

# **Proteine des männlichen Genitaltraktes: Struktur und Funktion**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Diplom-Biochemiker Marc Gentzel  
geboren am 01.11.1969 in Hannover

2000

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves

Koreferent: Prof. Dr. Dr. med. habil. Edda Töpfer-Petersen

Tag der Promotion: 29. Juni 2000

Datum der Veröffentlichung: 21. Juli 2000

*....meinen Eltern*

## Danksagung

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

Frau Prof. Edda Töpfer-Petersen möchte ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, das komplexe und faszinierende Thema, ihre Unterstützung und ihre stetige Gesprächsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Jürgen Alves danke ich für die konstruktiven Diskussionen, die Möglichkeit verschiedene Arbeiten im Labor der Abteilung Biophysikalische Chemie durchführen zu können und für die Vertretung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Manfred Raida für seine Begeisterungsfähigkeit und Unterstützung bei der Massenspektroskopie. Frau Jutta Baras-Ahknouk danke ich für ihre Unterstützung am Massenspektrometer und bei der N-terminalen Sequenzierung. Den Mitarbeitern des IPF Hannover, Abt. Peptidanalytik, danke ich für ihre herzliche Gastfreundschaft und Diskussionsbereitschaft.

Dr. Hans-Joachim Müller von der Fa. Hybaid GmbH, Heidelberg, gilt mein Dank für die Möglichkeit molekularbiologische Arbeiten in Heidelberg durchführen zu können.

Dr. Heiner Wolfes, Abt. Biophysikalische Chemie, MH Hannover, danke ich für die Oligonukleotid-Synthese, ständige Gesprächsbereitschaft und viele aufbauende Worte.

Dr. Peter Müller und Dr. Alexa Greube, Abt. Biophysik, Humboldt Universität Berlin, möchte ich für ihre Kooperation und Unterstützung bei den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und ihre Diskussionsbereitschaft danken.

Dr. Harald Sieme, Landgestüt Celle, danke ich für die Bereitstellung equiner Ejakulate, sowie Dr. Detlef Rath, Landwirtschaftliche Forschungsanstalt Mariensee, Dr. Hermann Bader und Prof. Weitze für Organisation und Unterstützung bei der Probengewinnung von Schlachttieren.

Allen Mitarbeitern der genannten Institute danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Dr. Alexandra Schambony möchte ich für ihre Zusammenarbeit und Unterstützung während und nach unserer gemeinsamen Zeit am Institut, ihre Revanche im Lesen von vielen Seiten grauenhafter Texte, ihre Geduld und Verständnis danken.

Hildegard und Rainer Schambony danke ich für ihr Verständnis und viele aufbauende Wochenenden.

Meinen Eltern Brigitta und Lutz Gentzel danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen, Geduld, Verständnis und ihre Anteilnahme an Freuden und Rückschlägen der naturwissenschaftlichen Arbeit.



## Zusammenfassung

Bei der Ejakulation werden die Spermatozoen der Säugetiere mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen vermischt und Proteine dieser in ihrer Gesamtheit als Seminalplasma bezeichneten Flüssigkeit assoziieren an die Spermienmembran. Die Hauptproteinkomponenten des Seminalplasmas in Rind, Schwein und Pferd bilden Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-30 kD, die den Proteinfamilien der Fibronectin (Fn)II-Typ, CUB- und *cysteine-rich secretory proteins* (CRISP) angehören. Sie zeichnen sich vor allem durch den Aufbau aus Domänen, die sonst Module komplexerer Proteine bilden, aus. Diese Proteine können aus dem Seminalplasma in ausreichenden Mengen für biochemische, biophysikalische, funktionelle und strukturelle Untersuchungen isoliert werden.

Funktion und Bedeutung der einzelnen Proteine im Befruchtungsgeschehen ist noch weitgehend unbekannt. Seminalplasmaproteine bilden in Lösung heterooligomere Aggregate. Diese Aggregation wurde anhand des Beispiels des FnII-Typ Proteins aus Rind, PDC-109, näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Assoziation zu Homooligomeren auf einer ionischen Protein-Protein Interaktion beruht, während die Interaktion mit dem spezifischen Liganden Phosphorylcholin unter Dimeren-Bildung auch in Gegenwart hoher Salzkonzentration erhalten bleibt. Diese unterschiedlichen Bindungsmodi könnten die direkte Interaktion mit Phosphatidylcholin der Plasmamembran und durch Protein-Protein Interaktion eine indirekte Oberflächenassoziation anderer Seminalplasmaproteine vermitteln. Zu den potentiellen Wechselwirkungspartner zählt auch das CRISP-Protein des Seminalplasmas, welches keine potentiellen Interaktionsmotive für eine Membranbindung besitzt. Das CRISP-3 Protein des Pferdes bindet auch *in vitro* nicht an Monolayer aus PC, PE oder PS, wie mittels eines ELISA-Systems festgestellt werden konnte. Die FnII-Typ Proteine des equinen Seminalplasmas binden analog zu PDC-109 in einem solchen System spezifisch an PC- und LPC- Monolayer und könnten eine indirekte Oberflächenassoziation vermitteln, wie erste Untersuchung ergaben.

Die Funktion der CRISP-Proteine ist unbekannt. Arbeiten zur Bedeutung des epididymalen CRISP-Protein der Ratte (CRISP-1), welches fest im Bereich des Äquatoralsegments an die Spermatozoen assoziiert, deuten auf eine essentielle Funktion bei der Gametenfusion und einen Rezeptor auf der Oocytenmembran hin. Ansätze zur möglichen Funktion von Proteinen der CRISP-Familie, die sich durch eine hohe Homologie und nicht zuletzt die Konservierung ihrer 16 Disulfidbrücken-bildenden Cysteine auszeichnen, sollten durch die strukturelle Analyse des equinen CRISP-3 gewonnen werden. Die partielle Aufklärung des Disulfidbrückenmusters von CRISP-3 durch enzymatische Proteolyse und Massenspektrometrie konnte tatsächlich zur Entwicklung eines funktionellen Domänenmodells genutzt werden. Demnach könnte es sich um ein Protein aus drei Domänen handeln: einer funktionellen N-terminalen, einer verbindenden und einer carboxyterminalen Domäne. Letztere könnte aufgrund ihrer Homologie einen Ionenkanal-Wechselwirkungspartner darstellen und bietet damit Perspektiven für zukünftige funktionelle Untersuchungen. Die analytischen Daten zum Disulfidbrückenmuster erlauben weiterhin die rekombinante Expression von Fragmenten der CRISP-Proteine, insbesondere der N-terminalen Domäne, da die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken als Grundlage für die Ausbildung einer nativen dreidimensionalen Struktur, durch *mass-fingerprinting* überprüft werden kann.

Die Konservierung sowohl der Seminalplasmaproteine des FnII- und CUB-Typs, als auch der verschiedenen Mitglieder der CRISP-Familie, wie sie für letztere beim Rind belegt werden konnte, betonen ihre Bedeutung für den Befruchtungsvorgang. Wie auch die Konservierung der Domänen als Module komplexerer Proteine, stützt sie ein zukünftiges Interesse an Funktion und Struktur dieser Proteine nicht nur im Rahmen der Reproduktionsbiologie.

Stichworte: Proteine des Seminalplasmas, Struktur und Funktion,  
Massenspektrometrie

## **Abstract**

Mammalian spermatozoa are mixed with the secretion of the accessory sexual glands during ejaculation. The proteins contained in the seminal plasma, collectively named seminal plasma proteins, associate to the sperm membrane. In bull, boar, and stallion the major protein components have a molecular weight in the range of 10 to 30 kD and can be divided into the three protein families of fibronectin type II-like (Fn II), CUB-, and cysteine-rich secretory (CRISP) proteins. Their simple modular architecture of domains usually found in more complex proteins as well as the possibility of isolation from a native source under non-denaturing conditions by classical methods makes them ideal candidates for biochemical, biophysical, functional, and structural studies.

Function and physiological relevance of these proteins during fertilisation still remain unknown. In solution, seminal plasma proteins show homo- and hetero-oligomeric aggregation. This behaviour has been subject of further investigation in case of PDC-109, the Fn II-type protein of the bull. The studies revealed that aggregation depends on ionic interactions, while binding of the specific ligand phosphorylcholine, a soluble analogue to the membrane lipid phosphatidylcholine (PC), involves hydrophobic interactions. Specific binding leads to dimer formation stable even under high salt concentrations. The latter conditions dissociate protein aggregates to monomers/homodimers depending on the method for mass determination. The different mechanisms of interaction could be responsible for direct binding of Fn II-type proteins to PC-containing membranes and indirect immobilisation of non-lipid binding proteins to the sperm membrane. The equine CRISP-3 protein can be found associated to the spermatozoon, but the amino acid sequence of this protein does not show any known lipid interaction feature. Indeed, equine CRISP-3 could be a potential candidate for indirect immobilisation by the Fn II type proteins of the stallion. Results obtained from an ELISA system further strengthen this thesis. CRISP-3 does not bind to monolayers of PC, PS or PE. In analogy to the bovine Fn II-type protein, its equine homologues HSP-1/2 bind specifically to PC and LPC monolayer. Primary investigations further indicate that the association of CRISP-3 indeed could be mediated by Fn II-type proteins in an indirect manner by protein-protein interaction.

The function of CRISP-proteins is still unknown. Contributions in case of the rodent proteins D/E (CRISP-1) demonstrate a potential role during gamete fusion. Inhibition of gamete fusion by pre-incubation of the egg with purified protein and detection of the protein in the equatorial region of spermatozoa, the sperm's fusion site, led to the development of a ligand (CRISP, spermatozoa) / receptor (egg) model. Evidence, like identification of the egg's receptor, is still missing and does not explain the existence of up to three different members of the CRISP-family on spermatozoa.

The conservation of 16 cysteines joined to eight disulfide bridges is a main feature of this protein family as well as high homology between the single proteins and between their counterparts in different species. Analysis of the disulfide bridge pattern has been aimed at additional information on domain structure and functional aspects based on more structural details. Indeed, the partial solution of the disulfide bridge pattern by limited enzymatic digestion and mass spectrometry could be used to develop a general domain model for CRISP-proteins. Results indicate the existence of an N-terminal PR-protein like domain, a short linking domain, and a C-terminal domain. The latter shows homology, not least because of the disulfide bridge pattern, to toxins making CRISP-proteins potential interaction partners of cation ion channels. Structural and analytical data further builds the basis for recombinant expression of protein and well defined fragments for biological assays. Disulfide bridges as an essential structural element of protein folding can be verified by the fast and sensitive method of enzymatic digestion and mass spectrometric analysis; a strategy not limited to CRISP-proteins.

Conservation of seminal plasma proteins of the FN II-, CUB-type, and CRISP proteins, recently demonstrated also for the bull, emphasizes an important and general role in mammalian fertilisation. A future interest in structure and function of these small proteins beside their role in fertilisation arises from their simple modular architecture and native accessibility, making them ideal examples for structure-function correlation studies.

**Keywords:** seminal plasma proteins, structure and function, mass spectrometry







# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 Einleitung	6
1.2 Spermatogenese	7
1.3 Epididymale Reifung	9
1.4 Bedeutung des Seminalplasmas	12
1.5 Spermatozoen im Ovidukt	15
1.6 Kapazitation	16
1.7 Bindung und Penetration der Zona Pellucida	19
1.8 Fusion mit der Oocyte	25
1.9 Zielsetzung	29
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
2.1 Allgemeine Methoden	30
2.2 Proteinchemische Methoden	30
2.2.1 SDS-Gelelektrophorese	30
2.2.2 Coomassie Brilliant Blue Färbung	32
2.2.3 Silber-Färbung nach Heukeshoven (modifiziert)	32
2.2.4 Proteinbestimmung	33
2.2.5 2-D Gelelektrophorese	33
2.2.6 Western Blotting	34
2.2.7 Immunchemischer Nachweis	35
2.2.8 Gewinnung und Vorbehandlung von Gewebeproben	36
2.2.9 Herstellung von Gewebeextrakten	37
2.2.10 Gewinnung von Ejakulaten und Seminalplasma	37
2.2.11 Isolierung von Seminalplasmaproteinen	37
2.2.12 Immunhistochemie	39
2.2.13 ELISA	40
2.2.14 Phospholipid-ELISA	41
2.3 Proteinanalytische Methoden	43
2.3.1 Reversed-Phase HPLC	43
2.3.2 Enzymatische Proteolysen	43
2.3.3 Massenspektrometrie	44
2.3.4 N-terminale Sequenzierung	45
2.3.5 Manueller Edman-Abbau	46
2.4 Molekularbiologische Methoden	47
2.4.1 Isolierung von RNA (Gesamt-RNA)	48
2.4.2 Isolierung von poly(A) <sup>+</sup> -RNA	48
2.4.3 Reverse Transkription und RT-PCR	50
2.4.4 PCR und spezielle PCR-Techniken	51
2.4.5 3'- und 5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)	52
2.4.6 Herstellung kompetenter Zellen	53
2.4.7 Transformation von kompetenten Zellen	54
2.4.8 Plasmid-Isolierung und Sequenzierung	54
2.5 Software	55

<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Bovine CRISP-Proteine</b>	<b>56</b>
3.1.1 Identifizierung und Sequenzierung boviner CRISP-Proteine	56
3.1.2 Transkription und Expression von bovinen CRISP-Proteinen im männlichen Genitaltrakt des Rindes	61
<b>3.2 Equines P47</b>	<b>64</b>
3.2.1 Identifizierung und Sequenzierung von equinem P47	64
3.2.2 Transkription von P47 im männlichen Genitaltrakt des Pferdes	68
<b>3.3 Isolierung von Seminalplasma-Proteinen</b>	<b>70</b>
3.3.1 Equine Seminalplasmaproteine – FnII-Typ Proteine	70
3.3.2 Porcine Seminalplasmaproteine – FnII-Typ und CRISP-Proteine	71
<b>3.4 Funktionelle Untersuchungen von FnII-Typ Proteinen</b>	<b>74</b>
3.4.1 Aggregation von Seminalplasmaproteinen am Beispiel von PDC-109	74
3.4.2 Interaktion von FnII-Typ Proteinen mit Phospholipiden	79
<b>3.5 Untersuchungen zur Struktur von CRISP-Proteinen</b>	<b>83</b>
3.5.1 Auswertungssoftware für Proteinverdau	84
3.5.2 Auswertungssystem für Peptide	85
3.5.3 Spaltungen von nativem equinem CRISP-3 mit spezifischen Endoproteinasen	89
3.5.4 Spaltung mit Endoproteinase Lys-C	91
3.5.5 Zusammenfassung Spaltung von ec CRISP-3 mit Endoprotease Lys-C	94
3.5.6 Isolierung von Proteinfragmenten für weitere Arbeiten	96
3.5.7 Spaltungen mit weiteren Proteasen – N-terminales Fragment	98
3.5.8 Spaltungen mit weiteren Proteasen – C-terminales Fragment	101
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>4.1 Identifizierung und Sequenzierung von Proteinen des männlichen Genitaltraktes</b>	<b>111</b>
4.1.1 Identifizierung und Sequenzierung boviner CRISP-Proteine	111
4.1.2 Identifizierung und Sequenzierung von equinem P47	113
<b>4.2 Aggregation von Seminalplasmaproteinen</b>	<b>116</b>
<b>4.3 Analyse des Disulfidbrückenmusters von equinem CRISP-3</b>	<b>121</b>
<b>4.4 Zusammenfassung und Perspektiven</b>	<b>131</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>133</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

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

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
CD	Circular Dichroismus
cDNA	komplementäre DNA
CTC	Chlortetracyclin
Da	Dalton
dd.	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
HIC	hydrophobic interaction chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	molecular weight
NBT	Nitroblau Tetrazoliumsalz
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCh	Phosphorylcholin
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Reverse Transkriptase
SDS	sodium dodecylsulfate
SSP	sequenzspezifischer Primer
TBS	Tris buffered saline
TCA	trichloro acetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	untranslated region

Für Abkürzungen von physikalischen und chemischen Einheiten werden die IUPAC Empfehlungen, für Aminosäuren der Ein-Buchstabenkode und nur in Sonderfällen der Drei-Buchstabenkode verwendet.



# 1. Einleitung

## 1.1 Einleitung

Mit der Fusion der Gameten werden zwei haploide Genome wieder in einer Zelle zu einem neuen diploiden Genom zusammengeführt. Die mit der Fusion verbundene Aktivierung der Eizelle ist der Beginn der Entwicklung eines neuen, und aufgrund der in Spermatogenese und Oogenese auftretenden Rekombinationsereignisse, individuellen Organismus.

Beim Säugetier stellt die Fusion der Gameten jedoch nur die letzte Zell-Zell-Interaktion während des Befruchtungsvorganges dar. Im Gegensatz zur Oocyte, die zum Zeitpunkt der Ovulation befruchtungsfähig ist, erreicht das Spermatozoon mit Abschluß der Spermatogenese im Hoden die Befruchtungsfähigkeit nicht. Vielmehr bedarf es der weiteren Reifung während der Passage durch den Nebenhoden. Bei der Ejakulation werden die Spermatozoen mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen gemischt und in das weibliche Genital übertragen. Hier interagieren die Spermatozoen mit dem Oviduktepithel und ein als Kapazitation bezeichneter Prozeß befähigt sie, bei Bindung an die schützende Glykoproteinmatrix der Oocyte, die *Zona pellucida*, die Akrosomreaktion durchzuführen. Die Freisetzung lytischer Enzyme aus dem Akrosom ermöglicht es den Spermatozoen durch limitierte Proteolyse die *Zona pellucida* zu penetrieren und die Eizelle zu erreichen. Mit der Bindung des Spermatozoons an die Eizellmembran wird die Fusion der Gameten eingeleitet. Das haploide Genom des Spermatozoons und das distale Centriol werden in das Cytosol der Eizelle übertragen. Mit diesem Schritt wird die Eizelle aktiviert und Veränderungen der Plasmamembran und der *Zona pellucida* verhindern die Fusion mit weiteren Spermatozoen.

Die molekularen Mechanismen, die dem Befruchtungsvorgang zugrunde liegen, wurden in verschiedenen Säugetierspezies untersucht. In den folgenden Abschnitten soll ein allgemeiner Überblick des aktuellen Kenntnisstands dargestellt werden.

## 1.2 Spermatogenese

Der männliche Gamet, das Spermatozoon, wird in den Kanälchen des Hodens gebildet. Die Wandung der Hodenkanälchen wird von myoloiden Zellen, Kollagen und anderen extrazellulären Proteinen gebildet und auch als Basallamina bezeichnet. Das Keimepithel besteht aus Stammzellen, proliferierenden und differenzierenden Spermatogonien, sowie den Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zellen bilden das biologische Milieu der Spermatogonien, umhüllen sie und unterstützen die Spermatogonien bei ihrer Differenzierung zu Spermatozoen.



Abb. 1.1: Histologisches Schnittpräparat eines Eberhodens, B- Basallamina, L- Lumen, E- Epithelium

Die Spermatogenese selbst kann in drei Phasen unterteilt werden. Während der mitotischen Phase wird der Bestand an Stammzellen erhalten und die Anzahl an proliferierenden Spermatogonien erhöht.

Zu Beginn der ersten meiotischen Phase wird das Genom repliziert, die Chromosomen werden jedoch nicht getrennt und die nun als Spermatocyten bezeichneten Zellen enthalten bei diploidem Chromosomensatz den doppelten DNA-Gehalt. Vor der ersten meiotischen Teilung beginnen die Spermatocyten 1. Ordnung in Richtung des Lumens zu wandern. Sie werden auf der basalen Seite durch die Blut-Hoden Schranke, welche durch *gap junctions* der Sertoli-Zellen untereinander gebildet wird, geschützt.

Die Rekombination des genetischen Materials findet vor der Bildung von Spermatocyten 2. Ordnung durch die erste meiotische Teilung statt. Die gebildeten Spermatocyten 2. Ordnung haben bei haploidem Chromosomensatz den doppelten



DNA-Gehalt. Mit der zweiten Reifeteilung werden schließlich Spermatisiden mit haploidem Genom gebildet (*Yanagimachi 1994*).

Erst während der postmeiotischen Phase kommt es zur Differenzierung der Spermatisiden. Sie ist gekennzeichnet durch Längsstreckung, Ausbildung des Akrosoms, der Entwicklung des Flagellums, Kondensation des Nukleus, Mitochondrienfusion und dem Verlust eines Großteils des Cytosols. Bis zur Freisetzung in das Lumen der Hodenkanälchen bleiben die Spermatozyten und Spermatisiden miteinander verbunden (*Yanagimachi 1994*). Anhand von heterozygoten Mäusen konnte gezeigt werden, daß auch große Moleküle wie mRNA Transkripte über die cytosolischen Brücken transportiert werden (*Braun et al. 1989*). Bei der Entlassung in das Lumen der Hodenkanälchen haben die Spermatozoen bereits ihre typische Morphologie (Abb. 1.2). Sie sind aber bei Säugetieren weder bewegungs- noch befruchtungsfähig. Diese Fähigkeit erlangen sie erst im Nebenhoden, während der sogenannten posttestikulären Reifung.

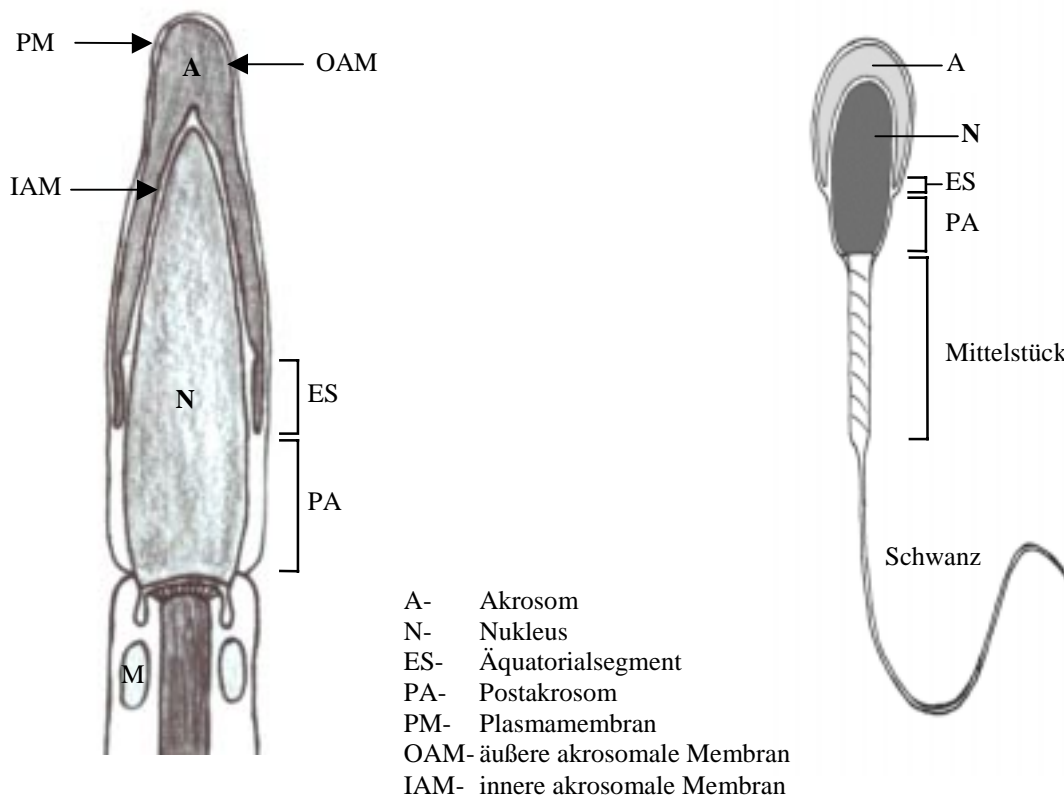


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Spermatozoons und eines Spermienkopfes (nach *Yanagimachi 1994*)

Die Sertoli-Zellen, die somatischen Zellen zwischen den Spermatogonien und Spermatiden, bilden die Blut-Hoden-Schranke und unterstützen die Spermatogenese. Durch die Verbindung zwischen Sertoli-Zelle und den sich entwickelnden Spermatogonien und Spermatiden, dem *tubulobullar complex*, wird eine vorzeitige Loslösung in das Lumen der Hodenkanälchen verhindert und ein Austausch von cytosolischem Material ermöglicht. Die Differenzierung der Spermatiden und ihre Wanderung von der Basallamina zum Lumen ist von einer ständigen Lösung und Erneuerung dieser *gap-junction* und Desmosom ähnlichen Strukturen begleitet. Eine weitere Funktion der Sertoli-Zelle besteht in der Phagozytose tubulären Materials und Pinocytose von Flüssigkeiten. (*Morales und Clermont 1993*). Außerdem konnte die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Eine damit verbundene Regulation der Aktivität der Spermatogonien wird angenommen (Review: *Robaire 1999*).

Der zeitliche Ablauf der Spermatogenese ist exakt reguliert und lässt sich in einzelne Schritte unterteilen, die sowohl die Erneuerung wie auch die Apoptose von Spermatogonien einschließen. Die Regulation und der zeitliche Ablauf der Spermatogenese wird dabei vom Genotyp der Spermatogonien bestimmt. Durch Transplantation von Spermatogonien zwischen Maus und Ratte konnte dies demonstriert werden (*Clouthier et al. 1996, Russell et al. 1996*). Nach Übertragung von Stammzellen der Ratte in murinen Hoden konnte eine normale Spermatogenese nach zeitlichem Ablauf der Ratte beobachtet werden, obwohl die Entwicklung von Rattenspermatozoen wesentlich länger dauert. Auch eine parallele Spermatogenese verschiedener Keimzellen ist möglich (*Franca et al. 1998, Russell et al. 1999*).

### **1.3 Epididymale Reifung**

Motilität und die Fähigkeit, an die *Zona pellucida* zu binden und damit die Befruchtungsfähigkeit, erlangen die Spermatozoen erst mit der Passage des Nebenhodens. Dieser Prozess wird aufgrund seiner Bedeutung auch als epididymale oder posttestikuläre Reifung bezeichnet. Die Epididymis ist ein einziger stark aufgewickelter Gang und kann aufgrund ihrer Segmente in Kopf (*caput*), Körper (*corpus*) und Schwanz (*cauda*) unterteilt werden. Die Aktivität der Epididymis wird hormonell reguliert und ist Testosteron-abhängig. Eine hohe Konzentration an

exogener 5- $\alpha$  Reduktase Aktivität sichert dabei eine hohe Konzentration des potenten Androgens Dihydrotestosteron (DHT) (*Yanagimachi 1994*).

Im Verlauf der Nebenhodenpassage kommt es zu Veränderungen im Spermatozoon wie auch an seiner Oberfläche. Die Protamine, die Chromatin-stabilisierenden Proteine des Spermatozoons, werden stärker durch Disulfidbrücken vernetzt und die akrosomale Matrix wird modifiziert (*Yanagimachi 1994*). Die Lipidkomposition der Zellmembran wird verändert. Insbesondere wird der Cholesteringehalt erhöht und damit die Fluidität der Membran verringert. Oberflächenproteine der Spermatozoen, die schon im Hoden gebildet werden, erfahren eine Umverteilung und Beschränkung auf bestimmte Oberflächenregionen, wie der akrosomalen Kappe oder dem Postakrosom (vergl. Abb 1.2). Die Protein- und Lipidausstattung unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Membranbereichen. Sowohl Proteine als auch Lipide können innerhalb, nicht aber zwischen den Bereichen diffundieren (*Eddy und O'Brien 1994*). Es wird angenommen, daß ein Zusammenhang mit den darunter liegenden Kompartimenten besteht und die Regionalisierung durch Membranproteine, die mit dem Cytoskelett verbunden sind, vermittelt wird (*Mei et al. 1997, Moos et al. 1998*). Die Entwicklung dieser Strukturierung kann durch monoklonale Antikörper und Lektine beobachtet werden (*Yanagimachi 1994, P26h: Russell et al. 1999, Lektine: Flesch et al. 1998, P47: Enßlin et al. 1998*). So sind bestimmte Proteine bei testikulären Spermatozoen auf der gesamten Oberfläche durch spezifische Antikörper nachweisbar. Im Verlauf der epididymalen Reifung wird eine Beschränkung auf das Akrosom bzw. Akrosom und Postakrosom festgestellt (PH20/Fertilin: *Blobel et al. 1992, Review: Myles 1993*).

Proteine, die vom Nebenhodenepithel sekretiert werden, assoziieren an die Spermienoberfläche oder werden in diese integriert. Zu den assoziierenden Proteinen zählen das für die Vorwärtsbeweglichkeit notwendige *forward motility protein* (FMP, *Vreeburg et al. 1992, Acott et al. 1978, 1981, 1983, Majunder et al. 1990*) und das Reifungsantigen P26h des Hamsters (*Sullivan et al. 1985, Robitaille et al. 1991*). Zum P26h homologe Proteine treten auch im humanen (P34H, *Boue et al. 1994*) und bovinen (P25b, *Lefievre et al. 1996*) Genitaltrakt, sowie bei Primaten auf (*Sullivan et al. 1999*). Das Protein kann auf testikulären Spermatozoen nicht nachgewiesen werden. Es assoziiert im Verlauf der Nebenhodenreifung regiospezifisch an die akrosomale Kappe (*Russell et al. 1999*).

Die Mechanismen des Proteintransfers an und in die Spermienmembran sind noch nicht vollständig geklärt. Ein direkter Transfer von epididymalen Epithelzellen bei der Anlagerung der Spermatozoen an die apikale Membran ist ebenso denkbar, wie der Transport durch *Carrier*-Proteine, die während des Transfers den hydrophoben Proteinbereich bedecken und eine Integration in die Membran ermöglichen. Kürzlich wurde auch die Möglichkeit des Transports durch Vesikel apokrinen und endokrinen Ursprungs wieder aufgegriffen (*Aumüller et al. 1999*). Ein Beispiel für diese Mechanismen stellt das Reifungsantigen CD52 dar. Es besitzt einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker über den es in der Spermienmembran verankert wird. Es kann sowohl im epididymalen Fluid als auch in Vesikeln nachgewiesen werden, womit beide, *Carrier*- und Vesikel-Modell, als Möglichkeit für eine Integration in die Spermienmembran in Frage kommen (*Schroter et al. 1997, Kirchoff et al. 1997, Kirchoff pers. Mitteilung*).

Während der epididymalen Reifung werden Proteine testikulären und epididymalen Ursprungs modifiziert und prozessiert. Die Sekretion verschiedener Glykosidasen und Glykosyltransferasen in den einzelnen Nebenhodenabschnitten führt zu einer schrittweisen Veränderung der Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen und -lipiden. Spermatozoen weisen beispielsweise erst im Nebenhodenschwanz, dem Spermienreservoir des männlichen Genitaltraktes, einen hohen Grad an endständigen Sialsäureresten (N-Acetylneuraminsäure) auf.

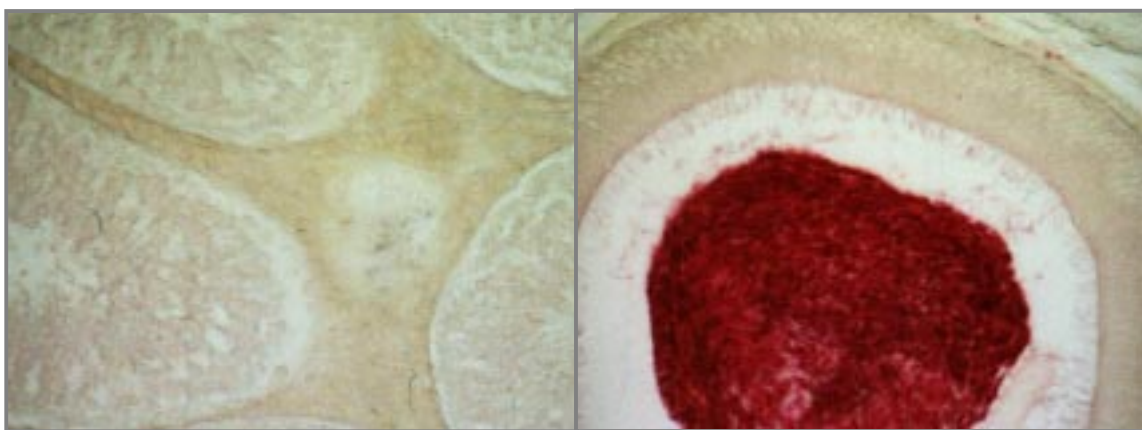


Abb 1.3: Immunhistologische Präparate: Detektion des Antigens P86/5 in (A) Hoden- und (B) Nebenhodengewebe des Ebers, Färbung: Fast Red, (Aufnahmen: Gentzel, M., Hasenleder, P. 1999)

Die proteolytische Prozessierung von Oberflächenproteinen kann zum Teil *in vitro* mit Trypsin imitiert werden. Zonadhesin, ein porcines Spermienprotein, wird bereits im Eberhoden gebildet (*Hardy und Garbers 1995*) und besteht aus einer

Polypeptidkette. Während des epididymalen Transits wird dieses Transmembranprotein gespalten und die Untereinheiten von 105 kD und 45 kD bleiben über Disulfidbrücken verknüpft. Ein analoger Mechanismus wird für das Oberflächenantigen P86/5 des Eberspermatozoons angenommen. Erst nach proteolytischer Prozessierung wird das testikuläre Transmembranprotein durch den epitopspezifischen monoklonalen Antikörper erkannt (*Töpfer-Petersen et al. 1989, Abb. 1.3*). Hingegen wird für das Protein PH30 (Fertilin  $\beta$ ), ein Mitglied der ADAM-Familie (*A metalloprotease and disintegrin domain*), eine autokatalytische Prozessierung angenommen, bei der auch die für die Prozessierung verantwortliche Protease-Domäne entfernt wird (*Reviews: Evans und Kopf 1998, Evans 1999*).

## 1.4 Bedeutung des Seminalplasmas

Die Spermatozoen werden bei der Ejakulation aus dem Nebenhodenschwanz freigesetzt und gelangen durch den Samenleiter und den Harn-Samenleiter in das weibliche Genital. Auf diesem Weg werden sie mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen vermengt. Allgemein wird die Gesamtheit der Sekrete als Seminalplasma bezeichnet. Zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen zählen Ampulle, Samenblase, Prostata und Bulbourethraldrüse (Abb. 1.4).

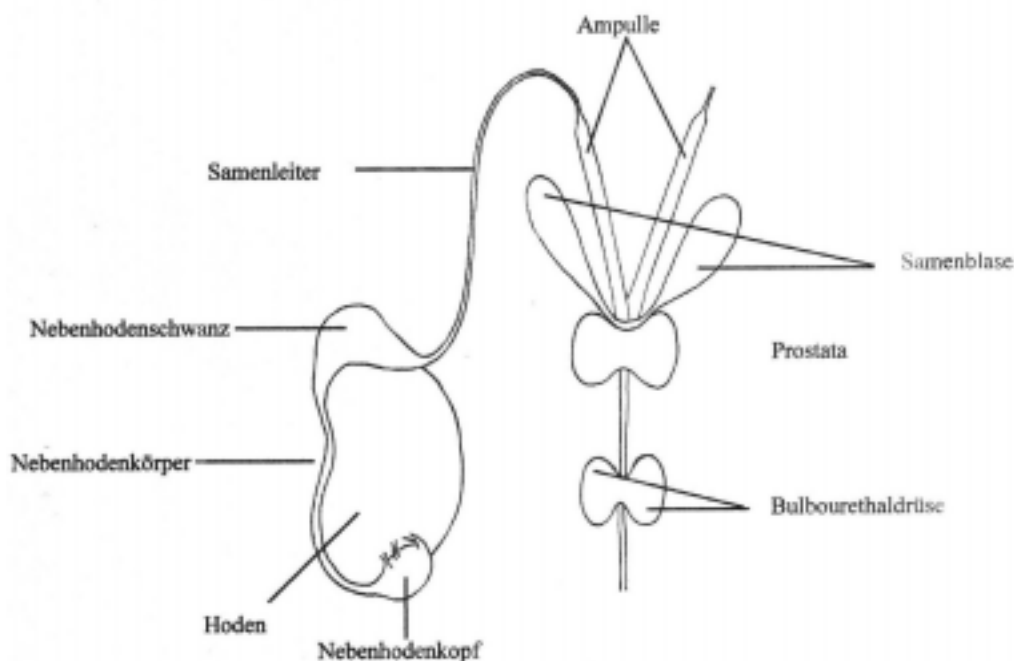


Abb. 1.4: Allgemeines Übersichtsschema des männlichen Genitaltraktes

Je nach Spezies sind nicht alle dieser Organe ausgeprägt und sie variieren in Größe und Aktivität. Beispielsweise besitzen Hund und Katze keine Samenblase und das Schwein keine Ampullen. Letztere sind dagegen beim Pferd besonders ausgeprägt und sezernieren einen Großteil der im Seminalplasma gefundenen Proteine. Auch das Volumen des Seminalplasmas variiert speziesabhängig und reicht von wenigen Millilitern beim Rind bis zu mehreren hundert Millilitern beim Schwein. Das Seminalplasma enthält niedermolekulare Substanzen und Proteine. Die niedermolekularen Substanzen sind gut untersucht. Verschiedene Ionen, Antioxidantien (z.B. Ergiothionin), Lipide, freie Aminosäuren, Puffersubstanzen wie Citrat, biogene Amine und Gelbildner, auch Prostaglandine und Steroidhormone konnten nachgewiesen werden (*Mann et al. 1981*).

Den Hauptanteil der Seminalplasmaproteine bilden Proteine mit einer Masse zwischen 10-30 kD. Sie lassen sich aufgrund der Homologie ihrer Primärstruktur zu bekannten Proteinen zwei Familien zuordnen, die als CUB- und Fibronektin (Fn) Typ-II ähnliche Proteine bezeichnet werden (Abb. 1.5). Die dreidimensionale Struktur dieser Domänen wurden anhand von Seminalplasmaproteinen gelöst (FnII-Typ: *Constantine et al. 1991*, CUB: *Varela et al. 1997*, *Romero et al. 1997*)

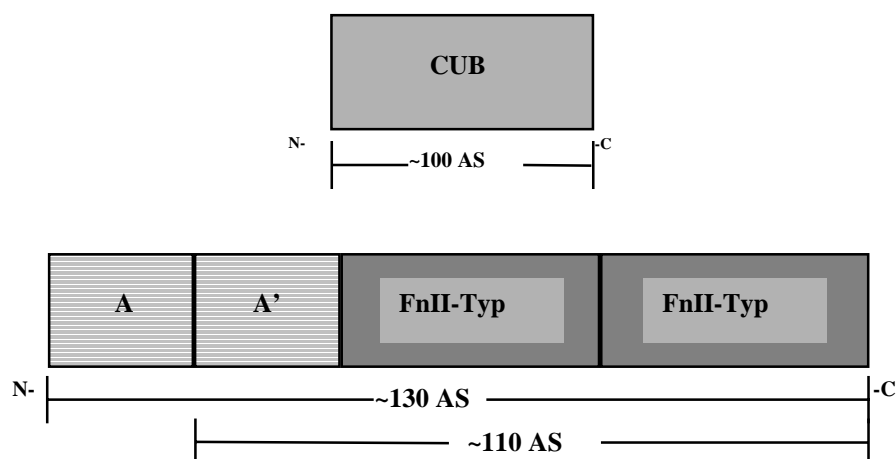


Abb. 1.5: Blockschema der Domänenstruktur von CUB- und FnII-Typ Proteinen des Seminalplasmas, A, A': nicht konservierter Sequenzbereich, der einfach (A) oder dupliziert auftreten kann (A,A'), wie z.B. bei HSP-1 (A, A') und HSP-2 (A), des equinen Seminalplasmas

Die seminalen CUB-Proteine bestehen aus einer einzigen CUB-Domäne und dominieren mit mehreren Vertretern (AWN, AQN, PSP) den Proteinanteil des Seminalplasmas beim Schwein. Sie besitzen Lipidbindungseigenschaften (Phosphatidylethanolamin) und Affinität zu Kohlenhydratseitenketten (Review: Töpfer-Petersen et al. 1998). Bei Rind und Pferd hingegen dominieren Proteine des

FnII-Typs die Proteinzusammensetzung des Seminalplasmas. Sie weisen Affinität zu Phospholipiden (Phosphatidylcholin) sowie zu Molekülen mit tertiären und quarternären Aminogruppen auf (Arginin, Diethylaminoethylgruppen) und sind in der Lage mit Proteinen zu interagieren (*Manjunath et al. 1987, Desnoyers et al. 1992*).

Tab. 1.1: Hauptproteinkomponenten des Seminalplasmas von Hengst, Eber und Bulle

Proteinfamilie	Pferd	Schwein	Rind
Fibronektin-TypII	HSP-1, HSP-2	pB1	PDC-109
Spermadhäsine	AWN	AWN, AWN-1, AWN-2, AQN-1, AQN-2, AQN-3	aSFP
CRISPs	CRISP-3 (HSP-3)	n.d.	n.d.

Die biologische Bedeutung der unterschiedlichen Glykosylierung der Seminalplasmaproteine ist noch unbekannt, da sowohl unglykosylierte, wie auch unterschiedlich glykosilierte Proteine, wie im Fall von PDC-109 (FnII-Typ, Rind) und AWN (CUB-Typ, Schwein), auftreten. Eine Übersicht über die Hauptproteinkomponenten des Seminalplasmas von Schwein, Rind und Pferd ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, daß der Zusatz von Seminalplasma die *in vitro* Befruchtungsrates bei Verwendung epididymaler Spermatozoen erhöht (*Henault et al. 1995*). Seminalplasmaproteine sind in der Lage direkt, durch Affinität zu Phospholipiden, oder indirekt, durch Bindung untereinander sowie mit anderen Oberflächenproteinen, an Spermatozoen zu binden. Sie bilden einen mehrschichtigen „Mantel“ über die Spermienoberfläche. In diesem Zusammenhang wird eine Funktion als Dekapazitationsfaktoren und als physikalischer Schutz vor mechanischen Belastungen während der Ejakulation diskutiert (*Desnoyers et al. 1992, Therien et al. 1995*). Die Affinität zu Kohlenhydratseitenketten, eine Lektin-ähnliche Funktion, macht einige Seminalplasmaproteine auch zu potentiellen Interaktionspartnern, sowohl mit dem Oviduktepithel als auch mit der *Zona pellucida* der Oocyte (*Review: Töpfer-Petersen 1999*). Ihre Bindungsspezifität und Einfluß auf die Oviduktbindung sind aktueller Forschungsgegenstand (*M. Ehklasi-Hundrieser pers. Mitteilung, Töpfer-Petersen, pers. Mitteilung*).

## 1.5 Spermatozoen im Ovidukt

Die Rolle des Ovidukts für die Befruchtung wurde lange Zeit wenig beachtet und ist erst vor kurzem intensiver untersucht worden. Als mögliche Funktionen werden die Speicherung der Spermatozoen (weibliches Spermienreservoir) und eine Synchronisation der Kapazitation mit der Ovulation diskutiert. Durch Kapazitation und Aktivierung wird die Lebensspanne der Spermatozoen erheblich verkürzt. Die Speicherung und damit die Erhaltung der Vitalität der Spermatozoen und die Kontrolle über die Kapazitation sind folglich als assoziierte Ereignisse zu betrachten.

Für an das Oviduktepithel gebundene Spermatozoen des Pferdes konnte ein deutlich niedrigerer intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, dem eine wichtige Rolle bei der Kapazitation zukommt, nachgewiesen werden (*Dobrinski et al. 1997*). Ein Zusammenhang mit einer erniedrigten Kapazitationsrate wird diskutiert (*Murray und Smith 1997, Nothnick und Smith 1997, Reviews: Bedford 1999, Suarez 1999*). Veränderungen der ionischen Umgebung der gebundenen Spermatozoen gehen mit der Ovulation einher (*Fraser et al. 1995*) und belegen eine entsprechende Aktivität des Ovidukts (*Reviews: Suarez 1998a, 1999, Töpfer-Petersen 1999*).

Der Mechanismus der Oviduktbindung ist noch weitestgehend ungeklärt. Für verschiedene Spezies konnte eine Hemmung der Bindung durch Glykoproteine und Monozucker gezeigt werden. Deutliche Unterschiede, mit welchen Glykoproteinen und Monozuckern eine effiziente Hemmung erreicht werden kann, könnten auf einen Beitrag zur Speziesselektivität der Oviduktbindung deuten. Sowohl Spermatozoen als auch Epithelzellen verfügen an ihren Oberflächen über Glykostrukturen und Rezeptoren. Welche Zelle Rezeptor und welche Zelle Ligand zur Verfügung stellt, kann dabei nicht eindeutig festgestellt werden. Denkbar ist aber eine Rolle der als Spermatozoen-Lektine bezeichneten Seminalplasma-Proteine als Rezeptoren für Kohlenhydratstrukturen an der Oberfläche der Epithelzellen. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, daß durch Behandlung mit Seminalplasma eine Bindung der Spermatozoen an das Oviduktepithel gehemmt werden kann (*Töpfer-Petersen et al. 1999*). Diese Proteine bedecken das Akrosom ejakulierter Spermatozoen, nach dessen Verlust eine Bindung an das Oviduktepithel nicht mehr möglich ist (*DeMott 1995*).



Vieles deutet auf eine Kohlenhydrat-vermittelte Interaktion zwischen den Spermatozoen und dem Ovidukt. Eine Beteiligung von nicht Kohlenhydrat-bindenden Proteinen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Fertiline  $\alpha/\beta$  zählen zu der Proteinfamilie der Disintegrine, die zusammen mit den Integrinen durch Protein-Protein Wechselwirkung eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion einnehmen. Sie wurden daher nach ihrer Entdeckung in verschiedenen Spezies als potentielle Interaktionspartner bei der Fusion der Gameten betrachtet. Wird eine Expression von Fertilin  $\beta$  im Mausmodell verhindert (*knock-out*), binden die Spermatozoen nicht mehr an das Epithel des Ovidukts und sind dadurch nicht mehr in der Lage die Oozyte zu erreichen. Da Spermatozoen Fertilin  $\beta$ -defizienter Tiere *in vitro* aber auch nicht mehr an die *Zona pellucida* oder die Plasmamembran der Eizelle binden, scheint die Verhinderung der Expression von Fertilin  $\beta$  weitreichende Folgen zu haben. Diskutiert wird eine Bedeutung des Proteins schon für die Spermatogenese und damit ein Einfluß auf Expression und/oder Lokalisation anderer Proteine, die sich bis auf den Verlust der Bindungseigenschaften nicht phänotypisch manifestiert (*Cho et al. 1998, Myles et al. 1999*).

## 1.6 Kapazitation

Erst der als Kapazitation bezeichnete Prozeß ermöglicht dem Spermatozoon die regulierte Akrosomreaktion bei der Bindung an die *Zona pellucida*. Die Kapazitation erfolgt *in vivo* im weiblichen Genital. *In vitro* kann der Prozeß durch den Zusatz von Oviduktflüssigkeit und Hitze-inaktiviertem Serum ausgelöst werden. Durch Zellkulturmedien, die  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , bovines Serumalbumin (BSA) und ein spezieabhängiges Energiesubstrat (Pyruvat, Lactat oder Glucose) enthalten, kann ebenfalls die Kapazitation eingeleitet werden (*Yanagimachi 1994*).

BSA kommt hierbei eine Rolle als Cholesterin-Akzeptor zu. Der während der Kapazitation auftretende Cholesterin-Efflux aus der Spermienmembran ist essentiell für die Akrosomreaktion bei Bindung an die *Zona pellucida*. Nur die Cholesterinverarmung erlaubt eine Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran. Auch scheint die hohe Konzentration an Cholesterin die Signaltransduktion, die letztlich zur charakteristischen Tyrosinphosphorylierung der Kapazitation führt, zu behindern (*Review: Kopf et al. 1999*).

Der Mechanismus der Extraktion von Lipid- und Cholesterinkomponenten ist noch nicht aufgeklärt. Es wird in diesem Zusammenhang eine Funktion der Fn II Typ - ähnlichen (pB1, PDC-109, HSP-1/2) und CUB-Typ Proteine (AWN, AQN) des Seminalplasmas diskutiert. Letztere könnten auch an dem die Kapazitation stimulierenden Effekt von Heparin beteiligt sein, da die Spermadhesine *in vitro* in der Lage sind an Kohlenhydratketten zu binden (*Reviews: Töpfer-Petersen et al. 1995, 1997*).

Als Effekte der Kapazitation können neben einem generellen Anstieg auch Veränderungen der lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Kompartimenten des Spermatozoons durch Visualisierung mit Chlortetracyclin (CTC) beobachtet werden (*Varner et al. 1987, 1992, Adeoya-Osiguwa et al. 1993*). Interessant ist, daß bei bovinen Spermatozoen ein genereller langsamer (0,5 nM/min)  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx während der Kapazitation stattfindet, der zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf ein dann konstant erhöhtes Niveau (125-175 nM) führt. Erst mit der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion kommt es durch einen schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (150 nM/min) zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 300-500 nM in dessen Verlauf die Akrosomreaktion stattfindet. Voraussetzung für den letzteren Vorgang ist die ebenfalls während der Kapazitation auftretende schwache Depolarisation der Spermienmembran, die eine Reaktion der an schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüssen beteiligten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ermöglicht (*Flormann et al. 1994, 1998, 1999, Arnoult et al. 1997*).

Die Beobachtung einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und eines Anstiegs des intrazellulären pH-Werts deuten auf die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, in deren Verlauf eine zunehmende Tyrosin-Phosphorylierung auftritt. Um welche Proteine es sich handelt und welche Funktion sie erfüllen, ist zur Zeit noch nicht aufgeklärt (*Harrisson et al. 1996, Visconti et al. 1995a, 1995b, 1997, Leclerc et al. 1996, Galantino-Homer et al. 1997, Brewis et al. 1998, Kopf et al. 1999*).

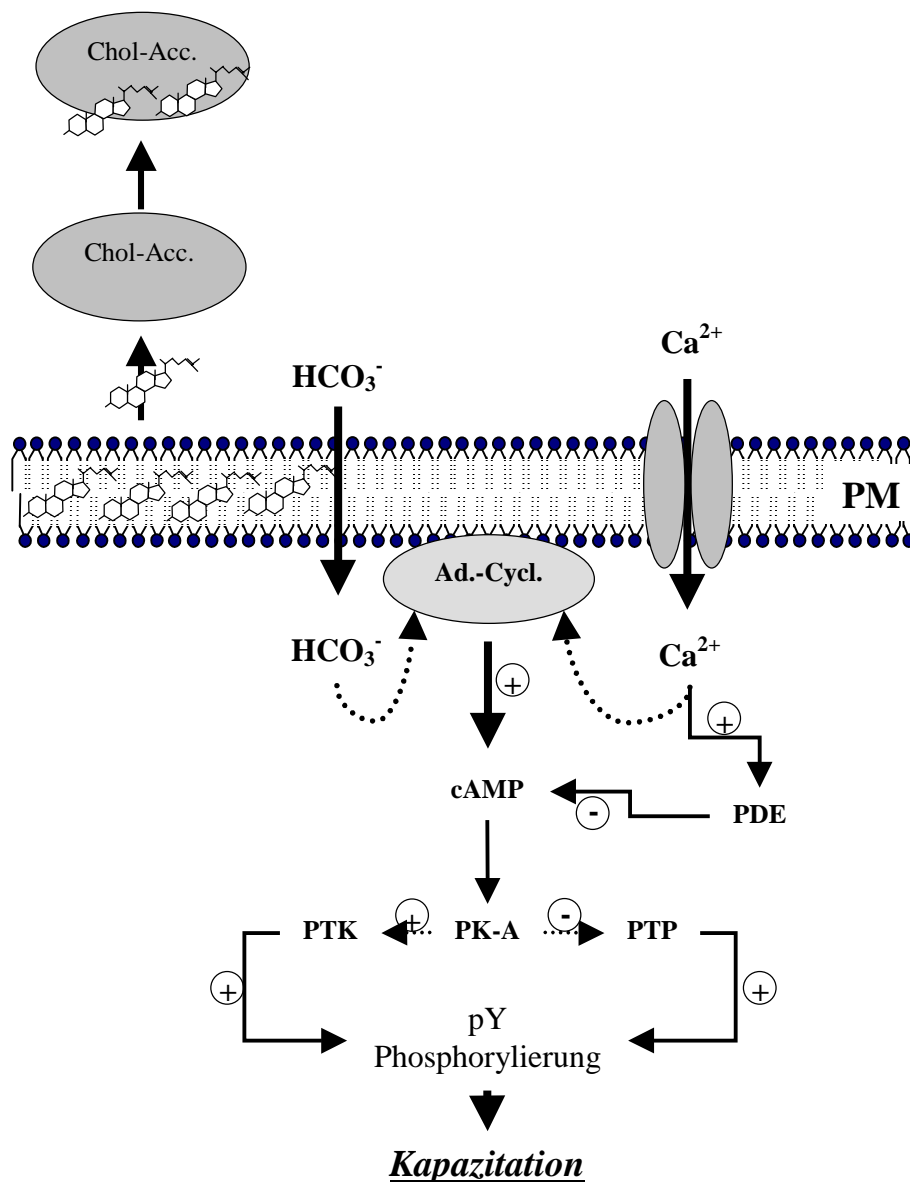


Abb: 1.6: Signaltransduktions-Prozesse der Kapazitation (nach Kopf *et al.* 1999), Chol-Acc.-Cholesterin-Akzeptor, Ad.-Cycl.- Adenylat-Cyclase, PDE- Phosphodiesterase, PTK- Phosphotyrosinkinase, PK-A- Proteinkinase A, PTP- Phosphotyrosinphosphatase, pY- Phosphotyrosin

Durch Inhibition der Signaltransduktionskaskade konnte gezeigt werden, daß HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anscheinend direkt aktivierend auf die Adenylatcyclase wirkt, ein Effekt der bisher nur für Spermatozoen gezeigt werden konnte (Abb 1.6).

Da *in vitro* keine weiteren Faktoren als Ca<sup>2+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und BSA benötigt werden, liegt die Kapazitationskontrolle durch das weibliche Genital wahrscheinlich weniger in der Stimulation der Kapazitation, wie es bei Zugabe von Oviduktflüssigkeit *in vitro* geschieht (Hunter und Nornes 1969, Yanagimachi 1994), als vielmehr in der

Schaffung einer nicht-kapazitierenden Mikroumgebung für die Spermatozoen und einer konzertierten Regulation der Kapazitation mit der Ovulation (*Kopf et al. 1998, Suarez 1998a, 1998b, 1999, Smith et al. 1997*).

Durch monoklonale Antikörper (*Shalgi et al. 1990, Rochwerger et al. 1992, Töpfer-Petersen et al. 1990*) und Lektine (*Cross und Overstreet 1987, Flesch et al. 1998*) kann eine erneute Reorganisation von Proteinen an der Spermienoberfläche beobachtet werden.

Mit der Kapazitation tritt eine Veränderung der Bewegungsmuster des Spermatozoons ein, die als Hyperaktivierung bezeichnet wird. Die Aufhebung der Bindung an das Oviduktepithel ist bei einigen Spezies mit der Ovulation koordiniert. Die Mechanismen für diesen Prozeß sind noch nicht bekannt. Spermatozoen, deren Bindung an das Ovidukt gelöst wurde, bewegen sich selbsttätig das Ovidukt vom Isthmus zur Ampulle aufwärts zur Oocyte.

## **1.7 Bindung und Penetration der Zona Pellucida**

Die ovulierte Eizelle ist von einer starren Glykoproteinmatrix, der *Zona pellucida*, umgeben und in einen Zellverband von *Cumulus* Zellen, dem *cumulus oophorus*, eingebettet (Abb. 1.7). Die Oocyte ist schon zum Zeitpunkt der Ovulation befruchtungsfähig. Der *cumulus oophorus* stellt, im Gegensatz zur *Zona pellucida*, kein physikalisches Hindernis für die Spermatozoen dar. Sein Vorhandensein wirkt sich bei der *in vitro* Befruchtung positiv aus, ist aber nicht essentiell. Eine Funktion als füllendes Element im Ovidukt und als Schutz vor der Einnistung der Eizelle im Eileiter wird diskutiert (*Yanagimachi 1994*).

Die *Zona pellucida* ist eine je nach Spezies 2-25 µm starke extrazelluläre Proteinmatrix aus nur drei hochglykosylierten Glykoproteinen. Die Aminosäuresequenz der nach ihren Genen als ZP A, ZP B und ZP C bezeichneten Proteine ist unter den Säugetierspezies hoch konserviert (*Wassarman et al. 1996, Yurewicz et al. 1998*).

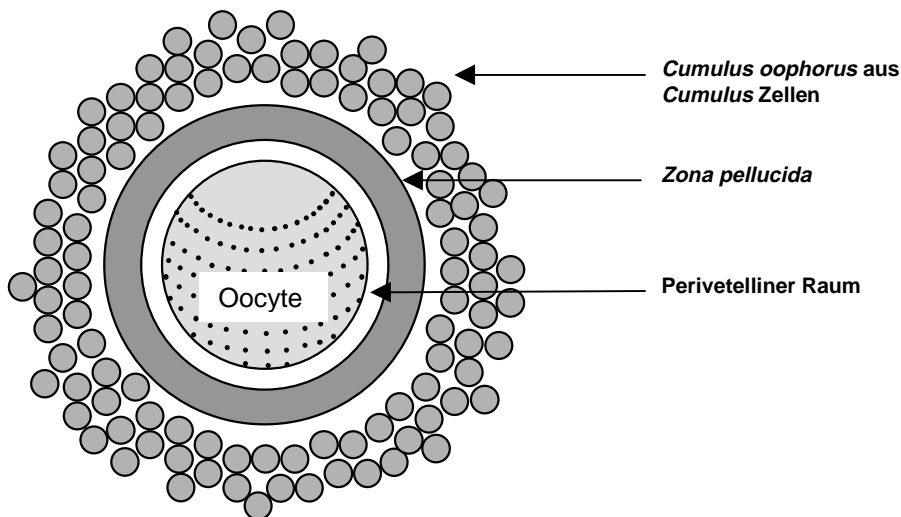


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Oocyte mit *Cumulus oophorus*

Alle drei Proteine weisen sowohl N-glykosidisch, wie auch O-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratseiten auf. Bei der Maus bilden sich aus Heterodimeren der Proteine ZP A und ZP C filamentäre Ketten, die durch Homodimere von ZP B quervernetzt werden und so ein dreidimensionales Netzwerk aufbauen (Abb. 1.8).

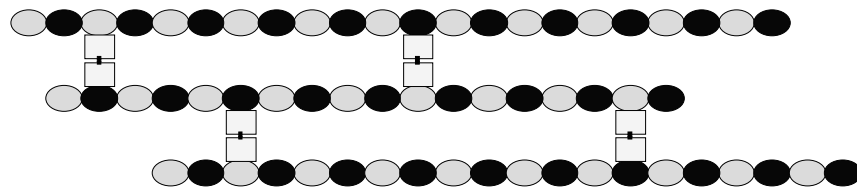


Abb. 1.8: Grundstruktur der *Zona pellucida* Filamente aus ZP A (grau), ZP C (schwarz) und ZP B (eckig)

Um die *Zona pellucida* durchdringen zu können, muß das Spermatozoon die im Akrosom befindlichen Proteasen freisetzen und die Glykoproteine abbauen. Die Freisetzung der Enzyme während der Akrosomreaktion erfolgt durch die Fusion der Plasmamembran mit der darunterliegenden äußeren akrosomalen Membran (OAM) und ist vergleichbar mit der Exocytose somatischer Zellen. Die Bindung kapazitierter Spermatozoen an die *Zona pellucida* induziert die Akrosomreaktion.

Es gilt inzwischen als anerkannt, daß die Erkennung und primäre Bindung zwischen den Kohlenhydratseitenketten der *Zona pellucida* Proteine und komplementären Kohlenhydrat-bindenden Proteinen des Spermatozoons vermittelt wird (*Töpfer-*

*Petersen, 1999, Jones und Williams 1990*). Im Mausmodell wurden spezifische Bindungsstellen für ZP C nur auf der akrosomalen Kappe nachgewiesen. ZP A hingegen bindet spezifisch an die innere akrosomale Membran (IAM), die nach der Akrosomreaktion vom Spermatozoon exponiert wird, und ist damit an der sekundären Bindung des Spermatozoons beteiligt. Es konnten bisher keine Hinweise für eine Wechselwirkung mit dem Protein ZP B ermittelt werden, so daß ihm wahrscheinlich nur eine strukturelle Funktion bei der Bildung der Glykoproteinmatrix zukommt (*Wassarman 1992, 1995a, 1995b*).

Ein Schlüsselrolle scheint die Auslösung einer G-Protein-vermittelten Signaltransduktionskaskade einzunehmen. Durch entsprechende Inhibitoren, wie Pertussis Toxin, kann die Akrosomreaktion verhindert, die Bindung selbst aber nicht aufgehoben werden (*Ward und Kopf 1993*). Die Inhibition mit Pertussis Toxin verhindert die bei der Akrosomreaktion beobachtete Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und den Anstieg des pH-Wertes im Akrosom, ebenso wie Antagonisten spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Wird jedoch die Depolarisation der Membran, wie sie im Verlauf der Akrosomreaktion auftritt, durch entsprechende Inkubationsbedingungen imitiert, kann die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion umgangen werden. Es erfolgt die spannungsabhängige Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und die Akrosomreaktion wird durchgeführt (*Arnoult et al. 1996, Kopf et al. 1999*).

Anhand dieser Daten läßt sich eine, wie in Abb. 1.9, dargestellte Signaltransduktionskaskade entwerfen (*Arnoult et al. 1996, Kopf et al. 1999*). Entsprechend würde die Bindung von ZP3 zu einer G-Protein unabhängigen Depolarisation der Membran führen. Ein G-Protein abhängiger Signalweg hat eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes zur Folge. Gemeinsam durch beide Effekte werden spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der T-Typ Familie aktiviert (*Florman et al. 1999*). Nachfolgend kann die Bildung von Sekundärbotenstoffen, wie Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ), Diacylglycerol cyclischen Nukleotiden und die Aktivierung anderer, ebenfalls an Signaltransduktionskaskaden beteiligter Enzyme (Phospholipasen, Proteinkinase C) beobachtet werden. Die Funktion und das Zusammenwirken dieser Mediatoren ist bisher nicht geklärt (*Cardullo 1999, Carrera et al. 1996, Kopf et al. 1999, Roldan 1999*).

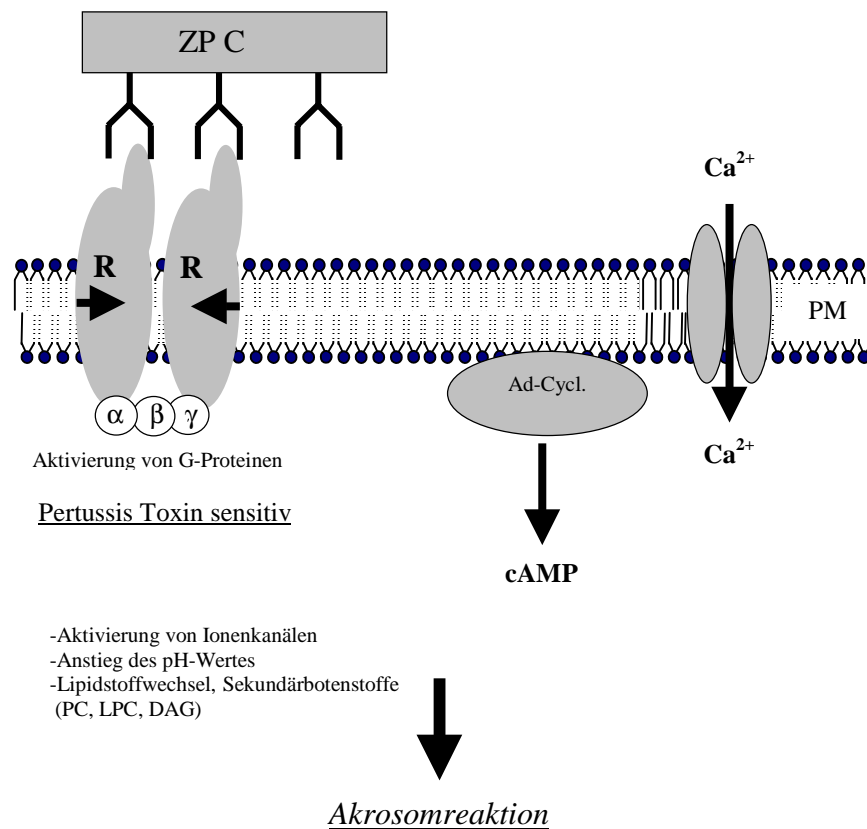


Abb: 1.9: Signaltransduktions-Prozesse der Akrosomreaktion (nach Kopf et al. 1999 und Roldan 1999), Ad.-Cycl.- Adenylat-Cyclase, PM- Plasmamembran, R- Zona-Rezeptor PC- Phosphatidylcholin, LPC- Lyso-Phosphatidylcholin,, DAG- Diacylglycerin  $\alpha, \beta, \gamma$ - Untereinheit von G-Proteinen

Der Mechanismus, der zum Abbau der Aktinfilamente zwischen äußerer akrosomaler Membran und Plasmamembran führt, ist ebenfalls unbekannt (Spungin und Breitbart 1996). Die Aktinfilamente verhindern eine spontane Fusion und ihre Depolymerisation stellt eine Voraussetzung für eine mögliche Exocytose dar. In somatischen Zellen erfolgt der Abbau des Aktingerüsts lysosomaler Vesikel vor der Fusion mit phagozytotischen Vesikeln durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protein Gelsolin. (McLaughlin et al. 1993). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für die Akrosomreaktion gelten. Zum einen kommt es zum massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, zum anderen kann das Akrosom als spermienpezifisches spezialisiertes Lysosom betrachtet werden, da es aus fusionierenden Golgivesikeln gebildet wird und verschiedene, wenn auch spermienpezifische, proteolytische Enzyme enthält (Yanagimachi 1994).

Die Rezeptoren des Spermatozoons, die an Erkennung und Bindung der *Zona pellucida* sowie der Auslösung der Akrosomreaktion beteiligt sind, werden kontrovers diskutiert. Durch verschiedene experimentelle Ansätze wurden zahlreiche Proteine als potentielle Kandidaten für diese Interaktionen identifiziert.

Es wird inzwischen angenommen, daß es sich vielmehr um einen oder mehrere hoch- und niedrigaffine Rezeptorkomplexe denn um einzelne Proteine handelt. Als Voraussetzungen eines spezifischen Rezeptors formulieren Kopf et al. (1999) fünf Randbedingungen, die sich an dem aktuellen Kenntnisstand orientieren. Diese beinhalten die korrekte Lokalisation an der akrosomalen Kappe, eine korrespondierende Gewebs- und zellspezifische Expression und die Möglichkeit zur Auslösung eines Signaltransduktionsweges durch den Rezeptor. Weiterhin sollten die Spezifität und Kinetik der Ligandenbindung, wie auch die Präsenz in Bezug auf die Anzahl der Rezeptorkomplexe in Übereinstimmung mit der Ligandenbindung des beobachtbaren biologischen Effektes stehen.

Durch kinetische Untersuchung zur ZP C Bindung an Mauspermatozoen konnte C. Thaler (1999) zeigen, daß die Bindung aus mindestens zwei Prozessen, einem schnellen und einem langsamen, besteht. Diese biologische Beobachtung erfordert mindestens zwei, wahrscheinlich aber mehrere, Rezeptoren bzw. Rezeptorkomplexe. Eine quantitative Analyse ermittelte ca. 30000 Bindungsplätze für ZP C auf der akrosomalen Kappe der Maus (Thaler 1999).

Die  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase (GalTase) stellt nach den Randbedingungen einen geeigneten Kandidaten für eine Beteiligung an Bindung und Aktivierung des Signaltransduktionsweges dar. Sie ist als gewebs- und zellspezifische Isoform nur auf Spermatozoen nachzuweisen und wird bereits im Hoden exprimiert. Die GalTase besitzt Affinität zu endständigen N-Acetylglucosamin-Resten (GlcNAc). Als integrales Membranprotein kann sie auch direkt an der Signaltransduktionskaskade zur Auslösung der Akrosomreaktion beteiligt sein. Eine Aktivierung von G-Proteinen durch die GalTase konnte bereits belegt werden. Voraussetzung für die Aktivierung ist die Liganden-vermittelte lokale Konzentrierung der GalTase. Eine Rezeptor-vermittelte Akrosomreaktion erfolgt nur bei Aggregation durch ZP C Liganden mit mehreren Bindungsstellen und kann *in vitro* auch durch aggregierende



Antikörper erreicht werden. Singuläre Liganden werden gebunden, führen aber nicht zur Auslösung der Akrosomreaktion, ebenso wie die Verwendung von F'ab Fragmenten entsprechender Antikörper. Als alleiniger Rezeptor kann die GalTase jedoch nicht gelten. Eine Überexpression von GalTase führt zwar zur Überempfindlichkeit gegenüber dem Liganden, GalTase defiziente Tiere sind jedoch nicht infertil. Vielmehr scheint die GalTase ein Element in einem optimierten komplexen System zu sein. Dieses System, welches zur regulierten *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion führt, ist anscheinend auch in der Lage, auf einzelne Elemente zu verzichten (Shur et al. 1998, 1999, Wassarman, 1995c, Johnston et al. 1998).

Als weiterer primärer Rezeptor wird das Protein P26h diskutiert, welches erst während der Nebenhodenpassage an die akrosomale Kappe assoziiert (vergl. 1.2). So verhindert die Behandlung von Spermatozoen mit spezifischen Antikörpern oder deren F'ab-Fragmenten gegen P26h eine Bindung an die *Zona pellucida in vivo* und *in vitro*. Die Fertilitätsrelevanz konnte *in vitro* und *in vivo* belegt werden. Es konnte jedoch kein Effekt auf die Motilität, die Ionophor-induzierte Akrosomreaktion ( $Ca^{2+}$ -Influx) oder die Plasmamembranfusion von Spermatozoon und Oocyte festgestellt werden (Boue et al. 1994, 1996). Analoge Ergebnisse konnten auch für das humane und bovine Protein erzielt werden (Sullivan et al. 1999). Eine Aussage zur Funktion dieses Proteins kann nicht getroffen werden, da keinerlei Sequenzinformation vorliegt.

In verschiedenen Spezies sind weitere potentielle Interaktionspartner mit der *Zona pellucida* mit unterschiedlichen Methoden identifiziert worden. Hierzu zählen das Transmembranprotein p95 (Maus, Gong et al 1995), wie auch das Mannose-bindende Protein MBP (Mensch, Benhoff 1997) und das Zonadhesin (Schwein, Hardy und Garbers 1995). Diskutiert wird auch die Beteiligung peripherer Membranproteine, p68/62 (Tanphaichitr et al. 1998) und P47 (Enßlin et al. 1998) an der *Zona pellucida*-Bindung und der Akrosomreaktion. Die im Mausmodell beobachtete Bedeutung der O-glykosidischen Kohlenhydratstrukturen als primäre Liganden kann zwischen den Spezies variieren (Shur et al. 1998). Zumindest beim Schwein scheinen N-glykosidisch verknüpfte tri- und tetraantennäre Kohlenhydratstrukturen einen entscheidenden Liganden darzustellen (Kudo et al. 1998, Töpfer-Petersen 1999).

Die sekundäre Bindung des Spermatozoons an die *Zona pellucida* wird sowohl durch andere Kohlenhydratstrukturen (ZP A) als auch Rezeptoren vermittelt (Thaler 1999). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang das Protein PH20. Es besitzt Hyaluronidaseaktivität und kann nach der Akrosomreaktion auf der nun exponierten inneren akrosomalen Membran nachgewiesen werden (PH20, Review: Wassarman 1992). Die Protease Akrosin, die einen Hauptanteil der Proteaseaktivität des Akrosoms darstellt, weist neben ihrer Trypsin-ähnlichen Proteaseaktivität auch Affinität zu sulfatierten Kohlenhydraten auf und ist damit ein weiterer potentieller Bindungspartner. Es wird ein Mechanismus aus abwechselnder Bindung und Hydrolyse angenommen. Analog zur GalTase, führt aber auch die Deletion des Akrosingens nicht zur Infertilität. Die sekundäre Bindungsfähigkeit, wie auch die Fähigkeit zur proteolytischen Penetration der *Zona pellucida*, bleiben erhalten, auch wenn eine langsamere Penetration beobachtet wird (Baba et al. 1994, Review: Eddy 1999).

## 1.8 Fusion mit der Oocyte

Nach der Penetration der *Zona pellucida* erreicht das Spermatozoon die Oocyte. Es bindet zuerst mit der Spitze des Spermienkopfes (*Tip binding*) an das Oolemma und lagert sich anschließend lateral im Bereich des hinteren Postakrosoms und des Äquatorialssegments an die Membran der Oocyte an. Daran schließt sich die Fusion der Gameten an, wobei nur die Kopfregion bis zum Mittelstück fusioniert (Yanagimachi 1994, Myles et al. 1999).

Die Bindung der beiden Gameten wird durch spezifische Ligand-Rezeptor Interaktion vermittelt, ebenso wie die laterale Anlagerung. Die Fusion ist als getrennter Prozeß zu betrachten (Myles et al. 1999).

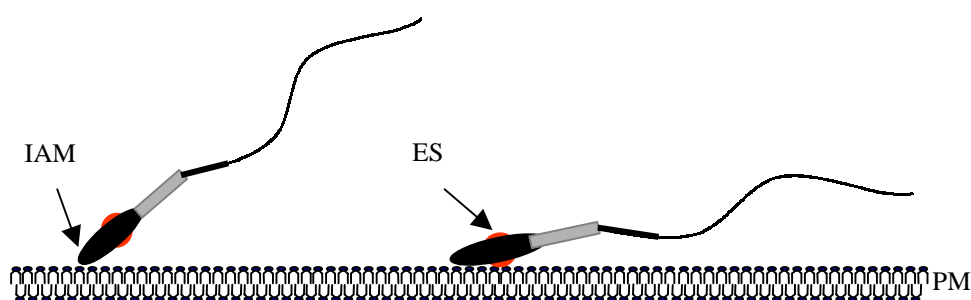


Abb. 1.10: „Tip binding“ und laterale Anlagerung des Spermatozoons im Bereich des Äquatorials-segments (ES, rot) an die Plasmamembran (PM) der Oocyte, IAM- innere akrosomale Membran (nach Myles et al. 1999)

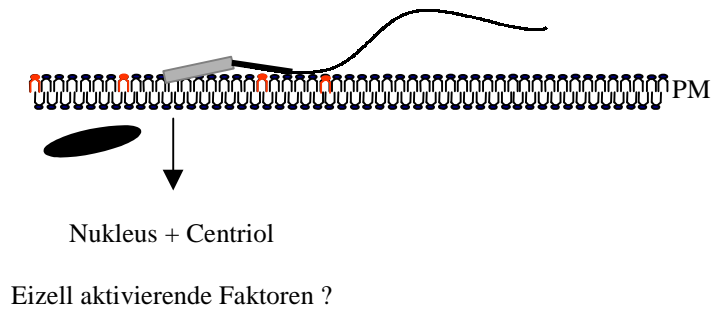


Abb. 1.11: Übertragung von männlichem Nucleus und Centriol mit einhergehender Eizellaktivierung, rot- Membrankomponenten des Spermatozoons, PM- Plasmamembran der Oocyte

Die Fusion beginnt am Äquatoralsegment und endet mit der Übertragung des Nucleus und des distalen Centriols. Mit der Verschmelzung geht die Aktivierung der Oocyte einher. Nach der Fusion kommt es zur Depolarisation der Oocytenmembran, die eine Fusion mit weiteren Spermatozoen verhindert (schneller Polyspermieblock). Anschließend werden durch Exocytose der granulären Vesikel Enzyme in den perivitellinen Raum ausgeschüttet, die die *Zona pellucida* biochemisch modifizieren. Spermatozoen sind dann nicht mehr in der Lage an die *Zona pellucida* zu binden oder sie proteolytisch zu penetrieren (langsamer Polyspermieblock) (Yanagimachi 1994, Parrington et al. 1996, Miller et al. 1993, Moller und Wassarman 1989).

Weder die an Bindung und Fusion der Gameten beteiligten Proteine, noch der molekulare Mechanismus von Bindung und Fusion sind bekannt. Im Gegensatz zur Ovidukt-Spermatozoen Interaktion und *Zona pellucida*-Erkennung wird für diese Prozesse eine Protein-Protein Interaktion postuliert. Gestützt wird diese These durch Untersuchungen zur Beteiligung von Disintegrinen, Cyrestin und Fertilin  $\alpha/\beta$  an der Gameten Interaktion (Review: Evans 1999). Auch wenn die Beteiligung der Fertiline  $\alpha/\beta$  selbst durch die Ergebnisse von Untersuchungen mit Fertilin  $\beta$  defizienten Mäusen fraglich ist (vergl. Ovidukt Bindung, Cho et al. 1998, Myles et al. 1999), so konnte doch gezeigt werden, daß eine Integrin-Disintegrin vermittelte Interaktion Grundlage für Bindung und Fusion sein könnte. Die Bindung von Spermatozoen und Eizelle kann durch Zugabe von Peptiden, die das Integrinbindungsmotiv -RGD- tragen, und Maskierung der für die Integrin-Bindung essentiellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch EDTA konzentrationsabhängig gehemmt werden (Reviews: Hynes 1992, Evans und Kopf 1998). Auch gelang die Identifikation potentieller komplementärer

Bindungsproteine, wie dem  $\alpha_1\beta_6$ -Integrin, auf der Oocytenmembran (*Almeida et al. 1995*).

Aufgrund der Ähnlichkeit einer Proteindomäne zu viralen Fusionsproteinen wurde eine Beteiligung der Fertiline  $\alpha/\beta$  an der Gametenfusion nicht ausgeschlossen. Als Mechanismus wurde ein Virus analoger Fusionprozeß zugrunde gelegt. Die Membran penetrierende Wirkung der viralen Fusionsproteine beruht auf einer Konformationsänderung des Fusionsproteins, die mit der Azidifizierung des lysosomalen Vesikels, durch welches die Viren über Rezeptor gekoppelte Endocytose in das Innere der Zelle gelangen, einhergeht. Für ein synthetisches Peptid (21 AS) der postulierten fusiogenen Domäne konnte gezeigt werden, daß es bei neutralem pH-Wert in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung mit Vesikeln interagieren kann und die Freisetzung des Vesikelinhalts begünstigt (*Martin et al. 1998*).

Mit der Entdeckung der epididymalen Proteine D/E wurden zwei weitere Proteine, welche möglicherweise an der Gametenfusion beteiligt sind, identifiziert (*Brooks et al. 1986b, 1987*). Die beiden Proteine unterscheiden sich durch eine N-terminale Extension von wenigen Aminosäuren (*Xu und Hamilton 1996, 1997*). Die Präinkubation der Spermatozoen mit einem spezifischen Antikörper gegen die Proteine D/E oder die Inkubation der Oocyte mit isoliertem Protein inhibieren die Fusion *in vitro*, nicht aber die Bindung der Gameten (*Rochwerger et al. 1992*). Die Immunisierung männlicher wie weiblicher Tiere führt *in vivo* bei der Ratte zur temporalen Infertilität (*Perez Martinez et al. 1995*). Bei männlichen Tieren ist weder Expression, Sekretion oder Lokalisation beeinträchtigt. Die Lokalisation des Proteins im Bereich des Äquatoralsegments, an dem die Gametenfusion beginnt, unterstützt die These einer Beteiligung dieser Proteine (*Rochwerger und Cuasnicu 1992, Review: Cuasnicu et al. 1999*).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Proteine D/E der Familie der cysteine-rich secretory proteins (CRISP) angehören, zu der neben diesen epididymalen Proteinen (CRISP-1, Lokalisation im Äquatoralsegment, *Eberspächer et al. 1995, Brooks et al. 1987, Rankin et al. 1992*), auch ein testikuläres Protein (CRISP-2, Lokalisation im Akrosom, *Kasahara et al 1989, Hardy et al. 1988, Foster et al. 1996, Krätzschar et al. 1996*) und ein Protein der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (CRISP-3,

Lokalisation an der Spermienmembran, *Händler et al. 1993, Kjeldsen et al. 1996, Schambony et al. 1998*) zählen. Sie sind sowohl untereinander als auch zwischen den Spezies konserviert (60-90% Aminosäure-Ähnlichkeit). Namensgebendes Merkmal sind die Disulfidbrücken-bildenden konservierten 16 Cysteine dieser nur 220-230 Aminosäuren umfassenden Proteine (Abb 1.12.).

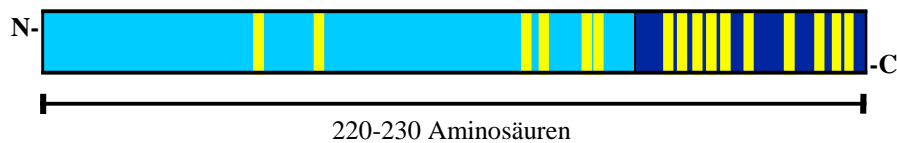


Abb. 1.12: Blockschema von Proteinen der CRISP-Familie, gelb: Position der Cysteine, hellblau: Sequenzbereich mit Homologie (~40%) zu Proteinen der *pathogenesis-related* (PR-) Familie dunkelblau: carboxyterminaler Bereich

Die hohe Homologie zwischen CRISP-Proteinen verschiedener Spezies deutet auf eine wichtige Rolle dieser Proteine nicht nur bei der Gametenfusion, sondern auch bei anderen Prozessen des Befruchtungsvorgangs. Auch wenn Funktion und molekulare Wechselwirkungspartner, wie ein potentieller Rezeptor auf der Oocyte, noch unbekannt sind.

## 1.9 Zielsetzung

Die Bedeutung der Membran-bindenden Proteine aus den Sekreten des Nebenhodens und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen für den Befruchtungsvorgang sind noch weitgehend unbekannt. Als Proteinkomponenten des Seminalplasmas treten Mitglieder weitverbreiteter Proteinfamilien auf. Diese Proteine können durch klassische chromatographische Methoden in ausreichenden Mengen für biophysikalische, biochemische, funktionelle und strukturelle Untersuchungen nativ isoliert werden.

Die Architektur der Seminalplasmaproteine, ihre geringe Größe und einfache Domänenstruktur, machen sie über die Reproduktionsbiologie hinaus interessant. So treten beispielsweise die Fibronectin Typ II- und CUB-Domänen sonst nur als Elemente komplexerer Proteine auf. Durch die Seminalplasmaproteine wird die Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung dieser Module ermöglicht. Diese Struktur-Funktions-Korrelationen können dann für zielgerichtete Untersuchungen komplexerer Proteine herangezogen werden. Das natürliche Vorkommen in verschiedenen Spezies und die damit verbundenen Unterschiede in Sequenz und Glykosylierung bieten die Option vergleichender Untersuchungen unterschiedlicher Mitglieder einer Familie strukturell verwandeter Proteine.

Ziel dieser Arbeit ist es, ausgewählte Proteine des Seminalplasmas aus Schwein, Rind und Pferd im Hinblick auf die Korrelation von Funktion und Struktur zu untersuchen. Dies schließt die Identifizierung, Sequenzierung, Isolierung und die funktionelle wie strukturelle Charakterisierung der Proteine ein.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeine Methoden**

Alle Chemikalien werden von den Firmen Merck, Darmstadt, Riedel de Haen, Seelze, Applichem, Darmstadt, Sigma-Aldrich, Steinheim und Roth, Karlsruhe in der Qualität p.a. oder besser bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind jeweils im Anschluß an die Durchführungsvorschriften aufgeführt.

Häufig benötigte Puffer und Stammlösungen:

#### PBS (10 x)

136 mM NaCl  
1,63 mM KCl  
4,28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O  
1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

zur Verwendung 1:10 verdünnen, pH 7,2

#### TBS (10 x)

200 mM TRIS-HCl  
1,54 M NaCl

zur Verwendung 1:10 verdünnen, pH 7,4

### **2.2 Proteinchemische Methoden**

#### ***2.2.1 SDS-Gelelektrophorese***

Für die PAAGE nach Laemmli et al. (1970) werden Gele der in den Tabellen 2.1 und 2.2 angegebenen Zusammensetzungen angefertigt.

Die Lösungen werden in einem großen Reagenzglas gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und 40 % APS gestartet. Zum Erhalt einer glatten Geloberkante wird das Trenngel anschließend mit H<sub>2</sub>O dd. überschichtet. Sobald sich das Trenngel verfestigt, kann es mit dem Sammelgel überschichtet werden.

Die Elektrophorese wird bei konstanter Spannung von 100 V bis zum Übergang der Proben vom Sammel- zum Trenngel begonnen und anschließend bei 200 V fortgesetzt. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der Frontmarker Bromphenolblau an der Gelunterkante austritt.

Trenngel:

Tab. 2.1: Pipettierschema für SDS-Trenngele

Endkonzentration Acrylamid	Endvolumen [ml]	30 % Acrylamid / 0,08 % Bisacrylamid [ml]	1,5 M Tris- HCl pH 8,8 [ml]	1 % SDS [ml]	H <sub>2</sub> O dd. [ml]	TEMED [ml]	40 % APS [ml]
10 %	10	3,3	2,8	1,0	2,9	0,02	0,02
12,5 %	10	4,2	2,8	1,0	2,0	0,02	0,02
15 %	10	5,0	2,8	1,0	1,2	0,02	0,02
17,5 %	10	5,8	2,8	1,0	0,4	0,02	0,02

Sammelgel:

Tab. 2.2: Pipettierschema für SDS-Sammelgele

Endkonzentration Acrylamid	Endvolumen [ml]	30 % Acrylamid / 0,08 % Bisacrylamid [ml]	1,0 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	1 % SDS [ml]	H <sub>2</sub> O dd. [ml]	TEMED [ml]	40 % APS [ml]
5 %	1,5	0,35	0,19	0,15	0,91	0,003	0,003
6 %	1,5	0,30	0,19	0,15	0,86	0,003	0,003

2 x Probenauftragspuffer (nicht reduzierend ohne β-Mercaptoethanol)

- 50 mM Tris-HCl pH 6,8
- 2 % SDS
- 10 % Glycerin
- 0,1 % Bromphenolblau
- 100 mM β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer

- 192 mM Glycin
- 25 mM Tris
- 0,1 % SDS

Elektrophoresessystem: Biorad Mini Protean II, Biorad, München. Deutschland



## **2.2.2 Coomassie Brilliant Blue Färbung**

Direkt nach der Elektrophorese werden die Gele 30-45 min unter leichtem Schütteln in CBB-Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgt durch mehrfaches Waschen mit 7 % Essigsäure bis ein klarer Hintergrund erreicht ist. Die Entfärbelösung ist nach Filtration über Aktivkohle wiederverwendbar.

### Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbelösung

5,0 g Coomassie Brilliant Blue R250

1,25 g Coomassie Brilliant Blue G250

1065 ml Ethanol (96 %)

125 ml Methanol

250 ml Eisessig

ad 2,5 l H<sub>2</sub>O dd.

## **2.2.3 Silber-Färbung nach Heukeshoven (modifiziert)**

Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30-60 min in 12,5 % TCA fixiert. Durch zweimaliges Waschen für 5 min mit H<sub>2</sub>O dd. wird die TCA entfernt und anschließend 45 min mit Thiosulfat-Lösung inkubiert. Diese Lösung wird durch sechsmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O dd. entfernt. Die Färbung erfolgt durch 45 minütige Inkubation in Silber-Färbelösung. Überschüssige Färbelösung wird durch dreimaliges Waschen (10 s) entfernt. Die Farbentwicklung wird durch Inkubation in Entwicklungslösung erhalten und mit Stop-Lösung beendet, wenn deutliche Banden zu erkennen sind. Als Orientierung kann die Färbung der Banden des Molekulargewichtsstandards dienen.

### Thiosulfat-Lösung

0,5 M Na-Acetat

80 mg NaS<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

0,5 % Glutaraldehyd

### Silber-Färbelösung

6,0 mM AgNO<sub>3</sub>

0,05 % Formaldehyd

### Entwicklungslösung

0,236 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0,01 % Formaldehyd

### Stop-Lösung

50 mM Glycin

## **2.2.4 Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wird der Mikrobiuret-Assay durchgeführt. Im ersten Schritt werden die Proteine durch Zugabe von TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) gefällt und durch Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 15 min) pelletiert. Der Überstand wird vollständig, nötigenfalls mit Zellstoff, abgenommen. Anschließend wird das Pellet mit 50 µl 2 M NaOH hydrolysiert und mit 500 µl Gebrauchslösung gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe von 450 µl H<sub>2</sub>O dd. erfolgt die photometerische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 334 nm. Die Kalibration erfolgt mittels einer BSA Verdünnungsreihe von 30 µg bis 1 mg. Alle Proben und Standards sind als Duplikate anzusetzen. Die Fällung der Proteine bietet den Vorteil, daß eine Vielzahl störender Substanzen nicht präzipitieren und somit keinen Einfluß auf die Reaktion mit Kupfer haben. Es empfiehlt sich jedoch Kontrollproben von BSA im Probenpuffer einzusetzen.

### Stammlösung

0,59 M Na-Citrat  
0,94 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,69 mM CuSO<sub>4</sub>

### Gebrauchslösung

1 Vol Stammlösung  
20 Vol 0,75 M NaOH

## **2.2.52-D Gelelektrophorese**

Die erste Dimension der 2-D Gelelektrophorese wird im IGPhor System mit Immobilon Dry Strips nach *Görg et al. 1997* durchgeführt. Die lyophilisierte Probe wird in Rehydratisierungspuffer gelöst und in die Elektrophoresekammer eingefüllt. Anschließend wird der Immobilon Strip mit der Gelseite nach unten auf die Lösung aufgelegt. Die Rehydratisierung erfolgt bei einer konstanten Spannung von 50 V für 12 h. Die Auftrennung im pH-Gradienten wird in mehreren Stufen durchgeführt:

150 V 1 h  
500 V 1 h  
1000 V 1 h  
8000 V bis Erreichen von 22500 Vh.

Zur Trennung nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension werden SDS-Gele nach 2.2.1 angefertigt und der Strip in SDS-Puffer äquilibriert (2 x 10 min). Der

Strip wird in die Geltasche eingelegt und die Geltasche mit 0,3 % Agarose aufgefüllt. Die Elektrophorese wird nach 2.2.1 durchgeführt. Die Gelgröße richtet sich nach der verwendeten Stripgröße, die Acrylamidkonzentration nach dem erwarteten Molekulargewicht der Probe. Das SDS-Gel wird wie unter 2.2.3 beschrieben durch Silberfärbung angefärbt. Sowohl die erste, wie auch die zweite Dimension, können je nach Trennziel nicht reduzierend oder in Gegenwart reduzierender Reagenzien ( $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT) durchgeführt werden.

#### Rehydratisierungslösung

8,5M	Harnstoff (deionisiert mit Amberlite MB-150)
2,0%	CHAPS
0,8%	IPG-Buffer (Amersham Pharmacia Biotech)
15 mM	DTT (reduzierend)

Elektrophorese-System: IGPhor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Immobilin Dry Strips: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

### **2.2.6 Western Blotting**

Western Blots werden nach der Semi-Dry Methode angefertigt (*Khyse-Andersen, 1984*).

Direkt vor der Verwendung müssen die PVDF Blot-Membranen durch Befeuchten mit Methanol (30 s) aktiviert werden. Das Methanol wird durch zwei kurze Waschschrte (10 s) wieder entfernt. Bis zur endgültigen Verwendung werden die Membranen in Blotting-Puffer gelegt.

Der Blot-Sandwich besteht aus drei Lagen Puffer-durchfeuchtetem Blot-Papier, der Membran auf die das SDS-Gel aufgelegt wird und wiederum drei Lagen feuchtem Blot-Papier. Bei jeder Lage ist die Bildung von Luftblasen zwischen den Lagen zu verhindern. Der Stromfluß darf nur über den Kontaktbereich von Membran und Gel verlaufen. Etwaige andere Kontaktbereiche sind durch geeignete Materialien abzudecken, zum Beispiel einer Umrahmung aus Parafilmstreifen. Der Blotvorgang wird bei einer konstanten Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  für 1 h (Proteine bis ca. 30 kD) bis 2 h (Proteine bis ca. 90 kD) durchgeführt. Der Aufbau eines Blot-Sandwiches ist

in Abb. 2.1 dargestellt. Nach Beendigung des Blotvorgangs wird der Transfer der Proteine auf die Membran durch die reversible Färbung mit Ponceau S überprüft. Hierfür wird die Blotmembran 5 min in Ponceau S Färbelösung inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O dd. bis zur Kenntlichkeit der Banden entfärbt. Bei einer Transferzeit von 1 h sollten generell die Banden bis 45 kD eines Standards erkennbar sein, sofern die Mengenangaben des Herstellers für eine CBB-Färbung eingehalten wurden. Die Blotmembran kann sofort ohne weitere Entfärbung verwendet oder getrocknet und bei -20°C gelagert werden. Getrocknete Membranen müssen vor der Verwendung wieder mit Methanol behandelt werden.

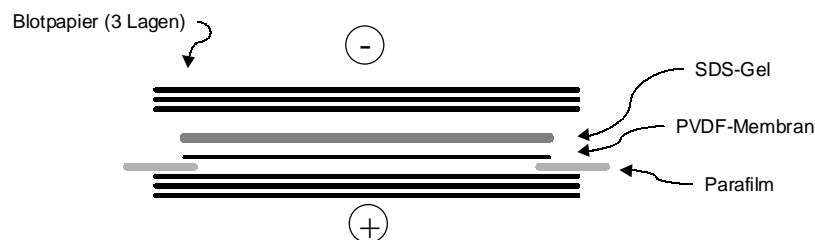


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Blot-Sandwich für die Semi-Dry Methode

Blotting Puffer (1 x)

39	mM	Glycin
48	mM	TRIS
0,0375	%	SDS
20	%	Methanol

Ponceau S Färbelösung

0,5%	Ponceau S
1,0%	Essigsäure

Immobilon P PVDF-Membran:

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland oder Millipore, Eschborn, Deutschland

Blot Papier:

Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland oder Macherey und Nagel, Düren, Deutschland

**2.2.7 Immunchemischer Nachweis**

Der Nachweis transferierter Proteine kann durch spezifische Antikörper erfolgen. Vor dem Nachweis müssen verbliebene Bindungsstellen der Blotmembran durch Inkubation (1 h, 37°C oder bei 4°C übernacht) mit einer Lösung von 1 % Blocking Reagenz in TBS, in der auch alle Antikörper und Enzyme zu verdünnen sind,

blockiert werden. Die Lösung wird verworfen und die Membran mit einer individuell ermittelten Verdünnung des jeweiligen Antikörpers behandelt (1 h, 37°C oder bei 4°C übernacht). Vor der Inkubation mit einem weiteren Antikörper wird überschüssiger Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS, 0,1% Tween-20 entfernt. Die Detektion erfolgt über Sekundärantikörper, die gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet sind, aus der der Primärantikörper stammt. Falls der Sekundärantikörper nicht als Konjugat mit alkalischer Phosphatase sondern biotinyliert vorliegt, schließt sich noch ein Inkubationsschritt mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat an. Vor der Inkubation in der Färbelösung wird die Membran 2 x 5 min in Detektionspuffer equilibriert. Die Umsetzung des Farbsubstrats NBT/BCIP durch alkalische Phosphatase resultiert in einem lokal begrenzten blauvioletten Präzipitat. Die Farbentwicklung wird durch Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O dd. gestoppt.

#### Detektionspuffer für Alkalische Phosphatase

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

Blocking Reagenz: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Anwendung nach Herstellerprotokoll

NBT/BCIP-Lösung: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Anwendung nach Herstellerprotokoll

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

Tierische Gewebeproben können von Schlachttieren gewonnen werden. Die Gewebe werden dafür aus den ausgebluteten Tieren entnommen und auspräpariert. Nach dem Abspülen von Körperflüssigkeiten vom Präparat mit 0,9 % Kochsalz-Lösung kann die Probe für die jeweilige Bestimmung weiterbehandelt werden:

- für immunhistochemische Untersuchung werden kleine Stücke (Kantenlänge 0,5 cm), abermals gespült und in Formalin-Lösung zur Fixierung überführt
- zur späteren Isolierung von mRNA und zur Proteinextraktion werden Gewebeproben entnommen, auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für molekularbiologische Zwecke bei -80°C, für Proteinextraktion bei -20°C gelagert.

### **2.2.9 Herstellung von Gewebeextrakten**

Das Gewebe (0,1 g/ml) wird in TBS, 10 mM Bezamidin, 5 mM EDTA mit einem Ultrathurrax homogenisiert. Der Zelldebris wird durch Zentrifugation bei 3000 x g, 4°C, 10 min und 10000 x g, 4°C, 15 min entfernt. Im Überstand können die löslichen Proteine nachgewiesen werden. Für die Gelelektrophorese werden entweder gleiche Volumina oder, nach Proteinbestimmung, gleiche Mengen an Gesamtprotein eingesetzt. Hierfür werden die Proben mit dem gleichen Volumen an zweifach SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei Raumtemperatur, 5 min bei 95° denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Vor dem Probenauftrag wird präzipitierendes Material durch Zentrifugation bei 12000 x g, 4°C, 3 min entfernt.

### **2.2.10 Gewinnung von Ejakulaten und Seminalplasma**

Die Ejakulate werden von trainierten adulten Tieren durch manuelle Stimulation (Eber) oder durch Verwendung einer künstlichen Scheide (Bulle und Hengst) gewonnen. Entweder während der Abnahme oder beim Umfüllen in geeignete Gefäße werden die Ejakulate durch Gaze filtriert. Bis zur Abtrennung der Spermatozoen werden die Ejakulate in temperierten (37°C) Gefäßen gelagert und transportiert.

Die Abtrennung der Spermatozoen erfolgt durch Zentrifugation bei 1500 x g, RT, 10 min. Durch eine weitere Zentrifugation bei 20000 x g, RT, 15 min werden verbliebene Spermatozoen und feine Verunreinigungen entfernt. Bis zur weiteren Verwendung kann zellfreies Seminalplasma bei -20°C gelagert werden.

### **2.2.11 Isolierung von Seminalplasmaproteinen**

Die Isolierung verschiedener Seminalplasmaproteine aus Schwein, Bulle und Pferd wird in mehreren Publikationen ausführlich beschrieben (HSP-1/2, BSP-30k, PDC-109, aSFP: *Calvete et al. 1994, 1995, 1996a, 1996b, 1997a, 1997b*, PDC-109, pB1: *Gasset et al. 1997*, PDC-109, BSP-A<sub>3</sub>, BSP-30k: *Manjunath et al. 1987a, 1987b*, equines CRISP-3: *Schambony et al. 1998*). Die gezielte Isolierung einzelner Proteine erfolgt nach diesen Vorschriften. Nachfolgend sind die modifizierte Isolierung der equinen Proteine HSP-1/2 und CRISP-3 aufgeführt.

Alle Chromatographien werden, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit einer variablen Pumpe wird die Flußrate gemäß den Herstellerangaben für das jeweilige Chromatographiematerial eingestellt. Die Detektion erfolgt mit einem UV-Durchflußdetektor durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Die Reinheit der Isolate wird durch SDS-Gelelektrophorese, 2-D Gelelektrophorese und vergleichende analytische RP-HPLC (2.3.1) überprüft.

### Isolierung von HSP-1/2

Das equine Seminalplasma (30 ml) wird auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Heparin-Sepharose CL-6B (r=1,9 cm, l=25 cm, 150 ml Bettvolumen) aufgebracht und mit TBS bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Gebundenes HSP-1/2 wird mit TBS, 10 mM PCh eluiert und anschließend erschöpfend gegen TBS dialysiert. Die Bindung an PC-Agarose (r=1 cm, l=2,3 cm, 7 ml Bettvolumen) erfolgt ebenfalls in TBS. Nach Erreichen der Basislinie wird die Säule mit 3 Volumina TBS, 10 mM PCh und anschließend 3 Volumina TBS, 1 M NaCl gewaschen. Gebundenes HSP-1/2 wird mit TBS, 100 mM PCh eluiert und zur Gefriertrocknung erschöpfend gegen Wasser dialysiert (MWCO 6-8 kD). Die Reinheit der beiden Proteine wird durch SDS-Gelelektrophorese, RP-HPLC und 2-D Elektrophorese überprüft.

Alternativ kann HSP-1/2 auch nach der Gelfiltration zur Präparation von CRISP-3 gewonnen werden. Die Fraktion kann direkt für die Bindung an PC-Agarose verwendet werden.

### Isolierung von equinem CRISP-3

Die nicht gebundene Fraktion der Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose wird erschöpfend gegen Wasser dialysiert (MWCO 6-8 kD), gefriergetrocknet und in einem geringen Volumen TBS aufgenommen. Maximal 50 ml dieser Lösung werden zur Gelfiltration über Sephadex G50 (zwei gekoppelt Säulen, r=2,5 cm, l=90 cm, ~3 l Bettvolumen) eingesetzt. CRISP-3 eluiert nach den Aggregaten von HSP-1/2. Die CRISP-3 enthaltenden Fraktionen werden durch ELISA bestimmt, vereinigt, erschöpfend gegen Wasser dialysiert (MWCO 6-8 kD) und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in einem geringen Volumen (5-8 ml) 20 mM Tris-HCl, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7,4 aufgenommen und zur Chromatographie an Butyl-Sepharose (r=0,5 cm, l=10 cm, 7,5 ml Bettvolumen) eingesetzt. Die Elution erfolgt in einem Gradienten von

20 mM Tris-HCl, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7,4 bis 20 mM Tris-HCl, 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7,4. CRISP-3 eluiert zwischen 0,3 M und 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Die Fraktionen werden vereinigt, erschöpfend gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgt bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die Reinheit wird durch SDS-Gelelektrophorese (nicht reduzierend) und RP-HPLC überprüft.

<u>Heparin-Sepharose CL-6B:</u>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
<u>Sephadex G-50:</u>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
<u>Butyl-Sepharose:</u>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
<u>p-Aminophenylphosphatidylcholine Agarose:</u>	Pierce, Rockford, IL, USA

### **2.2.12 Immunhistochemie**

Gewebe von Schlachttieren wird zur Entfernung von Körperflüssigkeitsresten mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Kleine Gewebstücke von ca. 0,5 cm x 0,5 cm werden entnommen und in 4 % gepuffertem Formalin für mindestens 48 h fixiert. Die Fixationslösung wird durch zweimaliges Waschen mit 70 % Ethanol (24 h und übernacht) entfernt. Die Dehydrierung erfolgt in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe von 80 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol und zweimal wasserfreiem Ethanol mit einer Inkubationszeit von jeweils einer Stunde. Anschließend werden die Gewebeproben je zweimal für eine Stunde in Essigsäure-n-butylester und auf  $60^\circ\text{C}$  erwärmtem Paraffin inkubiert und in Paraffin eingebettet.

Für die Verwendung in der Immunhistochemie werden 3-8  $\mu\text{m}$  starke Schnitte angefertigt, zur Streckung im Wasserbad eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, auf Objektträger aufgelegt und anschließend bei  $37^\circ\text{C}$  angetrocknet. Eine vollständige Trocknung wird durch zweistündige Trocknung bei  $56^\circ\text{C}$  erreicht. Die getrockneten Schnitte können ca. eine Woche bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Entparaffinierung und Rehydrierung wird durch Inkubation in Xylol (2 x 5 min), 100 % Ethanol (1 x 5 min), 96 % Ethanol (1 x 2 min), 70 % Ethanol (1 x 2 min) und PBS (2 x 2 min) vorgenommen.

Unspezifische Bindungsstellen werden durch Behandlung des Präparates mit 5 % BSA in PBS blockiert (60 min,  $37^\circ\text{C}$ ). Überschüssiges Protein wird durch dreimaliges Waschen mit PBS vom Objektträger entfernt. Die Bindung des Antikörpers erfolgt in



PBS, 0,5 % BSA für 60 min bei 37°C oder übernacht bei 4°C. Die Entfernung von nicht gebundenem Antikörper wird durch dreimaliges Waschen mit PBS, 0,5 % BSA, erreicht. Entsprechend erfolgt die Inkubation mit einem sekundären und weiteren Antikörpern und Entfernung von überschüssigen Reagenzien durch dreimaliges Waschen. Zur Detektion wird alkalische Phosphatase gekoppelt an einen sekundären Antikörper oder als Streptavidin-Konjugat eingesetzt. Vor der Durchführung der Farbreaktion wird der Gewebeschnitt durch zweimaliges Waschen mit PBS und viermaliges Waschen mit Detektionspuffer (s. 2.2.7) von überschüssigem alkalische Phosphatase Konjugat befreit. Als Farbreaagenzien können NBT/BCIP (1:20 Verdünnung) oder Fast Red<sup>®</sup> eingesetzt werden. Die Anwendung der Farbreaagenzien erfolgt nach dem Herstellerprotokoll. Für die Farbentwicklung hat sich der Einsatz von *cover slides* bewährt, da eine vollständige Bedeckung des Schnittes, ein konstantes Reagenzvolumen und durch die Abdeckung ein Schutz vor Luftoxidation erreicht wird. Geeignete Konzentrationen der Antikörper und alkalische Phosphatase Konjugate müssen individuell ermittelt werden.

NBT/BCIP-Lösung: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

Fast Red<sup>®</sup>: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

Cover Slides: Hybaid, Heidelberg, Deutschland

### **2.2.13 ELISA**

Für den Nachweis im ELISA werden die zu immobilisierenden Proteine in H<sub>2</sub>O dd. oder einem geeigneten Puffer gelöst. Der pH-Wert der Lösung sollte neutral oder leicht alkalisch sein, saure Lösungen (z.B: HPLC-Eluat) werden mit 1 M Tris-HCl pH 8,0 neutralisiert. Die Proteinlösung wird mit *Coating* Puffer mindestens im Verhältnis 1:4 verdünnt und 100 µl dieser Lösung je Well in die ELISA-Platte pipettiert. Die Immobilisierung erfolgt übernacht bei 4°C. Anschließend werden unspezifische Bindungen mit 200 µl 5 % BSA in ELISA-Puffer blockiert (1 h 37°C). Die Detektion des zu untersuchenden Proteins erfolgt durch Inkubation mit 100 µl Antikörperlösung in ELISA-Puffer, 0,5 % BSA für 1 h bei 37°C. Anschließend wird dreimal mit je 200 µl ELISA-Puffer gewaschen und gegebenenfalls weitere Bindungsschritte analog durchgeführt. Alle Bindungsschritte (weitere Antikörper oder

Streptavidin-Konjugate zur Detektion) erfolgen in ELISA-Puffer, 0,5 % BSA. Zur Detektion wird ein Antikörper- oder, bei Verwendung biotinylierter Antikörper, ein Streptavidin-Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase eingesetzt. Der Nachweis erfolgt durch Umsetzung eines Farbsubstrates (ortho-Phenylendiamin, OPD) in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{l}$ /Well). Die enzymatische Reaktion wird nach 15-20 min durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt. Die Extinktion wird bei 492 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

#### Coating Puffer

50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,6

#### ELISA-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

0,1 % Tween-20

#### Blocking-Puffer

ELISA-Puffer, 5 % BSA

#### Antikörper-Puffer

ELISA-Puffer, 0,5 % BSA

#### Substratpuffer

20 mM Zitronensäure

50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 5,0

#### Substratlösung

20 mg OPD (ortho-Phenylendiamin 1 Tablette)

in 10 ml Substratpuffer lösen und anschließend Zufügen von

7  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$

#### Stoplösung

4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

ELISA-Platten: Dynex, Hamburg, Deutschland

OPD-Tabletten (20 mg): Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

ELISA-Reader: ICN, Meckenheim, Deutschland

### **2.2.14 Phospholipid-ELISA**

Die Interaktion von Proteinen mit Zelloberflächen durch Wechselwirkungen mit Lipidkopfguppen kann in einem ELISA-System untersucht werden (*Bloom 1987*).

Für diesen modifizierten ELISA werden das Phospholipid oder Phospholipidgemisch in Methanol aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Je 100 µl dieser Lösung werden in die Wells (96 Well Platten) pipettiert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur im Vakuum verdampft. Anschließend wird die Platte mit 200 µl je Well einer Lösung von 0,05 % Gelatine in TBS zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert (1 h, 37°C oder übernacht, 4°C). Das üblicherweise verwendete BSA oder andere Albumine sind aufgrund ihrer Lipidbindungseigenschaften nicht geeignet. Vor dem Bindungsschritt werden die Wells zweimal mit TBS, 0,1 % Tween-20 gewaschen. Die Bindung des zu untersuchenden Proteins oder Proteingemisches erfolgt durch Zugabe von 100 µl Proteinlösung in einem geeigneten Puffer mit 0,1 % Tween-20 für 1 h bei 37°C. Anschließend wird dreimal mit je 200 µl TBS, 0,1 % Tween-20 gewaschen und es kann ein weiterer Bindungsschritt erfolgen. Alle Bindungsschritte (weitere Proteine oder Antikörper zur Detektion) erfolgen in geeigneten Puffern, die zur Verhinderung unspezifischer Bindung mit 0,1 % Tween und 0,05 % Gelatine versetzt sein sollten. Die Detektion erfolgt analog zum ELISA (2.2.13) mit OPD und Absorptionsmessung im ELISA-Reader.

#### Lipid-Lösungen

1 µg/ml in Methanol (Lagerung -80°C oder kurzfristig -20°C)

#### Waschpuffer 1

PBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2

#### Blocking Solution

TBS, 0,5 % Gelatine, pH 7,2

#### Bindungs- und Antikörper-Puffer

TBS, 0,05 % Gelatine, pH 7,2

#### Lipide:

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2.3 Proteinanalytische Methoden

### 2.3.1 Reversed-Phase HPLC

#### Trennung von Peptiden aus enzymatischen Spaltungen

Alle Trennungen werden, wenn nicht anders angegeben, mit einer Beckman HPLC-Anlage aus zwei Typ M114 Kolbenpumpen gesteuert über einem Typ 2149 Controller durchgeführt. Zur Trennung von Proteingemischen werden Macherey&Nagel Nucleosil C-18, Partikelgröße 5 µm, Porengröße 30 nm oder YMC C-18 *endcapped* jeweils mit 4 mm Durchmesser und 250 mm Länge verwendet. Als Trennmedium für Peptide wird ein C-18 ODS AQ (Partikelgröße 3µm, Porengröße 12 nm) Material der Fa. YMC Europe, Schermbeck, Deutschland in einer Säule von 2 mm Durchmesser und 250 mm Länge eingesetzt. Die Trennung erfolgt im Gradienten des Laufmittelgemischs aus A: 0,08 % TFA in H<sub>2</sub>O dd. und B: 0,065 % TFA in 90 % Acetonitril (Gradient). Die eluierenden Peptide werden mit UV-Detektoren der Fa. Beckman oder Pharmacia durch Absorptionsmessung bei 220 nm detektiert. Die Ausgabe der Chromatogramme erfolgt auf einem Zwei-Kanal-Analogschreiber.

<u>HPLC-Säulen:</u>	YMC Deutschland, Schermbeck, Deutschland Macherey&Nagel, Düren, Deutschland
<u>HPLC-System:</u>	Beckman, München, Deutschland
<u>UV-Detektoren:</u>	Beckman, München, Deutschland oder Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
<u>2-Kanal Analog-Schreiber:</u>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

### 2.3.2 Enzymatische Proteolysen

Für die enzymatische Spaltung von Proteinen und Peptiden werden ausschließlich Proteasen der Qualität *sequencing grade* eingesetzt. Die Proteolyse erfolgt in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer. Dazu wurde das lyophilisierte Protein/Peptide entweder in Reaktionspuffer aufgenommen oder, sofern der Zusatz von Acetonitril oder Harnstoff nötig ist, in Acetonitril bzw. 8 M Harnstoff aufgenommen und auf die gewünschte Endkonzentration mit Reaktionspuffer eingestellt. In Tabelle 2.3 sind die Reaktionsbedingungen der verwendeten Proteasen

zusammengestellt. Die Inkubationszeit ist abhängig vom jeweiligen Protein. Für Peptide wurde eine Inkubationszeit von 16 h nicht unterschritten.

Tab. 2.3: Übersicht über die Spezifität und Reaktionsbedingungen von Proteasen *sequencing grade*, nach Herstellerangaben

<b>Enzym</b>	<b>Reaktionspuffer</b>	<b>Reaktions- temperatur [°C]</b>	<b>Protein- Enzym Ratio</b>	<b>hydrolysiert Peptidbindung</b>	<b>Anmerkung [rules peptide mass]</b>
<b>Endoproteinase Lys-C</b>	25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5	37	1:100	carboxyterminal von K	keine Hydrolyse, wenn P carboxyterminal von K
<b>Trypsin</b>	100 mM Tris-HCl, pH 8,5	37	1:100	carboxyterminal von K und R	keine Hydrolyse, wenn P carboxyterminal von K, R
<b>Chymotrypsin</b>	100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,8	25	1:100	carboxyterminal von F, M, Y, W, L	
<b>Endoproteinase Asp-N</b>	50 mM Natrium- Phosphat pH 8,0	37	1:500	aminoterminal vom D	auch aminoterminal vom E bei zu hoher Enzymkonzentration oder anderem Reaktionspuffer

Endoproteinase Lys C sequencing grade: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

Endoproteinase Asp N sequencing grade: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

Chymotrypsin sequencing grade: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

Trypsin sequencing grade: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

### 2.3.3 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Peptidmassen erfolgt an einem Elektrospray-Massenspektrometer im positiven Modus. Die Daten werden in einem Bereich von m/z 400-2400 durch das Tune Programm aufgenommen. Die Proben werden in 0,5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril gelöst. Die Probenezuführung erfolgt über eine *fused-silica* Kapillare (50 µm ID, 192 µm AD) bei einem Fluß von 5 µl/min. Im Fall einzelner Proben aus einer Hamilton-Spritze mittels Kolbenvorschub, bei der Kopplung einer HPLC an das Massenspektrometer direkt nach der Säule mittels Flußteiler. Stickstoff dient als *Curtain*- und *Nebulizergas*. Die Optimierung der Gasströme erfolgt, wie auch der elektrischen Einstellungen, während der

Kalibrierung mit einem Polypropylen-Standard gemäß Herstellerangaben. Die *Orifice-Spannung* während der Messung beträgt 80 V. Mindestens 10 Einzelmessungen werden summiert. Der Meßbereich beträgt 400-2400 m/z. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm Scan Version 3.2

Alle massenspektrometrischen Messungen werden mit freundlicher Unterstützung durch Dr. M. Raida und Frau J. Barras-Aknoukh am Institut für Peptidforschung, Hannover, durchgeführt.

Sciex API III Massenspektrometer: PE Sciex, Langen, Deutschland

fused-silica Kapillare: Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA

Scan Version 3.2: PE Sciex, Langen, Deutschland

### **2.3.4 N-terminale Sequenzierung**

N-terminale Sequenzierungen werden in einem Gas-Flüssig Phasen Sequenator Procise 494A durchgeführt. Das System basiert auf dem Prinzip des Edman-Abbaus. Die zu sequenzierende Probe wird auf einer Trägermembran immobilisiert und in den Reaktionsraum eingebracht. Blots und Proben auf Blotmembranen können direkt eingesetzt werden, flüssige Proben werden auf einen Polybrene getränkten, mit TFA gewaschenen Glasfilter aufgetragen und unter Argon getrocknet. Das Reaktionsprodukt wird von überschüssigem Reagenz und Nebenprodukten durch HPLC getrennt. Die Detektion und Identifikation des farbigen Reaktionsproduktes erfolgt durch Absorption bei 492 nm anhand der Retentionszeit. Vor jeder Messung wird das System mit einem Aminosäure-Standard kalibriert.

Die N-terminalen Sequenzierungen werden mit freundlicher Unterstützung durch Dr. M. Raida, Dr. H. John und Frau J. Barras-Aknoukh und Frau G. Hein am Institut für Peptidforschung, Hannover, durchgeführt.

Procise 494A: PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

Reagenzien: PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

Glasfilter: PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

### **2.3.5 Manueller Edman-Abbau**

Für die manuelle Durchführung der Abbau-Reaktion werden die Chemikalien des ABI Procise 494A verwendet, die den Qualitäten *sequencing grade* entsprechen. Das Peptid wird in einem Glasreaktionsgefäß getrocknet, in ein größeres Glasgefäß gestellt und abermals getrocknet. In das größere Gefäß werden 100 µl N-Methylpiperidin in Methanol und auf das Peptid 10 µl PITC (Phenylisothiocyanat) pipettiert. Das Gefäß wird evakuiert, wobei flüssiges N-Methylpiperidin im Gefäß verbleiben soll. Anschließend wird 10 min bei 45°C inkubiert, abermals 100 µl N-Methylpiperidin in das größere Gefäß pipettiert und erneut wie oben inkubiert. Unter Vakuum werden die Reagenzien bis zur Trockne entfernt. Reagenzienreste werden durch zweimalige Zugabe von 20 µl Ethylacetat zum Peptid und Trocknung im Vakuum entfernt. Nach Zugabe von 5 µl wasserfreier TFA zum Peptid wird 10 min bei 45°C inkubiert, unter Vakuum getrocknet und durch zweimalige Zugabe von 20 µl Ethylacetat entwässert. Zum Abbau weiterer Aminosäuren wird der Abbauzyklus wiederholt. Die Temperaturen und Inkubationszeiten orientieren sich an dem Protokoll des *ABI Aminosäuresequencer Procise 494A*. Als Arbeitsmaterialien eignen sich die Gefäße der Aminosäureanalyse-Anlage Waters PICO TAG Workstation von Millipore.

Reagenzien:

PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

Alle speziellen Reagenzien und Chemikalien werden in höchster Qualität (geeignet für die Molekularbiologie) bezogen. Alle Lösungen werden mit H<sub>2</sub>O dd. angestzt und autoklaviert oder sterilfiltriert.

Häufig benötigte Puffer und Medien:

### Luria.Bertani-Medium (LB)

10 g Caseinhydrolysat

10 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

ad 1 l dd. H<sub>2</sub>O, autoklavieren (30 min, 120°C), pH 7,4

### LB-Platten

15 g Agar

ad 1 l LB-Medium, autoklavieren (30 min, 120°C)

### Zusätze

Die Zusätze werden bei Bedarf nach dem Autoklavieren und Abkühlen dem Medium (RT) oder Agar (ca. 50°C) zugefügt.

100 µg/ml Ampicillin

0,1 mM IPTG

40 µg/ml X-Gal

### TE (10 x)

100 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA

zur Verwendung 1:10 verdünnen, pH 8,0

### TPE (10 x)

100 mM TRIS-Phosphat, pH 8,0

10 mM EDTA

zur Verwendung 1:10 verdünnen, pH 8,0



### **2.4.1 Isolierung von RNA (Gesamt-RNA)**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA werden je 100 mg tiefgefrorenes Gewebe mit 2 ml RNA-Clean Reagenz mit einem Ultra-Thurrax homogenisiert. Das Homogenat wird mit 200 µl CHCl<sub>3</sub> je 2 ml RNA-Clean versetzt, gut durchmischt und zur Phasentrennung 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt. Zur vollständigen Präzipitation wird die Lösung 30 min bei –20°C inkubiert. Das Präzipitat wird durch 30 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 x g pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wird anschließend in 0,1 x TE aufgenommen und bei –70°C gelagert.

RNA-Clean:

Hybaid GmbH, Heidelberg, Anwendung nach Herstellerprotokoll

### **2.4.2 Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA**

Die Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA ist sowohl aus Gewebe, wie auch aus Gesamt-RNA mittels paramagnetischer (dT)<sub>18</sub>-beschichteter Beads möglich. Für letztere Möglichkeit kann das angegebene Protokoll verwendet werden, die Gesamt-RNA wird hierfür in Lysis-Binding Puffer verdünnt. Als Richtwert kann ein Anteil von 0,5 %-1,0 % mRNA angenommen werden (*Ausubel et al. 1999*).

Von der tiefgekühlten (-80°C) Gewebeprobe werden mehrere kleine Stücke aus verschiedenen Gewebsregionen entnommen und in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem Pulver zerrieben. Das Zellmaterial (ca. 10 mg) wird in 5 ml Lysis-Binding-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die genomische DNA wird durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 0,9 mm Kanüle geschert. Anschließend wird der Zelldebris durch Zentrifugation bei 13000 x g, RT, 10 min sedimentiert und der Überstand 5 min mit 200 µl Beadsuspension bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert. Die Beads werden in einem magnetischen Ständer sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Beads je einmal mit SDS-Hochsalz-, Hochsalz- und Niedrigsalzlösung gewaschen. Die Elution der poly(A)<sup>+</sup>-RNA erfolgt durch dreiminütiges Erhitzen der Beads auf 65°C unter Schütteln in 200 µl 1 x TE. Eine Nachreinigung kann durch Ausschütteln des Eluats gegen Phenol/Isoamylalkohol/Chloroform (PIC, 25:1:24) und anschließender

ethanolischer Fällung (600 µl Ethanol, 20 µl 3 M Na-Acetat) aus der wässrigen Phase (200 µl) erfolgen. Nach Zentrifugation bei 13000 x g, 4°C, 30 min wird das Präzipitat in 20 µl 0,1 x TE Puffer aufgenommen.

Lysis-Binding-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 7,5  
500 mM LiCl  
10 mM EDTA  
1 % SDS

SDS-Hochsalz-Lösung

100 mM Tris-HCl, pH 7,5  
250 mM LiCl  
2 mM EDTA  
0,5 % SDS

Hochsalz-Lösung

100 mM Tris-HCl, pH 7,5  
250 mM LiCl  
2 mM EDTA

Niedrigsalz-Lösung

100 mM Tris-HCl, pH 7,5  
125 mM LiCl  
1 mM EDTA

Oligo(dT)-Dynabeads:

Deutsche Dynal, Hamburg, Deutschland

### **2.4.3 Reverse Transkription und RT-PCR**

Als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription dient entweder Gesamt-RNA oder polyA<sup>+</sup>-RNA. Durch die Reverse Transkriptase wird anhand der RNA-Matrize und eines Primers ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) durch Verlängerung des Primers in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Dieser cDNA-Strang wird in einer anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

#### Reverse Transkription:

2 µg Gesamt-RNA (1,5 µl poly-A<sup>+</sup>-RNA)  
1 µl 10 µM spezifischer Primer oder (dT)<sub>15-18</sub>  
ad 12 µl H<sub>2</sub>O dd.

Inkubation 10 min 70°C und auf Eis abschrecken, dann hinzufügen von

2 µl 10 x RT-Puffer  
4 µl 50 mM DTT  
1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

auf 37°C temperieren und

1 µl MMLV Reverse Transkriptase (100 U/µl) hinzufügen

Inkubation 50 min 42°C, Enzym inaktivieren durch Erhitzen für 10 min bei 70°C, Lagerung –20°C

Für die weitere Verwendung in der PCR werden von dem inaktivierten Ansatz 1-2 µl direkt als Template eingesetzt.

TrueScript MMLV Reverse Transkriptase: Hybaid GmbH, Heidelberg, Deutschland

SuperScript II Reverse Transkriptase: GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

dNTP-Mix: Hybaid GmbH, Heidelberg, Deutschland

#### **2.4.4 PCR und spezielle PCR-Techniken**

Zur Amplifikation spezifischer Fragmente aus cDNA oder Plasmid-DNA werden 50 µl PCR-Ansätze wie folgt pipettiert und die Reaktion unter Mineralöl in einem Thermocycler durchgeführt:

5 µl	10 x Polymerase-Puffer
3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
2 µl	10 µM Primer 1
2 µl	10 µM Primer 2
1-2 µl	Template

ad 50 µl H<sub>2</sub>O dd. und entsprechende Aktivität an Polymerase (1U).

Die PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur T<sub>A</sub> und Zeitdauer der einzelnen Schritte) müssen für jedes Amplikon individuell ermittelt und optimiert werden. Ein Standardprogramm, das für Produkte bis 1 kb geeignet ist, ist im folgenden angegeben.

##### 1 Zyklus

5 min 94°C (Denaturierung des *Templates*)

##### 20-25 Zyklen

30 s 94°C (Denaturierung des *Templates*)

30 s T<sub>A</sub> (Primer-Anlagerung, *Annealing*)

1 min 72°C (Elongation)

##### 1 Zyklus

10 min 72°C (Finale Elongation)

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt in 1,5 % Agarose-Gelen in 1 x TPE, 0,3 µg/ml Ethidiumbromid und Visualisierung bei 254 nm auf einem Transilluminator.

AGS Gold DNA Polymerase: Hybaid, Heidelberg, Deutschland

AmpliTag DNA Polymerase: Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland

dNTP-Mix: Hybaid, Heidelberg, Deutschland

Agarose: GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Qualex Gold Agarose: Hybaid, Heidelberg, Deutschland

### **2.4.53'- und 5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)**

Zur Amplifikation unbekannter Bereiche am 3'- oder 5'-Ende einer mRNA werden spezielle RT-PCRs nach Frohmann et al. (1988) durchgeführt. Dabei wird nur ein sequenzspezifischer Primer aus einem Bereich mit bekannter Nukleinsäuresequenz und ein Homopolymer am jeweiligen Ende der cDNA eingesetzt. Dazu kann die poly-A Sequenz am 3'-Ende der mRNA sowohl zur Reversen Transkription wie oben beschrieben als auch zur Amplifikation genutzt werden. Die Annealing-Temperatur in der PCR richtet sich dabei nach dem verwendeten Oligo-dT Primer. Zur Erhöhung der Spezifität kann ein Oligo-(dT) Primer mit einer 5'-terminalen Verlängerung bereits in der Reversen Transkription eingesetzt werden, so daß die Annealing Temperatur in der PCR höher gewählt und somit unspezifisches Annealing des sequenzspezifischen Primers vermieden werden kann. Zur Amplifikation des 5'-Endes einer mRNA kann keine natürlich vorkommende universelle Sequenz genutzt werden. In diesem Fall wird zur Reversen Transkription ein sequenzspezifischer Primer eingesetzt und die erhaltene cDNA vor den weiteren Reaktionen aufgereinigt und in 30 µl 0,1 x TE eluiert. Mit Hilfe der Terminalen desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) wird ein dC Homopolymer am 3'-Ende der spezifischen cDNA erzeugt.

5 µl	5 x TdT-Puffer
17 µl	spezifische cDNA
2,5 µl	dCTP-Mix (1 mM)

5 min bei 95°C denaturieren und auf Eis abschrecken, dann hinzufügen von  
10 U TdT

Inkubation für 20 min bei 37°C, dann Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 10 min.

Die PCR-Amplifikation erfolgt mit einem zweiten sequenzspezifischen Primer und einem dG-dI Primer, der komplementär zum synthetischen dC Homopolymer ist. Auch in diesem Fall müssen die PCR-Bedingungen jeweils individuell ermittelt werden, ein langsames Abkühlen auf die Annealingtemperatur (1°C/s) hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen.

<u>AGS Gold DNA Polymerase:</u>	Hybaid, Heidelberg, Deutschland
<u>dATP-, dTTP-, dGTP-, dCTP-Lösung:</u>	Hybaid, Heidelberg, Deutschland
<u>Qualex Gold Agarose:</u>	Hybaid, Heidelberg, Deutschland
<u>High Pure PCR Product Purification Kit:</u>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

### **2.4.6 Herstellung kompetenter Zellen**

Zur Herstellung kompetenter Zellen wird eine 5 ml LB-Flüssigkultur (Luria-Bertani Medium) mit Bakterien (*E. coli* JM 109) angeimpft und übernacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die 5 ml Kultur in 500 ml LB-Medium überführt und bis zu einer Zelldichte von 0,5 OD<sup>600nm</sup> bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 2000 x g, 4°C, 5 min pelletiert und in 200 ml vorgekühltem TFB 1 resuspendiert. Es folgt eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Durch Zentrifugation bei 2000 x g, 4°C, 5 min werden die Zellen erneut pelletiert und in 20 ml vorgekühltem eiskalten TFB 2 resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird in Aliquoten von 200 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden bei -70°C gelagert.

#### TFB 1

30	mM	K-Acetat
100	mM	RbCl
10	mM	CaCl <sub>2</sub>
50	mM	MnCl <sub>2</sub>
15	%	Glycerin (v/v)

mit Essigsäure auf pH 4,8 einstellen, sterilfiltrieren

#### TFB 2

10	mM	MOPS
10	mM	RbCl
75	mM	CaCl <sub>2</sub>
15	%	Glycerin (v/v)

mit KOH auf pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren

#### **2.4.7 Transformation von kompetenten Zellen**

Zur Transformation werden kompetente Zellen des *E. coli* Stammes JM 109 verwendet. Es wird 1 µg Plasmid in 50 µl 1 x TE auf die Gefrierkulturen aufgegeben, 45 min auf Eis und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert (1 min, 3000 rpm) und in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Diese Suspension wird auf eine LB-Platte mit Ampicillin und gegebenenfalls IPTG und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion der transformierten Zellen ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Klone auf neue LB-Platten mit Ampicillin vereinzelt. Diese Kulturen können mit Parafilm verschlossen 4-6 Wochen bei 4°C gelagert werden.

#### **2.4.8 Plasmid-Isolierung und Sequenzierung**

Zur Isolierung der rekombinanten Plasmide werden 5 ml Flüssigkulturen (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) mit den gewünschten Klonen angeimpft und übernacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Das Plasmid wird mit einem kommerziellen Plasmidisolierungskit nach Herstellervorschrift isoliert. Zur Sequenzierung werden sowohl gereinigte PCR-Produkte als auch Plasmide eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgt entweder mit dem *BioCycle Sequencing Kit* und Analyse der Sequenzen auf einem *Direct Blotting* Sequenziersystem nach Herstellervorschrift oder in einem kommerziellen Sequenzierlabor. Bei der Sequenzierung mit dem *Direct Blotting* Sequenziersystem werden die in der Sequenzierreaktion biotinylierten DNA-Stränge in einem 4 %igen Polyacrylamidgel in TBE-Puffer, 7 M Harnstoff aufgetrennt und direkt auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Fixierung der DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (2 min) und Blockierung mit 1 % Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer (45 min 37°C) werden die Banden mittels eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats und Färbung mit NBT/BCIP detektiert. Die Membran wird 45 min mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in 1 % *Blocking Reagenz* bei 37°C inkubiert, 3 x mit Maleinsäurepuffer, 0,3 % Tween 20 und 2 x mit Detektionspuffer gewaschen und anschließend in Färbelösung inkubiert, bis eine deutliche Färbung der Banden zu erkennen ist. Die Farbreaktion wird durch Waschen mit H<sub>2</sub>O dd. gestoppt.

Mit der Durchführung einzelner Sequenzierungen wurde der Sequenzierservice der Fa. GATC GmbH, Konstanz, Deutschland beauftragt.

### Maleinsäurepuffer

10 mM Maleinsäure, pH 7,5  
150 mM NaCl

### Detektionspuffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5  
100 mM NaCl

### Färbelösung

2 % NBT/BCIP Stammlösung in Detektionspuffer

<u>Nucleobond Plasmid-Isolierungskit:</u>	Macherey&Nagel, Düren, Deutschland
<u>BioCycle Sequencing Kit:</u>	GATC, Konstanz, Deutschland
<u>Direct Blotting Sequenziersystem:</u>	GATC, Konstanz Deutschland
<u>Nylonmembran:</u>	GATC, Konstanz, Deutschland
<u>Blocking Reagenz:</u>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
<u>Streptavidin-alkalische Phosphatase:</u>	Dianova, Hamburg, Deutschland
<u>NBT/BCIP Stammlösung:</u>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

## **2.5 Software**

Zur Aufnahme von Meßdaten und zur Darstellung werden verschiedene Computerprogramme verwendet. Zur Datenaufnahme und –auswertung verwendete Programme die mit den Geräten geliefert werden sind nicht gesondert aufgeführt, da sie nicht unabhängig erhältlich sind. Neben dem kommerziellen Text- und Tabellenverarbeitungsprogramm Microsoft Office 97<sup>®</sup>, Microsoft GmbH, München, Deutschland, werden folgende für akademische Zwecke kostenlosen, über das Internet erhältliche oder interaktive Programme eingesetzt:

<u>Molekül-Visualisierung:</u>	Rasmol V2.6, Roger Sayle, Glaxo Wellcome R&D, Stevenage, Hertfordshire, Großbritannien
<u>Massenspektren-Darstellung:</u>	PAWS V8.5, ProteoMetrics, LLC, New York, New York, USA
<u>Peptidmassenberechnung:</u>	PeptideTools, interaktiv, am SBI, Zürich, Schweiz (SwissProt), Zugang über die <i>Homepage</i> : <a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
<u>Homologie-Vergleiche:</u>	FASTA 3, BLITZ, JPred <sup>2</sup> , Interpro, interaktiv, am EBI, Hinxton, Großbritannien, Zugang über die <i>Homepage</i> : <a href="http://www2.ebi.uk">http://www2.ebi.uk</a> PROSITE, PFAM, ProDom interaktiv, am SBI, Zürich, Schweiz (SwissProt), Zugang über die <i>Homepage</i> : <a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Bovine CRISP-Proteine

#### 3.1.1 Identifizierung und Sequenzierung boviner CRISP-Proteine

Die Identifikation von Mitgliedern der CRISP-Familie in verschiedenen Säugetierspezies, kürzlich auch in Pferd und Schwein (*Schambony et al. 1998*), und Hinweise auf eine entscheidende Funktion während der Spermatogenese und Fusion der Gameten, gab Anlaß zu der Vermutung, daß Mitglieder dieser Proteinfamilie auch beim Rind eine Rolle in der Reproduktion spielen.

Der erste Hinweis auf CRISP-Proteine beim Rind ergab sich durch Experimente mit verschiedenen Primern in der RT-PCR. Die Verwendung des Primers 2740 und des universellen Primers 2695 führte bei mRNA aus Hoden und Nebenhoden zur Amplifikation von Produkten mit einer Größe zwischen 800 bp und 900 bp, die bei entsprechender Primerkombination auch für die CRISPs kodierenden mRNAs aus Schwein und Pferd erzielt werden würden (Abb 3.1).

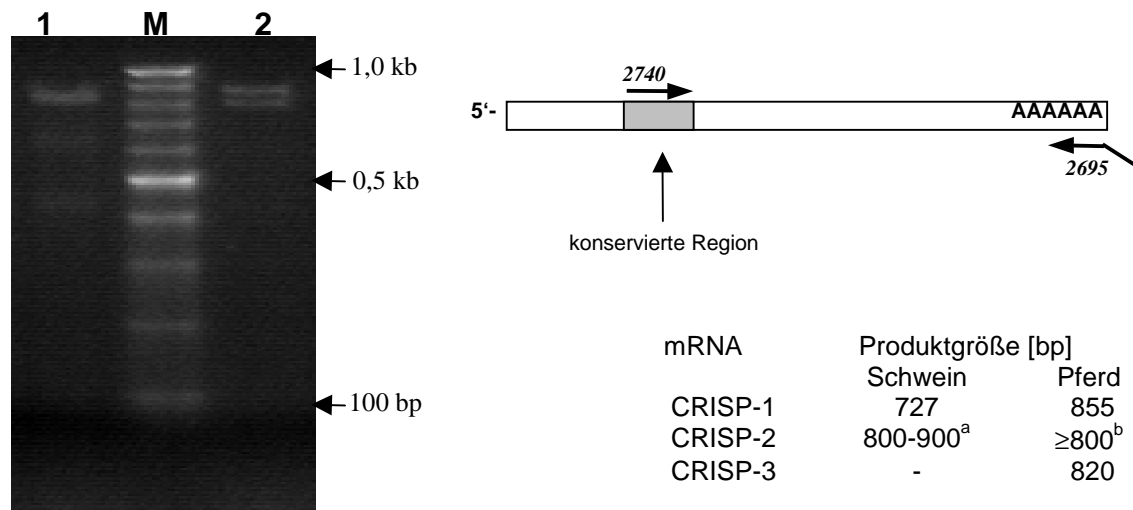


Abb. 3.1: Links: Agarosegel (2%) der RT-PCR Produkte mit Primern 2740/2695 aus Nebenhoden (1) und Hoden (2) RNA eines Bullen, M- 100 bp Standard, Rechts: Übersichtsbild der Primerpositionen auf CRISP mRNAs und berechnete Produktgrößen für Schwein und Pferd, <sup>a</sup>- pers. Mitteilung A. Schambony, <sup>b</sup>- vollständige Sequenz unbekannt

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und direkt sequenziert. Für das Produkt aus Hoden konnte eine Sequenz erhalten werden, die in verschiedenen Bereichen

heterogen erscheint. Besonders deutlich wurde dies am Codon TGC bzw. TGT welches für Cystein kodiert. Es traten an der Position der dritten Base mehrfach die Signale für dC und dT mit gleicher Intensität auf. Ein Effekt, der weder bei der Sequenzierung des epididymalen Produktes, noch bei den homologen Transkripten aus Schwein (CRISP-1, CRISP-2) oder Pferd (CRISP-1, CRISP-2, CRISP-3) zu beobachten war.

Anhand der erhaltenen Sequenzen konnten weitere Primer konstruiert werden, um überlappende Fragmente zur vollständigen Sequenzanalyse zu erzeugen. Für die Sequenzierung der 5'-untranslatierten Region (UTR) und des Bereichs 5'-aufwärts von Primer 2740 wurde ein 5'-RACE durchgeführt. Bei dieser Technik wird an eine cDNA durch die Terminale desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) eine begrenzte Anzahl eines Desoxynukleotids an das 3'-Ende angefügt. Man erhält eine sogenannte getailte cDNA, die durch PCR mittels eines spezifischen Primers und eines universellen Primers (komplementär zum angefügten Desoxynukleotidschwanz) amplifiziert werden kann (Abb. 3.2.).

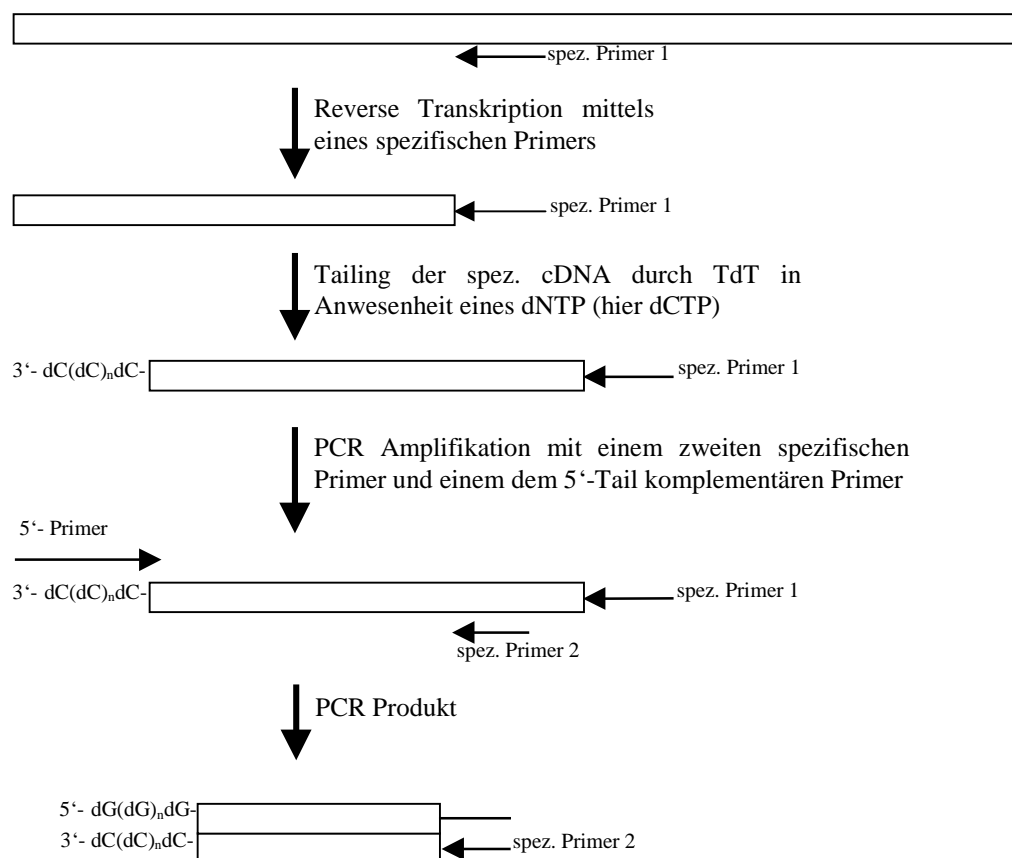


Abb. 3.2: Schema zur Durchführung einer 5'-RACE-PCR

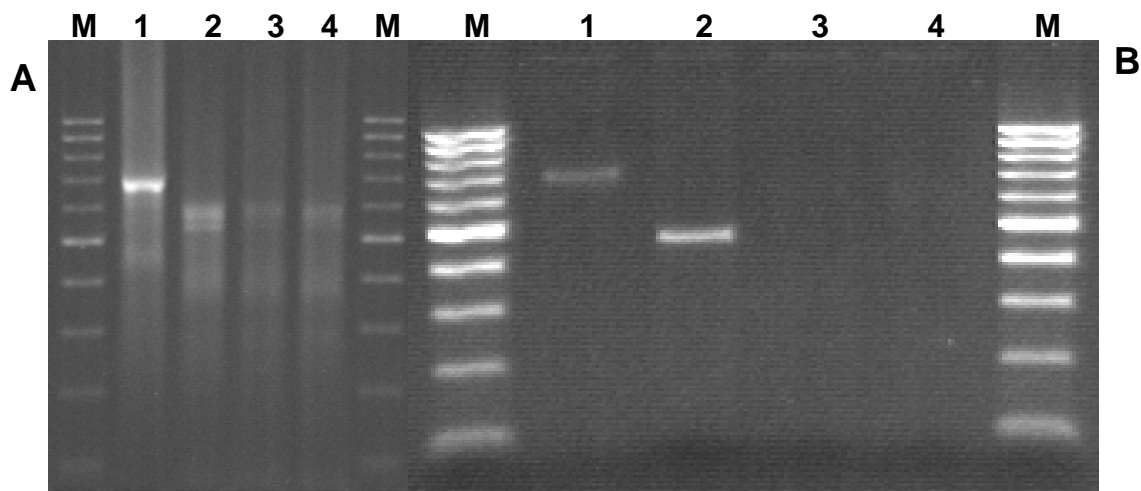


Abb. 3.3: Bullen CRISP 5'-Race PCR-Produkte vor (A) und nach (B) Aufreinigung der Produkte, 1- Testis, 3'-Primerkombination 2884/2886, 2-4: Epididymis, 3'-Primerkombination (spez. Primer 1 / spez. Primer 2): 2741/2742, 2741/2741, 2742/2742

Um eine erfolgreiche Amplifikation zu erreichen, mußten verschiedene Kombinationen von 3'-Primern getestet werden. Aus jeweils einem Ansatz konnte ein RACE-PCR Produkt für das Transkript des Hodens (Primerkombination: 2884/2886) bzw. Nebenhodens (Primerkombination 2741/2742) aufgereinigt werden (Abb. 3.3). Die Verwendung nur eines 3'-Primers für cDNA Synthese und PCR führt in beiden Fällen zu keinem Produkt (Abb. 3.3, Bahnen 3,4)

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend über T-A Klonierung in den Vektor pGem-T eingefügt und in E. coli JM 109 transformiert. Positive Klone wurden durch PCR-Screening (M13-Primer) identifiziert, anschließend in 4 ml Übernachtskulturen vermehrt und das Plasmid isoliert. Die Sequenzierung erfolgte über M13-Primer Positionen auf dem Vektor, da so die gesamte eingefügte Sequenz erhalten werden kann. Obwohl ein PCR-Produkt für das testikuläre, wie auch für das epididymale Transkript erzeugt und aufgereinigt werden konnte (Abb. 3.3), gelang eine Klonierung des epididymalen RACE-Produkts nicht.

Für das testikuläre Transkript konnte die vollständige kodierende Sequenz von 735 Nukleotiden, für das epididymale Transkript ein Teilbereich der kodierenden Sequenz von 300 Nukleotiden erhalten werden. Die Bestimmung von Leseraster und potentiellm Signalpeptid erfolgte anhand der Homologie zu bereits vorliegenden CRISP-Sequenzen. Die cDNA Sequenzen wurden an die Datenbank des EMBL unter der Bezeichnung bovines CRISP-1 für die Sequenz des epididymalen Transkriptes (AJ277709) und bovines CRISP-2 für die Sequenz des testikulären

Transkriptes (AJ277708) zur Veröffentlichung eingereicht. Die Benennung erfolgte aufgrund des exprimierenden Gewebes nach Eberspaecher et al. (1995). Die Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu CRISP-Proteinen anderer Spezies zeigen in der Tat auch die höchsten Übereinstimmungen entsprechend dieser Einordnung (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz boviner CRISP-Proteine zu homologen Proteinen anderer Spezies, hs-Mensch, ec-Pferd, ss-Schwein, rn-Ratte, mm-Maus, cp-Meerschweinchen (FASTA 3, Blosum 50 Matrix)

Protein	bovines CRISP-1 AS [% Identität]	SwissProt Eintrag.
hs CRISP-1	63,0	P54107
ec CRISP-1	<b>72,0</b>	O77719
rn CRISP-1	39,8	P12020
ss CRISP-1	<b>75,0<sup>a</sup></b>	O77816
mm CRISP-1	39,7	Q03401

Protein	bovines CRISP-2 AS [% Identität]	SwissProt Eintrag.
hs CRISP-2	82,8	P16562
ec CRISP-2	<b>93,9</b>	O77720
rn CRISP-2	69,3	O88205
ss CRISP-2	<b>85,5</b>	O77187
mm CRISP-2	71,7	P16563
cp CRISP-2	79,9	Q60477

<sup>a</sup> ss CRISP-1 zu bt CRISP-1 nicht erfaßt, manuelle Berechnung % identische Aminosäuren

Die cDNA Teilsequenz des epididymalen Produktes kodiert für die carboxyterminalen 98 Aminosäuren des bovinen CRISP-1 und enthält 13 der 16 konservierten Cysteine der CRISP-Familie. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist die für Typ 1 charakteristischen Sequenzabschnitte –YLY- und –TEIK- (Unterstreichung Abb. 3.4) auf. Ein Alignment verschiedener bekannter CRISP-1 Sequenzen zum bovinen CRISP-1 ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

bt CRISP-1	TSYLIG <b>CGM</b> SSCHK--GIH <u>YLYI<b>CHY</b>CHE</u> GNDPDKKNVP YNKGSP <b>CGDC</b>
ec CRISP-1	.....I ...S.RRSTQ ...V..... ..M.T..K..
hs CRISP-1	.....AI A..RQQGSPR ...V..... ...ET..E. .KT.V..EA.
ss CRISP-1	.....L ...G...SA. ....N...E. .RR.T.....
rn CRISP-1	NSTF.VA..V AE.PDQ-PLK .F.V....PG ..YVGRLYS. .TE.E..DS.
bt CRISP-1:	QNN <b>CE</b> DKL <b>CT</b> NP <b>C</b> IYYDEYN NCNTQTQRLG <b>C</b> NHLSVQRL <b>C</b> KAS <b>CM</b> CQTEI K
ec CRISP-1	P.D...R... ...L....S. K.K..KEA.. .S....KLF. ..T.L.D... .
hs CRISP-1	PS..... ..F D.DI.VHY.. ...STTILF. ..T.L.D... .
ss CRISP-1	PDY..... ..L.....S ..KA..RGP. .S.V...Q.. ....L.H... .
rn CRISP-1	PG....G... .S.E.E.N.S ..GDLKKMVS .DDPLLKEG. R...F.EDK. H

Abb. 3.4: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von bovinem CRISP-1 mit homologen Proteinen aus anderen Spezies, (.)- identische Aminosäuren, hs- Mensch, ec- Pferd, ss- Schwein, rn- Ratte

Das offene Leseraster der CRISP-2 mRNA kodiert für 244 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1-20 stellen ein potentiell hydrophobes Signalpeptid dar. Das reife Protein würde demnach aus 224 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 24789 Da bestehen. Konserviert sind die Positionen der für CRISP-Proteine charakteristischen 16 Cysteine, wie auch weitere konservierte Sequenzabschnitte bekannter CRISP-2 Proteine (Abb. 3.5).

bt	CRISP-2	<u>MALLPVVMFL</u>	<u>AAVLLPSLPT</u>	<u>EGKDPAFSAL</u>	LTTQTQVQRE	IVNKHNELRK
ec	CRISP-2	..F.....	.....	..-....-	.....	.....
ss	CRISP-2	.....M.L..	.....F..	.....C.T..	..S.P.I.K.	..A.....R
hs	CRISP-2	.....L-..	VT.....A	.....T..	....L.....	.....
rn	CRISP-2	..WFQ.ML.V	F.....LP..	.....D.AT.	T.N.I.....	..IA.....R
bt	CRISP-2	S-VSPPASNML	KMEWSREATA	NAQKWANKCT	LEHSSADDRK	TSTRCGENI
ec	CRISP-2	.SL.....	.....S	..KR.....	.....	.....
ss	CRISP-2	..-.....	.....TS.	.....	.....NP....	..K...L
hs	CRISP-2	A.....	.....V.T	..R-.....	.Q..DPE...	.....L
rn	CRISP-2	Q.....G..I.	....NVQ.A.	.....N.I	.....TE...	INIK...L
bt	CRISP-2	YMSSDPTPWS	DAIQSWYDES	LDFTYGVGPK	SAGSVVGHYT	QAVWYSSFRV
ec	CRISP-2	.....	.....T.....	.....	.....	.....Y..
ss	CRISP-2	.....AA..	.....F..R	H..V..A...	.SSK.....	.L...Y..
hs	CRISP-2	.....S..	S.....I	..V.....	.PNA.....	.L...TYQ.
rn	CRISP-2	...T...S.R	TV.....E.N	EN.VF...A.	P-N.A	....L.....K.
bt	CRISP-2	<u>GCGIAYCPNQ</u>	<u>ESLKYYYVCQ</u>	<u>YCPAGNNVSK</u>	<u>KNTPYQQGAP</u>	<u>CGSCPGNCDN</u>
ec	CRISP-2	.....	.....	...V...N.	.....H.	.AM.....
ss	CRISP-2	.....	.N.....	...P.....	.....KE.T.	.A...D..D
hs	CRISP-2	.....	D.....	.....MNR	.....T.	.AG..DD..K
rn	CRISP-2	...V.....	DT...F...H	...M...M.	.S...H..T.	.A...N....
bt	CRISP-2	GLCTNTCEYE	DLLSNCDSLK	QTAGCEHELL	KEKCKATCLC	EGKIY
ec	CRISP-2	.I...S....	.....	KQ.....	.....R.	.S...
ss	CRISP-2	.....Q..	.....	K...G....	.....	.....
hs	CRISP-2	.....S.Q.Q	.....	N.....	.....	.N...
rn	CRISP-2	.....S.DF.	.....E...	SS...K....	.A..E.....	.D..H

Abb. 3.5: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von bovinem CRISP-2 mit homologen Proteinen aus anderen Spezies, (.)- identische Aminosäuren, hs- Mensch, ec- Pferd, ss- Schwein, rn-Ratte

Auch die abgeleitete Aminosäuresequenz von bovinem CRISP-2 weist die für diesen Typ charakteristischen Sequenzabschnitte auf (-YYY-, -TPY- und -KIY-, Unterstreichung Abb. 3.5).

### 3.1.2 Transkription und Expression von bovinen CRISP-Proteinen im männlichen Genitaltrakt des Rindes

Durch RT-PCR konnte in Hoden, Nebenhodenkopf und –körper die Transkription von bovinen CRISP-Proteinen nachgewiesen werden. In cDNA Proben der akzessorischen Geschlechtsdrüsen konnten keine Transkripte für CRISP-Proteine durch RT-PCR mit dem Primer 2740 detektiert werden (Abb. 3.6). Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß eine Transkription eines dritten Mitglieds der CRISP-Familie (CRISP-3), dessen mRNA-Sequenz in diesem Sequenzbereich nicht homolog ist, stattfindet.

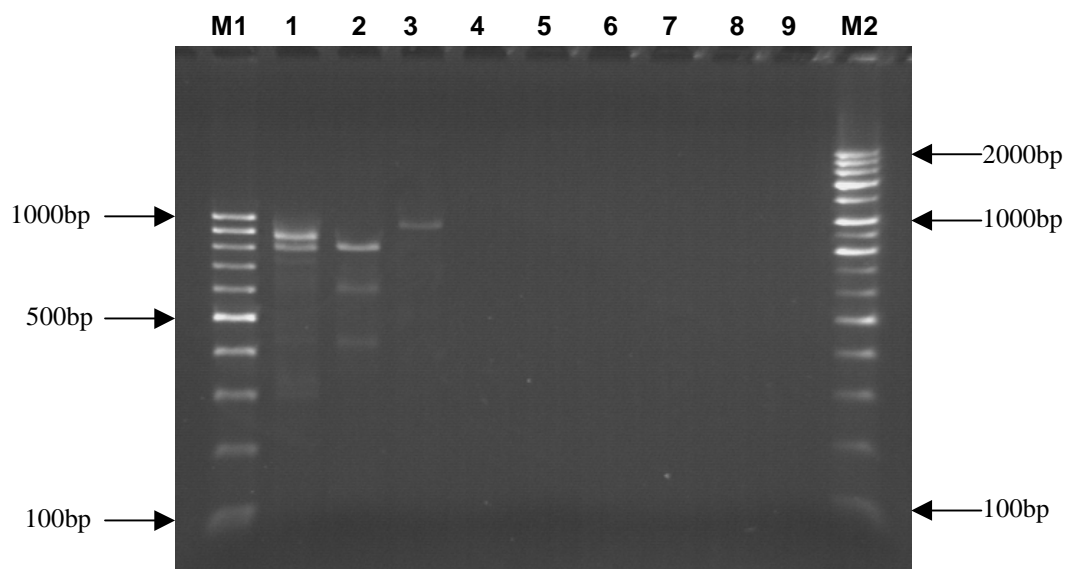


Abb 3.6: Nachweis von bovinen CRISP-Transkripten durch RT-PCR mit einem sequenzspezifischen Primer (2740) und einem universellen Oligo(dT)-Primer (2695), Agarosegel 2%, Ethidiumbromidfärbung, M1- 100bp Standard, 1- Hoden, 2- Nebenhodenkopf, 3- Nebenhodenkörper, 4- Nebenhodenschwanz, 5- Ampulle, 6- Samenblase, 7- Prostata, 8- Speicheldrüse, 9- Kontrolle, M2- 100/200bp Standard

Die Expression von CRISP-Proteinen im Genitaltrakt des Bullen wurde durch Western Blotting von Gewebsextrakten untersucht. Das zur Verfügung stehende aviäre Antiserum aus Huhn gegen HPLC-gereinigtes equines CRISP-3 zeigte Kreuzreaktionen sowohl mit equinem als auch mit porcinem CRISP-1 und CRISP-2 (Schambony 1999). Diese Kreuzreaktion tritt auch mit bovinem CRISP-1 und CRISP-2 auf (Abb. 3.7).

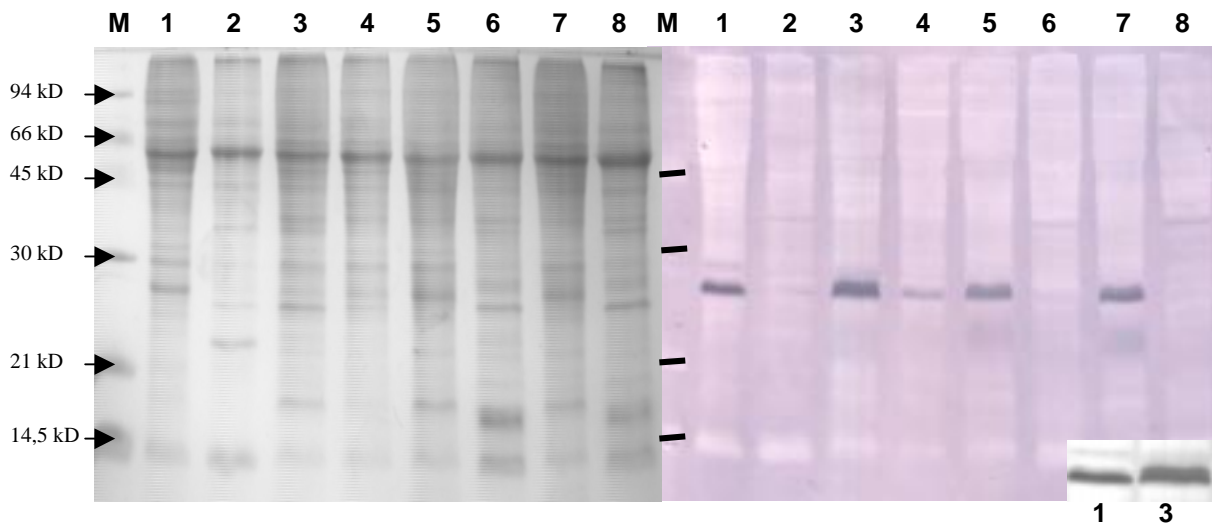


Abb. 3.7: Nachweis der Expression boviner CRISP-Proteine durch Western Blotting mit einem CRISP-spezifischen Antiserum aus Huhn, links: SDS-Paage 15%, Färbung CBB, rechts: Western Blot, Färbung NBT/BCIP, Ausschnitt: Vergrößerung aus Bahn 1 und 3 des Blots, M- Molekulargewichtsstandard, 1- Hoden, 2- Nebenhodenkopf, 3- Nebenhodenkörper, 4- Nebenhodenschwanz, 5- Ampulle, 6- Samenblase, 7- Prostata, 8- Speicheldrüse

Ein positiver Nachweis für CRISP-Proteine konnte in Hoden, Nebenhodenkörper und -schwanz, Ampulle und Prostata geführt werden (Abb. 3.7). Im Vergleich mit der Probe des Hodengewebsextraktes kann eine schwache Bande bei gleicher Masse im Extrakt des Nebenhodenkopfgewebes erkannt werden, die sich jedoch nicht wesentlich vom Hintergrund der Färbung abhebt. Im Hoden kann nur ein Protein nachgewiesen werden, während in den Extrakten von Nebenhodenkörper, Nebenhodenschwanz, Ampulle und Prostata eine Doppelbande zu erkennen ist (vergl. Ausschnitt Abb. 3.7). Eine Berechnung des Molekulargewichts anhand der Laufstrecken der aufgetragenen Standardproteine ( $R_f \sim \log MW$ ) ergibt für das testikuläre Protein ein Molekulargewicht von 26,8 kD und für die Proteine aus Nebenhodenkörper, Nebenhodenschwanz, Ampulle und Prostata ein Molekulargewicht von 26,8 kD und 27,8 kD. Der Nachweis von CRISP-Proteinen im Western Blot lässt keine eindeutigen Rückschlüsse auf das Gewebe zu, in welchem das Protein exprimiert wird. Proteine der CRISP-Familie konnten auf den Spermatozoen nachgewiesen werden (*Schambony et al. 1998*), somit kann ein positiver Nachweis auch in Geweben geführt werden, die kein CRISP-Protein exprimieren, sofern Spermatozoen im Lumen dieser Gewebe vorhanden sind (z.B. Nebenhoden) oder durch Relaxation nach dem Schlachten des Tieres in dieses Lumen eindringen können (z.B. Ampulle, Prostata).

Weder durch die RT-PCR mit dem Primer 2740, noch durch das Western Blotting kann eine Transkription und Expression eines bovinen CRISP-3 ausgeschlossen werden. Die geringen Unterschiede im Molekulargewicht führen beim Pferd lediglich zur Detektion von 2 Banden unterschiedlicher Größe, obwohl durch RT-PCR die Transkription und durch Immunhistologie die Expression von drei Mitgliedern der CRISP-Familie belegt werden kann.



## 3.2 Equines P47

### 3.2.1 Identifizierung und Sequenzierung von equinem P47

Mitglieder der P47-Familie könnten bei der Ovidukt Interaktion oder der *Zona Pellucida* Bindung eine Rolle spielen. Eine bedeutende Funktion im Befruchtungsgeschehen sollte sich in der Konservierung zwischen den Säugetierspezies widerspiegeln (*Enßlin et al. 1998*). In equinen Gewebsextrakten konnte mit einem polyklonalen Antiserum aus Huhn ein Antigen im Western Blot identifiziert werden (*A. Läkamp, E. Töpfer-Petersen, pers. Mitteilung*). Die Abschätzung des Molekulargewichts im SDS-Gel mit ca. 45 kD unterstützt die Vermutung eines P47-homologen Proteins. Da das Probenmaterial gerade fertiler Tiere begrenzt ist, wurde ein molekularbiologischer Ansatz zum Nachweis und zur Sequenzierung des equinen Homologons von P47 gewählt. Als Ausgangsmaterial stand Hodengewebe eines adulten fertilen Hengstes zur Verfügung. Mittels Oligo(dT)-Dynabeads wurde poly(A)-RNA aus dem Gewebe isoliert und zur RT-PCR nach 2.4.3 eingesetzt. Für die Amplifikation wurden Primer verwendet, die in konservierten Regionen der beim Schwein und Rind gefundenen DNA-Sequenzen liegen. Eine erniedrigte Annealing-Temperatur ( $\Delta T=15^{\circ}\text{C}$ ) im Vergleich zu den Reaktionsbedingungen bei der Sequenzierung der bovinen und porcinen Homologen (*Enßlin et al. 1998*) sollte eine Anlagerung zwischen Primer und Zielsequenz auch bei mehreren Basenfehlpaarungen (*Mismatches*) ermöglichen und damit eine Amplifikation erlauben.

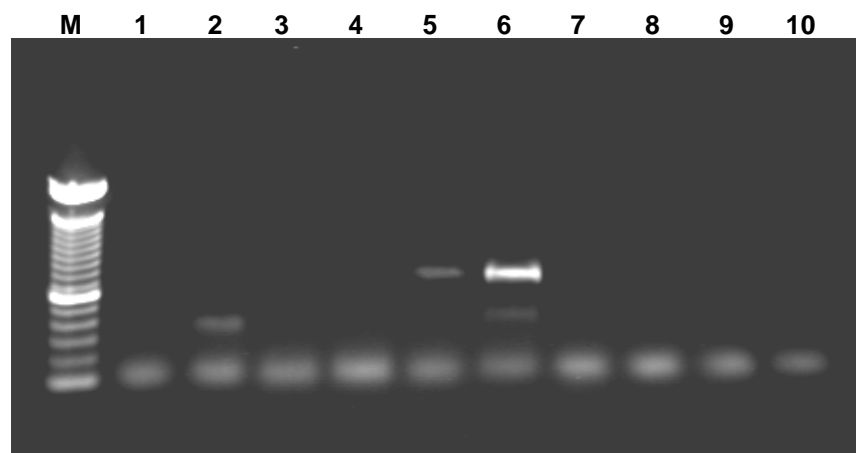


Abb. 3.8: Agarose-Gel verschiedener Primer-Kombinationen zur Amplifikation equiner P47 cDNA-Fragmente, M- Marker, 1- ME2/ME6, 5% DMSO, 2- ME2/ME6, 3- ME3/ME5 5% DMSO, 4- ME3/ME5, 5- ME2/ME3 5% DMSO, 6- ME2/ME3, 7- ME2/ME1 5% DMSO, 8- ME2/ME1, 9- ME6/ME1 5% DMSO, 10- ME6/ME1

PCR-Produkte wurden für die Primer-Kombinationen ME3/ME2 und ME6/ME2 erhalten. Der Zusatz von 5% DMSO (Spezifitätserhöhung) führte bei ersterer Kombination zu einer geringeren Ausbeute und zur Eliminierung des kleineren Nebenproduktes (Abb. 3.8, Bahn 5), während ein Amplifikat mit der Primerkombination ME6/ME2 nur ohne DMSO erhalten wird (Abb. 3.8, Bahn 1,2). Die PCR-Produkte wurden mittels *High Pure Purification Kit* aufgereinigt, mit dem Vektor pGEM-T ligiert und in *E.coli* JM109 transformiert. Positive Klone wurden durch PCR-Screening selektiert. Mehrere Klone wurden in 4 ml Kulturen vermehrt und die Plasmide isoliert. Die Sequenzierung der Inserts erfolgte durch PCR-Sequenzierung mit M13-Primern auf einem *Direct Blotting* System (vergl. Methoden).

Anhand dieser bekannten Teilsequenz konnten spezifische Primer konstruiert werden, um eine vollständige Sequenzierung des Fragments durchzuführen. Die spezifischen Primer erlaubten weiterhin eine Optimierung der PCR mit dem Mismatch-Primer ME1 und die Sequenzierung eines weiteren 5'-terminalen Bereichs (Abb. 3.9).

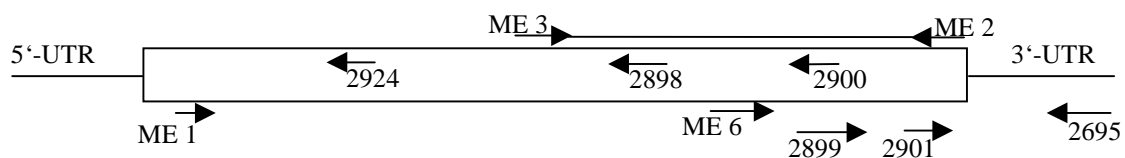


Abb. 3.9: Positionen der Sequenzierprimer auf der mRNA von equinem P47, Pfeile: Primer (Pfeilspitze in Amplifikationsrichtung)

Der sequenzierte mRNA-Bereich umfaßt 1089 Nukleotide und damit nahezu den gesamten für das sekretierte Protein kodierenden Anteil. Die Sequenz zeigt eine hohe Homologie zu den für Rind und Schwein gefundenen DNA-Sequenzen. Als Kreuzkontaminationskontrollen wurden parallele Sequenzierungen von Amplifikaten gleicher Primer-Kombinationen der verwendeten testikulären poly(A)-RNA Proben dieser Spezies durchgeführt. Die Ergebnisse konnten Kreuzkontamination eindeutig ausschließen und bestätigten die hohe Homologie der mRNA Sequenzen zwischen den einzelnen Spezies. Die equine Sequenz wurde zum Eintrag in die EMBL Datenbank eingereicht (AJ010121).

Die Degeneration des genetischen Codes erlaubt den Austausch einzelner Basen bishin zu ganzen Codons. Es wird daher anhand der abgeleiteten

Aminosäuresequenz eine höhere Homologie bestimmt als für die mRNA Sequenz. In Tabelle 3.2 sind Identität und Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen zu equinem P47 (ec P47) dargestellt.

Tab. 3.2: Identität und Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von Proteinen der P47-Familie zu equinem P47 (ec P47)

Spezies	Identität der Aminosäuren	Ähnlichkeit der Aminosäuren	Datenbank Nr. (Swiss Prot)	Anmerkungen
Schwein	80 %	92 %	P79385	testikuläres Protein
Rind	80 %	91 %	Q95114 / E1188582	testikuläres Protein
Maus	71 %	87 %	E1188599	testikuläres Protein
Ratte	69 %	87 %	P70490	testikuläres Protein
Mensch	62 %	81 %	Q08431	nur Brustdrüsen-Protein bekannter Tumormarker, erste EGF-ähnliche Domäne fehlt

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des equinen P47 weist die gleiche Domänenabfolge von zwei EGF- und zwei C-Typ ähnlichen Bereichen wie seine Homologen aus anderen Spezies auf. Konserviert sind neben dem Integrinwechselwirkungsmotiv -RGD- (AS 68-71) auch die Disulfidbrücken bildenden Cysteine der jeweiligen Domänen (Andersen *et al.* 1997) und potentielle Glykosierungsstellen (Enßlin *et al.* 1998, vergl. Abb. 3.10)

```

EGF1 (AS 1-43):
ec:          TCLLGEDDL-PFYCLCPQGFTGLICNET
bt:  ASGDFCDSSLCLHGG.....E...-.....E.....
ss:  FSGDFCDSSLCLNGG...DQ...K..H...E.....
mm:  ASGDFCFSLCLNGG...T.Q.ND--I.....E.S...V...
rn:  ASGDFCDSSLCLNGG...M.Q.ND--I.....EG...V...
                                     ***

EGF2 (AS 44-89):
ec:  EKGPCFPNPCQNDGECHVIDDSHRGDVFTQYICSCPRGYTGTHCETT
bt:  .H.....H..A..Q.T...RGD..I...K..L..V..I.....
ss:  .....H..A..E...A.RGD...E...K..H...I...II
mm:  .R.G.S...Y..AK.L.TL.TQRGDI..E...Q..V..S..I...G
rn:  .....S....FH.AK.L.TE.TQRGDI..E...Q..V.YS.I...LG

C1 (AS 90-257):
ec:  CAMPLGMETGAIADAQISASSVYFGFMGLQRWVPELARLHHTGIVNAWTA
bt:  .TS...Q.....S.....MHL.....A.....Q.....S
ss:  .NA.....F.....MHL.....A.....RA.....
mm:  .STQ...GG...S.....M.....G.....YR.....
rn:  .STK..L.G.....S.....M.....G.....YR.....

ec:  GNYDKNPWIQVNLMRKMRVTGVVTTQASRAGTAEYLKTFKVAYSVDGRKF
bt:  .....W.....S.....T...Q...
ss:  S...R.....L.R.....S...M.....T.....
mm:  S...SK.....L...S..M.....R.....L.....
rn:  SS..SK.....DFL.....S..M.....R.....L...R...

ec:  QFIRDAGESGDKVFGVGNVNSGLKVNMFVPLEVTYVRLVPLACHHGCTRRFELLGC
bt:  ...QV...R...I..I.....I.L..T...TQ.....II..R.....
ss:  ...QG.E...I.M..LD.....L.E...Q.....II..R...L.....
mm:  E..Q-DESG...E.L..LD.NS.....NPT..AQ.I.LY.VS..R...L.....
rn:  E..Q.ESGT...E.M..QD.NS...I...NPT..AQ.I.LY.VS..R...L.....
                                     ****

C2 (AS 258-406):
ec:  EVNGCAEPLGLEDNSIPDRQITASSTYRTRGLNAFSWYPFYARLDKQGFNA
bt:  .L...T.....K..T..NK.....Y.K.W..S...F.Y...N.....
ss:  .LS.....K..T..NK.....F..W..S.....N.....
mm:  .LH..S.....KN.T...S.MS...S.K.WN.R..G...HLG...N..I..
rn:  .LH..S.....KN.T...S.....S.K.WN.R..G...HLG...N..I..
                                     ***

ec:  WTAQSNSASEWLQDDLGSQKEVTGVITQGARDFGHIQYVDAYKVSHSDDGAN
bt:  ....T.....I.....R..I.....A..R.AYG...VT
ss:  .....I.....RR...I.....A...AY...VS
mm:  .....K...V...T.RQ...I.....AQS...A...VQ
rn:  .....K...V...T..K..I.....AS...A...VQ

ec:  WTEYRDQRAADSKIFLGNLDNNSHKKNIFETPFLARFVRIQPVAWHNRITLRLLELLGC
bt:  ...K.PG.SE...P..M.....Q.....
ss:  .....G.LEG...P.....M.....T.....L.....V.....
mm:  ..D.EE.GSS--V.Q.....K..M..Y..VL..S.....V.....
rn:  ..V.EE.GTS--V.Q.....K..M..Y..VL.LS.....
                                     ***

```

Abb. 3.10: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von equinem (ec) P47 und homologen Proteinen aus Rind (bt), Schwein (ss), Maus (mm) und Ratte (rn), (-)– Sequenzlücke, (\*)– potentielle Glykosylierungsstellen, (.)– identische Aminosäuren, rot: Disulfidbrücken-bildende Cysteine, blau: Disintegrinmotiv, Unterstreichung: potentieller Membran-bindender Sequenzbereich (vergl. 4.2.1, S. 113)

### 3.2.2 Transkription von P47 im männlichen Genitaltrakt des Pferdes

Die Gewebs-spezifische Transkription des equinen P47 wurde durch RT-PCR vergleichend zum Rind untersucht.

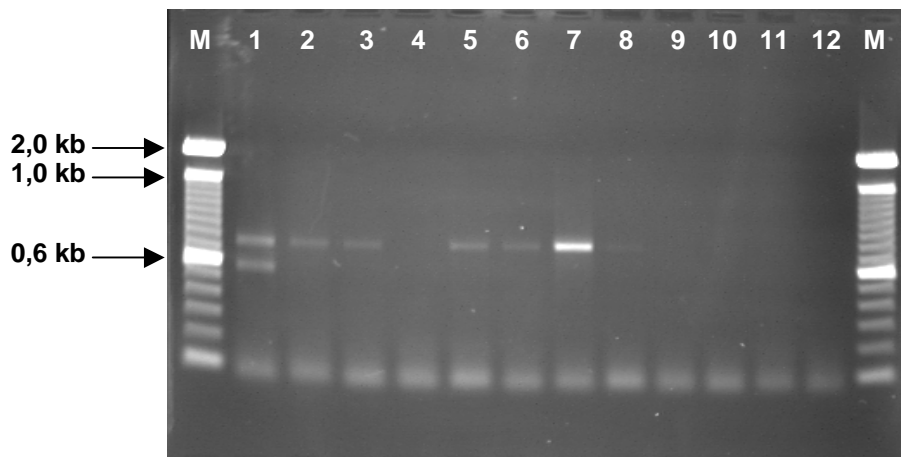


Abb. 3.11: Transkription von P47 in equinem Gewebe durch RT-PCR (Primer ME1-2900) M- Standard, 1- Hoden, 2- Nebenhodenkopf, 3- Nebenhodenkörper, 4- Nebenhodenschwanz, 5- Samenleiter, 6- Ampulle, 7- Samenblase, 8- Prostata, 9- Bulbourethaldrüse, 10- Speicheldrüse, 11- Leber, 12- Negativ-Kontrolle (kein *Template*), M- Standard

Für die RT-PCR wurden Primer (ME1-2900) ausgewählt, die ein Amplifikat erzeugen, welches den Sequenzbereich, der für beide EGF-Domänen, die erste C-Typ Domäne und Teile der zweiten C-Typ Domäne kodiert, umfaßt. Amplifikate der erwarteten Größe können damit nur entstehen, wenn diese Sequenzabfolge vorliegt. Dieses Vorgehen gewährleistet eine höhere Spezifität im Vergleich zu Primerkombinationen, deren Amplifikate jeweils nur Sequenzbereiche einer oder zwei Domänen umfassen, da beide, EGF-Typ und C-Typ Domäne, in verschiedenen anderen Proteinen auftreten. Als kritisch erwies sich die vollständige Denaturierung des Templates. Mangelnde Denaturierung der RNA Sekundärstruktur (z.B. „*Haarnadelbildung*“) führt zur Amplifikation eines Teilfragmentes des erwarteten Amplikons und kann auf die hohe interne Homologie der EGF-Domänen zurückgeführt werden. Die in Abbildung 3.11, Bahn 1 erkennbare Nebenbande weist eine Differenz von ca. 120-140 bp auf und entspricht damit der Größe des für eine EGF-Domäne von 40 Aminosäuren kodierenden Bereichs.

Vergleichend wurde eine Gewebsverteilung der P47 Transkription auch für das bovine Gewebe durchgeführt. In vorhergehenden Arbeiten wurde auf die Unterscheidung der verschiedenen Nebenhodenabschnitte verzichtet. Es stellte sich daher die Frage, ob auch beim Bullen der Nebenhodenschwanz kein P47 transkribiert.

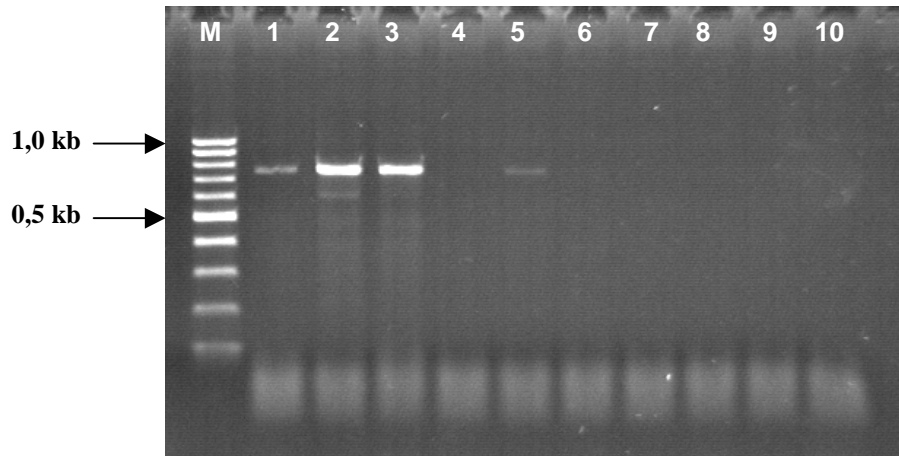


Abb. 3.12: Transkription von P47 in bovinem Gewebe durch RT-PCR (Primer ME1-2900), M- Marker, 1- Hoden, 2- Nebenhodenkopf, 3- Nebenhodenkörper, 4- Nebenhodenschwanz, 5- Ampulle, 6- Samenblase, 7- Prostata, 8- Bulbourethraldrüse, 9- Speicheldrüse, 10- Negativ-Kontrolle (kein *Template*)

Beim Bullen tritt, ebenso wie beim Hengst, keine Transkription von P47 im Nebenhodenschwanz auf. In mRNA-Proben der akzessorischen Geschlechtsdrüsen kann ein positiver Nachweis nur in der Probe der Ampulle geführt werden, während beim Pferd auch in der Samenblase das P47-Gen transkribiert wird.

### 3.3 Isolierung von Seminalplasma-Proteinen

Die Isolierung von Seminalplasma-Proteinen wurde in zahlreichen Veröffentlichungen ausführlich beschrieben (vergl. Methoden 2.2.11). In den folgenden Abschnitten werden deshalb nur Veränderungen, Anpassungen und neue analytische Kontrollen, die zur Reproduzierbarkeit und optimierten Isolierung beitragen, angeführt. Das Seminalplasma kann in Zusammensetzung und Volumen variieren. Die Variation ist vom Individuum und den damit verbundenen Parametern, wie zum Beispiel Gesundheit, Ernährung, Alter und Konditionierung auf die Ejakulatabnahme, wie auch von saisonalen Schwankungen abhängig. Um eine Reproduzierbarkeit über mehrere Präparationen zu gewährleisten, wurden Ejakulate nach Abtrennung der Spermien in *Pools* von 200-300 ml (Bulle: 30-40 Ejakulate, Hengst: 3-5 Ejakulate, Eber: 2-3 Ejakulate) vereinigt und aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

#### 3.3.1 Equine Seminalplasmaproteine – FnII-Typ Proteine

Die in der Literatur beschriebene Isolierung von HSP-1/2, den FnII-Typ Proteinen des Hengstes (*Calvete et al. 1995, 1997a*), wurde aufgrund der Feststellung einer Kontaminante mit Phospholipase-Aktivität in der ESR-Spektroskopie modifiziert (*A. Greube, pers. Mitteilung*). Die Kontaminante kann durch Waschen der an PC-Agarose gebundenen Proteine HSP-1/2 mit 10 mM PC in TBS (drei Säulenvolumina) und 1 M NaCl in TBS (drei Säulenvolumina) entfernt werden.

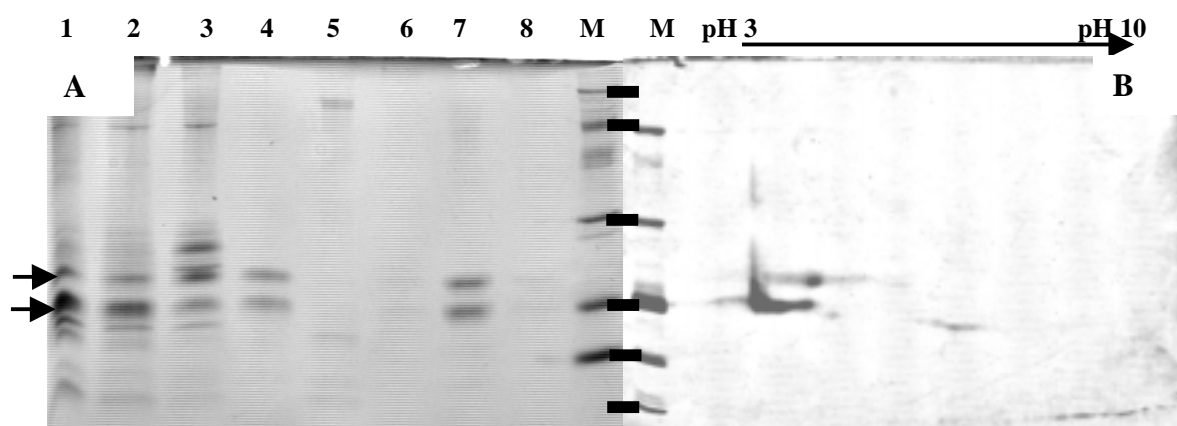


Abb. 3.13: (A) SDS-Gelelektrophorese (12,5%, nicht reduzierend) von Fraktionen einzelner Isolierungsschritte, 1- Seminalplasma, 2- Durchfluß Heparin-Speharose CL-6B, 3- Eluat Heparin-Sepharose CL-6B, 4-Eluat 10 mM PC Heparin-Sepharose CL-6B, 5- Durchfluß PC-Agarose, 6- Eluat 10 mM PC von PC-Agarose, 7- Eluat 100 mM PC von PC-Agarose 8- PC-Agarose nach Elution mit 100 mM PC, M- Molekulargewichtsstandard, Färbung: CBB (B) 2-D Gelelektrophorese von HSP-1/2, 2. Dimension, Auftragsmenge: ca. 4µg Protein, Molekulargewichtsstandard wie (A), Detektion: Silberfärbung  
Pfeile: HSP-1/2, Balken: Proteinstandard 94 kD, 66 kD, 45 kD, 31 kD, 21,5 kd, 14,5 kD

Die gebundenen FnII-Typ Proteine eluieren bei einer Konzentration 100 mM PC in TBS. Zur Charakterisierung der isolierten Fraktion werden SDS-Gele nach 2.2.1, 2-D Gele nach 2.2.5 und RP-HPLC Chromatographien nach 2.3.1 durchgeführt (Abb. 3.13). Die Proteine HSP-1/2 sind heterogen glykosiliert und bilden daher keine diskreten *Spots* in der 2-D Elektrophorese. Die in Abb. 3.13B exemplarisch dargestellte zweite Dimension der 2-D Elektrophorese zeigt eine Verteilung im sauren pI-Bereich (pH 3,5-4,5). Die Proteine eluieren getrennt bei ca. 44 % und 48 % von der RP-HPLC (vergl. 2.3.1).

### **3.3.2 Porcine Seminalplasmaproteine – FnII-Typ und CRISP-Proteine**

Im Gegensatz zum equinen Seminalplasma konnte kein direkter Nachweis von CRISP-Proteinen im porcinen Seminalplasma erfolgen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit der Transkription von porcinem CRISP-2 in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen (*Schambony 1999*).

Um eine Abtrennung niedermolekularer Substanzen und eine Fraktionierung der Proteine des porcinen Seminalplasmas zu erreichen, wurde als erster Trennschritt eine Gelfiltration an Sephadex G50 durchgeführt (Detektion: UV-Absorption 280 nm). Das Eluat wurde fraktioniert und die Fraktionierung anhand von Stichproben durch nicht reduzierende SDS-Gelelektrophorese sowie vergleichende RP-HPLC charakterisiert. Die qualitative Änderung der Proteinzusammensetzung diente als Orientierung für die Vereinigung der Fraktionen zu *Probenpools* (Abb. 3.15A). Ein entscheidendes Merkmal für die Trennung in die *Pools* war die Detektion ein Verlustes oder Zugangs eines deutlich erkennbaren Peaks in der RP-HPLC, die zum Teil aufgrund früherer Arbeiten (*Dostalova et al. 1995*) einzelnen Proteinen zugeordnet werden können.

In den ersten Fraktionen, später in *Pool I* zusammengefaßt, eluieren multimere Aggregate, die sich aus den Spermadhesinen AWN-1, AWN-2, AWN-3, AQN-1, AQN-2, AQN-3 sowie dem FnII-Typ Protein pB1 zusammensetzen. Aus *Pool I* konnte anschließend nach 2.2.11 durch Affinitätschromatographie an PC-Agarose pB1 isoliert werden.



Das Protein pB1 bildet in der zweiten Dimension der 2-D Gelelektrophorese einen diskreten *Spot* mit einem pI-Wert von 4,5-5 und zeigt keine Heterogenität. N-terminale Sequenzierung und das höhere Molekulargewicht in der SDS-Gelelektrophorese im Vergleich zu Aminosäuresequenz ( $\Delta$ MW ca. 4 kD) weisen auf Glykosilierung hin (Abb. 3.14, *Calvete et al. 1997*). pB1 eluiert bei ca. 43 % Laufmittel B von der RP-HPLC (2.3.1).

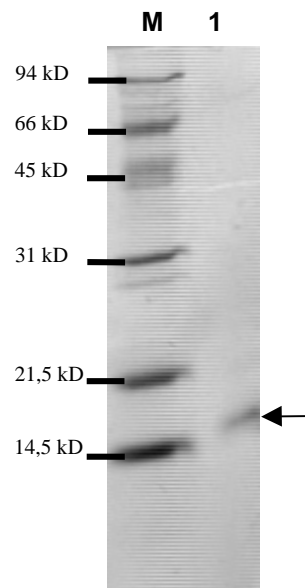


Abb. 3.14: SDS-Gelelektrophorese (15 %) von pB1, Auftragsmenge ca. 1,5  $\mu$ g Protein, Färbung: CBB, M- Molekulargewichtsstandard, 1- pB1-Isolat ( $\leftarrow$ )

In *Pool II* konnte mittels des aviären anti-ec CRISP-3 Antiserums (vergl. 3.1.2) eine kreuzreaktive Komponente identifiziert werden (Abb. 3.15B). Das Molekulargewicht von ca. 26-27 kD entspricht den in Gewebsextrakten detektierten Proteinen CRISP-1 und CRISP-2 (26,8 kD und 27,8 kD). Die Detektion einer weiteren Komponente mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kD konnte bereits in Extrakten der Bulbourethraldrüse beobachtet werden. Es konnte jedoch kein Nachweis eines CRISP-Transkriptes in diesem Gewebe erbracht werden (*Schambony 1999*). Da das Antiserum mit beiden Proteinen kreuzreagiert, kann nicht entschieden werden, um welches CRISP-Protein es sich im Seminalplasma handelt. Eine zu equinem CRISP-3 analoge Isolation des CRISP-Antigens durch Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose CL-6B und Butyl-Sepharose führt nicht zur vollständigen Abtrennung der anderen Seminalplasmaproteine dieses *Pools*.

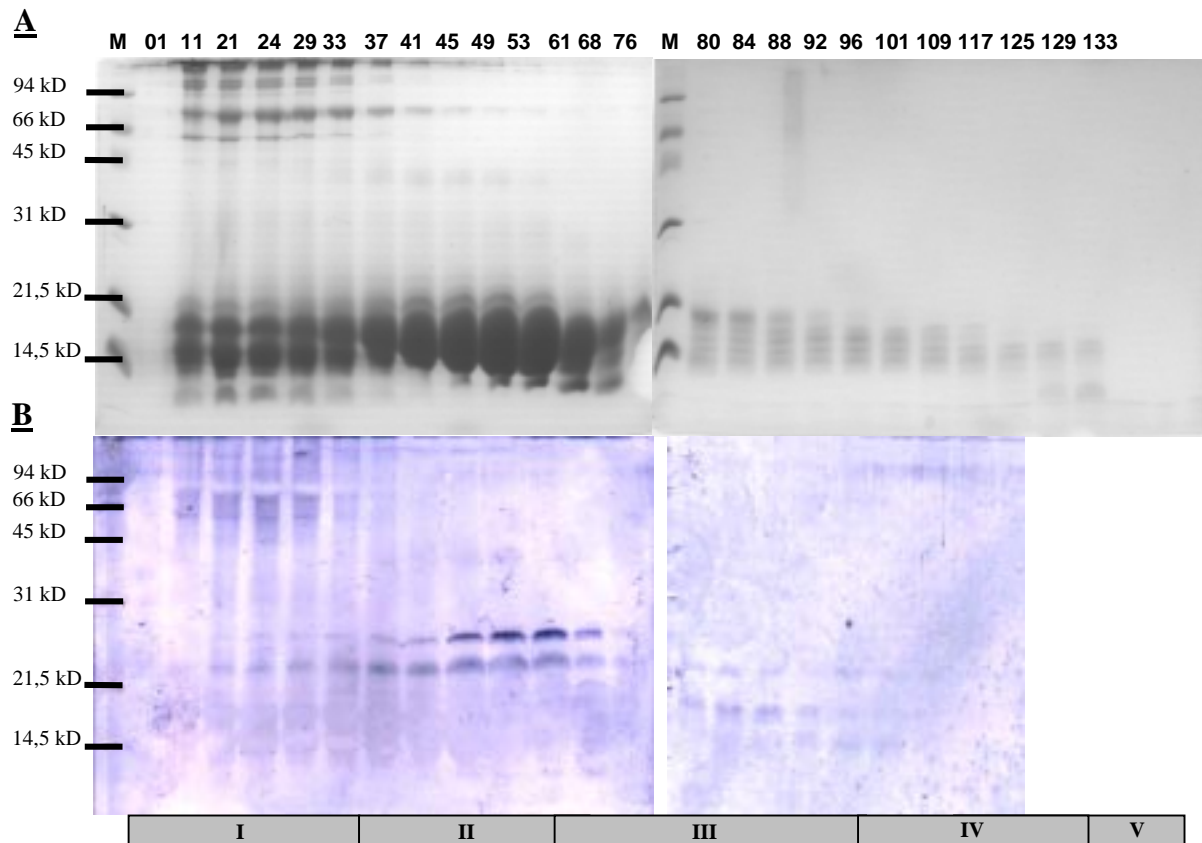


Abb. 3.15: (A) SDS-Gelelektrophorese (15 %, nicht reduzierend) von Seminalplasma-Fractionen nach Gelfiltration an Sephadex G50 (5 cm x 180 cm, Auftragsvolumen: 100 ml, Flußrate: 6 ml/min, Fraktionsvolumen: 9 ml, Detektion: UV-Absorption 280 nm), Probenauftrag: 7,5 µl, Färbung: CBB  
(B) Western Blot mit aviärem anti-ec CRISP-3 Antiserum, korrespondierend zu (A) Detektion: NBT/BCIP  
Nummerierung oben: Fraktionsnummer, M- Molekulargewichts-Marker  
Felder unten: in Pools (I-V) vereinigte Fraktionen

Das equine Seminalplasma wird von den FnII-Typ Proteinen (HSP-1/2, *Calvete et al. 1995*) dominiert. Das equine AWN, als einziger Vertreter der CUB-Typ Proteine, kann durch Affinität zu Heparin isoliert werden. Im porcinen Seminalplasma hingegen stellen die CUB-Typ Proteine den Hauptanteil der Proteinkomponenten. Eine Isolierung der porcinen CRISP-Komponente wird nur durch ein verändertes Protokoll möglich sein, die dieser veränderten Zusammensetzung des Ausgangsmaterials Rechnung trägt.

## 3.4 Funktionelle Untersuchungen von FnII-Typ Proteinen

### 3.4.1 Aggregation von Seminalplasmaproteinen am Beispiel von PDC-109

Viele Seminalplasmaproteine bilden in Lösung (TBS) stabile Homo- und Heterooligomere (*Calvete et al. 1994, 1995, 1996b, Gasset et al. 1997*) Gelfiltrationen, die zur Isolierung von Seminalplasmaproteinen des Bullen und Ebers eingesetzt werden, zeigen beispielsweise, daß PDC-109 mit einem Molekulargewicht  $MW_{obs}$  zwischen 180 kD und 90 kD eluiert. Diese Beobachtung kann auch für die CUB-Typ Proteine der AQN- und AWN-Familien gemacht werden, während das ebenfalls zu dieser Proteingruppe zählende bovine aSFP als Monomer eluiert (*Calvete et al. 1996b*). Welche Bedeutung dieses Verhalten für die physiologische Funktion dieser Proteine hat und ob andere Komponenten des Seminalplasmas dazu beitragen, ist unbekannt. Ein Zusammenhang zwischen Aggregation zu Homo- und Heterooligomeren und der Modulation der Affinität zu anderen Makromolekülen, wie z. B. Heparin, wird diskutiert.

Zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens von PDC-109 wurden Gelfiltrationen mit Superose 12 (Säulenlänge 30 cm, Radius 0,8 cm) an einem FPLC-System durchgeführt. Als Laufpuffer wurde ein 10 mM MOPS-Puffer pH 7,0 gewählt, da dieser auch für biophysikalische Messungen (Kalorimetrie, CD-Spektroskopie) verwendet werden kann, die parallel am Instituto de Quimica-Fisica "Roscasolano" C.S.I.C., Spanien in Kooperation durchgeführt wurden (*Gasset et al. 1997*). Diesem Puffer wurden die Substanzen, von denen angenommen wurde, daß sie die Aggregation von PDC-109 beeinflussen, zugesetzt und anhand der Retentionszeit das beobachtbare Molekulargewicht  $MW_{obs}$  bestimmt. Die Kalibration des Gelfiltrationssystems erfolgte durch einen Molekulargewichtsstandard (Biorad, Thyroglobulin (670 kD), Gamma-Globulin (158 kD), Ovalbumin (44 kD), Myoglobin (17 kD), Cobalamin (1,35 kD)) nach Herstellervorschrift. Es konnte eine lineare Abhängigkeit der Retentionszeit  $t$  vom Logarithmus des Molekulargewichts über einen Bereich von 158 kD bis 17 kD bestimmt werden:

$$\log(MW_{obs}) = -0,0182 \times t + 2,8057, \quad R^2 = 0,9887$$

Für alle Messungen wurde ein standardisierter Fehler von 5% in Bezug auf die Bestimmung der Retentionszeit und des Molekulargewichts angenommen, um

Ungenauigkeiten wie z.B. Ablesefehlern, Temperaturschwankungen und Flußratenschwankungen Rechnung zu tragen (Ausubel et al. 1999).

Die verwendete Präparation setzte sich aus einem Gemisch (1:1) an glykosyliertem (13443 Da) und nicht glykosyliertem Protein (12788 Da) zusammen. Für die Berechnung der Molekülzahl pro Aggregat wurde daher eine Masse von 13,1 kD zugrunde gelegt. Die Interaktion mit Phosphorylcholin (PCh) wurde durch Zusatz von verschiedenen Konzentrationen zum Chromatographiepuffer untersucht. PCh dient in diesem Testsystem und im Rahmen der biophysikalischen Untersuchungen als lösliches Analogon zu Diacylphosphatidylcholin (PC). PDC-109 interagiert mit diesem Membranlipid, wobei davon ausgegangen wird, daß die Wechselwirkung mit der Kopfgruppe ausgebildet wird (Desnoyers et al. 1992). Es kann eine deutliche Abhängigkeit der Oligomerisierung von der PCh-Konzentration im Puffer festgestellt werden (Abb 3.16, Tab. 3.3). Ohne PCh im Puffer wird ein Molekulargewicht  $MW_{obs}$  von ca. 142 kD bestimmt. Dies entspricht einer durchschnittlichen Aggregatgröße von 11 Molekülen. In einem geringen Konzentrationsbereich (1-5 mM PCh) werden diese Aggregate auf ein Molekulargewicht  $MW_{obs}$  von ca. 32 kD (2,5 Moleküle) reduziert. Aggregate dieser Größe werden auch noch für eine Konzentration von 10 mM PCh bestimmt. Erst bei einer Konzentration von 20 mM PCh im Puffer ergibt sich aus der Bestimmung der Retentionszeit ein Molekulargewicht  $MW_{obs}$ , welches einem Dimer (~25 kD) entspricht.

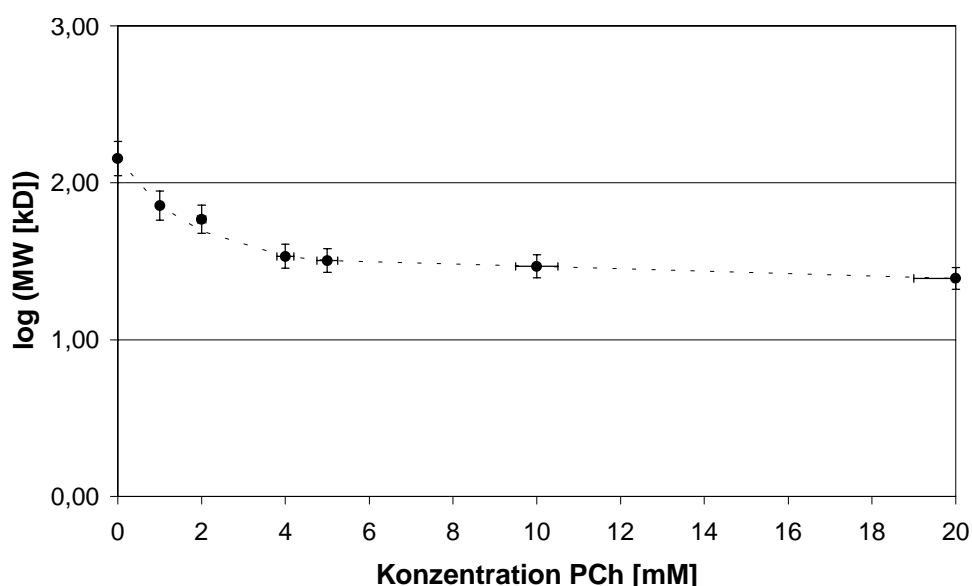


Abb. 3.16: Abhängigkeit des beobachtbaren Molekulargewichts  $MW_{obs}$  von der Konzentration an PCh im Chromatographiepuffer

Tab. 3.3: Meßwerte der Gelfiltrationen mit verschiedenen Konzentrationen an Phosphorylcholin im Chromatographiepuffer

$c_{\text{PCh}}$ [mM]	Retentionszeit [min]	$\log(MW_{\text{obs}} [\text{kD}])$	$MW_{\text{obs}} [\text{kD}]$	Anzahl Moleküle im Aggregat
0	35,75	2,1551	142,9	10,90
1	52,25	1,8548	71,6	5,46
2	57,00	1,7683	58,7	4,48
4	70,00	1,5317	34,0	2,59
5	71,50	1,5044	31,9	2,43
10	73,50	1,4680	29,4	2,24
20	77,75	1,3907	24,6	1,87

PDC-109 bindet auch in Gegenwart hoher Konzentrationen an NaCl an PC-Agarose (p-Aminophenylphosphorylcholin) und DEAE (Diethylaminoethyl)-Sepharose. Der Zusatz von NaCl hat ebenfalls Einfluß auf das beobachtbare Molekulargewicht und damit die Aggregatgröße von PDC-109. Bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM wird ein Molekulargewicht  $MW_{\text{obs}}$  von ca. 20 kD (1,3 Moleküle/Aggregat) ermittelt. Mit höherer NaCl-Konzentration wird dieser Wert nur noch geringfügig verringert bis bei 1 M NaCl das Molekulargewicht  $MW_{\text{obs}}$  eines Monomers (12,4 kD) beobachtet wird (Abb. 3.17, Tab 3.4).

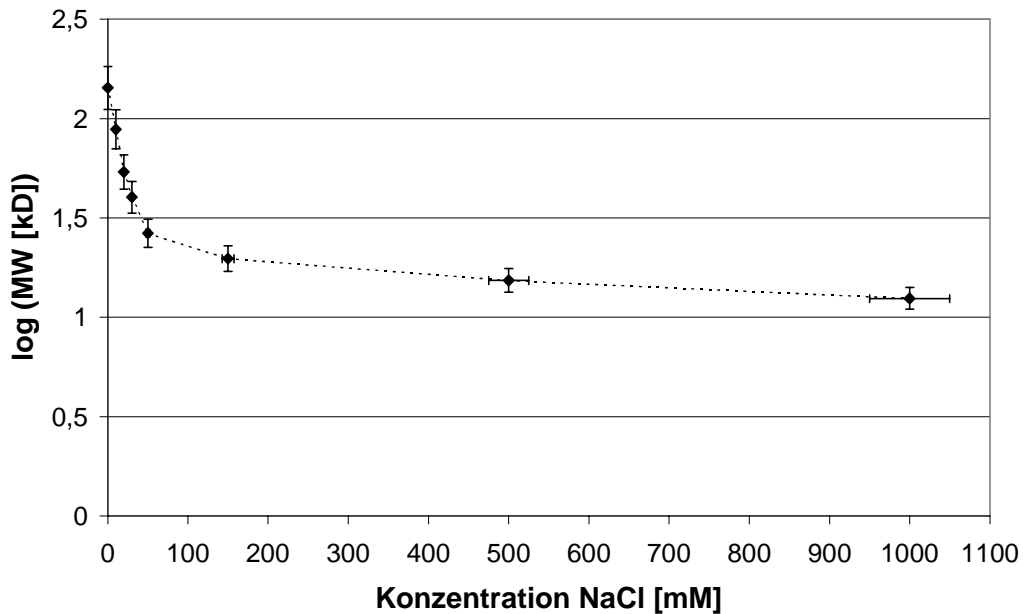


Abb. 3.17: Abhängigkeit des beobachtbaren Molekulargewichts  $MW_{\text{obs}}$  von der Konzentration an NaCl im Chromatographiepuffer

Tab. 3.4: Meßwerte der Gelfiltrationen mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl im Chromatographiepuffer

$c_{\text{NaCl}}$ [mM]	Retentionszeit [min]	$\log(MW_{\text{obs}}[\text{kD}])$	$MW_{\text{obs}}$ [kD]	Anzahl Moleküle im Aggregat
0	35,75	2,155	142,9	10,99
10	47,25	1,94575	88,3	6,79
20	59	1,7319	53,9	4,15
30	66	1,6045	40,2	3,09
50	76	1,4225	26,5	2,03
150	83	1,2951	19,7	1,52
500	89	1,1859	15,3	1,18
1000	94	1,0949	12,4	0,96

Extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  ist essentiell für die *in vitro* Kapazitation und auch das verwendete Phosphorylcholin liegt als  $\text{Ca}^{2+}$ -Salz vor. Die Untersuchung des Einflusses von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stellt somit ein Kontrollexperiment zu den mit PCh durchgeführten Messungen dar. Darüberhinaus ist ein möglicher Einfluß von Calcium auf die Seminalplasmaproteine aufgrund seiner physiologischen Bedeutung in Zusammenhang mit den Signaltransduktionsprozessen während Kapazitation und Akrosomreaktion von Interesse.

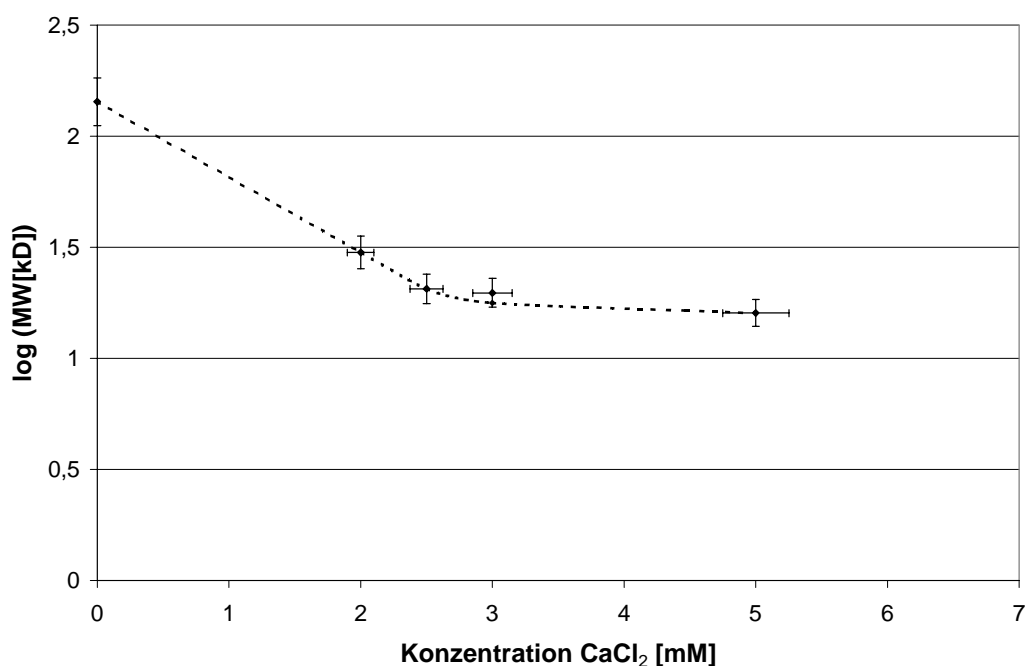


Abb. 3.18: Abhängigkeit des beobachtbaren Molekulargewichts  $MW_{\text{obs}}$  von der Konzentration an  $\text{CaCl}_2$  im Chromatographiepuffer

Tab. 3.5: Meßwerte der Gelfiltrationen mit verschiedenen Konzentrationen an CaCl<sub>2</sub> im Chromatographiepuffer

<sup>c</sup> CaCl <sub>2</sub> [mM]	Retentionszeit [min]	log (MW <sub>obs</sub> [kD])	MW <sub>obs</sub> [kD]	Anzahl Moleküle im Aggregat
0,0	36	2,155	142,9	10,99
2,0	73	1,477	30,0	2,31
2,5	82	1,313	20,6	1,58
3,0	83	1,295	19,7	1,52
5,0	88	1,204	16,0	1,23

Schon eine Konzentration von 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> genügt, um das Molekulargewicht MW<sub>obs</sub> der PDC-109 Aggregate auf eine Größe unterhalb des Wertes für ein Dimer (~26 kD), zu reduzieren (20,6 kD). Ein Wert, der mit PCh im untersuchten Meßbereich nicht erreicht wird. Eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentration reduziert die Aggregation, bis bei einer Konzentration von 5 mM das beobachtbare Molekulargewicht nahezu dem eines Monomers entspricht (Abb 3.18, Tab 3.5).

Zur Maskierung zweiwertiger Kationen wird häufig der Chelatbildner EDTA eingesetzt. Um eine effiziente Maskierung des durch das PCh eingebrachten Calciums (1 Mol/Mol) bei pH 7,0 zu gewährleisten, wurde ein 2,5-facher Überschuß an EDTA verwendet. Der Zusatz von 50 mM EDTA führt zu einem beobachtbaren Molekulargewicht von ca. 13 kD, also einem Monomer. Dieser Effekt muß nicht zwangsläufig auf eine Interaktion von EDTA mit PDC-109 hindeuten, sondern könnte auch auf die Erhöhung der Ionenstärke zurückgeführt werden, da eine Konzentration von mehr als 100 mM Na<sup>+</sup> mit dem EDTA eingebracht wird (> 2 Mol/Mol). Eine direkte Wechselwirkung aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur DEAE-Gruppe kann dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Fügt man dem Puffer neben 50 mM EDTA zusätzlich 20 mM PC zu, beobachtet man die Elution in zwei Fraktionen, deren Retentionszeit einem Dimer und einem Monomer entsprechen (Abb. 3.19, Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Meßwerte der Gelfiltrationen mit verschiedenen Konzentrationen an EDTA und PCh im Chromatographiepuffer

Pufferzusatz	Retentionszeit t1 [min]	Retentionszeit t2 [min]	MW <sub>obs 1</sub> [kD]	MW <sub>obs 2</sub> [kD]	Anzahl Moleküle im Aggregat
50 mM EDTA	92	-	13,5	-	1
50 mM EDTA 20 mM PC	78	92	24,3	13,5	2/1

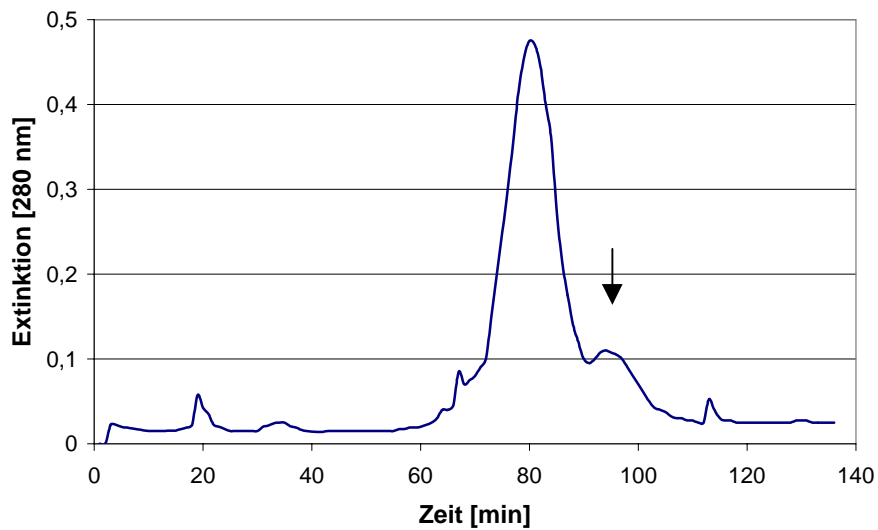


Abb. 3.19: Gelfiltrationschromatogramm von PDC-109 in 10 mM MOPS pH 7,0, 50 mM EDTA, 20 mM PCh, Pfeil: Retentionszeit 92 min

### 3.4.2 Interaktion von FnII-Typ Proteinen mit Phospholipiden

Seminalplasmaproteine können auf der Oberfläche ejakulierter Spermatozoen durch indirekte Immunfluoreszenz (*Dostalova et al. 1995*) nachgewiesen werden. Verschiedene Publikationen beschreiben mögliche Bindungsmodi für diese Proteine (*Reviews: Töpfer-Petersen et al. 1997, 1998, 1999*). Die Affinität der FnII-Typ ähnlichen Proteine zu Cholin-Gruppen legt eine Bindung an Phosphatidylcholin nahe. Die Interaktion von peripheren Membranproteinen mit Lipidoberflächen kann in einem modifizierten ELISA untersucht werden (*Bloom 1987, Desnoyers 1992*). Die Detektion erfolgt über gegen das Protein gerichtete Antikörper. Für die FnII-Typ Proteine des Pferdes, HSP-1/2, sowie das CRISP-Protein CRISP-3 des Pferdes, standen polyklonale Antiseren aus Hühnern zur Verfügung (*Heß et al. 1998, Schambony. et al. 1998*).

Die einzelnen *Wells* der ELISA-Platte werden mit Lipid beschichtet, indem man 100 µl Lipid-Lösung in Methanol in die *Wells* pipettiert, das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur verdampft und anschließend noch vorhandene Bindungsstellen mit 200 µl 0,05 % Gelatine-Lösung blockiert. Es wird davon ausgegangen, dass sich durch dieses Vorgehen Bereiche bilden, die einer Zell- bzw. Vesikeloberfläche ähneln. BSA ist als Blockierungsreagenz nicht geeignet, da es selbst in der Lage ist,



Lipid zu binden. Die verwendeten ELISA-Platten bieten sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Bindungsbereiche an. Es muß also damit gerechnet werden, daß auch Bereiche entstehen, in denen verschiedene räumliche Orientierungen der Lipide auftreten. Ausgeschlossen werden kann jedoch die Bildung von Lipiddoppelschichten, da alle Wasch- und Inkubationslösungen das Detergenz Tween-20 enthalten. Das Detergenz löst Doppelschichten auf, nur an die Welloberfläche gebundene Lipide bleiben als Monolayer zurück.

Als Positivkontrolle wurden die Proteine HSP-1/2 verwendet. Aufgrund ihrer Homologie zu PDC-109 des Bullen war zu erwarten, daß sie in einem ELISA-System mit PC interagieren. Die Affinität zu PC-Agarose konnte schon durch die Isolierung der nativen Proteine belegt werden. Die Proteine HSP-1/2 binden im Phospholipid ELISA-System an die Lipid-beschichtete Oberfläche der *Wells*. Es liegt dabei eine Präferenz für PC und LPC vor. In den mit PC beschichteten *Wells* wird ein Endwert erreicht, der für eine Kontrollreihe mit Proteinverdünnungen als Maximalwert bestimmt wird (Abb. 3.20). Auch für die mit PS und PE beschichteten Wells kann eine Farbreaktion beobachtet werden, die jedoch die Messwerte der Kontrolle nicht überschreitet. Diese Reaktion kann auf die Affinität von HSP-1/2 zu der Aminosäure Arginin und Gelatine zurückgeführt werden, wie sie für PDC-109 in säulenchromatographischen Experimenten bestimmt wurde (*Desnoyers et al. 1992*).

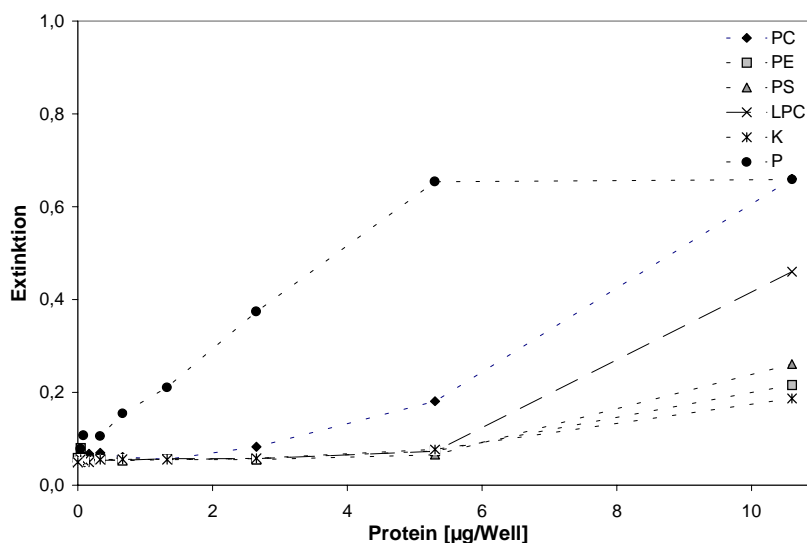


Abb. 3.20: ELISA mit immobilisiertem Lipid und Inkubation mit variablen Mengen HSP-1/2, PC- Phosphatidylcholin, PE- Phosphatidylethanolamin, PS- Phosphatidylserin, LPC- Lysophosphatidylcholin, K- Negativ-Kontrolle (Methanol), P- Positiv-Kontrolle, immobilisiertes Protein

Eine Interaktion von equinem CRISP-3 mit Phospholipiden konnte in diesem ELISA-System nicht detektiert werden. Alle Meßwerte für Lipid-beschichtete Wells liegen niedriger als die Meßwerte einer Negativ-Kontrolle mit Methanol (MeOH, Abb. 3.21), dem Lösungsmittel der Lipide.

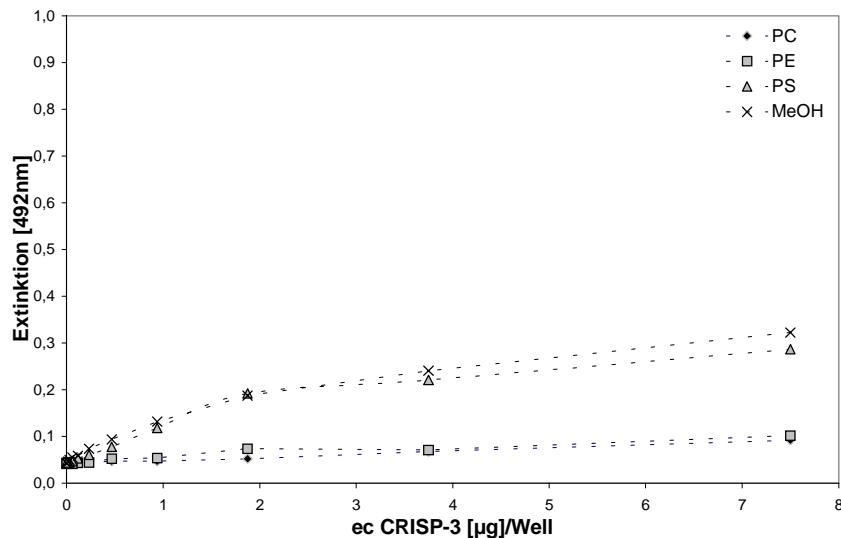


Abb. 3.21: ELISA mit immobilisiertem Lipid und Inkubation mit variablen Mengen equinem CRISP-3, PC- Phosphatidylcholin, PE- Phosphatidylethanolamin, PS- Phosphatidylserin, LPC- Lysophosphatidylcholin, K- Negativ-Kontrolle (Methanol)

Als Alternative zu einer direkten Oberflächenbindung könnte die Bindung auch durch andere Komponenten des Seminalplasmas vermittelt werden. Eine solche Bindung könnte durch HSP-1/2 vermittelt werden, da es sowohl in der Lage ist, an den Lipidmonolayer, als auch an Proteine (Oligomerbildung) zu binden. Zur Ermittlung, ob eine Interaktion zwischen dem im Phospholipid-ELISA gebundenen HSP-1/2 und CRISP-3 auftreten kann, wurden die Wells mit PC beschichtet, unspezifische Bindungsstellen mit Gelatine blockiert, mit HSP-1/2 beschichtet und anschließend für eine Stunde mit CRISP-3 inkubiert. Die Detektion erfolgte wie in den vorhergehenden Testreihen mit Antiseren gegen die Proteine. Es wurden sowohl verschiedene Konzentrationen an HSP-1/2 bei konstanter CRISP-3 Konzentration wie auch umgekehrt eingesetzt.

Die Bindung von HSP-1/2 an die Lipid-beschichteten Wells mit anschließender Inkubation mit CRISP-3 führt zu einem konzentrationsabhängigen Signal, sowohl von HSP-1/2, wie auch CRISP-3, ohne daß der CRISP-3 Antikörper mit HSP-1/2 interagiert.

Eine Standardisierung dieses ELISA-System zur quantitativen Auswertung war jedoch nicht möglich. Dieser Effekt lässt sich zum Teil auf die lange Inkubationszeit für ein schrittweises ELISA-System und die damit verbundene hohe Anzahl an Waschschrritten zurückführen. Die Verwendung von Antiseren, und nicht gereinigter Antikörper, stellt einen weiteren Aspekt dar, da das Serum aufgrund der nicht bekannten Komponenten, Proteine (Phospholipasen, Serumalbumine, Immunglobuline) und niedermolekulare Substanzen (Lipide), zu Artefakten führen kann.

Bei der Fluoreszenzspektroskopie an Phospholipidvesikeln kann auf Detektion durch Antikörper, ebenso wie auf Detergenzien und Fremdprotein zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, verzichtet werden. Gemessen wird die Änderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz. Für die Untersuchung der Lipidbindung von PDC-109 konnte die Fluoreszenzspektroskopie bereits erfolgreich eingesetzt werden (*Müller et al. 1998*).

Erste Messungen in Kooperation mit Dr. P. Müller und Dr. A. Greube, Institut für Biologie/Biophysik an der Humboldt Universität Berlin, deuten ebenfalls auf eine Interaktion von HSP-1/2 mit CRISP-3 in Anwesenheit von PC-Phospholipidvesikeln hin. Es sind jedoch noch weitere Messungen notwendig, um die beobachteten Effekte zu verifizieren und zu charakterisieren.

### 3.5 Untersuchungen zur Struktur von CRISP-Proteinen

Die Proteine der CRISP-Familie sind im männlichen Genitaltrakt verschiedener Spezies gefunden und sequenziert worden (*Brooks et al. 1987, Eberspächer et al. 1995, Foster et al. 1996, Händler et al. 1993, Hardy et al. 1988, Kasahara et al. 1989, Krätzschar et al. 1996, Rankin et al. 1992, Schambony et al. 1998, 1999*). Aufgrund der bisherigen Untersuchungen wird eine Beteiligung von CRISP-Proteinen an der Gametenfusion und der Spermatogonien Sertoli-Zellen Interaktion diskutiert. Es liegen jedoch keine Erkenntnisse zur Funktion dieser 220 bis 230 Aminosäuren umfassenden Proteine vor.

Das entscheidende Merkmal dieser Proteine sind ihre 16 konservierten Cysteine, die acht Disulfidbrücken bilden. Auch im CD-Spektrum dominieren die Disulfidbrücken (*Magdalena et al. 1997*), so daß Interpretationen des Spektrums in Hinsicht auf Sekundärstrukturelemente nicht möglich sind. Kristall- oder NMR-Strukturen vollständiger Proteine liegen noch nicht vor. Mit dem CRISP-3 des Pferdes liegt zum ersten Mal ein natives CRISP-Protein vor, welches in ausreichenden Mengen isoliert und biochemisch charakterisiert werden kann.

Durch sukzessiven proteolytischen Abbau sollte eine Aufklärung des Disulfidbrücken-Musters erfolgen, um weitere Anhaltspunkte zu Strukturen und Homologien zu geben, aus denen Schlüsse auf die Funktion dieser Proteine erhalten werden können. Gleichzeitig bietet die Kenntnis der Disulfidbrücken die Möglichkeit, durch *mass-fingerprinting* das korrekte Disulfidbrückenmuster als Voraussetzung für die Ausbildung der nativen Proteinstruktur zu überprüfen.

Aus Arbeiten, die die Grundlage für die molekularbiologische Sequenzierung (*Schambony et al. 1998, Schambony 1999*) der korrespondierenden mRNA-Sequenz bildeten, war bekannt, daß die Spaltung von equinem CRISP-3 mit der Endoproteinase Lys-C zu mehreren aufgrund ihrer Masse identifizierbaren Peptiden führt. Aus diesen Ergebnissen war ebenfalls abzusehen, daß eine geringe Anzahl von Fragmenten entsteht, die nicht direkt aufgrund ihrer Masse Proteinfragmenten zugeordnet werden können. Diese sollen anschließend, wie in Abbildung 3.22 schematisch dargestellt, über RP-HPLC isoliert, massenspektrometrisch bestimmt,

N-terminal ansequenziert und individuell für jedes Fragment weiteren Abbauschritten unterworfen werden.

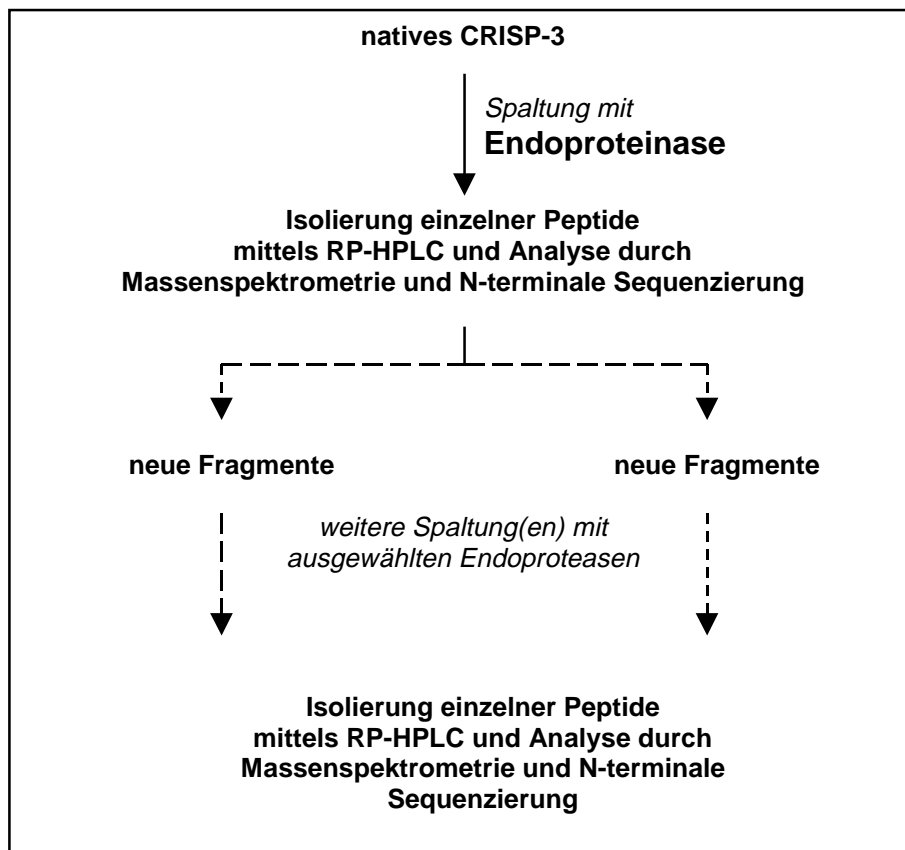


Abb. 3.22: Schema der geplanten Vorgehensweise zur Analyse des Disulfidbrückenmusters von equinem CRISP-3

### 3.5.1 Auswertungssoftware für Proteinverdaus

Zur Auswertung der erhaltenen Messwerte und für die Berechnung der theoretischen Fragmente wurden verschiedene Programme eingesetzt. Dem Elektrospray-Massenspektrometer ist eine Detektions- und Auswertungssoftware (*Sherpa 3.1*) beigelegt, die bei gegebener Aminosäuresequenz in der Lage ist, Peptide den Messdaten zuzuordnen (LC-MS Lauf). Für die Berechnung theoretisch entstehender Peptide wurde das Programm *Peptide Mass* des SBI, welches interaktiv im Internet zugänglich ist, verwendet. Als Ergebnis eines theoretischen Verdaus erhält man als Ausgabe eine Liste mit Sequenz und Masse der einzelnen Peptide.

Durch die Verwendung des nativen Proteins muß mit unvollständiger Proteolyse aufgrund sterischer Hinderung der Protease und Peptiden, die aufgrund intakter Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, gerechnet werden. Fragmente, die

durch unvollständige Proteolyse entstehen sind leicht zu identifizieren, sofern sie nicht noch zusätzlich über Disulfidbrücken mit weiteren Peptiden verknüpft sind. Diese Möglichkeit wird von den meisten Softwareprodukten, wie dem verwendeten Sherpa 3.1, berücksichtigt.

Sofern nur eine geringe Anzahl an unbekanntem Disulfidbrücken auftritt und die Spaltung vollständig verläuft, ist die Berechnung der möglichen Fragmente noch manuell durchführbar. Die Kombination mehrerer Disulfidbrücken in einem Fragment und zusätzlich eine unvollständige Hydrolyse potentieller Spaltstellen erschweren die Berechnung, wie im Fall der acht Disulfidbrücken am nativen CRISP-3, erheblich. Theoretisch ergeben sich aus der Kombination von 16 Cysteinen zu acht Disulfidbrücken 120 verschiedene Möglichkeiten. Ist in einem Fragment mehr als eine Brücke vorhanden, z.B. zwei Disulfidbrücken, setzt sich das Fragment additiv aus zwei Lösungen der 120 Einzelkombinationen zusammen. Kommt es dann noch zu unvollständiger Hydrolyse durch die Protease, wird der manuelle Aufwand erheblich. Die N-terminale Sequenzierung von Fragmenten ist nur teilweise hilfreich. Es ist zwar möglich, eine Abfolge von mehr als 30 Aminosäuren abzubauen und zu bestimmen, jedoch sind hierfür vergleichbar große Mengen Ausgangsmaterial nötig. Weiterhin können durch die proteolytische Spaltung mehrere freie N-Termini entstehen, so daß in einem Abbauschritt mehrere Aminosäuren detektiert werden, die anschließend wieder zugeordnet werden müssen. Die Kosten und der Zeitaufwand der Peptidsequenzierung fordern ihrerseits eine Reduzierung der Proben auf die notwendige Anzahl. Zur Analyse wurde daher ein Auswertungssystem entwickelt, welches in einem Tabellenkalkulationsprogramm realisiert werden kann.

### **3.5.2 Auswertungssystem für Peptide**

Als Ausgangssituation werden alle Peptide berechnet, die entstehen würden, wenn eine vollständige Hydrolyse eintreten würde und keine Disulfidbrücken vorlägen. Ein Fragment, welches durch unvollständige Hydrolyse und/oder durch Verbrückung durch eine oder mehrere Disulfidbrücken entsteht, muß sich aus diesen Peptiden zusammensetzen.

Im Fall unvollständiger Hydrolyse können nur in der Sequenz aufeinander folgende Peptide miteinander verknüpft sein und die Fragmentmasse  $m_F$  addiert sich aus den

Massen der einzelnen Peptide  $m_{P1}$ ,  $m_{P2}$  verringert um die Masse von einem Molekül  $H_2O$ , welches nicht durch Proteolyse eingeführt wird (Formel 3.1).

$$m_F = m_{P1-P2} = m_{P1} + m_{P2} - m_{H_2O} \quad \text{Formel 3.1}$$

Sind die Peptide über eine Disulfidbrücke verbunden, so ergibt sich die Masse des Fragmentes  $m_F$  aus den Einzelmassen der Peptide  $m_{P1}$ ,  $m_{P2}$  verringert um die Masse eines Protons und eines Hydridions, die bei der Bildung einer Disulfidbrücke formal freigesetzt werden (Formel 3.2).

$$m_F = m_{P1} + m_{P2} - m_{H^+} - m_{H^-} \quad \text{Formel 3.2}$$

Eine Berücksichtigung beider Aspekte ermöglicht die Berechnung einer Fragmentmasse ausgehend von den Massen der einzelnen Peptide. Für Peptide, die kein Cystein enthalten, wird ein Korrekturwert von  $-18$  Da für die nicht hydrolysierte Peptidbindung eingeführt. Peptide, die ein oder mehrere Cysteine enthalten, werden mit einem Korrekturwert von  $-1$  Da je Cystein belastet. Hieraus ergeben sich die als korrigierte Masse  $m_k$  bezeichneten Massen. Die Cystein-enhaltenden Peptide werden in diesem Modell als Ausgangspeptide betrachtet, an die durch unvollständige Hydrolyse weitere Peptide angehängt werden. Daher werden sie nicht mit einer Korektur von  $-18$  Da belastet.

Da das Protein nur aus einer Polypeptidkette besteht, kann in einem Fragment ein Peptid entweder vorhanden sein oder nicht. Stellt man dies als die Zahlenwerte 0 (nicht vorhanden) und 1 (vorhanden) dar, ist es möglich, die Zusammensetzung eines Fragments aus den verschiedenen Peptiden anhand dieser Zustandswerte binär darzustellen.

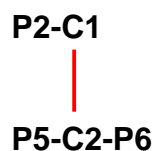


Abb. 3.23: Mögliches Fragment eines Verdaus, welches durch unvollständige Hydrolyse und Verknüpfung über eine Disulfidbrücke entsteht, P- Peptide ohne ein an einer Disulfidbrücke beteiligtem Cystein, C- Peptide mit einem an einer Disulfidbrücke beiteiligtem Cystein, Erläuterung: siehe Text

Für das in Abb. 3.23 dargestellte Fragment, welches aus einem Verdau eines Proteins mit der Zusammensetzung P1-P2-C1-P3-P4-P5-C2-P6 erhalten wird, würde sich damit folgende Beschreibung durch die Zustandswerte  $z_p=0$  oder  $z_p=1$  ergeben (P1-P6: Peptide ohne ein an einer Disulfidbrücke beteiligtes Cystein, C1 und C2: Peptide mit einem an einer Disulfidbrücke beteiligten Cystein):

Peptid	P1	P2	C1	P3	P4	P5	C1	P6
Zustandswert $z_p$	0	1	1	0	0	1	1	1

Diese Schreibweise ist geeignet, um in einem Computerprogramm oder in geringerem Umfang in einer Tabellenkalkulation realisiert zu werden. Da keine Disulfidbrücken bekannt sind, müssen alle Kombinationen berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen werden. Grundlage bildet eine binäre Matrix, in der alle Kombinationen von 0-0-0-...-0 bis 1-1-1-...-1 enthalten sind. Für die Analyse der proteolytischen Verdau von CRISP-3 wurde eine 11x11 Matrix für die Kombination von 11 Peptiden ( $2^{10}=1024$  Kombinationen) manuell erstellt. Die Zusammensetzung des zu berechnenden Fragments ist durch die Werte einer Zeile angegeben. Multipliziert man den Zustandswert eines Peptids mit seiner korrigierten Masse und summiert diese Werte in einer Zeile auf, erhält man die theoretische Masse des gesuchten Fragments (Formel 3.3):

$$m_{F(P1-Pn)} = z_{P1} * m_{P1} + z_{P2} * m_{P2} + \dots + z_{Pn} * m_{Pn}$$

Formel 3.3

$$m_F = z_{P1} * m_{P1} + z_{P2} * m_{P2} + \dots + z_{Pn} * m_{Pn}$$

In einer Tabellenkalkulation lässt sich diese Rechnung als Spaltenoperation zügig auch für eine große Anzahl von Kombinationen umsetzen. Die in der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97<sup>®</sup> enthaltene Funktion „Suchen“ erlaubt unter Angabe eines Wertebereiches das Auffinden gesuchter Massenwerte.

Das beschriebene Lösungssystem konnte erfolgreich für die Analyse der proteolytischen Verdau von CRISP-3 eingesetzt werden. Als hilfreich erwies sich zusätzlich die Berechnung der Anzahl von Cysteinen in einem theoretischen Fragment. In CRISP Proteinen sind alle Cysteine über Disulfidbindungen verbunden.



Theoretische Fragmente mit ungerader Anzahl an Cysteinen konnten daher als Lösung ausgeschlossen werden. Da jede Lösung über die Matrix auch direkt die beteiligten Peptide repräsentiert, konnten ebenfalls Lösungen ausgeschlossen werden, in denen Peptide auftreten, die kein Cystein enthalten und sich nicht direkt an ein anderes Peptid anschliessen.

Die Verwendung dieses Systems ermöglichte es, die Auswahl an Fragmenten für die N-terminale Sequenzierung einzuschränken und die Auswertung zu vereinfachen, da bereits Kenntnisse über die zu erwartenden N-Termini vorlagen. Anschließend an die N-terminale Sequenzierung konnten die fehlenden Fragmentanteile anhand dieser Daten ergänzt werden. Auch ohne N-terminale Sequenzierung war eine Identifikation möglich, wenn die isolierten Peptidmengen nicht für eine eindeutige Sequenzierung ausreichten. Die Ergebnisse der ermittelten Disulfidbrücken bestätigen die Verwendbarkeit des Berechnungssystems als Hilfsmittel für die Analyse unbekannter Disulfidbrücken. Eine Realisation als unabhängiges Computerprogramm ist vorgesehen.

### 3.5.3 Spaltungen von nativem equinem CRISP-3 mit spezifischen Endoproteinasen

#### Proteasen

Für die Versuche wurden spezifische Endoproteasen hoher Spezifität und Reinheit verwendet (*sequencing grade*). Diese sind z.T. durch chemische Modifikation gegen Selbstverdau geschützt. Die Proteasen hydrolysieren die Peptidbindung carboxy- oder aminoterminal der in Tabelle 3.7 angegebenen Aminosäure bzw. Aminosäuren.

Tab. 3.7: Spezifität von Endoproteasen (*sequencing grade*) nach Swiss Institute for Bioninformatics, Zürich, Schweiz, <http://expasy.huge.ch>

Enzyme	Hydrolisiert Peptidbindung	Keine Hydrolyse
Trypsin	C-terminal von K oder R	wenn P C-terminal von K oder R
Lys-C	C-terminal von K	wenn P C-terminal von K
Arg-R	C-terminal von R	wenn P C-terminal von R
Asp-N	N-terminal von D	
Asp-N + N-terminal Glu	N-terminal von D und E	
Glu-C (Bicarbonat Puffer)	C-terminal von E	wenn P oder E C-terminal von E
Glu-C (Phosphat-Puffer)	C-terminal von E und D	wenn P C-terminal von E oder D, oder E C-terminal von E
Chymotrypsin	C-terminal von F, L, M, W und Y	

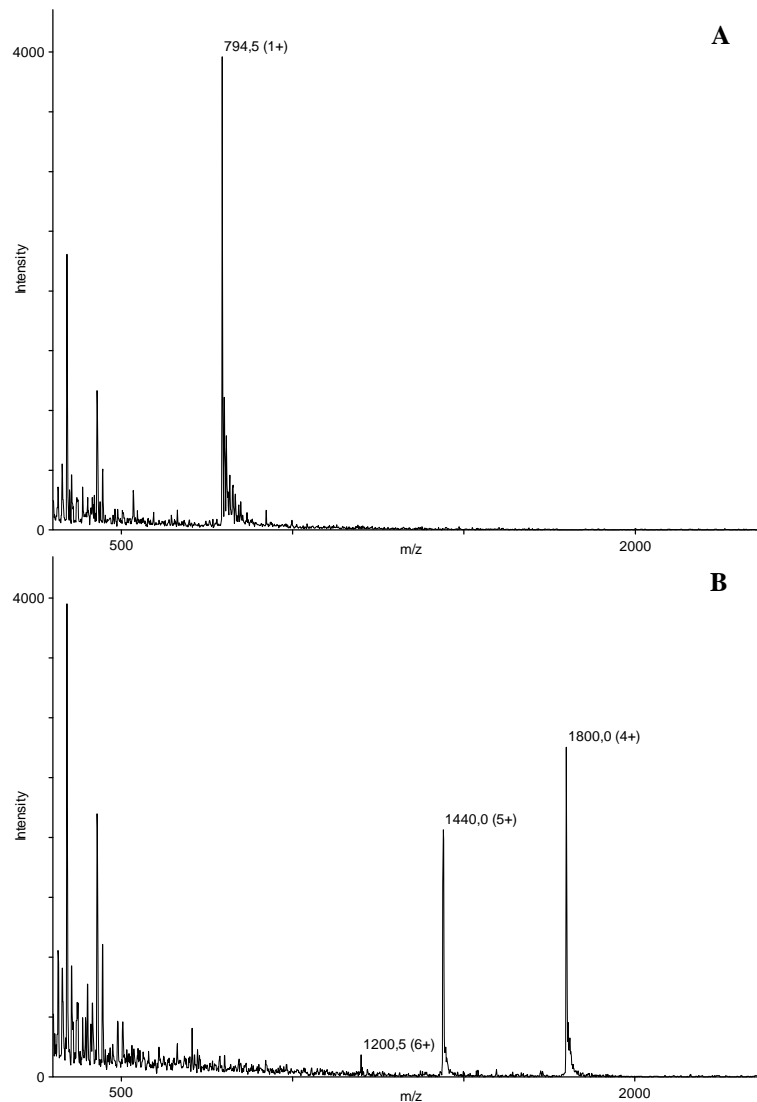
#### HPLC-Trennungen

Für die Trennung der Peptidgemische wurden spezielle Trennmaterialien verwendet, die eine gute Auflösung auch für hydrophile Peptide aufweisen. Mit Ausnahme der direkten Kopplung von HPLC und MS (vergl. Abb. 3.25) wurden alle Trennungen mit einer YMC C-18 ODS-AQ HPLC-Säule durchgeführt (vergl. Methoden).

#### ESI-Massenspektrometrie

Für größere Massen, die in einer ESI-Massenspektrometrie ionisiert werden, treten im Gegensatz zu kleinen Peptiden mehrere Ladungszustände im Meßbereich (400-2400 m/z) auf. Dies ermöglicht sowohl die Massenbestimmung großer Moleküle, wie auch die Angabe eines Meßfehlers (vergl. Tab 3.8). In Abbildung 3.24 (A) ist exemplarisch das Massenspektrum eines Peptids dargestellt, dessen zweiwertiges

Ion außerhalb ( $<400$  m/z) des Meßbereichs liegt. Detektiert wird das einwertige Ion. Von dem Fragment der Masse 7197 Da (Abb. 3.24B) können nur die Ionen +6, +5 und +4 detektiert werden. Das dreiwertige Ion liegt bereits außerhalb des Meßbereichs ( $>2400$  m/z).



**A:** MQWDSK

m = 793,5 Da

(AS 40- 45)

**B:** INTPYEQGTPCARCPGNCDNGLCTNSCEYEDLVSNCDLKKIAGCEHELLKENCKTTCQCENK

m = 7197±0,7 Da

(AS 159-221)

Abb. 3.24: Massenspektren von Peptiden verschiedener Masse und ihre Sequenz (Kasten), A- Peptid der Masse 793,5 Da, dessen zweiwertiges Ion ( $m/z=397,5$ ) außerhalb des Meßbereichs liegt ( $m/z<400$ ), B- Fragment der Masse 7195 Da, dessen dreiwertiges Ion ( $m/z=2400$ ) außerhalb des Meßbereichs liegt ( $m/z\geq 2400$ )

### 3.5.4 Spaltung mit Endoproteinase Lys-C

Alle verwendeten Proteinpräparationen wurden durch Reversed-Phase HPLC auf Verunreinigungen überprüft. Als erster Schritt wurde natives equines CRISP-3 mit der Endoproteinase Lys-C gespalten. Die entstandenen Fragmente wurden über Reversed-Phase HPLC aufgetrennt und die Fragmentmassen in einem Elektrospray-Massenspektrometer bestimmt. Zu diesem Zweck wurde als Spaltungskontrolle eine Auftrennung in einer HPLC-MS Kopplung durchgeführt.

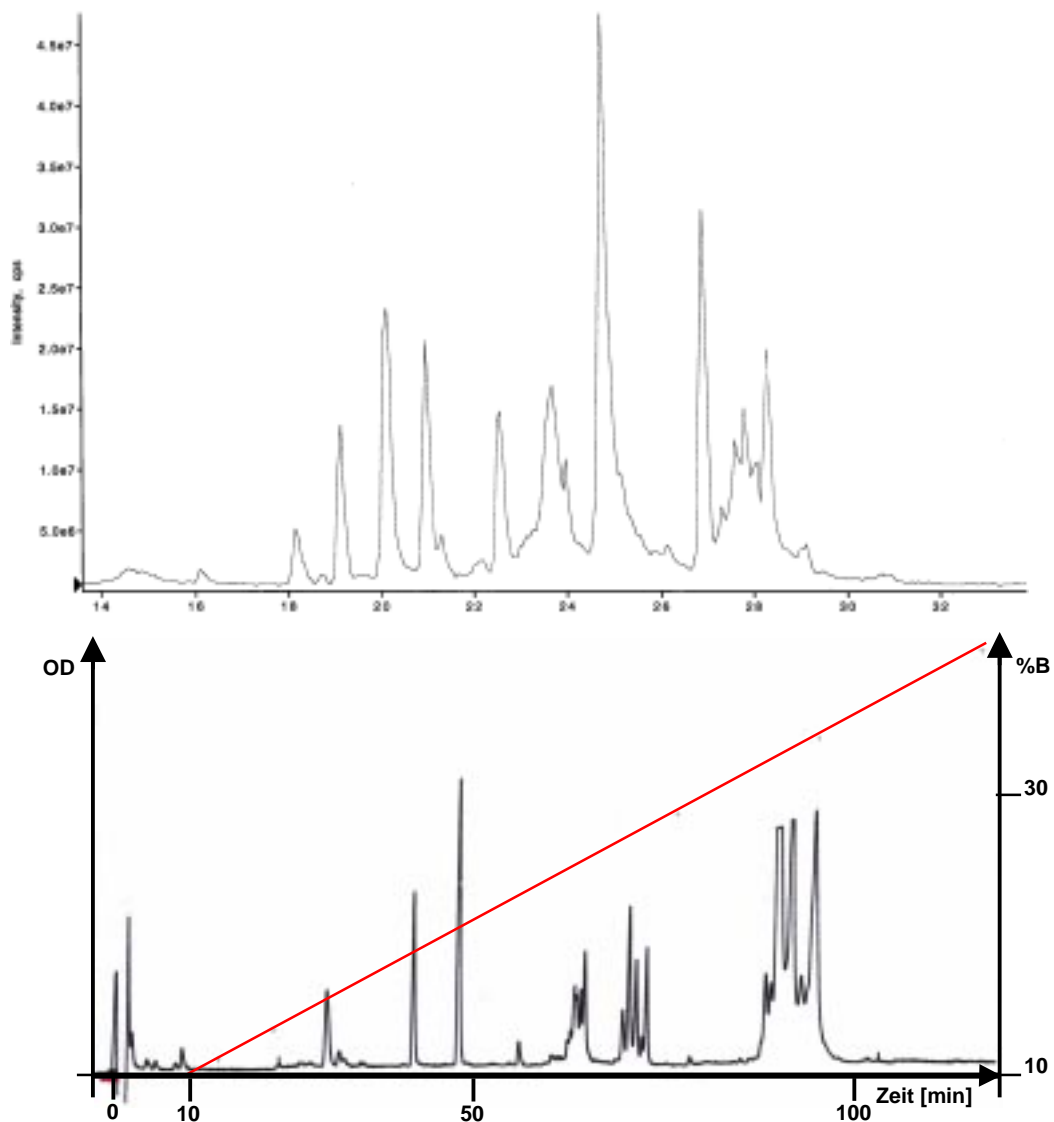


Abb. 3.25 : HPLC-Chromatogramm ec CRISP-3 x Lys-C, Laufmittel: A: H<sub>2</sub>O 0,08% TFA, Laufmittel B: 90% CH<sub>3</sub>CN 0,065% TFA  
A: LC-MS, Detektion durch ESI-MS (Total-Ionenstrom-Chromatogramm TIC, Reprisil C-18 ODS-AQ 125mm/1mm/3µm/12nm, Flußrate 20µl/min, Messbereich 400-2300 m/z Gradient: 1 % B/min, Beginn bei t=10 min  
B: LC-Lauf, Detektion durch UV Absorption  $\lambda=220\text{nm}$ , YMC ODS-AQ 250mm/2mm, 3µm/12nm, Flußrate 150µl/min, Messbereich 0,5 OD, rot: Gradient,

Die erhaltenen Fragment-Daten (Anzahl der Fragmente und Massen) wurden anschließend mit einer Auftrennung auf dem zur Präparation vorgesehenen System verglichen. Die verwendeten RP-Materialien zeigen ein einheitliches Trennverhalten, jedoch aufgrund der Säulenlänge und Kapazität einen Unterschied im Trennungsvermögen. Da die nicht direkt identifizierbaren Peptidfragmente hier von Interesse waren, wurden einige Fraktionen, die aufgrund ihrer Retention im Gradienten eindeutig zugeordnet werden konnten, nicht wiederholt bestimmt. Ein Vergleich der Chromatogramme ist in Abb. 3.25 dargestellt.

Tab. 3.8: Theoretische Peptide und identifizierte Peptide aus dem Verdau von equinem CRISP-3 mit Lys-C, ✓ - Identifiziert aufgrund der Retentionszeit, / - nicht detektiert

Theoretische Fragmente		identifizierte Fragmente		Aminosäure-Sequenz
Aminosäuren	m/z <sub>calc</sub>	LC-MS m/z	manuell m/z	
01-12	1231,6	1231,5	1231,5	<b>pQDPGFAALSITK</b>
13-17	590,32	590,5	✓	<b>SEVQK</b>
18-22	602,5	602,5	✓	<b>EIVNK</b>
23-39	1952,3	1952,8	1953	<b>HNDLRRTVSPLASNMLK</b>
40-45	794,5	794,5	794,5	<b>MQWDSK</b>
46-56	1218,6	1218,5	✓	<b>TATNAQNWANK</b>
57-63	828,4	/	/	<i>CLLQHSK</i>
64-73	1077,5	/	/	<i>AEDRAVGTMK</i>
74-102	3408,7	/	/	<i>CGENLFMSSIPNSWSDAIQNW</i> <i>HDEVHDFK</i>
103-108	620,3	620,5	✓	<b>YGVGPK</b>
109-137	3220,7	/	/	<i>TPNAVVGHYTQVVWYSSYRVG</i> <i>CGIAYCPK</i>
138-142	546,5	546,5	✓	<b>QGTLK</b>
143-158	1949,2	/	/	<i>YYYVCQYCPAGNYVVK</i>
159-198	4329,8	/	/	<i>INTPYEQGTPCARCPGNCDNG</i> <i>LCTNSCEYEDLVSNCDSLK</i>
199-199	147,1	/	/	<i>K</i>
200-209	1112,6	/	/	<i>IAGCEHELLK</i>
210-213	493,2	/	/	<i>ENCK</i>
214-221	926,4	/	/	<i>TTCQCENK</i>
222-223	295,2	/	/	<i>IY</i>

In Tabelle 3.8 sind die theoretischen und tatsächlich gefundenen Peptide aufgeführt. Es konnte kein Cystein-enthaltendes Peptid identifiziert werden. Dies bestätigt, daß

alle Cysteine an Disulfidbrücken beteiligt sind. Eine Detektion des Lysins K199 und des Dipeptids IY (AS 222-223) war nicht zu erwarten, da bei der Auftrennung des Reaktionsansatzes auf einer C-18-Säule im Acetonitrilgradienten diese hydrophilen Moleküle im Durchfluß, neben den Puffersalzen, zu finden sind und damit nicht detektiert werden. Mehrere isolierte Fragmente konnten nicht direkt zugeordnet werden.

Anhand ihrer Massen konnte durch kombinatorische Auswertung die Zusammensetzung der Fragmente bestimmt werden. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich, zu entscheiden, an welchen Positionen die Protease gespalten bzw. nicht gespalten hat. Daher wurden zur Überprüfung der Auswertung und zur Bestimmung der freien N-Termini N-terminale Sequenzierungen durchgeführt.

Tab. 3.9: Unbekannte Fragmentmassen des Lys-C Verdau, die durch kombinatorische Analyse und z.T.durch anschließende N-terminale Sequenzierung (N-) identifiziert wurden

<b>Fragment Nr.</b>	<b>m<sub>exp</sub> [Da]</b>	<b>m<sub>calc</sub> [Da]</b>	<b>Zusammensetzung nach kombinatorischer Analyse und Sequenzierung Aminosäureposition gemäß Tab. 3.8</b>	<b>Anzahl an Cysteinen</b>
1	11654±1,7	11655	46-63, 64-102, 109-137, 143-158	6
2	12182±2,2	12183, 5	46-63, 64-102, 109-142, 143-158	6
3	10455±0,3	10454, 5	57-63, 74-102, 109-137, 143-158	6
4	10595±3,4	10595	46-63, 64-102, 109-137, 143-158	6
5	9394±1,4	9495	57-63, 74-102, 109-137, 143-158	6
6	7250±0,7	7258	159-199, 200-209, 210-213, 214-223	10
7	7122±0,4	7124	159-198, 200-209, 210-213, 214-223	10
8	7191±0,8	7194	159-223	10
9	6920±0,0	6917	159-221	10
10	7195±0,7	7198	159-223	10

### 3.5.5 Zusammenfassung Spaltung von *ec CRISP-3* mit Endoprotease Lys-C

Die Spaltung von CRISP-3 mit Lys-C führte zu verschiedenen durch ihre Massen identifizierbare Peptide, die teilweise durch N-terminale Sequenzierung bestätigt wurden (graue Bereiche, Abb. 3.28). Der Verdau ist insoweit vollständig verlaufen, als keine Proteinfragmente detektiert wurden, die sich aus zwei oder mehr dieser Peptide zusammensetzen (Tab. 3.8, S. 92 und Tab. 3.9, S. 93). Nicht detektiert wurden Peptide, die ein oder mehrere Cysteine enthalten.

Weiterhin entstanden Fragmente, die sich nach weitergehender Analyse in zwei Gruppen einteilen lassen:

1. Fragmente, die Peptide enthalten, die direkt oder indirekt (unvollständige Proteolyse) über Disulfidbrücken zwischen den ersten sechs Cysteinen verknüpft sind. Hierzu zählen die Fragmente der Massen 9395 Da, 10455 Da, 10595 Da, 11654 Da und 12184 Da. Bei vollständiger Proteolyse entsteht das in Abbildung 3.26 dargestellte Fragment, welches tatsächlich in geringen Mengen isoliert werden kann (N-terminaler Cystein-Cluster).

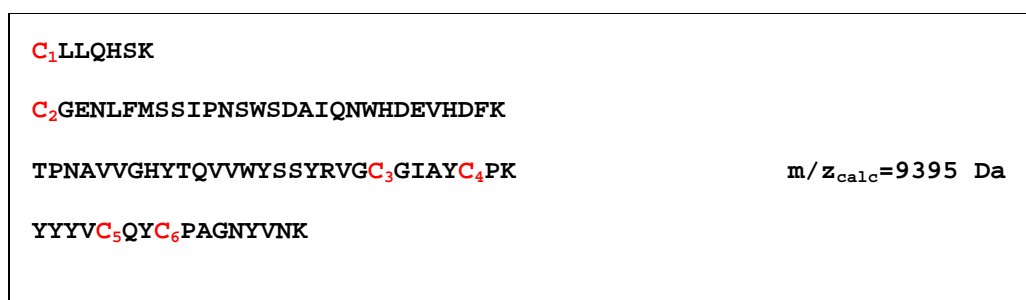


Abb. 3.26: Kleinstes Fragment des N-terminalen Cystein-Clusters

2. Fragmente, die Peptide enthalten, die direkt oder indirekt (unvollständige Proteolyse) über Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen C<sub>7</sub> bis C<sub>16</sub> verknüpft sind (Abb. 3.27). Zu dieser Gruppe, dem C-terminaler Cystein-Cluster, zählen die Fragmente der Masse 6920 Da, 7122 Da, 7195 Da und 7250 Da.

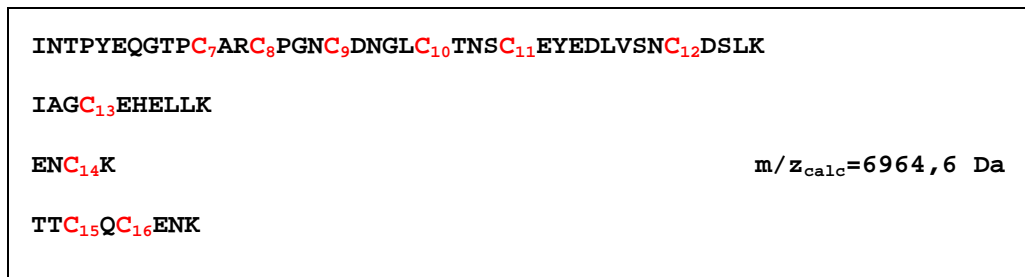


Abb. 3.27: Kleinstes Fragment des C-terminalen Cystein-Clusters

Es konnten keine Fragmente isoliert werden, deren Analyse diesen Ergebnissen widerspricht, so daß sich die Spaltung durch die Endoproteinase Lys-C wie in Abbildung 3.28 dargestellt skizzieren läßt. Neben einzelnen, keine Cysteine enthaltende Peptiden (graue Bereiche), können die beiden als N- und C-terminaler Cysteincluster bezeichneten Fragmente isoliert werden. Aus diesen Fragmenten werden zum Teil interne Peptide bzw. Aminosäuren (Pfeile) durch Lys-C freigesetzt: Im N-terminalen Cystein-Cluster sind es die Peptide YGVGPK (103-108) und QGTLK (138-142), im C-terminalen Cluster die Aminosäure K199 und das C-terminale Dipeptid IY (222-223).

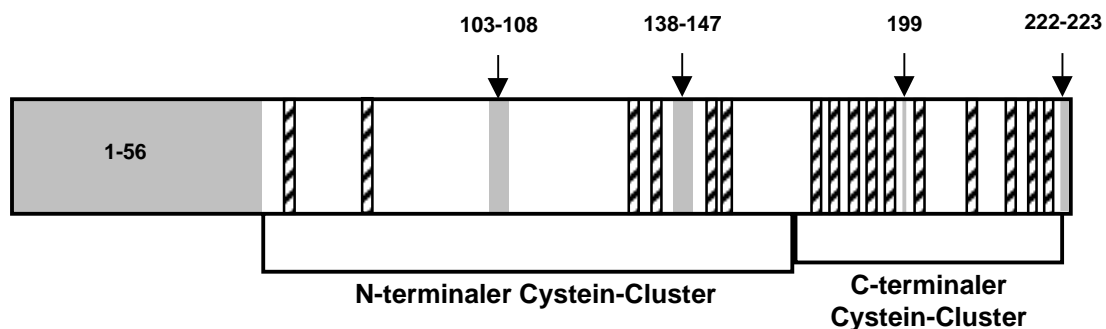


Abb. 3.28: Blockschema von equinem CRISP-3, graue Bereiche – Identifizierte Peptide nach Tab. 3.8, Pfeile: detektierbare interne Peptide der Cystein-Cluster, schraffiert: Positionen der Cysteine

Die Diversität der Fragmente spielt für die weitere analytische Vorgehensweise nur eine untergeordnete Rolle, da nach der Isolierung der Fragmente nötigenfalls ein wiederholter Verdau erfolgen kann. Alle Fragmente, die dem einen oder anderen



Cystein-Cluster zugeordnet werden können, eluieren gemeinsam in einem Bereich (N-terminaler Cluster ca: 33-36% Laufmittel B, C-terminaler Cluster: ca. 27-30% Laufmittel B) von der HPLC-Säule.

### 3.5.6 Isolierung von Proteinfragmenten für weitere Arbeiten

Zur Präparation der beiden Cystein-Cluster enthaltenden Fragmente konnte anhand der Ergebnisse der Lys-C Spaltung auch Trypsin geeignet sein. Trypsin ist hoch effizient auch in Gegenwart denaturierender Reagenzien. Eine Spaltung mit Trypsin führt zusätzlich zur Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von Arginin, welches je einmal im N- und C- terminalen Cluster auftritt. Es zeigte sich jedoch, daß die Verwendung von Trypsin zur Präzipitation der Spaltprodukte während der Inkubation und damit zu erheblichen Verlusten der Ausbeute führt. Die Analyse des Reaktionsansatzes durch RP-HPLC (Abb. 3.29, vergl. Abb. 3.25) und Massenspektroskopie zeigte weiterhin, daß die Spaltung des N-terminalen Bereichs des Proteins (AS 1-56) unvollständig verläuft. Trypsin ist daher nicht zur Präparation geeignet.

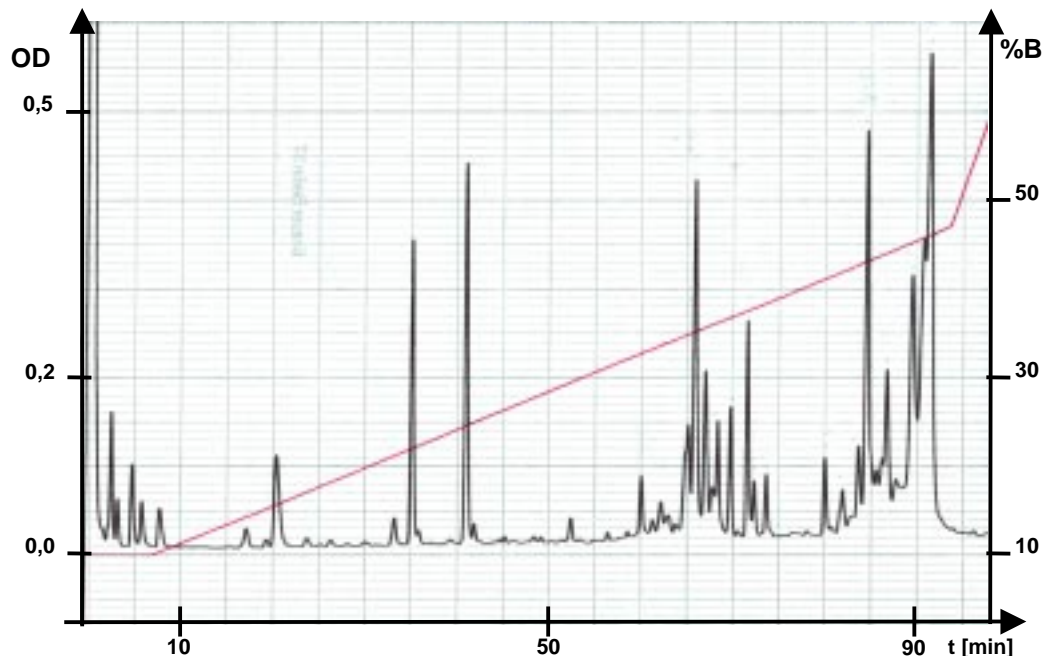


Abb. 3.29: HPLC-Chromatogramm ec CRISP-3 x Trypsin, Detektion durch UV Absorption  $\lambda=220\text{nm}$ , HPLC-Säule: YMC ODS-AQ 250mm/2mm/3 $\mu\text{m}$ /12nm Flußrate 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ , Messbereich 1,0 OD, rot: Gradient, Laufmittel A: H<sub>2</sub>O 0,08% TFA, Laufmittel B: 90% CH<sub>3</sub>CN 0,065% TFA,

Tab. 3.10: Fragmente der Trypsin-Spaltung von equinem CRISP-3

<b>m/z<sub>exp</sub></b>	<b>m/z<sub>calc</sub></b>	<b>Zusammensetzung nach kombinatorischer Analyse, Aminosäureposition gemäß Tab. 3.8</b>
7188	7194	159-223
7216	7208	159-172(R), 173-223
11695	11654	46-63, 64-102, 109-137, 143-158 (+ Kalium, 39 Da ?)
24407	24403	01-102, 109-223
24983	24987	01-223 (vollständig)

Da Trypsin aufgrund der im Vorversuch erhaltenen Ergebnisse als ungeeignet für die Präparation von einzelnen Fragmenten für den weiteren proteolytischen Verdau angesehen werden muß, wurde weiterhin die Endoproteinase Lys-C verwendet. Zur Präparation wurde 1 mg equines CRISP-3 eingesetzt und in Spaltungspuffer mit 10 µg Enzym inkubiert. Durch RP-HPLC wurde der Reaktionsverlauf über sechs Tage verfolgt und mit der Isolierung begonnen als keine Änderungen im Chromatogramm mehr zu erkennen waren.

Um die Isolierung der einzelnen Fragmente zu erleichtern, wurde eine Fraktionierung und Konzentrierung mittels Membranfiltration der Ausschlußgrenzen 4 kD und 10 kD durchgeführt. Sowohl die 7 kD Fragmente als auch die 10-12 kD Fragmente werden schon durch die 10 kD MWCO Membran von den kleineren Peptiden abgetrennt. Der konzentrierte Reaktionsansatz wurde in drei Aliquoten von 200 µl über RP-HPLC getrennt und die einzelnen Fraktionen gepoolt. Das Acetonitril wurde unter Vakuum in einer Speed Vac entfernt und die Proben anschließend lyophilisiert. Die Charakterisierung erfolgte durch Massenspektrometrie und N-terminale Sequenzierung.

Folgende Fragmente konnten für weitere Experimente isoliert werden:

Tab. 3.11: Isolierte Fragmente für weitere Spaltungen von equinem CRISP-3

<b>Fragment</b>	<b>Masse [Da]</b>	<b>N-terminale Sequenzierung - Aminosäureposition (AS) gemäß Tab. 3.8</b>
1	10495	n.d. – AS 57-63, 64-102, 109-137, 143-158
2	9396	n.d. – AS 57-63, 74-102, 109-137, 143-158
3	6846	INTPY... - AS 159-198, 200-209, 210-213, 214-221
4	6846	INTPY... - AS 159-198, 200-209, 210-213, 214-221
5	7123	INTPY... - AS 159-198, 200-209, 210-213, 214-223

### 3.5.7 Spaltungen mit weiteren Proteasen – N-terminales Fragment

Die Analyse der potentiellen Spaltstellen des N-terminalen Cystein Clusters zeigt, daß eine Spaltung mit Chymotrypsin Peptide erzeugen würde, die jeweils nur ein Cystein enthalten (Abb. 3.30).

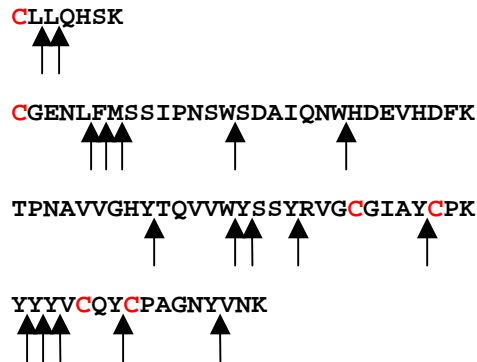


Abb. 3.30: Potentielle Spaltstellen ↑ durch Chymotrypsin (carboxyterminal von F, M, L, W, Y) im N-terminalen Fragment

Die lyophilisierten Fragmente waren in Spaltungspuffer unlöslich. Sie konnten jedoch mit 8 M Harnstoff oder Acetonitril wieder in Lösung gebracht werden. Für den Proteaseverdau wurde eine Endkonzentration von 1 M Harnstoff bzw. 20% Acetonitril mit Spaltungspuffer eingestellt. Unter beiden Bedingungen weist Chymotrypsin noch ca. 80% Aktivität auf. Nach der Inkubation (24 h, 25°C) wurden die Reaktionsansätze durch RP-HPLC im Acetonitril-Gradienten aufgetrennt und die Fraktionen manuell gesammelt.

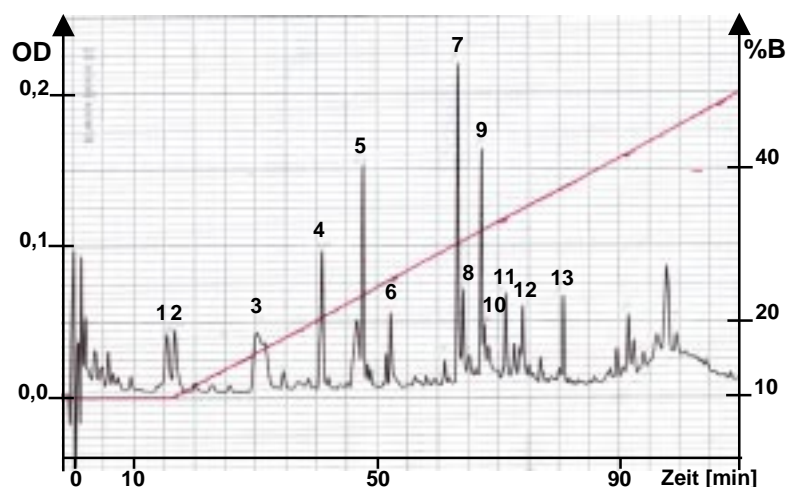


Abb. 3.31: HPLC UV-Chromatogramm des Chymotrypsin-Verdau des in Acetonitril aufgenommenen Fragments (N-terminaler Cystein Cluster), Detektion durch UV Absorption  $\lambda=220\text{nm}$ , YMC ODS-AQ 250mm/2mm/3 $\mu\text{m}$ /12nm, Flußrate 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ , Messbereich 0,5 OD, rot: Gradient, Laufmittel A: H<sub>2</sub>O 0,08% TFA, Laufmittel B: 90% CH<sub>3</sub>CN 0,065% TFA

Die Massen der in den Fraktionen enthaltenen Peptide wurden anschließend im ESI-Massenspektrometer bestimmt. Von den Peptiden in den Fraktionen 5-7 und 9 konnte durch MS-MS Fragmentierung die Sequenz bestimmt werden (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Durch MS-MS Fragmentierung bestimmte Sequenzen nach Chymotrypsin-Spaltung eines Fragmentes des N-terminalen Cystein-Clusters, AS- Aminosäure

Fraktion Nr.	$m_{exp}$	Sequenz	AS-Position
5	897,5	HDEVHDF	95-101
6	956,5	TPNAVVGHY	109-117
7	832,5	SDAIQNW	88-94
9	631,5	TQVWW	118-122

Die Fraktionen 8,10,11 und 12 (Abb. 3.31) wiesen Massen auf, die anhand der kombinatorischen Analyse über Disulfidbrücken verknüpfte Peptide sein konnten (Abb. 3.32 und 3.33). Durch N-terminale Sequenzierung wurden diese Ergebnisse bestätigt.

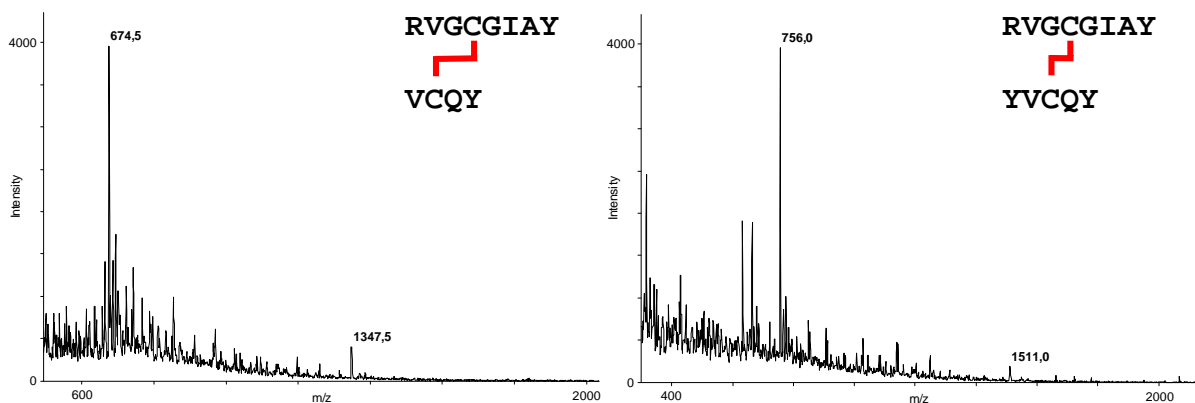


Abb. 3.32: Massenspektren der Fraktion 8 (links) und Fraktion 10 (rechts) mit berechneter und durch N-terminale Sequenzierung bestätigter Aminosäuresequenz

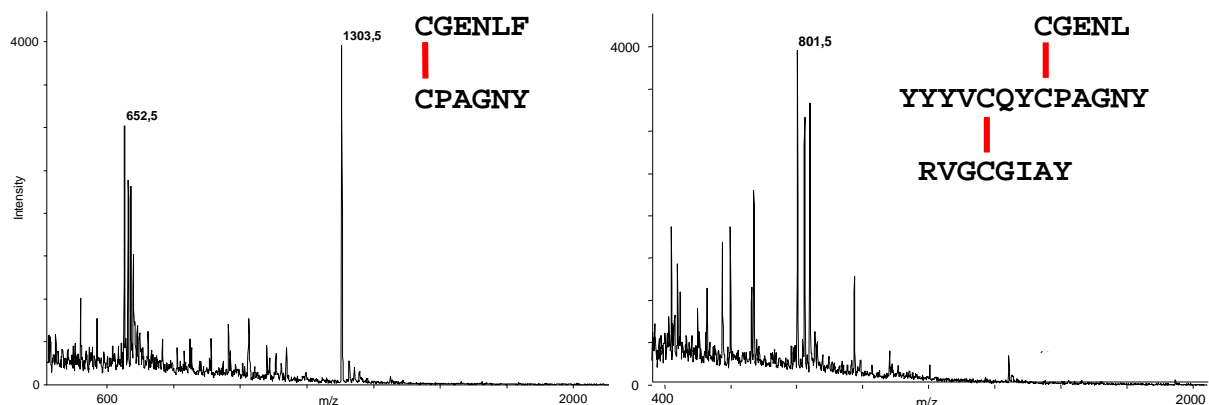


Abb. 3.33: Massenspektren der Fraktion 11 (links) und Fraktion 12 (rechts), mit berechneter und durch N-terminale Sequenzierung bestätigter Aminosäuresequenz

Das Fragment der Disulfidbrücke C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub> (CPK-CL...) konnte nicht durch N-terminale Sequenzierung überprüft werden. Massenspektrometrisch konnten jedoch die Fragmente CPK-CLL  $m_{\text{calc}}=692$  Da und CLLQHSK-CPK  $m_{\text{calc}}=1172$  Da (Abb 3.34) nachgewiesen werden.

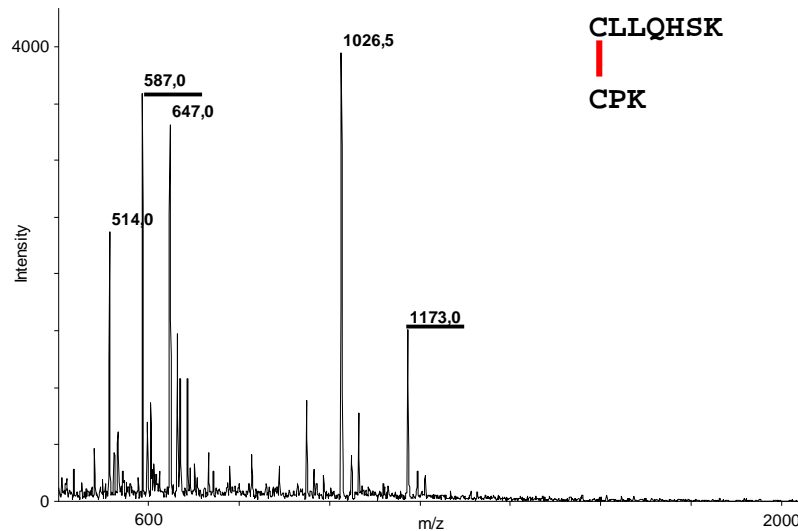


Abb. 3.34: Massenspektrum mit berechneter Aminosäuresequenz, Unterstreichung: ein- und zweiwertiges Ion des Fragments CLLQHSK-CPK

Anhand dieser Daten lässt sich das Disulfidbrücken-Muster für die N-terminalen Disulfidbrücken von equinem CRISP-3 wie folgt darstellen (Abb. 3:35):

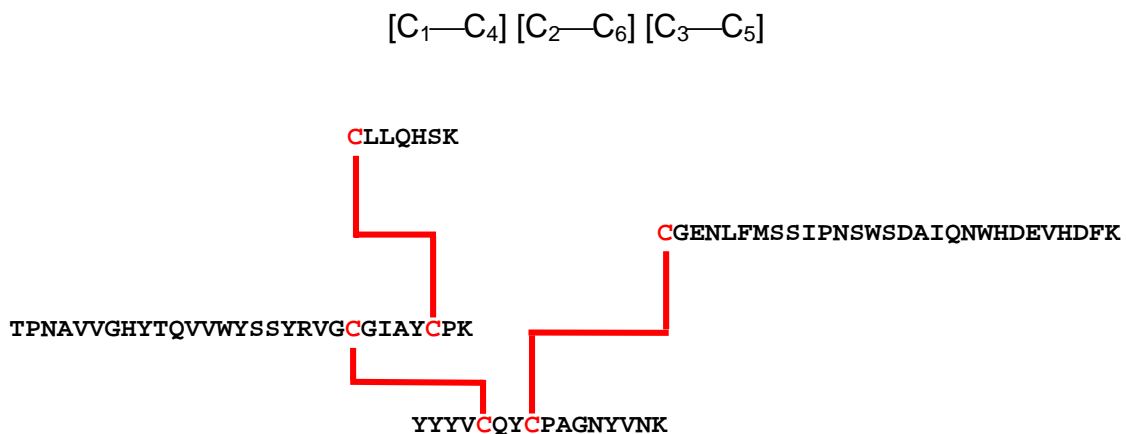


Abb. 3.35: Disulfidbrückenmuster des N-terminalen Cystein Clusters



Die Aktivität des Enzyms wird durch die Verwendung zur Analyse des N-terminalen Cystein-Cluster und durch Freisetzung des Pentapeptids INTPY (m=606,5 Da, Abb. 3.37) aus dem C-terminalen Fragment belegt. Es wurde daher vermutet, daß die weiteren potentiellen Spaltstellen nicht für die Protease zugänglich sind, also demzufolge eine sterische Hinderung vorliegt. Das C-terminale Fragment weist noch potentielle Spaltstellen für die Proteasen Trypsin und Asp-N auf (Abb. 3.38).

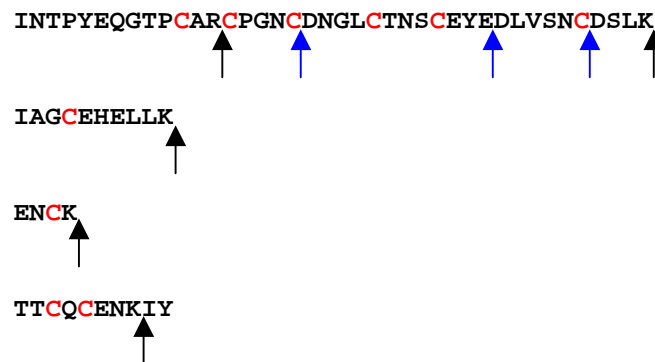


Abb. 3.38: Potentielle Spaltstellen ↑ durch Trypsin (schwarz) und Asp-N (blau) im C-terminalen Fragment

Die Spaltung mit einer Protease könnte dazu führen, daß die sterische Hinderung einer Spaltstelle für die andere Protease aufgehoben wird.

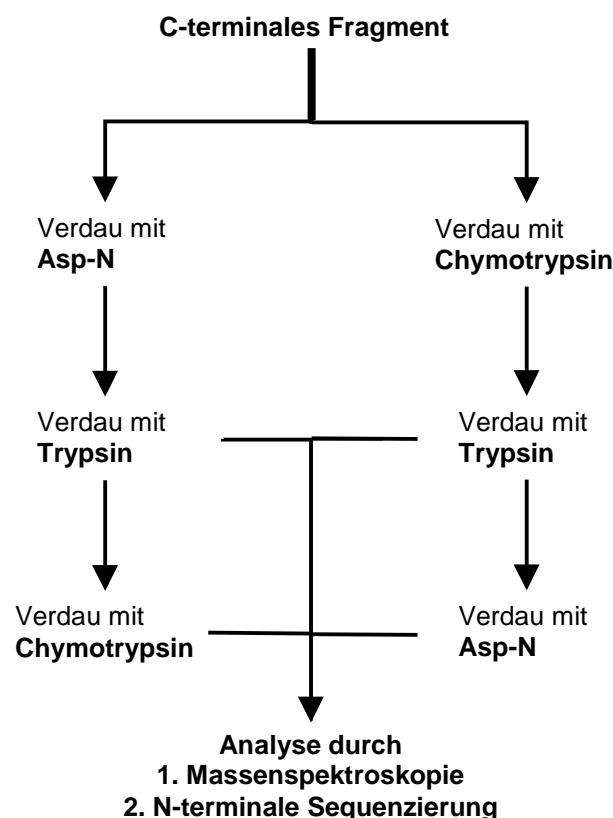


Abb. 3.39: Schema zur Durchführung der sukzessiven Hydrolyse von isolierten Peptiden des C-terminalen Cystein Clusters mit mehreren Proteasen

Entsprechend mußte die Reihenfolge des Zusatzes der Enzyme berücksichtigt werden, wie im Durchführungsschema (Abb. 3.39) dargestellt.

Da die limitierte Probenmenge einen sparsamen Umgang erforderte, wurde folgendermaßen vorgegangen. Ein lyophilisiertes Fragment wurde in 40 µl Acetonitril aufgenommen, auf zwei Reaktionsgefäße verteilt, mit dd. H<sub>2</sub>O auf 90 µl aufgefüllt und mit 10 µl 10-fach Reaktionspuffer auf die Pufferbedingung für die erste zu verwendende Protease eingestellt. Anschließend wurde die jeweilige Protease (0,125 µg Chymotrypsin/0,05 µg Asp-N) zugefügt und 24 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurde in der Folge Trypsin (0,1 µg) zugefügt und weitere 6 h inkubiert. Ein Versuchsansatz wurde nach Verdau mit Trypsin abgebrochen, ein jeweils identischer Ansatz wurde mit der dritten Protease gemäß des Schemas (Abb. 3.39) behandelt (0,125 µg Chymotrypsin/0,05 µg Asp-N).

Die Spaltung mit Trypsin als zweiter Protease sollte die vollständige Proteolyse aller K-X Bindungen und zusätzlich an einer Position die Spaltung C-terminal von R gewährleisten, wodurch ein neues Peptid entstehen könnte (vgl. Abb. 3.38).

Jeder Reaktionsansatz wurde über HPLC aufgetrennt, massenspektrometrisch analysiert und die isolierten Fragmente N-terminal ansequenziert.

### Chymotrypsin und Trypsin

Nach der sukzessiven Behandlung der Probe mit Chymotrypsin und Trypsin konnte das bereits aus der Chymotrypsin Behandlung bekannte Pentapeptid INTPY der Masse  $m=606,5$  Da isoliert werden. Die N-terminale Sequenzierung der Fraktionen 2-5 (Abb. 3.40) zeigte, daß sich die Fragmente auf das in Abbildung 3.41 dargestellte Fragment zurückführen lassen. So unterscheiden sich die Fragmente der Masse  $m=6835$  und  $m=6257$  ( $\Delta m=128$  Da), um K199, welches bei letzterem durch Hydrolyse der Peptidbindung zwischen K198 und K199 abgespalten wurde. Die Massen  $m=6257$  ( $m_{\text{calc}}=6275$ ) und  $6304$  ( $m_{\text{calc}}=6275$ ) können nur als Artefakte durch die Präparation, z.B. Lyophilisation in TFA-haltiger Lösung, interpretiert werden. Ihre Massendifferenzen von den berechneten Werten ( $\Delta m=-18$  Da und  $\Delta m=+30$  Da) lassen sich nicht durch Abweichungen in der Aminosäuresequenz erklären. Die Abweichung  $\Delta m=-18$  kann als Dehydrierung interpretiert werden.



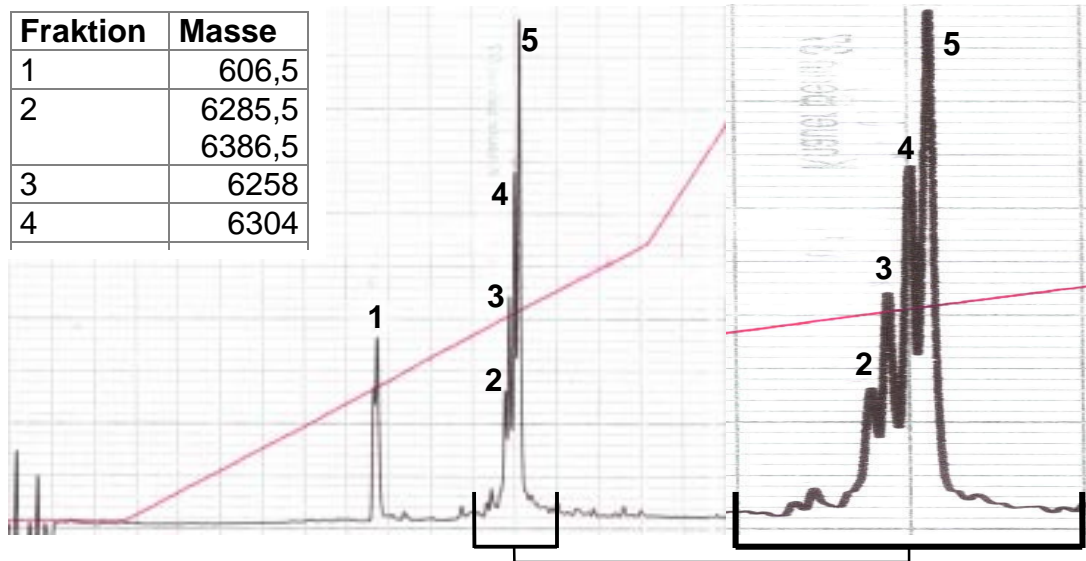


Abb. 3.40: UV-Chromatogramm nach Behandlung des Fragments  $m=6846$  Da mit Chymotrypsin und Trypsin, Kasten: Experimentelle Massen der in den Fraktionen detektierten Peptide

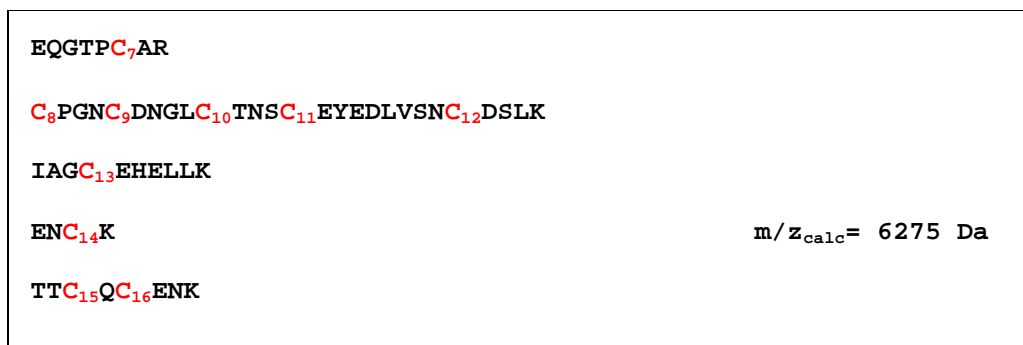


Abb. 3.41: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung des Peptids der Masse 6275

Die N-terminale Sequenzierung belegt eindeutig, daß Trypsin carboxyterminal von R171 die Peptidbindung hydrolysiert hat, das Peptid *EQGTPC<sub>7</sub>AR* bleibt aber über eine Disulfidbrücke im Fragment gebunden. Daraus folgt, daß keine Disulfidbrücke zwischen diesem Peptid und dem Peptid *ENC<sub>14</sub>K* (C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>) oder dem Peptid *IAGC<sub>13</sub>EHELLK* (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>) vorliegen kann, da in beiden Fällen die entsprechenden Fragmente detektiert werden müßten. Durch diese Bestimmung kann auch die Disulfidbrücke C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub> ausgeschlossen werden.

## Asp-N, Trypsin und Chymotrypsin

Nach dem Verdau mit Endoproteinase Asp-N konnten weitere Fragmente detektiert werden. Fraktion 3 (Abb. 3.42) wurde aufgrund ihrer Fragmentmasse identifiziert (Peptid *INTPY*  $m_{\text{calc}}=606,5$  Da).

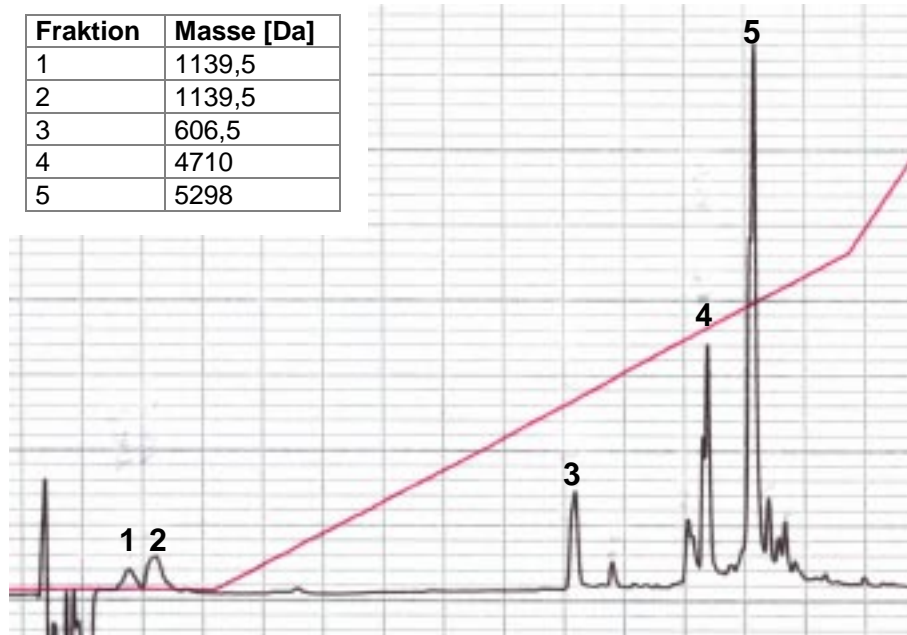


Abb. 3.42: UV-Chromatogramm nach Behandlung des Fragments  $m=6846$  Da mit Asp-N und Typsin, Kasten: Experimentelle Massen der in den Fraktionen detektierten Peptide, rot: Gradient Laufmittel B, Detektion:  $\lambda=220\text{nm}$ , YMC ODS-AQ 250mm/2mm/3 $\mu\text{m}$ /12nm, Flußrate 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ , Messbereich 0,5 OD, Laufmittel A: H<sub>2</sub>O 0,08% TFA, Laufmittel B: 90% CH<sub>3</sub>CN, 0,065% TFA

In Fraktion 1 und 2 konnte ein Fragment der gleichen Masse identifiziert werden, welches nur gering mit dem RP-Material der HPLC interagiert. Das Fragment wurde vollständig sequenziert (Abb. 3.43). Die Sequenzierung zeigte, daß es um die Peptide *DLVSNC* und *ENCCK* handelt, die über eine Disulfidbrücke [C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>] verknüpft sind.

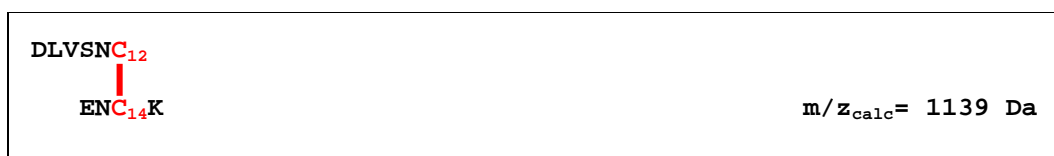


Abb. 3.43: Sequenz des Fragments der Disulfidbrücke C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>

Den Fragmenten der Masse  $m_{\text{exp}}=5300$  Da und  $m_{\text{exp}}=4710$  Da konnten die in Abbildung 3.44 und Abbildung 3.45 dargestellten Peptide zugeordnet und durch N-terminale Sequenzierung bestätigt werden.



Abb. 3.44: Sequenz des Fragmentes der Masse  $m_{\text{exp}}= 5300$  Da

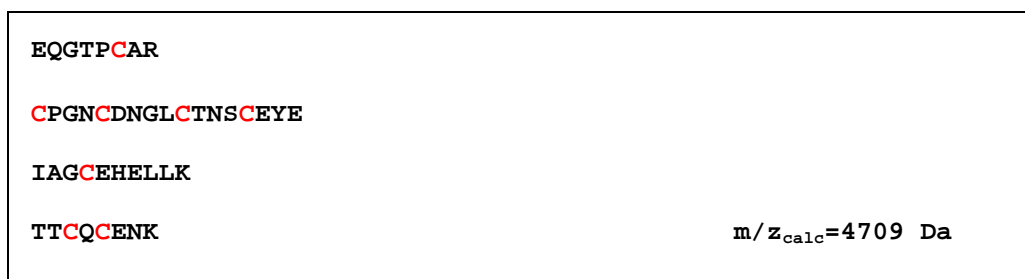


Abb. 3.45: Sequenz des Fragmentes der Masse  $m_{\text{exp}}= 4710$  Da

Beide Fragmente belegen, daß weder Asp-N noch Chymotrypsin in der Lage sind, die Peptidbindung einer Aminosäure im Sequenzabschnitt  $-C_9$ DNGLC $_{10}$ - zu hydrolysieren.

Aus den Reaktionsansätzen Asp-N/Trypsin und Chymotrypsin/Trypsin/Asp-N konnten keine weiteren Fragmente isoliert werden, die zur weiteren Aufklärung des Disulfidbrückenmuster beitragen konnten. Weder das Peptid **TTCQCENK** noch das Peptid **CPGNCDNGLCTNSCEYE** besitzen potentielle Spaltstellen für kommerziell erhältliche spezifische Proteasen. Die Verwendung unspezifischer Exoproteasen (z.B. Carboxypeptidase A), um einen sukzessiven Abbau vom Carboxy- oder Aminoterminus zu erreichen, ist denkbar. Die sterische Hinderung der durch die Disulfidbrücken erzeugten Struktur ist aber auch für diese Proteasen zu erwarten. Als alternative chemische Methode bietet sich die N-terminale Sequenzierung an. Ein Abbruch der Reaktion nach einem Cystein mit anschließender Massenbestimmung der verbleibenden Fragmente könnte bei den vorliegenden Fragmenten zur Bestimmung der Disulfidbrücke führen.

Zur Massenspektroskopie kann jedoch nicht das Trägermaterial des Sequencers verwendet werden. Auch eine Elution der Fragmente von dem Trägermaterial ist nicht möglich (*M. Raida, pers. Mitteilung*). Eine manuelle Durchführung einzelner Sequenzierungsschritte führte nicht zum Erfolg. Es wurden ein, zwei und drei Abbauschritte an jeweils einem isolierten Fragment durchgeführt. In keinem Reaktionsansatz konnte ein Fragment, auch keine Ausgangssubstanz, durch ESI-MS nachgewiesen werden. Als Alternative zur manuellen Durchführung wurden verschiedene PVDF-Blotmembranen mit Peptid beladen und in den Sequencer eingesetzt. Die im Western Blotting eingesetzten Membranen eignen sich für diesen Zweck nicht, da aufgrund der Porengröße und Materialbeschaffenheit kleine Fragmente nicht oder nur ungenügend immobilisiert werden. Nur auf einer Immobilon-CD Membran (Fa. Millipore), einer positiv vorgeladenen PVDF-Membran, konnte eine Menge von ca. 120-140 pmol des Fragmentes 4710 Da immobilisiert und drei Abbauschritten unterworfen werden. Die Mengenbestimmung erfolgte anhand des Signals für PTH-Glycin im zweiten Abbauschritt (vergl. Abb 3.45 Sequenzposition 2). Da sich die entstandenen Fragmente nicht von der Membran eluieren lassen, muß die Bestimmung der Fragmentmassen direkt von der Membran durch MALDI-MS erfolgen. Dies war bisher nicht möglich, da keine geeignete Matrix für diesen Membran-Typ ermittelt werden konnte.

Aus der N-terminalen Sequenzierung der verschiedenen Fragmente können jedoch Schlüsse auf die Position der Disulfidbrücken gezogen werden. Nach Spaltung der Peptidbindung mit Phenylisothiocyanat (PITC) bleibt die Disulfidbrücke erhalten. Erst wenn die Sequenzierungsreaktion auch das korrespondierende Cystein aus der Peptidkette löst, werden beide Cysteine aus dem Reaktionskompartiment freigesetzt. Für die Sequenzposition des ersten Cysteins erhält man folglich kein Signal, während ein geringes Signal an der Position des zweiten Cysteins auftritt, da das PTH-Dicystein unter den sauren Bedingungen teilweise zerfällt. Aber auch Cystein selbst wird unter den Reaktionsbedingungen der Sequenzierung zu über 50% zerstört (*M. Raida, pers. Mitteilung*).

Ein eindeutiges Fehlen eines Signales an der Position eines Cysteins während der Sequenzierung sollte also auf das Cystein in erster Sequenzposition, ein geringes PTH-Cystein Signal auf ein Cystein in zweiter Sequenzposition hindeuten.

Zyklus 3

Zyklus 4

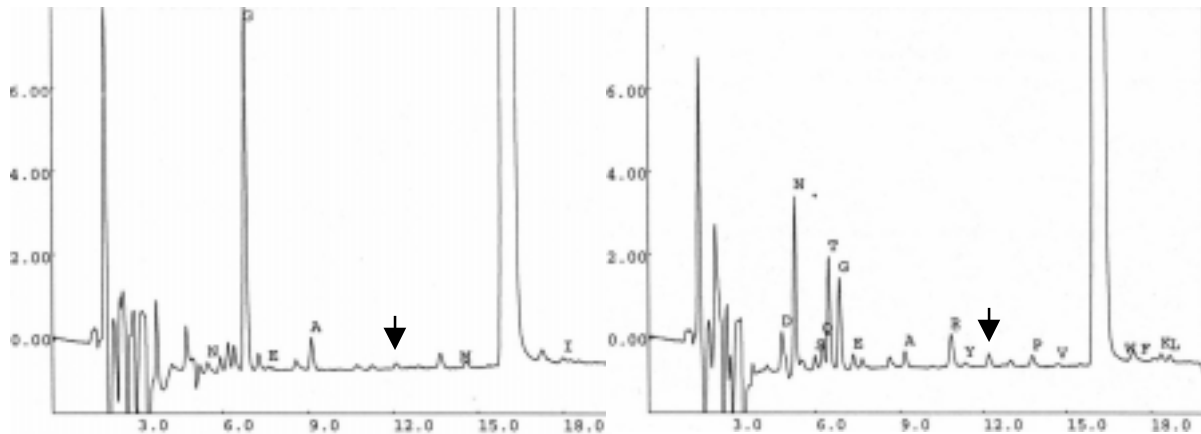


Abb. 3.46: Chromatogramme der Auftrennung der PTH-Aminosäuren, Pfeil: Position des durch die Disulfidbrücke verursachten Signals, y-Achse: Intensität [mOD], x-Achse: Zeit [min] Fragment 4710 kD

Bis Zyklus 3 tritt kein PTH-Cystein auf, während in den Zyklen 4,5 und 6 ein Signal auftritt (Abb. 3.46, Fragment 4710 kD, Sequenz siehe Abb. 3.47). Im siebten Abbauzyklus schwächt sich dieses Signal ab und ist ab dem achten Zyklus gegenüber dem Signalhintergrund kaum mehr detektierbar. Die Sequenzierung deutet darauf hin, daß erst im vierten Abbauschritt der Sequenzierung das zweite Cystein einer Disulfidbrücke abgespalten wird. Ein persistierendes Signal wird bis zum achten Zyklus beobachtet. Ein Fehlen eines Signales im dritten Zyklus weist darauf hin, daß wahrscheinlich keine Disulfidbrücke zwischen C<sub>8</sub> und C<sub>15</sub> besteht.

Zyklus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Peptid	E	Q	G	T	P	C <sub>7</sub>	A	R									
Peptid	C <sub>8</sub>	P	G	N	C <sub>9</sub>	D	N	G	L	C <sub>10</sub>	T	N	S	C <sub>11</sub>	E	Y	E
Peptid	I	A	G	C <sub>13</sub>	E	H	E	L	L	K							
Peptid	T	T	C <sub>15</sub>	Q	C <sub>16</sub>	E	N	K									
Signal				*	*	*	*										

Abb. 3.47: Korrespondierende Sequenz zu den in Abb 3.46. dargestellten Sequenzierungsschritten, (\*) - (schwaches) detektiertes Cystein-Signal

Faßt man die Beobachtungen zusammen, kann man anhand der Daten die verbliebenen 28 Kombinationsmöglichkeiten weiter einschränken.

Diese nicht erlaubten Kombinationen würden nicht zum dem in Abbildungen 3.44 und 3.45 dargestellten, sondern zu Fragmenten führen, die nicht mehr über Disulfidbrücken verknüpft sind und damit in der Massenspektrometrie detektierbar wären:

1. Ausgeschlossen ist eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen  $C_7$ - $C_{13}$  und die Disulfidbrücke  $C_{15}$ - $C_{16}$ .

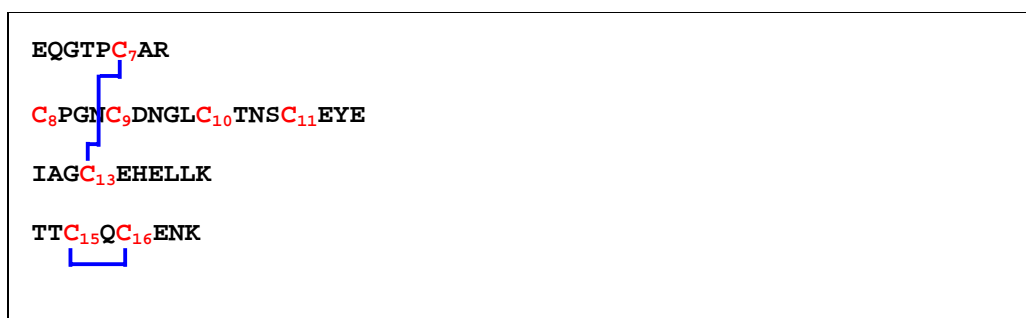


Abb. 3.48: Verbotene Disulfidbrücken nach Punkt 1

2. Nicht erlaubt ist die Bildung von zwei Disulfidbrücken unter Beteiligung der Cysteine  $C_7$ - $C_{13}$ - $C_{15}$ - $C_{16}$  oder  $C_8$ - $C_9$ - $C_{10}$ - $C_{11}$ . Unter Cysteinen dieser Gruppen darf jeweils nur eine Disulfidbrücke ausgebildet werden.

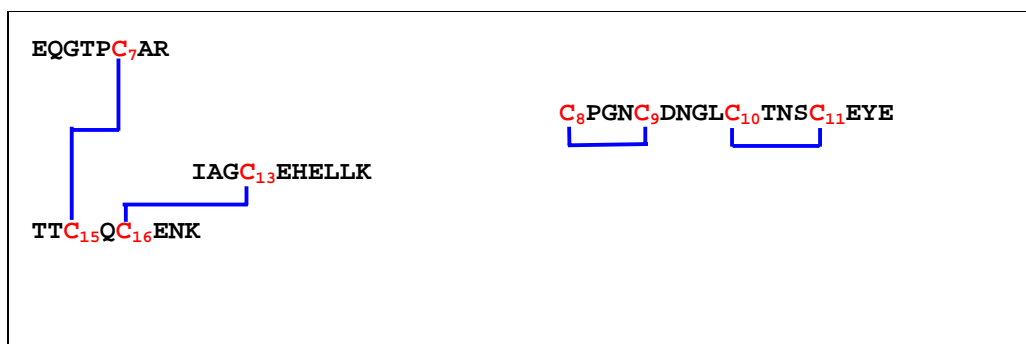


Abb. 3.49: Verbotene Disulfidbrücken nach Punkt 2 (Beispiel, weitere nicht erlaubte Kombinationen möglich)

3. Zwingend ist jedoch mindestens eine Disulfidbrücke zwischen  $C_{15}$ / $C_{16}$  und einem Cystein des Peptids  $C_8$ PGNC $_9$ DNGLC $_{10}$ TNSC $_{11}$ EYE.

4. Aufgrund der N-terminalen Sequenzierung kann vermutet werden, daß keine Disulfidbrücke C<sub>8</sub>-C<sub>13</sub> vorliegt. Da dieses Ergebnis der Sequenzierung entnommen ist, sollte es eher als Hinweis, denn als Verbot gewertet werden.

Da immer vier Disulfidbrücken gebildet werden müssen, sind diese Einschränkungen sehr restriktiv. Setzt man eine Disulfidbrücke voraus, so ergeben sich neue Einschränkungen. Diese können im Zusammenhang mit der Suche nach ähnlichen Proteinen oder der Analyse anderer CRISPs genutzt werden. Bezüglich der Aminosäuresequenz ähnliche Proteine, die aber nicht die Randbedingung der erlaubten Disulfidbrücken erfüllen, bilden eine andere dreidimensionale Struktur aus. Letztlich ist es aber die räumliche Struktur des Protein, welches die biologische Funktion erfüllt. Bezogen auf den betrachteten Sequenzbereich von nur ca 80 Aminosäuren erfüllen Domänen mit verschiedener räumlicher Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht eine ähnliche Funktion und sind bei der Suche nach funktionellen Hinweisen für CRISP-Proteine nicht hilfreich.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Identifizierung und Sequenzierung von Proteinen des männlichen Genitaltraktes**

Die Kenntnis von Sequenz und Expression homologer Proteine in verschiedenen Spezies ermöglicht die Identifizierung von Sequenzmotiven und konservierter funktioneller Domänen. Damit stehen weitere Informationen für Homologievergleiche zur Verfügung. Die Charakterisierung konservierter Regionen, Muster, Motive und Domänen kann ein zentrales Element auf der Suche nach einer physiologischen Funktion darstellen, wie dies in den Datenbanken PROSITE (Motive, Muster), Prodom (Domänen) und Jpred<sup>2</sup> (Strukturen in Kombination mit PROSITE und Prodom) realisiert ist (Rost et al. 1997, Pearson und Lipman 1988, Ponting et al. 1999, Schultz et al. 1999, 2000). Insbesondere für physiologische Untersuchungen sind Rückschlüsse zu homologen Proteinen von großer Bedeutung. Kenntnisse der biologischen Funktion eines Proteins erlauben gezielte Experimente zur Aufklärung der physiologischen Rolle und Funktion homologer Proteine.

#### **4.1.1 Identifizierung und Sequenzierung boviner CRISP-Proteine**

Aufgrund von Untersuchungen an der Ratte, wird eine Beteiligung des epididymalen Proteins CRISP-1 an der Gametenfusion vermutet (Review: Cuasnicu et al. 1999). Das testikuläre Protein, CRISP-2, ist anhand von Ergebnissen an Zellkulturen an der Anheftung der Spermatozoen an die Sertoli-Zellen beteiligt (Maeda et al. 1998).

Die Transkription und Expression CRISP-homologer Proteine konnte in bovinem Hoden und Nebenhoden nachgewiesen werden. In Anlehnung an Eberspächer et al. (1995) wurden die Transkripte CRISP-1 (Nebenhoden) und CRISP-2 (Hoden und Nebenhodenkopf) benannt. Tatsächlich weisen die Sequenzen die höchste Homologie zu den entsprechenden Proteinen anderer Spezies auf (vergl. Tab. 3.1, Abb. 3.4 und 3.5). Wie auch schon beim Schwein (Schambony et al. 1999, 2000), war eine Identifizierung eines CRISP-3 homologen Transkripts, dem dritten Mitglied der CRISP-Familie, mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich. Während beim Schwein Transkription und Expression von CRISP-2 in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen detektiert wurde, ist die Transkription von



CRISP-Proteinen beim Rind auf Testis und Epididymis (*caput, corpus*) beschränkt. Beim Schwein konnte deshalb angenommen werden, daß eine Expression von CRISP-2 das Fehlen eines CRISP-3 Proteins kompensiert. Gestützt wurde diese Annahme durch die höhere Homologie zu Proteinen des CRISP-2 Typs als zu Proteinen der CRISP-1 Gruppe insbesondere auch im carboxyterminalen Bereich und der charakteristischen Sequenzen –YYY-, -TPY- und –KIY- (vergl. Abb. 3.5, Unterstreichungen). Die Detektion eines CRISP-Proteins im Seminalplasma des Ebers im Rahmen der präparativen Arbeiten stärkt ebenfalls die Möglichkeit einer Kompensation durch Expression des porcinen CRISP-2 in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen (vergl. 3.3.2, S. 72). Eine vergleichende Übersicht der Transkription der CRISP-Proteine im Genitaltrakt von Schwein, Pferd (*Schambony et al. 1998, 1999*) und Rind, untersucht durch RT-PCR, ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

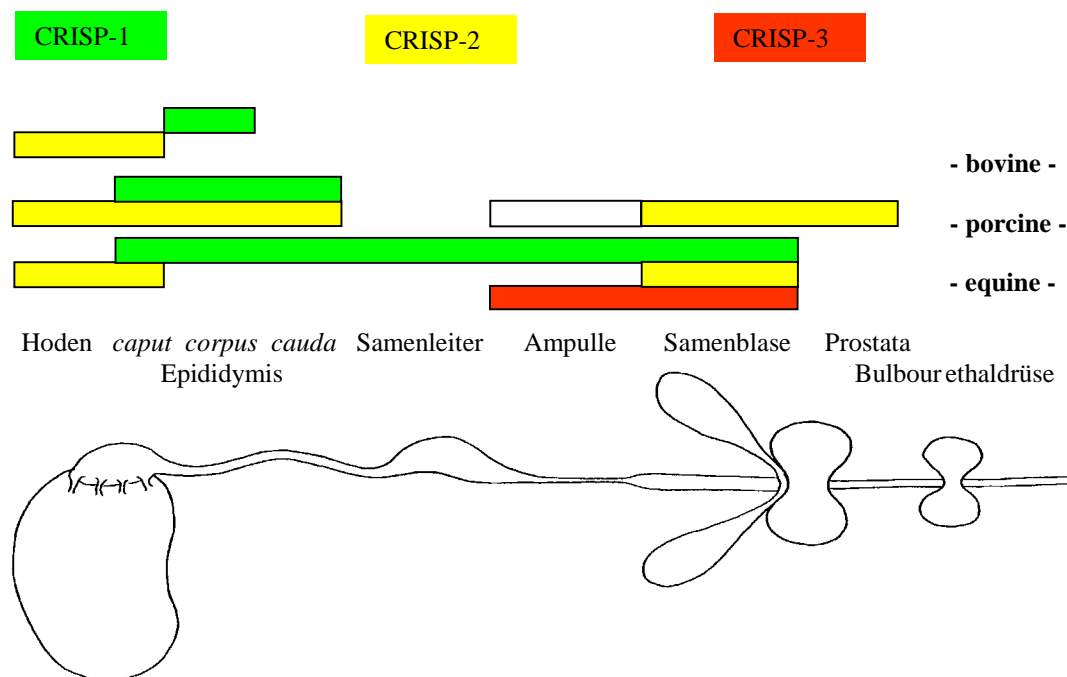


Abb. 4.1: Transkription von CRISP-Proteinen im männlichen Genitaltrakt, Detektion durch RT-PCR: grün: CRISP-1, gelb: CRISP-2, rot: CRISP-3, keine Transkripte konnten in RNA-Präparationen der Bulbourethraldrüse nachgewiesen werden, Ampulle beim Schwein nicht entwickelt

Transkripte der Proteine der CRISP-3 Gruppe wurden im Northern Blot auch beim Menschen und in der Maus identifiziert (*Eberspächer et al. 1995*). Vollständige vergleichende Untersuchung liegen für andere Spezies nicht vor. Bekannt sind weiterhin CRISP-1 Transkripte aus Ratte (*Rochwerger und Cuasnicu 1992*), Maus, Mensch (*Eberspächer et al. 1995*) und Makake (*O'Rand et al. 1999*), sowie CRISP-2

Transkripte aus Ratte (*Maeda et al. 1998*), Maus, Mensch, (*Eberspächer et al. 1995*) und Meerschweinchen (*Foster et al. 1996*).

Die Identifizierung und Sequenzierung der bovinen CRISP-Proteine ist insbesondere für physiologische Untersuchungen von großer Bedeutung. Die Rinderzucht ermöglicht eine gute Kontrolle der Fertilität männlicher Tiere über die industriell relevante 60-90tägige Nichtrückkehrate (*non return rate, NRR*). Sie berücksichtigt unter anderem in einem linearen statistischen Zusammenhang auf einer Skala von 1-9 den Monat der Insemination, das durchführende Personal, die Rasse und das Alter der besamten Kühe und erlaubt damit eine Korrelation mit der Fertilität der Bullen. Die durch die industriellen Anforderungen bedingte Standardisierung der Probenbehandlung bietet eine gute Möglichkeit für die Durchführung von Fertilitätsstudien, wie dies eindrucksvoll am Beispiel des fertilitätsrelevanten Proteins P25b gezeigt werden konnte (*Sullivan et al. 1999*). Das bovine Genom-Projekt wird diesen Vorteil durch die Beschreibung regionaler Unterschiede auf genetischer Ebene weiter stärken.

#### 4.1.2 Identifizierung und Sequenzierung von equinem P47

Das porcine Protein P47 wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisierten *Zona pellucida* Glykoproteinen aus CHAPSO-solubilierten Proteinen der Spermienmembran angereichert. Identifizierung und Sequenzierung zeigten, daß es sich um ein Protein mit hoher Homologie zu Glykoproteinen aus der Brustdrüse handelt. Das Protein ist modular aus zwei EGF-Domänen und zwei C-Typ Domänen, die man auch im Faktor VIII der Blutgerinnungskaskade und anderen extrazellulären Proteinen findet, aufgebaut. Ein exponierter *Loop* trägt das Disintegrin-Aminosäuremotiv *-RGD-* (Abb. 4.2, *Enßlin et al. 1998*).

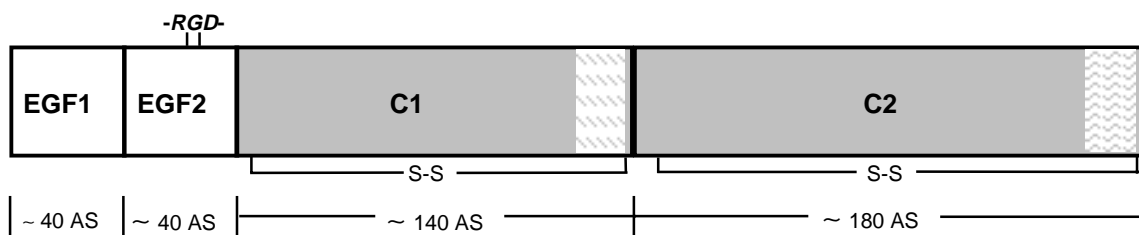


Abb.4.2: Blockdiagramm von Proteinen der P47-Familie, AS- Aminosäuren, gemusterte Bereiche: potentielle Lipidbindungsbereiche (Erläuterungen s. Text)

Die Bindung des Proteins an Zelloberflächen wird wahrscheinlich durch die in Abbildung 4.2 schraffiert dargestellten Bereiche der C-Typ Domänen vermittelt. Untersuchungen durch NMR-Spektroskopie an synthetischen Peptiden, basierend auf der Sequenz der zweiten C-Typ Domäne des humanen Faktor VIII, zeigten, daß eine  $\alpha$ -helikale Struktur ausgebildet wird. Hydrophobe Aminosäuren werden entlang einer Achse ausgerichtet und sind in der Lage mit Lipiden der Zellmembran hydrophobe Wechselwirkungen auszubilden. Die Spezifität für negativ geladene Lipide (Phosphatidylserin) wird durch zwei parallel zur Membranoberfläche orientierte Arginine vermittelt (Abb. 4.3, *Gilbert und Baleja, 1995*).

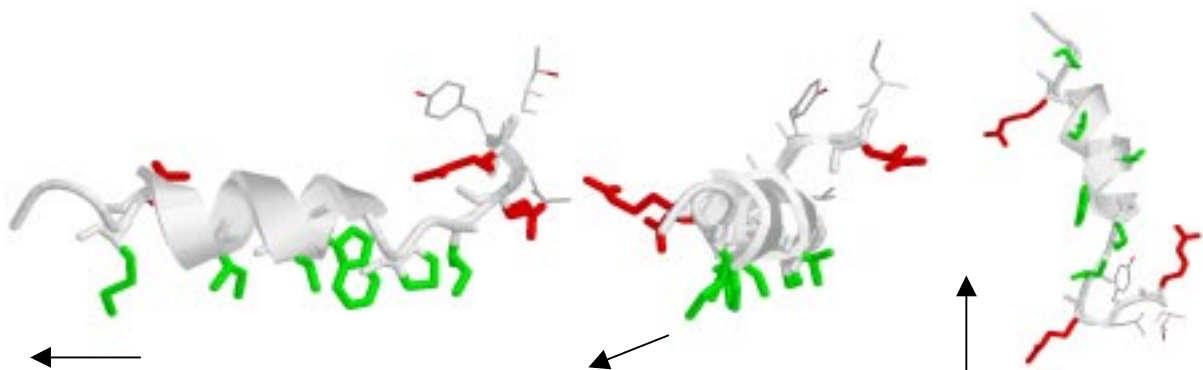


Abb. 4.3: NMR-Struktur Darstellung des Membran-bindenden Peptids des human Faktor VIII, nach *Gilbert und Baleja, 1995*, rot: Arginine R2,R4,R18, die Arginine R4 und R18 sind auch in der P47 Familie konserviert, grün: Membran-penetrierende Aminosäuren I6, P8, W11, V12, I15, M19 (Konservierung vergl. auch Abb 4.4 und Abb. 3.10, Seite 67), Pfeile: Molekülorientierung

Die Lipidbindung und –spezifität vermittelnden Sequenzbereiche sind auch in den C-Typ Domänen der P47-Proteinfamilie konserviert, wie im Beispiel des equinen P47 dargestellt (Abb. 4.4). Inzwischen konnte für das Protein der bovinen Milchdrüse (PAS 6/7) die Lipidbindung mit Spezifität für Phosphatidylserin bestätigt werden (*Andersen et al. 1997*).

ec P47 C1:	VTYVRLVPLACHHGCTRRFELL
	..... : . : .. :....
hs F VIII:	TRYLRIHPSQSWVHQIALRMELV
	.....: : : .....:....
ec P47 C2:	ARFVRIQPVAWHNRITLRLELL
	hchch hhc hhhch

Abb. 4.4: Sequenzvergleich der potentiellen Lipid-bindenden Sequenzbereiche von humanem Faktor VIII (Domäne C2) und equinem P47 (Domänen C1 und C2), h: hydrophobe Aminosäure, beteiligt an Lipid-Interaktion, c: geladene Aminosäure, beteiligt an Lipidspezifität (Sequenzkonservierung zwischen Proteinen der P47-Familie s. Seite 67, Abb. 3.10)

Als Interaktionspartner des Disintegrin-Motivs konnte ein  $\alpha_v/\beta_5$ -Integrin durch Affinätschromatographie an immobilisiertem bovinen PAS 6/7 aus Rindermilch, dem P47-homologen Produkt der Brustdrüsen identifiziert werden. Die Annahme, daß es sich bei dem exponierten –RGD- Motiv der zweiten EGF-Domäne um ein Intergrin-Wechselwirkungsmotiv handelt, wird somit gestützt (*Anderson et al. 1997*). Die Funktion der P47-homologen Proteine ist unbekannt. Ihre Interaktionspartner, die Integrine, sind an einer Vielzahl von Vorgängen beteiligt, die Zelladhäsion, Proliferation und Apoptose einschließen (*Review: Hynes 1992*). Die Interaktion mit ihnen läßt daher keine Rückschlüsse auf die konkrete Funktion von P47 und homologen Proteinen zu. Mitglieder der P47-Familie konnten in einer Anzahl von Säugetieren und in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (Rind: *Anderson et al. 1997*, Schwein/Rind: *Enßlin et al. 1998*). Unterschiedliche Glykosylierung (Rind, Schwein: *Enßlin et al. 1998*), Sequenzinsertion (Maus, *Stubbs et al. 1990*) und Deletion (Mensch, *Couto et al. 1996*) in Abhängigkeit vom exprimierenden Gewebe erschweren zusätzlich eine Interpretation der möglichen Funktion von P47.

Die Identifizierung des equinen Mitglieds der P47 Proteinfamilie bestätigt die mögliche Beteiligung dieses Proteins auch im Befruchtungsvorgang des Pferdes. Es ist hoch konserviert im Vergleich mit seinen testikulären Homologen aus Schwein, Rind und Maus (vergl. Tab. 3.2, S. 66). Dies gilt insbesondere für die Sequenz der möglichen Wechselwirkungsmotive, der Lipidbindungsregion und dem Disintegrin-Motiv. Mit der Lokalisation auf dem Akrosom des Spermatozoons (*Enßlin et al. 1998*) stellt es einen potentiellen Wechselwirkungspartner zu Integrinen anderer Zellen, wie den Epithelzellen des Oviduktes, dar. Die wenig restriktive Expression im männlichen Genitaltrakt, wie anhand der Transkriptionsmuster und Immunhistologie ersichtlich (Immunhistologie: *Läkamp et al. in Vorbereitung*), und die bisherigen Untersuchungen der P47-homologen Proteine können nicht zur Eingrenzung einer möglichen Funktion dieses Proteins im Befruchtungsvorgang beitragen. Die Konservierung in verschiedenen Spezies unterstützt das Interesse an der Funktion von P47 und bietet die Möglichkeit den Einfluß von Glykosylierung, Sequenzdeletion und –insertion an diesem Beispiel zu untersuchen.

## 4.2 Aggregation von Seminalplasmaproteinen

Das FnII-Typ Seminalplasmaprotein PDC-109 des Rindes kann durch Kombination von Gelfiltration und Affinitätschromatographie an DEAE-Sepharose isoliert werden. Die Elution von der Gelfiltration erfolgt als hochmolekulares Aggregat ( $MW_{\text{obs}}$  60-150 kD, *Calvete et al. 1996b*) zusammen mit anderen Seminalplasmaproteinen des Bullen. Nur das zur Gruppe der Spermadhäsine gehörende aSFP kann als Monomer isoliert werden. Die nachfolgende Affinitätschromatographie an DEAE-Sepharose wird in Gegenwart von 1 M NaCl durchgeführt. Nur PDC-109 bindet und kann mit 10 mM PCh in salzfreiem Puffer eluiert werden.

Die multimeren Assoziation von PDC-109 kann sowohl durch einen spezifischen Liganden, der Cholin-Kopfgruppe von PCh, oder durch Erhöhung der Ionenstärke beeinflusst werden. In 10 mM MOPS-Puffer pH 7,0 eluiert PDC-109 als Multimer mit einem apparenten Molekulargewicht  $MW_{\text{obs}}$  von ~142 kD. Die Anwesenheit von PCh im Chromatographiepuffer führt zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung des beobachtbaren Molekulargewichts  $MW_{\text{obs}}$ . Bei einer Konzentration von 10 mM PCh wird ein Wert von ca. ~25 kD ermittelt und entspricht damit einem Dimer. Auch das Gegenion des PCh-Salzes,  $\text{Ca}^{2+}$ , vermag eine Reduzierung des beobachtbaren Molekulargewichts zu bewirken. Bei einer Konzentration von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  liegt nach den Ergebnissen der Gelfiltration nahezu ausschließlich das Monomer vor. Die Maskierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions mit einer hinreichend hohen EDTA-Konzentration führte ebenfalls zu einem beobachtbaren Molekulargewicht in der Größe eines Monomers. Ein Effekt, der auch durch Zusatz einer bezüglich ihrer Ionenstärke vergleichbaren NaCl-Konzentration (150 mM) erreicht werden kann. Ein Gehalt von 20 mM PCh im Chromatographiepuffer führt hingegen auch in Gegenwart eines 2,5-fachen Überschusses an EDTA zu einem beobachtbaren Molekulargewicht von ca. ~25 kD, also einem Dimer.

Diese Ergebnisse deuten auf zwei verschiedene Mechanismen zur Dissoziation der multimeren PDC-109 Aggregate hin. Zum einen eine Dissoziation die durch den Liganden PCh vermittelt wird, wie auch eine Dissoziation aufgrund der Ionenstärke. Die Ligandeninteraktion ist auch in Gegenwart hoher Ionenstärke möglich, wie die Gelfiltration in Gegenwart von EDTA und die Affinitätschromatographie an DEAE-Sepharose und PC-Agarose in Gegenwart von 1 M NaCl belegen.

Diese These wird durch parallel durchgeführte Untersuchung der kooperierenden Arbeitsgruppe am C.S.I.C. Madrid durch M. Gasset et al. (1997) gestützt. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts mittels analytischer Ultrazentrifugation ergibt in Gegenwart von PCh einen Wert, der mit 19 kD deutlich größer ist als der eines Monomers (~13 kD). Eine geringere Dissoziation wird jedoch in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  und NaCl bestimmt. Unter Umständen deutet dies auf ein nicht ideales Verhalten in der Gelfiltration hin. Eine Interaktion mit der Säulenmatrix, z.B. durch hydrophobe Wechselwirkungen, würde zu einer verzögerten Elution und damit zur Bestimmung eines zu niedrigen beobachtbaren Molekulargewichts führen. Eine klare Unterscheidung der durch Ionenstärke und PCh-Ligand vermittelten Dissoziation zeigt sich in der CD-Spektroskopie. Der Zusatz von PCh hat eine deutliche Änderung des Spektrums zur Folge, die weder von EDTA erreicht, noch beeinflusst wird. Die Änderung des CD-Spektrums spricht für eine spezifische Erkennung des Liganden und dokumentiert eine Änderung der Sekundärstruktur bei der Bindung des Liganden (Gasset et al. 1997).

Die Assoziation von PDC-109 zu Oligomeren in Lösung kann auf eine ionische Interaktion zurückgeführt und durch den Zusatz von Salzen beeinflusst werden. Bei einer physiologischen NaCl-Konzentration von 154 mM liegen wahrscheinlich Oligomere aus 2 (Gelfiltration) bis 4 (Ultrazentrifugation) Molekülen vor. Die verschiedenen Aggregate stehen miteinander im Gleichgewicht. Weder in der Gelfiltration noch der Ultrazentrifugation konnten diskrete Größen, die bei einem Zerfall z.B. eines Tetramers in zwei Dimere oder vier Monomere auftreten müssten, bestimmt werden. Der Übergang erfolgt kontinuierlich und spricht für ein Gleichgewicht zwischen Oligomeren verschiedener Aggregatgröße durch ständige Assoziation und Dissoziation einzelner Proteine.

Nur die Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  und PCh führen, verglichen mit NaCl, in niedriger Konzentration zu einer deutlichen Verringerung der Assoziation. Der Einfluß von  $\text{CaCl}_2$  konnte bisher nicht geklärt werden. In fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zeigte sich kein Einfluß auf die intrinsische Proteinfluoreszenz (A. Greube, pers. Mitteilung). Die Interaktion mit PC hingegen führt auch hier zu einer Änderung der Proteinfluoreszenz. Dieser Effekt ist auf die Änderung der chemischen Umgebung der Fluorophore zurückzuführen und kann durch die spezifische Bindung des Liganden erklärt werden, da dieser die Proteinstruktur, wie anhand der CD-

Spektroskopie ersichtlich, beeinflusst. Beobachtet werden kann bei der Interaktion mit Phosphatidylcholin-haltigen Lipidvesikeln auch eine Änderung der Proteinfluoreszenz und ein immobilisierender Effekt auf die Lipide des Lipidbilayers durch Messung der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) spezieller in die Membran integrierter Lipidanaloga (*Müller et al. 1998*). Die Untersuchungen bestätigen auch die Spezifität der Affinität zu der Cholingruppe. PDC-109 bindet spezifisch an Phosphatidylcholin, die Einführung von Lipiden mit anderen Kopfgruppen wie Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin reduziert den Anteil an gebundenem Protein im Verhältnis zum Gesamtlipid.

Da in Lösung die Assoziation von PDC-109 durch PCh zurückgedrängt wird, kann davon ausgegangen werden, daß Wechselwirkungsoberflächen, die für die Protein-Protein Assoziation verantwortlich sind, verändert werden. Ob es sich um eine sterische Hinderung durch PCh oder eine veränderte Wechselwirkungsoberfläche des Proteins handelt, kann anhand dieser Daten nicht entschieden werden. Weitergehende Untersuchung der Arbeitsgruppe um P. Müller zeigten, daß PDC-109 nicht nur mit der Cholin-Kopfgruppe interagiert, sondern tiefer in den Lipidlayer hinein Wechselwirkungen ausbildet (*Müller et al. 1998*).

Die Interaktion mit PCh bzw. Phosphatidylcholin wird durch die Fibronectin Typ-II ähnlichen Domänen vermittelt (*Desnoyers et al. 1992, Calvete et al. 1997a*). Sie finden sich auch in homologen Proteinen anderer Spezies, die ebenfalls der Affinität zu PC aufweisen. (Schwein: pB1: PC-Agarose, Pferd: HSP-1/2: PC-Agarose, ELISA). Der jeweilige N-Terminus dieser Proteine besteht aus 20-40 Aminosäuren und ist zwischen den Spezies nicht konserviert (Abb. 4.5). Die Glykosylierung der Proteine tritt nur in diesem Sequenzbereich auf und kann innerhalb der Proteinpopulation, wie im Fall des PDC-109 (drei oder keine Kohlenhydratreste), unterschiedlich sein (*Calvete et al. 1997a, pB1, HSP-1/2*). Sie hat bei PDC-109 keinen Einfluß auf die Affinität zu PCh oder das Assoziationsverhalten. Eine Funktion dieses N-terminalen Bereichs, wie auch der Kohlenhydratseitenketten, konnte bisher nicht ermittelt werden.

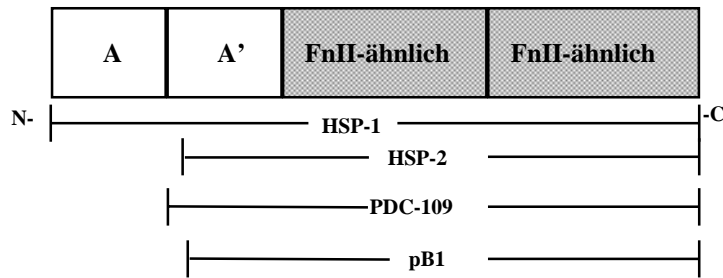


Abb. 4.5: Domänen-Organisation von Proteinen des FnII-Typs aus Pferd (HSP-1/2 121 AS / 106 AS), Rind (PDC-109, 109 AS) und Schwein (pB1, 105 AS)

Mit der Bindung von Proteinen der FnII-ähnlichen Familie an eine Membran wird die Membranoberfläche verändert. Nicht mehr die Lipidkopfgruppen sind exponiert, sondern die der Cholinbindungstelle gegenüberliegende Proteinoberfläche. Die Bindung des Proteins hat also zwei Effekte auf die Membran, die von physiologischer Bedeutung sein könnten. Die Fluidität der Membran wird durch den meßbaren immobilisierenden Effekt verringert und es wird eine veränderte Wechselwirkungsfläche exponiert, nicht mehr die der Cholingruppe sondern die des Proteins. Bedenkt man, daß der Anteil an PC mehr als 60% des Gesamtlipidgehaltes beträgt, wird die Bedeutung einer Oberflächenbedeckung durch die FnII-ähnlichen Proteine deutlich. Die partielle Glykosilierung und der hohe Anteil geladener Aminosäuren der N-terminalen Sequenz spricht gegen eine zusätzliche Interaktion dieser Domäne mit den Lipidkopfgruppen oder eine Integration in die hydrophobe Membran. Einige denkbare Expositionen des N-Terminus sind in Abbildung 4.6. dargestellt. Es ist ersichtlich, daß der N-Terminus durchaus ein Wechselwirkungsmotiv darstellen könnte.

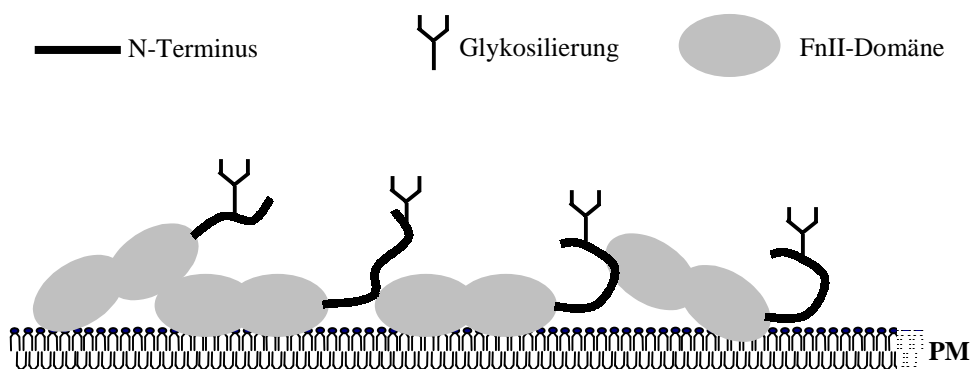


Abb. 4.6: Membranbindung und Protein-Protein Interaktion durch Proteine des FnII-Typs. Mögliche Exposition des N-terminalen Bereichs als Wechselwirkungsmotiv. Erläuterung s. Text



In erster Linie kämen als Interaktionspartner andere Proteine des Seminalplasmas in Frage, die gemeinsam von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen sekretiert werden. Dies schließt eine Interaktion mit anderen Wechselwirkungspartnern zu einem späteren Zeitpunkt des Befruchtungsvorganges nicht aus. Von Bedeutung als Interaktionspartner für den Befruchtungsvorgang sind nur die Proteine des Seminalplasmas, die durch direkte Bindung der Spermatozoen oder indirekte Bindung, durch die bindenden Proteine vermittelt wird. Nur die Spermienoberflächen-gebundenen Proteine werden mit den Spermatozoen zum Ovidukt transportiert, dem ersten Interaktionsort mit Elementen des weiblichen Reproduktionsapparates.

Eine direkte Assoziation von equinem CRISP-3 an Lipidmonolayer als Membranoberflächenmodell konnte nicht belegt werden. Dies steht mit den theoretischen Analysen durch Sequenz- und Motivvergleiche in Einklang. CRISP-Proteine besitzen keine signifikanten Sequenzabschnitte oder Domänen, die mit einer Membranbindung, sei es peripher oder integral, in Verbindung gebracht werden können. Der hohe Anteil von CRISP-3 im Seminalplasma und die hohe Anzahl von CRISP-Antigenen an der Oberfläche ejakulierter Spermatozoen belegen jedoch die Oberflächenassoziation von CRISP-Proteinen (*Schambony 1999*). Es muß daher ein anderer Bindungsmodus, wie zum Beispiel eine Protein-Protein Interaktion, angenommen werden. Dieser Fragestellung wurde im Rahmen der PL-Bindungsstudien mittels ELISA nachgegangen. Die Homologen FnII-Typ Proteine des Pferdes, HSP-1/2, binden ebenso an Lipidmonolayer mit einer Präferenz zu PC und LPC, wie es für PDC-109 ermittelt wurde (*Desnoyers et al. 1992*). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß equines CRISP-3 nicht an Monolayer von PC, PE oder PS bindet. Inzwischen konnten diese Ergebnisse auch durch die Fluoreszenzspektroskopie anhand der Interaktion mit Lipidvesikeln bestätigt werden (*A. Greube, persönl. Mitteilung*). Die durch Koinkubationsversuche erarbeiteten Hinweise auf eine HSP-1/2 vermittelte Oberflächenbindung des CRISP-Proteins fanden zwar ihre erste Bestätigung durch die Fluoreszenzspektroskopie. Sie zu verifizieren und zu charakterisieren dauert derzeit noch an. Sollte eine Bestätigung endgültig möglich sein, werden neue Fragen nach der physiologischen Bedeutung, insbesondere in Bezug auf die drei verschiedenen Mitglieder der CRISP-Proteinfamilie und ihrer unterschiedlichen Bedeutung für den Befruchtungsvorgang aufgeworfen.

### 4.3 Analyse des Disulfidbrückenmusters von equinem CRISP-3

Mit der Analyse des Disulfidbrückenmusters liegen erstmals Informationen zu Strukturelementen eines nativen CRISP-Proteins vor, die über die Primärsequenz hinausgehen.

Die Aminosäuresequenz der CRISP-Proteine weist eine hohe Homologie zu Proteinen der *pathogenesis-related* (PR-) Familie auf. Die Ähnlichkeit der Aminosäuren erstreckt sich N-terminal über eine Sequenzlänge von ca. 150 Aminosäuren. Dies entspricht der vollständigen Sequenz der PR-Proteine. Allein die Gruppe der CRISP-Proteine besitzt gegenüber den PR-Proteinen eine carboxyterminale Verlängerung von ca. 65 Aminosäuren einschließlich 10 konservierter Cysteine. Das minimale Erkennungsmotiv der Prosite Datenbank beinhaltet kein bzw. nur ein Cystein (Abb 4.7)

<u>Prosite Eintrag PS01009:</u>	
	[GDER]-H-[FYWH]-T-Q-[LIVM](2)-W-x(2)-[STN]
ec CRISP-3:	G H Y T Q VV W YS S (AS:116-126)
<u>Prosite Eintrag PS01010, C an Disulfidbrücke beteiligt:</u>	
	[LIVMFYH]-[LIVMFY]-x-C-[NQRHS]-Y-x-[PARH]-x-[GL]-N-[LIVMFYWDN]
ec CRISP-3:	Y Y V C <sub>s</sub> Q Y C P A G N Y (AS:145-156)

Abb. 4.7: Erkennungsmotive der PR/SCP/TPX/Ag –Familie Prosite PS01009 und PS010010 und der korrespondierenden Sequenzbereiche von equinem (ec) CRISP-3

Ziel dieser Erkennungsmotive ist die Identifizierung aller Angehörigen einer Proteinfamilie und die Minimierung falsch positiver Erkennungen. Alle bekannten CRISP-Proteine erfüllen die Bedingungen der Prosite Motiv-Einträge PS01009 und PS01010. (Abb. 4.7). Falsch positive Erkennungen sind nicht bekannt. Die Aminosäureähnlichkeit und -identität geht im direkten Vergleich der Proteine über die minimalen Identifizierungsmotive hinaus, beinhaltet aber die Insertion und Deletion einzelner Sequenzabschnitte.

Für das PR-Protein PR 14a aus Tomate, als *inclusion bodies* in *E. coli* rekombinant exprimiert, liegt eine NMR-Struktur vor. Es handelt sich dabei um die bisher einzige öffentlich zugängliche Struktur eines PR-Proteins. PR 14a besitzt, ebenso wie alle CRISP-Proteine im homologen N-terminalen Bereich, sechs Cysteine, die drei Disulfidbrücken bilden. Das Disulfidbrückenmuster kann den Strukturdaten entnommen werden (Abb. 4.8, *Fernandez et al. 1997*).

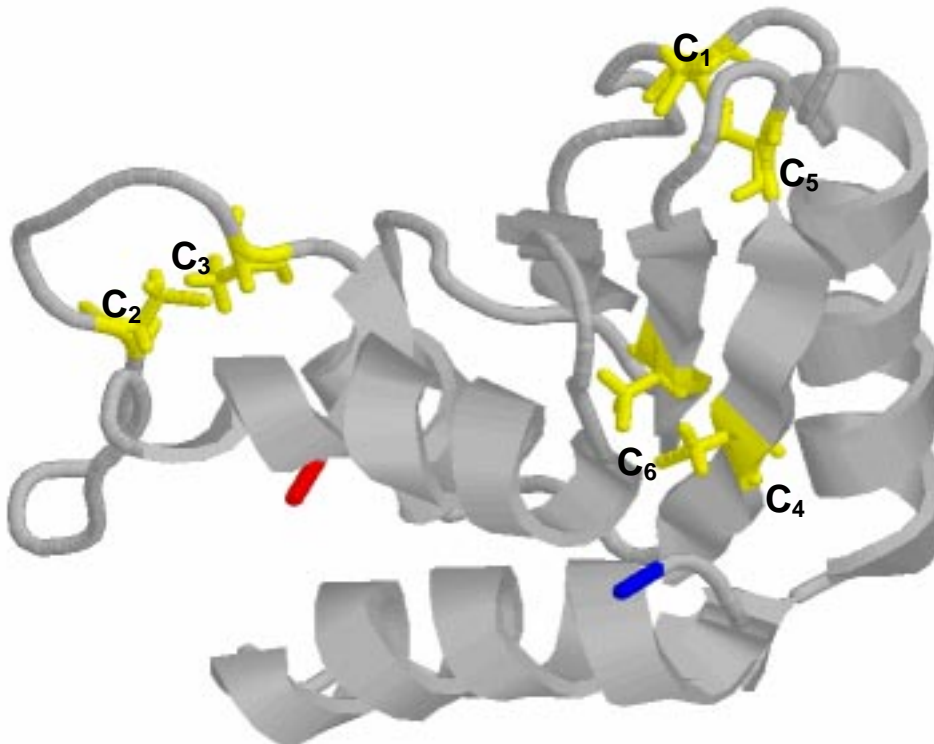


Abb. 4.8: Struktur von rekombinantem PR 14a aus *E.coli* nach *Fernandez et al. 1997* (PDB Eintrag: 1cfe), C1-C6: Disulfidbrücken-bildende Cysteine

Das Disulfidbrückenmuster des rekombinanten PR 14a [C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>] [C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>] [C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>] steht nicht in Übereinstimmung mit der Analyse des nativen CRISP-3 [C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>] [C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>] [C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>]. Dieser Unterschied weist auf eine andere dreidimensionale Struktur hin, wie anhand der Disulfidbrücke [C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>] im Vergleich mit der NMR-Struktur (Abb. 4.8) deutlich wird. Unter Proteinen der PR-Familie sind nicht alle Cysteine konserviert und es ist daher möglich, daß im Vergleich mit den CRISP-Proteinen eine andere Sekundär- und Tertiärstruktur ausgebildet wird. Das konservierte Cystein des Motivs PS 01010 ist C<sub>5</sub> des CRISP-3 Proteins. Da auch das Motiv die Bedingung der Beteiligung dieses Cysteins an einer Disulfidbrücke stellt, bedingt es unter Berücksichtigung der Analyse eine Verbrückung mit C<sub>3</sub> der CRISP-Familie bzw. C<sub>1</sub> der PR-Familie. Beide Cysteine, C<sub>1</sub> und C<sub>3</sub>, sind konserviert. Nicht

konserviert in der PR-Familie sind die Cysteine C<sub>2</sub> und C<sub>6</sub>. Gemäß der Analyse des Disulfidbrückenmusters von CRISP-3 hätte ein Fehlen beider Cysteine nur den Verlust der Disulfidbrücke [C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>] zur Folge. In Bezug auf die NMR-Struktur des PR-Proteins wären zwei Disulfidbrücken nicht vorhanden, insbesondere die Loop-stabilisierende Brücke [C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>]. Die rekombinante Expression eines Mitglieds der CRISP-Familie aus Maus in eukaryontischen Zellen (CHO, *chinese hamster ovarian cells*, Eberspächer et al. 1995) führt zu einem Protein mit nativem CRISP-Disulfidbrückenmuster in Bezug auf den N-terminalen Cysteincluster. Ebenso wie auf Proteinebene belegt die Genanalyse die Verwandtschaft zwischen PR- und CRISP-Proteinen. Letztere haben im Lauf der Evolution neben den Exons, die für den N-terminalen Bereich einschließlich des N-terminalen Cysteinclusters kodieren, zwei zusätzliche Exons akquiriert, die für den C-terminalen Bereich kodieren (Mizuki et al. 1992). Es ist daher fraglich, ob PR-Proteine tatsächlich ein anderes Disulfidbrückenmuster als CRISP-Proteine ausbilden, dennoch kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Eine Beantwortung dieser Frage kann nur durch die Bestimmung des Disulfidbrückenmusters eines nativen PR-Proteins erfolgen. Für die Bestimmung des Disulfidbrückenmusters werden Mengen im Bereich von µg benötigt, die gegebenenfalls auch denaturierend isoliert werden können (RP-HPLC). NMR-Struktur oder Kristallisation hingegen erfordern größere Mengen (NMR eines 13 kd Proteins: ca. 1 mg) an hochreinem nativem Protein. Die Ermittlung des Disulfidbrückenmusters mittels *mass-fingerprinting* des nicht reduzierten PR14a-Proteins bietet daher eine Überprüfungsmöglichkeit, die geringe Proteinmengen und analytischen Aufwand erfordern, da in erster Linie nur nach Fragmenten gesucht werden muß, die durch NMR-Struktur oder CRISP-Disulfidbrückenmuster definiert sind.

#### Bildet der Carboxyterminus der CRISP-Proteine eine biologische Einheit ?

Das Disulfidbrückenmuster unterstützt die Annahme, daß CRISP-Proteine aus mindestens zwei Domänen bestehen. Einer N-terminalen Domäne, die die Aminosäuren 1-152 umfaßt und die drei Disulfidbrücken [C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>] [C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>] [C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>] enthält, und einem carboxyterminalen Bereich, Aminosäuren 153-223, der ebenfalls eine biologische Einheit darstellen könnte. Ein Vergleich dieser spekulativen carboxyterminalen Domäne (AS 158-223) mit den in den Datenbanken registrierten Sequenzen könnte zu neuen Ergebnissen führen. Die Durchführung eines

Sequenzvergleiches mit den Programmen Fasta und Blitz (Pearson und Lipman 1988) ergab die höchsten Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten CRISP-Proteinen.

Mit einer Aminosäure-Identität von 35 % und weniger werden Mitglieder der Proteinfamilie der Metallothionine aufgeführt. Sie zeichnen sich, ebenso wie der C-terminale Bereich der CRISP-Proteine, durch einen hohen Anteil an geladenen (K, D, E, R) und hydrophilen (N, Q, S, T) Aminosäuren, sowie eine hohe Anzahl an Cysteinen aus.

Metallothionine sind Teil der zellulären Reaktion auf toxische Metallionen ( $Cd^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{+2+}$ ) in einer Vielzahl von Organismen, einschließlich Pilze und Säugetiere. Ihre biologische Funktion erfüllen die Proteine durch Komplexierung der Metalle mittels der Sulfhydrylseitenketten eines Teils ihrer Cysteine. Dies erklärt den hohen Anteil an Cysteinen verglichen mit ihrer Größe von ca. 70 Aminosäuren (Sayers et al. 1999, Peterson et al. 1996). Die geringe Aminosäureidentität, vorallem aber die nicht konservierten Cysteine wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich ist, und ihre Funktion sprechen gegen eine Verwandtschaft mit einer C-terminalen CRISP-Proteindomäne. Ein Vergleich auf Basis von konservierten Motiven mit dem Program PROSITE gegen die gleichnamige Datenbank von Proteinmotiven (Bairoch 1999) erbrachte keine Hinweise auf strukturelle Verwandtschaft mit den Metallothioninen oder anderen bekannten Proteinen und Peptiden.

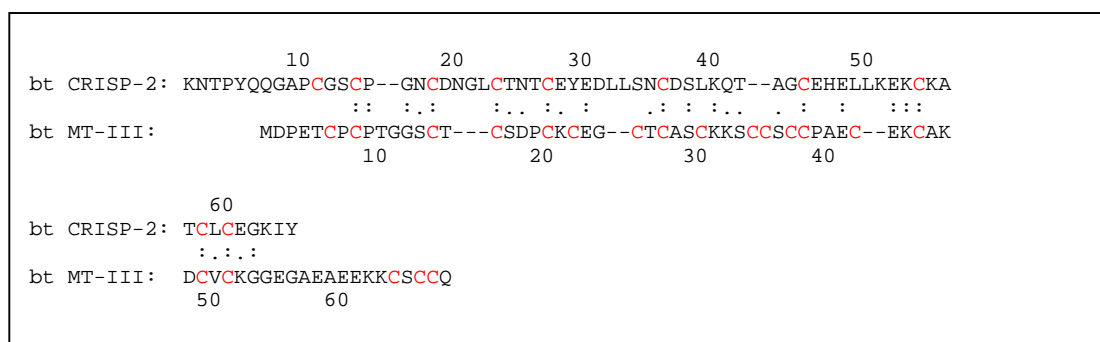


Abb. 4.9: Sequenzvergleich des carboxyterminalen Bereichs von bovinem (bt) CRISP-2 mit dem bovinen Metallothionin MT-III, 33,9 % Identität im überlappenden Sequenzbereich von 53 Aminosäuren

Stellen die carboxyterminalen 60 Aminosäuren von CRISP-Proteinen mehr als eine Domäne dar ?

Die nachgewiesene Disulfidbrücke [C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>] des CRISP-Proteins und die Einschränkungen für die Bildung der weiteren Disulfidbrücken zwischen den carboxyterminalen 10 Cysteinen lassen auch Kombinationsmöglichkeiten zu, die zu unabhängigen Gruppen führen, die sich nicht gegenseitig bedingen. Eine Gruppierung von C<sub>7</sub>,C<sub>8</sub>,C<sub>9</sub> und C<sub>10</sub> (AS 158-182) sowie C<sub>11</sub> bis C<sub>16</sub> (AS 183-223) ist denkbar. Die Suche nach homologen Sequenzen kurzer Peptide wird durch den Schwellenwert der verfügbaren Programme auf Sequenzabschnitte mit einer Länge von mindestens 30-35 Aminosäuren eingeschränkt. Dies erfordert die Verlängerung des zum Vergleich eingereichten Sequenzabschnitts über den gewünschten Bereich hinaus. Tatsächlich konnte für die Gruppe der Cysteine C<sub>7</sub> bis C<sub>10</sub> mit einem Fragment von 29 Aminosäuren eine Suche durchgeführt werden. Identifiziert werden neben zahlreichen CRISPs auch Sequenzabschnitte von Proteinen, die keinen Zusammenhang zu den CRISP-Proteinen aufweisen. Die Sequenzabschnitte zeichnen sich durch eine Aminosäure-Identität von 40-64 %, konservierte Abstände zwischen den Cysteinen und die Konservierung einzelner Aminosäuren, insbesondere P und G, aus. Mit dem in Abbildung 4.10 dargestellten Vergleich konnte ein Sequenzabschnitt einer Integrin-Untereinheit (β1CN) identifiziert werden, der sich durch eine Identität von 64% in einem überlappenden Sequenzabschnitt von nur 17 Aminosäuren auszeichnet.

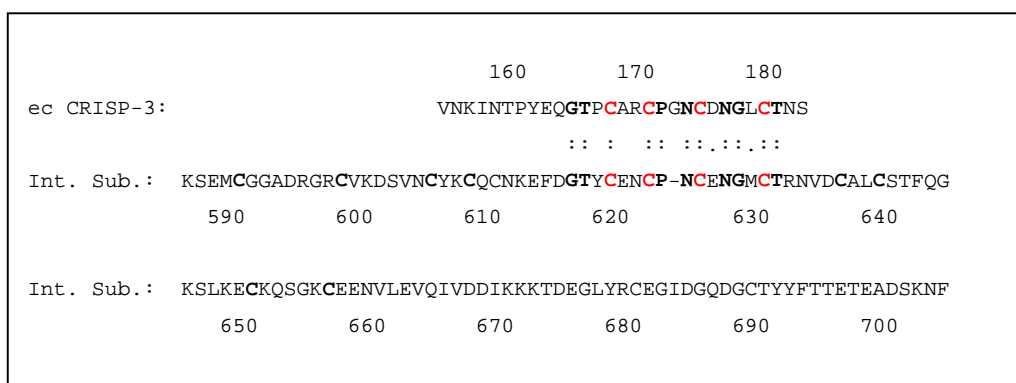


Abb. 4.10: Sequenzvergleich des carboxyterminalen Bereichs AS 156-184 (C<sub>7</sub> bis C<sub>10</sub>) von equinem (ec) CRISP-3 mit der Integrin Untereinheit β CN1 (O17494) Gesamtlänge der Untereinheit 792 AS, 64,7 % Identität des überlappenden Bereichs (17 AS)

Eine Reihe von Domänen ist nahezu fast ausschließlich durch ihre konservierten Cysteine definiert, wie anhand des Prosite Musters für Mitglieder der Fn II- und EGF-Domänen Familie deutlich wird:

**Fn II:** xxCxxPFx#xxxxxxxCxxxxxxxxWCxxxxx#xxx#x#Cxx

x= unbekannte Aminosäure, #=große hydrophobe Aminosäure  
Disulfidbrücken: C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>

**EGF:** C x<sub>2-7</sub> C x<sub>1-6</sub> C x<sub>1-13</sub> tta x C x C x<sub>1-2</sub> G<sub>1-7</sub> xx C x

x= unbekannte Aminosäure, t=nicht hydrophobe Aminosäure, a=aromatische Aminosäure  
Disulfidbrücken: C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>

Die Bedingungen der EGF-Domäne, bezogen auf die ersten vier Cysteine mit der Einschränkung a=L, könnte auch von der CRISP-Teilsequenz einschließlich der Disulfidbrücken erfüllt werden. Es wäre also denkbar, daß dieser Sequenzbereich (AS 165-182) mit den Cysteinen C<sub>7</sub> bis C<sub>10</sub> eine eigenständige Domäne repräsentiert. Gestützt wird diese Hypothese durch ein kürzlich identifiziertes Protein, welches in Zusammenhang mit humanen Gliomen steht (*Szyperski et al 1998*). Dieses Protein weist im N-terminalen Bereich eine deutliche Ähnlichkeit zu PR-/CRISP-Proteinen auf. Dem Protein GLiPR fehlen trotz vergleichbarer Größe zu den CRISP-Proteinen die letzten sechs Cysteine, die Ähnlichkeit endet mit N183 (Abb. 4.11).

ec CRISP-3:				10	20	30	40
				QDPGFAALSITKSEVQKEIVNKHNDLRRTVSP			
				:	:	:	:
hs GLiPR:	MRVTLATIAWMVSVFSVSNYSHTANILPDIENEDFIKD						
	10	20	30	40	50	60	
ec CRISP-3:	DSKTATNAQNWANK	CLLQHS---	KAEDRA-VGTMK				
hs GLiPR:	DPALAQIAKAWASN						
	70	80	90	100	110	120	
ec CRISP-3:	VHDFKYGVGPKTPNAVVGHYTQVVWYSSYRVG						
hs GLiPR:	IQDYDFKT--RICKKV						
	130	140	150	160	170		
ec CRISP-3:	GNVVKINTPYEQGTP						
hs GLiPR:	GNYPW---						
	180	190	200	210	220	230	
ec CRISP-3:							
hs GLiPR:							

Abb. 4.11: Sequenzvergleich zwischen humanen GLiPR Protein (P48060) und equinem CRISP-3

Die Hinweise auf eine funktionelle Einheit der Cysteine C<sub>7</sub> bis C<sub>10</sub> (AS 165-182) sind nur dann von biologischer Bedeutung, wenn eine entsprechende Homologie einer anderen funktionellen Einheit zum C-terminalen Bereich (C<sub>11</sub>-C<sub>16</sub>, AS 183-223) von CRISP-Proteinen identifiziert werden kann.

Mit der Erstellung des Identifikationssystems SMART (*Schultz et al. 2000, 1999, 1998, Ponting et al. 1999, Copley et al. 1999*) wurde die Möglichkeit geschaffen auch kurze Sequenzabschnitte zu vergleichen. Eine Recherche mit diesem System ermöglichte die Identifikation eines Kalium-Ionenkanal Inhibitors aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus*. Dieses Toxin umfaßt lediglich 35 Aminosäuren mit drei Disulfidbrücken. Neben dem Disulfidbrückenmuster [C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>] [C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>] [C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>] (*Pohl et al. 1995*) liegen zwei NMR Strukturen vor (*Tudor et al. 1996, Kalman et al. 1998*). Die Disulfidbrücken-Kombination ist nach den ermittelten Einschränkungen erlaubt und die Brücke [C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>] entspricht der bestimmten Disulfidbrücke [C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>] von CRISP-3 (Abb. 4.12).

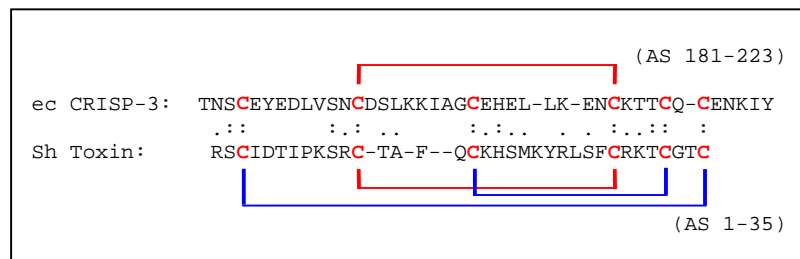


Abb. 4.12: Sequenzvergleich des Sh Toxins (P29187) aus Seeanemone mit equinem CRISP-3  
 rot: übereinstimmende Disulfidbrücke, blau: Disulfidbrücken von Sh Toxin,  
 Disulfidbrücken [C<sub>11</sub>-C<sub>16</sub>] [C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub>] für ec CRISP-3 nach Analyse erlaubte Kombination

Durch Homologievergleiche in Kombination mit dem partiellen Disulfidbrückenmuster wird eine plausible Unterteilung der CRISP-Proteine in drei Domänen möglich: dem N-terminalen, PR-homologen Bereich, einer verbindenden und einer Toxin-ähnlichen Domäne. Der Hinweis, es könne es um einen Ionenkanal-Interaktionspartner handeln, läßt sich gut in Übereinstimmung mit den bisherigen Erkenntnissen zu CRISP-Proteinen bringen. Die lethargisierende Wirkung des Giftes der mexikanischen Eidechse *Heloderma horridum horridum* wird auf das enthaltene CRISP-Protein zurückgeführt. Es inhibiert Ca<sup>2+</sup>-Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums *in vitro* (*Mochca-Morales et al. 1990, Morrisette et al. 1995*). Eine Zuordnung der biologischen Aktivität zu einer Proteindomäne konnte nicht erfolgen. Kürzlich konnte in einem molekularbiologischen Versuchsansatz ein weiteres CRISP



als spezifisches Produkt der Giftdrüsen einer Schlangenart nachgewiesen werden (*Trimeresurus mucrosquamatus*, Chang et al. 1997).

Die Genanalyse des murinen CRISP-Proteins TPX-1 zeigt weiterhin, daß die carboxyterminale Verlängerung der CRISP-Proteine gegenüber den PR-Proteinen durch zwei zusätzliche Exons erreicht wird. Das erste Exon (Exon 9) umfaßt einen Bereich, bezogen auf ec CRISP-3, der für die Aminosäuren 154-182 (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), das zweite Exon (Exon 10) einen Bereich, der für die Aminosäuren 183-223 (C<sub>11</sub>-C<sub>16</sub>) kodiert (Mizuki et al 1992). Die Trennung in zwei Domänen findet also auf dem Gen seine Entsprechung, auch wenn dadurch nicht zwingend eine Domänenstruktur vorgeschrieben wird.

### Potentielle Domänenstruktur und Disulfidbrückenmuster von CRISP-Proteinen

Als Arbeitshypothese kann aufgrund des Disulfidbrückenmusters und der Homologievergleiche ein Modell zur Domänenstruktur von CRISP-Proteinen entworfen werden. Demnach bestehen CRISP-Proteine aus einer N-terminalen Domäne (AS 1-152) mit Homologie zu PR-Proteinen, einer verbindenden Domäne (AS 153-182) mit Homologie zu einer verkürzten EGF-Domäne und einer carboxyterminalen Domäne (AS 183-223), die Homologie zu Ionkanal-Inhibitoren aufweist (Abb. 4.13).

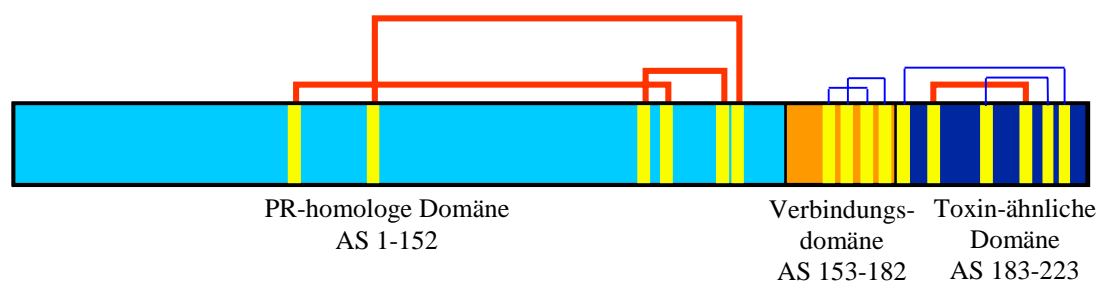


Abb. 4.13: Potentielle Domänenstruktur von equinem CRISP-3, rot: identifizierte Disulfidbrücken, blau: potentielle Disulfidbrücken, für ec CRISP-3 nach Analyse erlaubte Kombination

Unter Proteinen der CRISP-Familie sind alle Cysteine und die Distanzen zwischen den Cysteinen konserviert und die Schlußfolgerungen der Disulfidbrückenanalyse sollten daher auf alle Mitglieder der Proteinfamilie übertragbar sein.

### Potentielle Funktion von CRISP-Proteinen

Die strukturelle Analyse und die Ergebnisse der durch sie gestützten Homologievergleiche ermöglichen Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von CRISP-Proteinen. Die Beobachtung, daß ein CRISP-homologes Protein als Ionenkanal-Inhibitor wirkt, wurde von der Reproduktionsbiologie wenig beachtet, zumal Helothermin trotz Konservierung der 16 Cysteine eine Homologie von nur ca. 40-45 % Aminosäure-Identität zu den Proteinen des männlichen Genitaltrakts aufweist. Es konnte auch keine Zuweisung der Aktivität zu einem Proteinbereich oder –domäne erfolgen, womit unklar blieb, ob es sich um einen konservierten und somit einen für andere CRISP-Proteine relevanten und übertragbaren Sequenz- oder Strukturbereich handeln könnte.

Die Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz zu Proteinen der PR-Familie läßt ebenfalls keine Rückschlüsse auf die Funktion dieser Domäne zu, da keine Funktion dieser Proteine bekannt ist. Gentechnisch veränderte Tabakpflanzen, die ein Mitglied der CRISP-homologen PR Typ-1 Familie exprimieren, weisen eine höhere Resistenz gegen viralen Befall auf. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch unbekannt. Eine Zellmembran-schädigende Wirkung wird in diesem Zusammenhang diskutiert.

Die Rolle des CRISP-1 der Ratte wurde weitergehend untersucht. CRISP-1 (Protein D/E) ist nur mit Detergenzien von der Spermienoberfläche lösbar. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei Hengstspermatozoen gemacht werden. CRISP-Proteine bilden zwei Population, eine durch Hochsalz-Waschungen entfernbare, also ionische gebundene, und eine Population, die gebunden bleibt. Eine Unterscheidung der vom Pferd exprimierten drei CRISP-Proteine (CRISP-2, testikulär; CRISP-1, epididymal; CRISP-3, seminal) konnte in diesem Zusammenhang nicht getroffen werden. Auf Oocyten der Ratte konnte mittels isoliertem Protein D/E (CRISP-1) ein Rezeptor detektiert werden, dessen Expression mit der Reifung der Oocyte korreliert und essentiell für die Gametenfusion ist. Die kompetitive Hemmung dieses Rezeptors verhindert eine Fusion, nicht aber die Bindung von Spermatozoon und Oocyte. Somit könnten CRISP-Proteine Elemente einer Rezeptor-gekoppelten Fusion darstellen. Diese These könnte auch mit der Lokalisation des testikulär exprimierten CRISP-2 im Akrosom unter dem Aspekt einer Beteiligung an den Fusionprozessen während der

Akrosomreaktion im Einklang stehen. Für equines CRISP-3 konnte eine Interaktion mit einem uterinen Mitglied der Lipocallin-Familie (p19) in einem ELISA-Assay festgestellt werden. Welche Rolle eine Wechselwirkung mit diesem Retinolsäure-Carrier spielt, blieb aber unklar (*Schambony 1999*).

Inhibition von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch Helothermin und die durch die strukturellen Untersuchungen gestützte Homologie des carboxyterminalen Bereichs von CRISP-Proteinen zu Ionenkanal-Inhibitoren legen eine mögliche Wechselwirkung mit Ionenkanälen nahe. Die biologische Aktivität muß in diesem Zusammenhang nicht unbedingt inhibitorisch sein. Denkbar ist eher eine weitergehende regulative Wirkung, die von weiteren Proteinen oder niedermolekularen Substanzen beeinflusst wird. Die bedeutende Rolle von Ionenströmen, insbesondere von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, während Kapazitation, Akrosomreaktion und Gametenfusion spricht für zusätzliche regulative Elemente.

Dieser Gedankenansatz widerspricht nicht einer essentiellen Bedeutung für die Gametenfusion, sondern stützt diese These.

Die Fusion von Vesikeln während der Exocytose in somatischen Zellen ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden von dem Protein Gelsolin benötigt um durch Bedeckung (*Capping*) der freien (+)-Enden von Aktinfilamenten eine Depolymerisation der Membran-stabilisierenden Filamente zu erreichen. Gelsolin benötigt für diese Funktion lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im niedrigen millimolaren Bereich ( $\sim 10^{-6}$  M, *McLaughlin et al. 1993*). Eine schnelle Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann bei der Akrosomreaktion beobachtet werden (Maus: *Arnoult et al. 1996*) und könnte nicht nur für die Signaltransduktionskaskade bei der Akrosomreaktion von Bedeutung sein. Letztlich handelt es sich um einen Fusionsprozeß, der analog zur somatischen Zelle eine lokale Depolymerisation stabilisierender Filamente erfordert. Die Fusion der Gameten stellt die gleichen Anforderungen: die Ermöglichung eines lokal einsetzenden Fusionsprozesses, beginnend am Äquatoralsegment, sich über den Kopfbereich fortsetzend, nicht aber Mittelstück und Spermienschwanz umfassend. Eine erst mit der Bindung der Gameten vermittelte Aktivierbarkeit von Ionenkanälen sowohl auf der Oocyte, wie auch dem Spermium, ist denkbar. Das Modell eines Oocyten-ständigen Rezeptors (*Cuaniscu et al. 1999*), CRISP-1 als Mediator und einem Spermatozoen-ständigen

zweiten Rezeptor, steht in Einklang mit den bisherigen Beobachtungen. Einer der beiden Rezeptoren sollte demnach ein Ionenkanal sein, der mit der Toxin-ähnlichen Domäne des CRISP-Proteins Wechselwirkungen ausbildet. Während der zweite Interaktionspartner mit einer anderen Domäne des Proteins, höchstwahrscheinlich der PR-Domäne, eine Bindung eingehen muß.

#### **4.4 Zusammenfassung und Perspektiven**

Durch Identifizierung und Sequenzierung homologer CRISP-Proteine des Rindes und die strukturelle Analyse von equinem CRISP-3 konnte, unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Eigenschaften, eine Arbeitshypothese zur Funktion der CRISP-Proteine entwickelt werden. Auf Basis dieser These können gezielt neue funktionelle Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung der CRISP-Proteine im Befruchtungsvorgang entwickelt werden.

Die Untersuchung der potentiellen Interaktion mit Ionenkanälen ist mit der *Patch-Clamp* Technik möglich. Für erste Arbeiten kann das aus equinem Seminalplasma isolierbare CRISP-3 herangezogen werden. Die Präparation Ionenkanal-haltiger Vesikel, wie denen des sarkoplasmatischen Retikulums aus equinem (Herz-) Muskel, könnte analog zur Isolierung dieses Probenmaterials aus anderen Säugetierarten erfolgen. Für die Verknüpfung dieser Wechselwirkung mit der carboxyterminalen Toxin-ähnlichen Domäne von CRISP-Proteinen können Studien mit dem isolierten Fragment, welches durch tryptischen Verdau von equinem CRISP-3 erhalten wird (vergl. 3.5.6), durchgeführt werden. Die isolierten Toxine zeigen, vermutlich durch die Disulfidbrücken-vermittelte strukturelle Stabilität, noch eine Inhibition der Ionenkanäle *in vitro*. Eine Detektion von Bindungsstellen des carboxyterminalen Fragments auf der Oocyte wird durch chemische Kopplung von Fluorophoren oder Affinitätsmarkierungen (z.B. Biotin) ermöglicht. Gleichzeitig könnte ein solcher Versuchsansatz die zur Klärung der Frage beitragen, ob es sich bei dem Oocyten-ständigen CRISP-Rezeptor um einem Ionenkanal handelt. Analoge Studien können auch zur Funktion und Interaktion der PR-homologen Domäne durchgeführt werden. Sie kann nicht durch proteolytische Spaltung vollständig erhalten werden. Mit der Lösung des Disulfidbrückenmusters wird jedoch die Grundlage für eine rekombinante Expression in eukaryontischen Zellen gelegt. Eberspächer et al. (1995) konnten ein CRISP-Protein mit korrekter Disulfidverbrückung rekombinant

exprimieren, wie jetzt durch die Analyse des Disulfidbrückenmusters des CRISP-3 gezeigt werden konnte. Die Expression eines CRISP-Fragments, welches nur aus der PR-homologen Domäne besteht, kann nun durchgeführt und die Bildung der Disulfidbrücken schnell und effizient mittels *mass-fingerprinting* überprüft werden. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den Mitgliedern gerade in Bezug auf die konservierten Cysteine, wäre das zu verwendende Tiermodell frei wählbar und auch auf andere Spezies übertragbar. Es bieten sich auf Basis der Sequenzierung und strukturellen Charakterisierung von CRISP-Proteinen vielfältige Perspektiven für zukünftige Arbeiten zur Aufklärung der Funktion dieser interessanten Proteine. Das Auftreten identischer (humanes CRISP-3, *Krätschmar et al. 1996*) und verwandter (GLiP- und PR-Proteine) Proteine in Verbindung mit anderen physiologischen Prozessen als der Reproduktion und Krankheitsbildern unterstützt auch in Zukunft das Interesse an Struktur und Funktion der CRISP-Proteine.

## **5. Literaturverzeichnis**

1. Acott T.S. und Hoskins D.D. (1978) Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 253: 6744-6750
2. Acott T.S. und Hoskins D.D. (1981) Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 24: 234-240
3. Acott T.S., Katz D.F., Hoskins D.D. (1983) Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29: 389-399
4. Adeoya-Osiguwa S.A. und Fraser L.R. (1993) A biphasic pattern of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *J. Reprod. Fert.* 99: 187-194
5. Almeida E.A., Huovila A.P., Sutherland A.E., Stephens L.E., Calarco P.G., Shaw L.M., Mercurio A.M., Sonnenberg A., Primakoff P., Myles D.G. (1995) Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81: 1095-1104
6. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
7. Andersen M.H., Berglund L., Rasmussen J.T., Petersen T.E. (1997) Bovine PAS-6/7 binds  $\alpha_v\beta_5$  integrin and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry* 36: 5441-5446
8. Arnoult C., Cardullo R.A., Lemos J.R., Florman H.M. (1996) Activation of mouse sperm T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13004-13009
9. Aumüller G., Wilhelm B., Seitz J. (1999) Apocrine secretion –Fact or artifact. *Ann. Anat.* 181: 437-446
10. Baba T., Azuma S., Kashiwabara S.-I., Toyoda T. (1994) Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol Chem.* 50: 31845-31849
11. Bairoch A. (1999) PROSITE: A dictionary of protein sites and patterns. User Manual. <http://www.expasy.ch/prosite/>
12. Baker, M.E. (1985) The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and a kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 130: 1010-1014
13. Bedford J.M. (1999) The implications of unusual sperm/female relationships in mammals. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete.* Cache River Press, Vienna, IL, USA: 82-92
14. Benhoff S. (1997) Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 599-637
15. Bleil J.D., Wassarman P.M. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95: 317-324
16. Blobel C.P., Wolfsberg T.G., Turck C.W., Myles D.G., Primakoff P., White J.M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356: 248-252

17. Bloom J.W., (1987) The Interaction of rDNA Factor VIII, Factor VIII<sub>des-797-1562</sub> and Factor VIII<sub>des797-1562</sub> derived Peptides with Phospholipids, *Thromb. Res.* 48: 439-448
18. Boue F., Berube B., de Lamirande E., Gagnon C., Sullivan R. (1994) Human sperm zona pellucida interaction is inhibited by an antibody against a hamster sperm protein, *Biol. Reprod.* 51: 577-585
19. Boue F., Blais J., Sullivan R. (1996) Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54: 1009-1017
20. Braun, R.E., Behringer, R.R., Peschon, J.J., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1989) Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*: 337,373
21. Brewis I. A., Clayton R., Browes C.E., Martin M., Baratt C.L., Hornby D.P., Moore H.D. (1998) Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 1136-1144
22. Brooks D.E. (1987a) Androgen-regulated epididymal secretory proteins associated with post-testicular sperm development. *Ann. NY Acad. Sci.* 513: 179-194
23. Brooks D.E. (1987b) the major androgen-regulated secretory proteins of the rat epididymis bear sequence homology with members of the  $\alpha_{2u}$ -globulin superfamily. *Biochem. Int.* 14: 235-240
24. Brooks D.E., Means A.R., Wright E.J., Singh S.P., Tiver K.K. (1986) Molecular cloning of the cDNA for two major androgen-dependent secretory proteins of 18,5 kilodaltons synthesized by the rat epididymis. *J. Biol. Chem.* 261: 4956-4961
25. Calvete J.J., Mann K., Sanz L., Raida M., Töpfer-Petersen E. (1996a) The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett.* 399: 147-152
26. Calvete J.J., Nessau S., Mann K., Sanz L., Sieme H., Klug E., Töpfer-Petersen E. (1994a) Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 411-426: 1994
27. Calvete J.J., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Töpfer-Petersen E. (1997a) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 407: 201-206
28. Calvete J.J., Raida M., Sanz L., Wempe F., Scheit K.-H., Romero A., Töpfer-Petersen E. (1994b) Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. *FEBS Lett.* 350: 203-206
29. Calvete J.J., Varela P.F., Sanz L., Romero A., Mann K., Töpfer-Petersen, E. (1996b) A procedure for the large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. *Protein. Expr. Purif.* 8: 48-56
30. Calvete, J.J., Reinert, M., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. (1995) Effect of glycosylation on heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins, *J. Chrom. A* 711: 167-173
31. Cardullo R.A. (1999) Characteristics of the sperm-zona interaction: Key issues for identifying receptors for ZP3. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 238-247

32. Carrera A., Moos J., Ning X.P., Gerton G.L., Tesarik J., Kopf G.S., Moss S.B. (1996) Regulation of protein phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosin phosphorylation. *Dev. Biol.* 180: 284-296
33. Charest N.J., Joseph D.R., Wilson E.M., French F.S. (1988) Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence-homology with metalloproteins. *Mol.Endocrinol.* 2: 999-1004
34. Cho C., O'Dell Bunch D., Faure J.-E., Goulding E.H., Eddy E.M., Primakoff P., Myles D.G. (1998) Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin  $\beta$ . *Science* 281: 1857-1859
35. Cohen D.J., Munuce M.J., Cuasnicú P.S. (1996) mammalian sperm-egg fusion: the development of rat oolemma fusibility during oogenesis involves the appearance of binding sites for sperm protein "DE". *Biol. Reprod.* 55: 200-206
36. Couto J.R., Taylor M.R., Godwin S.G., Ceriani R.L., Peterson J.A. (1996) Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol.* 4: 281-6.
37. Cross N.L. (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7-11
38. Cross N.L., Overstreet J.W. (1987) Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gam. Res.* 16: 23-35
39. Cuasnicu P.S., Cohen D.J., Ellerman D.A. (1999) Participation of the protein "DE" and its egg binding sites in sperm-egg fusion. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 267-272
40. Cuasnicu P.S., Echeverria F.G., Piazza A.D., Cameo M.S., Blaquier J.A. (1984) Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J. Reprod. Fertil.* 72: 467-471
41. DasGupta S., Mills C.L., Fraser L.R. (1994) A possible role for Ca<sup>2+</sup>-ATPase in human sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 102: 107-116
42. DeMott R.P., Lefebvre R., Suarez S.S. (1995) Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 52: 1395-1403
43. Desnoyers, L., Manjunath, P. (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.* 267: 10149-10155
44. 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
45. Dostalova Z., Calvete J.J., Töpfer-Petersen E. (1995) Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 237-242
46. Eberspaecher, U., Roosterman, D., Krätzschar, J., Haendler, B., Habenicht, U.-F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W.-D., Donner, P. (1995) Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization and expression in recombinant form. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 157-172
47. Eddy E.M. (1999) The effects of gene knockout on spermatogenesis. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 23-36



48. Eddy E.M., O'Brien, D.A. (1994) The spermatozoon. in: Knobil E. und Neill J. (eds.) 2<sup>nd</sup> ed. (1994) The physiology of reproduction. Raven Press, New York: 29-78
49. Enßlin M., Vogel T., Calvete J.J. Thole H.H., Schmidke J., Matsuda T., Töpfer-Petersen E. (1998) Molecular cloning and characterization of p47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol. Reprod.* 58: 1057-1064
50. Esch F.S., Ling N.C., Böhlen P., Ying S.Y., Guillemin R. (1983) Primary structure of PDC 109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 861-867
51. Evans J.P. (1999) Sperm integrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Frontiers Bio. Sci.* 4: 114-131
52. Evans J.P. und Kopf G.S. (1998) Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* 30: 297-307
53. Evans J.P., Schultz R.M., Kopf G.S. (1998) Roles of disintegrin domains of mouse fertilins  $\alpha$  and  $\beta$  in fertilization. *Biol. Reprod.* 59: 145-152
54. Flesch F.M., Voorhout W.F., Colenbrander B., van Golde L.M.G., Gadella B.M. (1998) Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol. Reprod.* 59: 1530-1539
55. Florman H.M., Arnoult C., Kazam I.G., Li C., O'Toole C.M.B. (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59: 12-16
56. Foster J.A. und Gerton G.L. (1996) Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 221-229
57. Franca L.R., Ogawa T., Avarbock M.R., Brinster R.L., Russell L.D. (1998) Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59: 1371-1377
58. Fraser L.R. und McDermott C.A. (1992)  $\text{Ca}^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J. Reprod. Fert.* 96: 363-377
59. Frohmann M.A., Dush M.K., and Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8998-9002
60. Galantino-Homer H.L., Visconti P.E., Kopf G.S. (1997) regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56: 707-719
61. Gasset, M., Saiz, J.L., Sanz, L., Gentzel, M., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., (1997) Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes, *Eur. J. Biochem.* 250: 735-744
62. Gilbert G.E., Baleja J.D. (1995) Membrane-binding peptide from the C2 domain of Factor VIII forms an amphipathic structure as determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34: 3022-3031
63. Gong X., Dubois D.H., Miller D.J., Shur B.D. (1995) Activation of a G protein complex by aggregation of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269: 1718-1721

64. Haendler B., Krätzschar J., Theurig F., Schleuning W.D. (1993) Transcripts for Cystein-Rich Secretory Protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* 133: 192-198
65. Hardy D.M. und Garbers D.L. (1995) A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 270: 26025-26028
66. Hardy D.M., Huang T.T.F., Driscoll W.J., Tung K.S.K. Wild G.C. (1988) Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 38: 423-437
67. Harrison R.A., Miller N.G. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 220-228.
68. Heukeshoven, J. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in phast system development unit. *Staining of SDS-gels. Electrophoresis* 9: 28-32
69. Hynes R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
70. Johnston D.S., Wright W.W., Shaper J.H., Hokke C.H., Van den Eijnden D.H., Joziassse D.H. (1998) Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. *J. Biol. Chem.* 273: 1888-1895
71. Jones R. und Williams R.M. (1990) Identification of zona- and fucoidan-binding proteins in guinea-pig spermatozoa and mechanism of recognition. *Development* 109: 41-50
72. Kalman K., Pennington M.W., Lanigan M.D., Nguyen A., Rauer H., Mahnir V., Paschetto K., Kem W.R., Grissmer S., Gutman G.A., Christian E.P., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J. Biol. Chem.* 273: 32697-32707
73. Kasahara M., Gutknecht J., Brew K., Spurr N., Goodfellow P.N. (1989) Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5: 527-534
74. Kasahara M., Hayashi M., Yoshida M.C., Nadeau J.H., Fujimoto S., Ishibashi T. (1995) Mapping of acidic epididymal glycoprotein (Aeg) genes to mouse chromosome 17. *Mamm. Genome* 6: 52-54
75. Kirchhoff C., Pera I., Derr P., Yeung C.H., Cooper T. (1997) The molecular biology of the sperm surface: Post-testicular membrane remodelling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424: 221-232
76. Kjeldsen L., Cowland J.B., Johnsen A.H., Borregaard N. (1996) SGP 28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and to a rodent sperm-coating glycoprotein. *FEBS Lett.* 380: 246-250
77. Kopf G.S., Ping Ning X., Visconti P.E., Purdon M., Galantino-Homer H., Fornes M. (1999) Signalling mechanisms controlling mammalian sperm fertilization competence and activation. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 105-118
78. Krätzschar J., Haendler B., Eberspaecher U., Roosterman D., Donner P., Schleuning W.-D. (1996) The human cyteine-rich secretory protein (CRISP) family: Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur. J. Biochem.* 236: 827-836

79. Kudo K., Yonezawa N., Katsumata T., Aoki H., Nakano M. (1998) Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 252: 492-499
80. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
81. Leblond E., Desnoyers L., Manjunath P. (1993) Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Del.* 34: 443-449
82. Lefebvre R., Lo M.C., Suarez S.S. (1997) Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol. Reprod.* 56: 1198-1204
83. Maeda T., Sakashika M., Ohba Y., Nakanishi Y. (1998) Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and sertoli cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 248: 140-146
84. Magdaleno L., Gasset M., Varea J., Schambony A., Urbanke C., Raida M., Töpfer-Petersen E., Calvete J.J. (1997) Biochemical characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Lett.* 420: 179-185
85. Majunder G.C., Dey C.S., Hldar S., Barua M. (1990) Biochemical parameters of initiation and regulation of sperm motility. *Arch. Androl.* 24: 287-303
86. Manjunath P., Sairam M.R. (1987a) Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A<sub>1</sub>, BSP-A<sub>2</sub> and BSP-A<sub>3</sub>) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 241: 685-692
87. Manjunath P., Sairam M.R., Uma J. (1987b) Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Rep.* 7: 231-238
88. Mann, T., Lutwack-Mann, C., *Male Reproductive Function and Semen*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 1981
89. Martin I., Epand R.M., Ruyschaert J.-M. (1998) Structural properties of the putative fusion peptide of fertilin, a protein active in sperm-egg-fusion, upon interaction with the lipid bilayer. *Biochemistry* 37: 17030-17039
90. Martinez S.P., Conesa D., Cuasnicù P.S.. Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J. Reprod. Immunol.* 29, 31-45: 1995
91. McLaughlin P.J., Gooch J.T., Mannherz, H.-G., Weeds A.G. (1993) Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364: 685-692
92. Medeiros C.M.O. und Parrish J.J. (1996) Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 525-532
93. Mei X., Singh I.S., Erlichman J., Orr G.A. (1997) Cloning and characterization of a testis-specific, developmentally regulated A-kinase-anchoring protein (TAKAP-80) present on the fibrous sheath of rat sperm. *Eur. J. Biochem.* 246: 425-432
94. Miller D.J., Gong X., Decker G., Shur B.D. (1993) Egg corticle granule N-acetylglucosaminidase id required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.* 123: 1431-1440

95. Mizuki N., Kasahara M. (1992a) Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89: 25-32
96. Mizuki N., Sarapata D.E., Garcia-Sanz J.A., Kasahara M. (1992b) The mouse male germ cell-specific gene *Tpx-1*: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm. Genome* 3: 274-280
97. Mochca-Morales J., Martin B.M., and Possani L.D. (1990) Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heletherma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. *Toxicon* 28: 299-309
98. Moller C.C. und Wassarman P. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* 132: 103-112
99. Moos J., Peknicova J., Geussova G., Philimonenko V., Hozak P. (1998) Association of protein kinase A type I with detergent-resistant structures of mammalian sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 50: 79-85
100. Morales C., Clermont, Y. (1993) Structural changes of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium. In: *The Sertoli cell*, Russell, L.D. and Griswald, M.D. (eds), Cache River Press, Clearwater, Florida (1993): 305-330
101. Moreau, R., Manjunath, P. (1999) Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1438: 175-184
102. Morrisette J., Krätzschar J., Haendler B., El-Hayek R., Mochca-Morales J., Martin B.M., Patel J.R., Moss R.L., Schleuning W.-D., Coronado R., Possan L.D. (1995) Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. *Biophys. J.* 68:
103. Müller, P., Erlemann, K.-R., Müller, K., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., Marienfeld, K., Herrmann, A. (1998) Biophysical characterisation of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles, *Eur. Biophys. J.* 27: 33-41
104. Murphy EV, Zhang Y, Zhu W, Biggs J. (1995) The human glioma pathogenesis-related protein is structurally related to plant pathogenesis-related proteins and its gene is expressed specifically in brain tumors. *Gene* 159: 131-135
105. Murray S.C., Smith T.T. (1997) Sperm interaction with the Fallopian tube apical plasma membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil. Steril.* 68: 352-357
106. Myles D.G. (1993) Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev. Biol.* 158: 35-45
107. Myles D.G., Cho C., Ruiyong Y., Primakoff P. (1999) A current model for the role of ADAMs and integrins in sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 249-255
108. Naz R. K. (1996) Protein tyrosine phosphorylation and signal transduction during capacitation-acrosome reaction and zona pellucida binding in human sperm. *Arch. Androl.* 37: 47-55
109. Parrington J., Swann K., Shevchenko V.I., Sesay A.K., Lai F.A. (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379: 364-368
110. Pearson W.R., Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444-2448

111. Perez Martinez S., Conesa D., Cuasnicú P.S. (1995) Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J. Reprod. Immunol.* 29: 31-45
112. Pfisterer P., König H., Hess J., Lipowsky G., Haendler B., Schleuning W.-D., Wirth T. (1996) CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells under the control of Oct2. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6160-6168
113. Pohl J., Hubalek F., Byrnes M.E., Nielsen K.R., Woods A. (1995) Pennington M.W. Assignment of the three disulfide bonds in ShK toxin. A potent potassium channel inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Lett. Pept. Sci.* 1: 291-297
114. Ponting C.P., Schultz J., Milpetz F., Bork P. (1999) SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 27: 229-232
115. Rankin T.L., Tsuruta K.J., Holland M.K., Griswold M.D. (1992) Isolation, immunolocalization, and sperm-association of three proteins of 18, 25, and 29 kilodaltons secreted by the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 46: 747-766
116. Robaire B. (1999) Fifty years of insight into the seminiferous epithelium: A tribute to Yves Clermont. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 1-4
117. Robitaille G., Sullivan R., Bleau G., (1991) Identification of epididymal proteins associated to hamster sperm. *J. Exp. Zool.* 258: 69-74
118. Rochwerger L., Cohen D.J., Cuasnicú P.S. (1992) Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev. Biol.* 153: 83-90
119. Rochwerger L., Cuasnicú P.S. (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 34-41
120. Roldan E.S.R. (1999) Signalling for exocytosis: lipid second messengers, phosphorylation cascades and cross-talks. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 128-138
121. Romero, A., Romao, M., Varela P.F., Kölln I., Dias J.M. Carvalho A.L., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., Calvete J.J. (1997) The crystal structure of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.* 4: 783-787
122. Russell L.D., Hausler C.L. (1999) Prospects for the spermatogonial transplantation in livestock and endangered species. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 37-46
123. Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467
124. Schambony A. (1999) Cystein-reiche sekretorische Proteine (CRISPs) des männlichen Genitaltrakts von Pferd und Schwein. Thesis, Universität Hannover
125. Schambony A., Gentzel M., Wolfes H., Raida M., Neumann U., Töpfer-Petersen E. (1998) Equine CRISP-3: Primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim. Biophys. Acta* 1387: 206-216
126. Schambony A., Hess O., Gentzel M., Töpfer-Petersen E. (1998) Expression of CRISP-proteins in the equine male genital tract. *J. Reprod. Fert.*, 53: 67-72
127. Schroter S., Kirchhoff C., Yeung C.H., Cooper T., Meyer B. (1997) Purification and structural analysis of sperm CD52, a GPI-anchored membrane protein. *Adv Exp Med Biol*: 424:233-4

128. Schultz J., Copley R.R., Doerks T., Ponting C.P., Bork P. (2000) SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* 27: 229-232
129. Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS* 95: 5857-5864
130. Seidah N.G., Manjunath P., Rochemont J., Sairam M.R., Chrétien M. (1987) Complete amino acid sequence of BSP-A<sub>3</sub> from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 243: 195-203
131. Shalgi R., Matityahn A., Gaunt S.J., Jones R. (1990) Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 34-41
132. Shur B. (1999) Zona pellucida-induced signal transduction via sperm surface  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 213-225
133. Shur B.D. (1998) Is sperm galactosyltransferase a signalling subunit of a multimeric gamete receptor? *Biochem. Biophys. Res. Com.* 250: 537-543
134. Sivaprasadarao A., Boudjelal M., Findlay J.B.C. (1993) Lipocalin structure and function. *Bioch. Soc. Trans.* 21: 619-622
135. 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
136. Spungin B., Breitbart H. (1996) Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J. Cell Sci.* 109: 1947-1955
137. Stubbs J.D., Lekutis C., Singer K.L., Bui A., Yuzuki D., Srinivasan U., Parry G. (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 8417-8422
138. Suarez S.S. (1998a) The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol. Reprod.* 58: 1105-1107
139. Suarez S.S. (1999) Regulation of sperm transport in the mammalian oviduct. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 71-80
140. Suarez S.S., Revah I., Lo M., Kolle S. (1998b) Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol. Reprod.* 59: 39-44
141. Sullivan R. (1999) Interaction between sperm and epididymal secretory proteins. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 94-104
142. Sullivan R., Bleau G. (1985) Interaction between isolated components from mammalian sperm and egg. *Gam. Res.* 12: 101-116
143. Szyperski T, Fernandez C, Mumenthaler C, Wuthrich K. (1998) Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2262-2266
144. Tanphaichitr N., Moase C., Taylor T., Surewicz K., Hansen C., Namking M., Berube B., Kamolvarin N., Lingwood C.A., Sulliva R., Rattanachaiyanont M., White D. (1998) isolation of antiSLIP1-reactive boar sperm p68/62 and its binding to mammalian zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 203-216

145. Thaler C.D. (1999) Defining the biochemical mechanisms of sperm-zona pellucida binding. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 195-204
146. Thaler C.D. und Cardullo R.A. (1996) Defining oligosaccharide specificity for initial sperm-zona pellucida adhesion in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 535-546
147. Therien, I., Bleau G., Manjunath P. (1995) Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52: 1372-1379
148. Töpfer-Petersen E. (1999) Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Upd.* 5: 314-329
149. Töpfer-Petersen E. und Calvete J.J. (1995a) Molecular mechanism of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. *Int. J. Androl.* 18: Suppl. 2, 20-26
150. Töpfer-Petersen E., Calvete J.J., Sanz L., Sinowatz F. (1995b) Carbohydrate- and heparin-binding proteins in mammalian fertilization. *Andrologia* 27: 303-324
151. Töpfer-Petersen E., Dostalova Z., Calvete J.J. (1997) The role of carbohydrates in sperm-egg interaction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424: 301-310
152. Töpfer-Petersen E., Romero A., Varela P.F., Ekhlesi-Hundrieser M., Dostalova Z., Sanz L., Calvete J.J. (1998) Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30: 217-224
153. Töpfer-Petersen E., Schill W.-B. (1989) The sperm surface and sperm-egg interaction in the pig. in Holstein, A.F., Voigt, K.D., Grässlin, D. (Eds.) *Reproductive biology and medicine*, Diesbach, Berlin
154. Tudor J.E., Pallaghy P.K., Pennington M.W., Norton R.S., (1996) Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nat. Struct. Biol.* 3: 317-320
155. Varela P.F., Romero, A., Sanz, L., Romao, M., Töpfer-Petersen, E., Calvete J.J. (1997) The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a Zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *J Mol. Biol.* 274: 635-649
156. Varner D.D., Bowen J.A., Johnson L. (1992) Capacitation and acrosome reaction of equine spermatozoa by heparin. *Mol. Androl.* 5: 81-100
157. Varner D.D., Ward C.R., Storey B.T., Kenney R.M. (1987) Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1383-1389
158. Visconti P.E. und Kopf G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59: 1-6
159. Visconti P.E., Galantino-Homer H., Moore G.D., Bailey J.L., Ning X., Fornes M., Kopf G.S. (1998) The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19: 242-8
160. Visconti P.E., Johnson L.R., Oyaski M., Fornés M., Moss S.B., Gerton G.L., Kopf G.S. (1997) Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 192: 351-361
161. Vreeburg J.T.M., Holland M.K., Orgebin-Christ M.-C. (1992) Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo. *Biol.Reprod.* 47: 588-597
162. Ward C.R., Kopf G.S. (1993) Molecular events mediating sperm activation. *Dev, Biol.* 158: 1-26

163. Wassarman P.M. (1992) Mouse gamet adhesion molecules. *Biol. Reprod.* 46: 186-191
164. Wassarman P.M. (1995) Mammalian fertilization: egg and sperm (glyco)proteins that support gamete adhesion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33: 253-258
165. Wassarman P.M. (1995) Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 658-664
166. Wassarman P.M. The mammalian ovum. In: Knobil E. and Neill J. (eds.) 2<sup>nd</sup> ed. (1994) *The physiology of reproduction*. Raven Press, Ltd., New York
167. Wassarman P.M. und Litscher E.S. (1995) Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 1-19
168. Wassarman P.M., Litscher E.S. (1999) Molecular dissection of the sperm combining-site of mouse egg zona pellucida glycoprotein mZP3, the sperm receptor. In: (Gagnon C., ed.) *The male gamete*. Cache River Press, Vienna, IL, USA: 205-212
169. Wassarman P.M., Liu C., Litscher E.S. (1996) Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J. Cell Sci.* 109: 2001-2004
170. Xu W., Hamilton D.W. (1996) Identification of the rat epididymis-secreted 4E9 antigen as Protein E. further biochemical characterization of the highly homologous epididymal secretory proteins D and E. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 347-357
171. Yanagamachi R. Mammalian Fertilization. in: Knobil E. und Neill J. 2. Auflage (1994) *The physiology of reproduction*. Raven Press, Ltd., New York
172. Yurewicz E.C., Sacco A.G., Gupta S.K., Xu N., Gage D.A. (1998) Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 273: 7488-7494



## 6. Anhang

### Sequenzen der verwendeten *Primer*:

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
ME1	GGTGA <del>CTT</del> CTGTGACTCCAGCCTGTGC
ME2	CAGGGTGAT(A/G)CGGTT(A/G)TGCCAGG
ME3	GTGGC(C/T)TACAGCGACGA(C/T)GG(A/G)CGC
ME5	CCAGGTTTCTGTAGAAGCTGGAGGCTGTGATCTG
ME6	GGGCAAGTTCAA(C/T)GCCTGGACCGC
2695	GAATTCAACGTTCCCGGGA-(T) <sub>16</sub>
2740	GTGGTTGGACATTATACACAGGTTGTTTGG
2741	ATTACCTGCAGGA
2742	TTGGCAAACATAGTAGTA
2884	TTGGCAAACGTAATAGTA
2886	ACAGTAGTGACAAACGTA
2898	CCACAAACACCCTTGTCTTTTGAGTC
2899	TGTGAGGTGAATGGATGTGCTGAACC
2900	GGTTCAGCACATCCATTACCTCACA
2901	GACCAGAGGGCCGCAGACAGCA
2904-GAPDH1	GGCGTCTTACCACCATGGAG
2937-GAPDH2	GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG
2812-AKTIN1	ACCCACACTGTGCCCATCTAC
2813-AKTIN2	CTTCATGGTGCTAGGAGCCAG
2794-RACE	GACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG

Die Primer beginnend mit ME wurden von der Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg, Deutschland, bezogen und von M. Enßlin entworfen (*Enßlin et al. 1998*).

Primer mit vierstelliger Bezeichnung wurden von Dr. H. Wolfes, MH Hannover, Abt. Biophysikalische Chemie, synthetisiert und teilweise bereits bei der Sequenzierung equiner und porciner CRISP-Proteine eingesetzt.

Die GAPDH (Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) und  $\beta$ -Aktin Primer wurden für die Kontroll-PCR Reaktionen der cDNA bei der Untersuchung der Transkriptionsmuster für die Spezies Rind, Schwein und Pferd erfolgreich eingesetzt.

## Lebenslauf

<b>Persönliche</b>	Name:	Gentzel
<b>Angaben</b>	Vorname:	Marc
	Geburtsdatum:	01.11.1969
	Geburtsort:	Hannover
<b>Schulbildung</b>	1976-1980	Grundschule Meterstraße, Hannover
	1980-1982	Orientierungsstufe Birkenstraße
	1982	Gymnasium St. Ursula Schule, Hannover
	1982-1989	Bismarckschule Hannover
<b>Studium</b>	1990-1991	Diplomstudiengang Chemie, Universität Hannover
	1991-1996	Diplomstudiengang Biochemie, Universität Hannover
	02/96-08/96	Diplomarbeit am Zentrum Biochemie, Abteilung Biophysikalische Chemie, der Medizinischen Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Dr. H. Wolfes „Anwendungsfluoreszenzmarkierter Oligodesoxynukleotide zur Untersuchung der c-Myb-DNA Interaktion“
	12.08.1996	Diplom in Biochemie
	seit 11/96	Doktorarbeit am Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. med. habil. E. Töpfer-Petersen