylation of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *Electrophoresis*, 19, 1950-1959.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lagow, E., DeSouza, M.M., Carson, D.D. (1999) Mammalian reproductive tract mucins. *Hum Reprod Update*, 5 (4), 280-292.
- Lee, Y.C. (1992) Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. *FASEB J*, 6, 3193-3200.

- Lefebvre, R., Lo, M.C., Suarez, S.S. (1997) Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod*, 56, 1198-1204.
- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. (2000) Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect*, 2 (3), 279-288.
- Lottspeich, F. (1999) Proteomanalyse - ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. *Angew Chem*, 111, 2630 – 2647.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum, Akad Verl, Heidelberg, Berlin.
- Luan, Y., Xu, W. (2007) The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem*, 14 (6), 639-647.
- Malette, B., Bleau, G. (1993) Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulphated zona pellucida-binding glycoprotein. *Biochem J*, 295, 437-445.
- McCauley, T.C., Buhi, W.C., Wu, G.M., Mao, J., Caamano, J.N., Didion, B.A., Day, B.N. (2003) Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 69, 828-834.
- McEver, R.P., Moore, K.L., Cummings, R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*, 270, 11025.
- McNutt, T.L., Killian, G.J. (1991) Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl*, 12 (4).
- Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D. (1992) Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, 357 (6379), 589-593.
- Mori, K., Daltoh, T., Irahara, M., Kamada, M., Aono, T. (1989) Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am J Obstet Gynecol*, 161 (1), 207-211.
- Oehninger, S., Patankar, M., Seppala, M., Clark, G.F. (1998) Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia*, 30 (4-5), 269-274.
- Oliveira, R.G., Tomasi, L., Rovasio, R.A., Giojalas, L.C. (1999) Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil*, 115, 23-27.
- Ozawa, K., Kuwabara, K., Tamatani, M., Takatsuji, K., Tsukamoto, Y., Kanedai, S., Yanagii, H., Stern, D.M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Ogawa, S., Tohyama, M. (1999) 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 274,10, 6397–6404.

- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., Redmond, J.W. (1998) A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconjugate J*, 15, 737-747.
- Palter, S.F., Mulayim, N., Senturk, L., Arici, A. (2001) Interleukin-8 in the human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (6), 2660-2667.
- Papac, D.I., Wong, A., Jones, A.J. (1996) Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 68 (18), 3215-23.
- Perez-Vilar, J., Hill, R.L. (1999) The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem*, 274 (45), 31751–31754.
- Petrunkina, A.M., Gehlhaar, R., Drommer, W., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E. (2001a) Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*, 121, 889-896.
- Petrunkina, A.M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E. (2001b) Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction*, 122, 469-480.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J.M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L., Calvete, J.J. (2005) Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63, 514-535.
- Satoh, T., Abe, H., Sendai, Y., Iwata, H., Hoshi, H. (1995) Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochem Biophys Acta*, 1266, 117-123.
- Sendai, Y., Abe, H., Kikuchi, M., Satoh, T., Hoshi, H. (1994) Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod*, 50, 927-934.
- Sendai, Y., Komiya, H., Suzuki, K., Onuma, T., Kikuchi, M., Hoshi, H., Araki, Y. (1995) Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod*, 53, 285-294.
- Sharon, N., Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14 (11), 53R–62R.
- Sharon, N. (2007) Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*, 282 (5), 2753–2764.
- Shibuya, N., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J.M., Peumansy, W.J. (1988) Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem*, 263 (2), 728-734.
- Shur, B.D., Ensslin, M.A., Rodeheffer, C. (2004) SED1 function during mammalian sperm–egg adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 477–485.

- Smith, T.T., Yanagimachi, R. (1990) The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod*, 42, 450-457.
- Smith, T.T., Yanagimachi, R. (1991) Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil*, 91, 567-573.
- Smith, T.T., Nothnick, W.B. (1997) Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. *Biol Reprod*, 56, 83-89.
- Suarez, S.S., Brockman, K., Lefebvre, R. (1997) Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, 56, 447-453.
- Suarez, S.S. (1998a) The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals: Mechanisms of Formation. *Biol Reprod*, 58, 1105-1107.
- Suarez, S.S., Revah, I., Lo, M., Kölle, S. (1998b) Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a  $Ca^{2+}$ -dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol Reprod*, 59, 39-44.
- Suarez, S.S. (2001) Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs*, 168 (1-2), 105-112.
- Suarez, S.S. (2002) Formation of the reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim*, 37, 140-143.
- Suarez, S.S., Pacey, A.A. (2006) Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12 (1), 23-37.
- Sun, F., Bahat, A., Gakamsky, A., Girsh, E., Katz, N., Giojalas, L.C., Tur-Kaspa, I., Eisenbach, M. (2005) Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod*, 20 (3), 761-767.
- Suzuki, K., Sendai, Y., Onuma, T., Hoshi, H., Hiroi, M., Araki, Y. (1995) Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod*, 53, 345-354.
- Takasaki, S., Mori, E., Mori, T. (1999) Structures of sugar chains included in mammalian zona pellucida glycoproteins and their potential roles in sperm-egg interaction. *Biochim Biophys Acta*, 1473, 206-215.
- Thomas, P.G.A., Ball, B.A., Brinsko, S.P. (1994) Interaction of Equine Spermatozoa with Oviduct Epithelial Cell Explants Is Affected by Estrous Cycle and Anatomic Origin of Explant. *Biol Reprod*, 51, 222-228
- Töpfer-Petersen, E. (1999a) Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update*, 5 (4), 314-329.
- Töpfer-Petersen, E. (1999b) Molecules on the sperm's route to fertilization. *J Exp Zool*, 285, 259-266.

- Töpfer-Petersen, E., Petrunkina, A.M., Ekhlesi-Hundrieser, M. (2000) Oocyte–sperm interactions. *Anim Reprod Sci*, 60–61, 653–662.
- Töpfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, J., E., Petrunkina, A.M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Waberski, D., Drommer, W. (2002) Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J Exp Zool*, 292, 210-215.
- Töpfer-Petersen, E., Petrunkina, A.M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Waberski, D. (2003) Funktion des weiblichen Spermienreservoir beim Säugetier. *Andrologie*, 19, 173-180.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoлова, M., Leeb, T., Kirchhoff, C., Müller, P. (2005) Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia*, 37 (6), 202-204.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4354.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999) *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Vieira, E.G., Chapman, D.A., Killian, G.J. (1999) Evidence for multiple forms of estrus-associated protein in bovine oviductal fluid associated with oviduct region and stage of the estrus cycle. *Biol Reprod*, 60 (Supplement 1), 202.
- Vinson, G.P., Saridogan, E., Puddefoot, J.R., Djahanbakhch, O. (1997) Tissue renin–angiotensin systems and reproduction. *Hum Reprod*, 12 (4), 651–662.
- Wagner, A., (2001) *Das funktionelle Spermienreservoir im Säuger: Charakterisierung der kohlenhydratvermittelten Vorgänge der Spermien-Ovidukt-Bindung beim Schwein*. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- Wagner, A., Ekhlesi-Hundrieser, M., Hettel, C., Petrunkina, A.M., Waberski, D., Nimitz, M., Töpfer-Petersen, E. (2002) Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation – studies in the pig. *Mol Reprod Dev*, 61, 249-257.
- Walter, I., Bavder, S. (1997) Lectin binding patterns of porcine oviduct mucosa and endometrium during the oestrous cycle. *J Anat*, 190, 299-307.
- Wegner, C.C., Killian, G.J. (1991) In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol Reprod Dev*, 29 (1), 77-84.
- Wheeler, S.F., Harvey, D.J. (2001) Extension of the in-gel release method for structural analysis of neutral and sialylated N-linked glycans to analysis of sulphated glycans: application to the glycans from bovine thyroid-stimulating hormone. *Anal Biochem*, 296, 92-100.
- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*, 2nd ed., 1, Raven Press, New York, USA, 189-317.

Yonezawa, N., Aoki, H., Hatanaka, Y., Nakano, M. (1995) Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *Europ J Biochem*, 233, 35-41.

Yonezawa, N., Amari, S., Takahashi, K., Ikeda, K., Imai, F.L., Kanai, S., Kikuchi, K., Nakano, M. (2005) Participation of the nonreducing terminal beta-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev*, 70 (2), 222-227.

Yurewicz, E.C., Pack., B.A., Sacco, A.G. (1991) Isolation, composition and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Mol Reprod Dev*, 30, 126-134.

Zanetta, J.P., Kuchler, S., Lehmann, S., Badache, A., Maschke, S., Thomas, D., Dufourcq, P, Vincendon, G. (1992) Glycoproteins and lectins in cell adhesion and cell recognition processes. *Histochem J*, 24 (11), 791-804.

Zhou, Q., Park, S.H., Boucher, S., Higgins, E., Lee, K., Edmunds, T. (2004) N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. *Anal Biochem*, 335, 10-16.

## Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Edda Töpfer-Petersen für die freundliche Aufnahme im Institut für Reproduktionsbiologie, für Ihr Vertrauen mir dieses anspruchsvolle und spannende Thema zu überlassen, für ihre persönliche wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und ihr Motivationsvermögen. Herzlichen Dank für die geleistete finanzielle Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Referates dieser Arbeit und für seine Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Mahnaz Ekhlasi-Hundrieser danke ich für die fachliche Betreuung als Postdoc, für ihre uneingeschrenkte Hilfsbereitschaft und für ihre persönliche Herzlichkeit.

Mein bester Dank geht an Frau Christine Kochel für die kompetente technische Hilfe bei der Durchführung vieler Versuche und für ihr nettes freundliches Wesen.

Herzlichen Dank an Herrn PD Dr. Andreas Pich und seinen Mitarbeitern aus dem Labor für Massenspektrometrie des Instituts für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover für die Hilfe bei der Aufnahme und der Auswertung der massenspektrometrischen Daten, für die gute Zusammenarbeit und die Gastfreundschaft.

Frau Dr. Dorothee von Witzendorff danke ich für die nette kollegiale Unterstützung und Beistand.

Ich bedanke mich bei Frau Christiane Hettel für die Hilfe bei der Anfertigung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und für ihre Freundlichkeit. Danke an Frau Dr. Silja Ebeling und Herrn Christian Lipke aus der AG Prof. Dr. B.Meinecke und an Herrn Heiko Henning und Frau Christiane Bode aus der AG Prof. Dr. D. Waberski für die Unterstützung bei der Besorgung des biologischen Materials.

Herrn Dr. Peter Schwarz aus dem Zentrum für Anatomie der Universität Göttingen danke ich für die angefertigten TEM-Aufnahmen der oviduktalen apikalen Membran.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die liebevolle moralische Unterstützung, für ihre Geduld und ihr Verständnis.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Miroslava Tsoleva (geb. Yordanova)  
Geburtsdatum/-ort: 20.11.1974 in Vratsa, Bulgarien  
Staatsangehörigkeit: bulgarisch  
Familienstand: verheiratet

## Schul- und Hochschulausbildung:

1981-1988            Grundschule in Vratsa, Bulgarien

1988-1992            Gymnasium in Vratsa, Bulgarien – fachspezifische Ausbildung  
mit Schwerpunkt Biologie und Chemie; Abiturabschluss

1992-1997            Studium an der Universität Sofia, Bulgarien im Studiengang  
Molekularbiologie mit Schwerpunkt Klinische Chemie; Abschluss  
mit einer Diplomarbeit zum Thema „Methode zur Messung des  
freien Hämoglobins im Blutplasma“

10.2003-03.2004    Aufbaustudium „Biomedizinische Technik“ der Hannoverschen  
Hochschulen

## Promotion:

04.2004-09.2007    Promotion am Institut für Reproduktionsbiologie, Stiftung  
Tierärztliche Hochschule Hannover, AG Prof. Dr. Dr. E. Töpfer-  
Petersen

## **Wissenschaftliche Tätigkeit**

### **Publikationen:**

Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E. (2005) Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod*, 73, 536–545.

Petrunkina, A.M., Harrison, R.A.P., Tsoлова, M., Jebe, E., Töpfer-Petersen, E. (2007) Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume. *Reproduction*, 133, 61-73.

Tsoлова, M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kochel, C., Pich, A., Töpfer-Petersen, E. (2006) The female sperm reservoir in the pig: characterization of sperm-binding glycoproteins from oviductal epithelial cells. *Reprod Dom Anim*, 41 (Supplement 1), 37.

Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoлова, M., Leeb, T., Kirchhoff, C., Müller P. (2005) Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia*, 37 (6), 202-4.

### **Posterpräsentationen:**

Tsoлова, M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kochel, C., Pich, A., Töpfer-Petersen, E.  
The female sperm reservoir in the pig: characterization of sperm-binding glycoproteins from oviductal epithelial cells. 39. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 31. Veterinär-humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Februar 2006, Hannover, Deutschland.

Tsoлова, M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kochel, C., Pich, A., Töpfer-Petersen, E.  
Glycoproteins of the porcine oviduct – candidate proteins involved in the sperm-oviduct interaction. 17th Glycobiology Meeting, November 2006, Bruges, Belgium.

Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoлова, M., Petrunkina, A.M., Töpfer-Petersen, E.  
The role of spermadhesins in the formation of the oviductal sperm interactions in pigs. The VII<sup>th</sup> International Conference On Pig Reproduction (Icpr) Was Held At Rolduc, June 2005, The Netherlands.

Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoлова, M., Leeb, T., Kirchhoff, C., Müller P. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Workshop “Molecular Andrology”, October 2005, Giessen, Germany.