

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Heparin bindenden Proteine des equinen Seminalplasmas strukturell zu charakterisieren sowie ihre Ligandenbindungsfähigkeiten zu analysieren. Außerdem sollte der Ursprung des auch auf epididymalen Spermien nachgewiesenen HSP-7 immunhistochemisch untersucht werden.

Bei der durch heparinähnliche Glukosaminoglykane beeinflussten Kapazitation von Bullenspermien spielen die Heparin bindenden Proteine der Fibronectin-Typ-II-Familie (PDC-109, BSP-A3 und BSP-30K) eine Rolle. Die Heparin und Kohlenhydrate bindenden Proteine der Spermadhäsin-Familie des Schweines spielen vermutlich eine Rolle bei der Spermien-Zona pellucida-Interaktion. Auch das Hengstseminalplasma enthält Heparin bindende Proteine. CALVETE et al. (1994 a) hatten die N-terminalen Sequenzen der beiden HSP-1 und HSP-2 genannten Hauptproteinkomponenten ermittelt und eine strukturelle Gemeinsamkeit beschrieben. Außerdem fanden sie in der Heparin bindenden Fraktion ein Protein (HSP-7), das im Immunoblot mit Anti-AWN kreuzreagierte, einem monospezifischen, polyklonalen Antikörper gegen das porcine Seminalplasma-protein AWN, das zur Gruppe der Spermadhäsine gehört. Der Antikörper zeigte außerdem eine Bindung an Hengst spermien.

Zunächst wurde das Seminalplasma mittels Heparinaffinitätschromatographie in seine an Heparin bindende (Hep<sup>+</sup>) und nicht an Heparin bindende (Hep<sup>-</sup>) Proteinfraction unterteilt. HSP-1 und HSP-2 erschien in beiden Fraktionen, während HSP-7 nur in der Heparin bindenden Fraktion vorlag. Mittels Phosphorylcholinaffinitätschromatographie, Gelatineaffinitätschromatographie und rp-HPLC wurden die Proteine weiter aufgereinigt. Außerdem wurde ihre Masse mittels SDS-PAGE-Elektrophorese und Massenspektrometrie bestimmt. Ihre chemische Charakterisierung erfolgte mittels Aminosäure-, Aminosucker- und Zuckermanalyse sowie der N-terminalen Sequenzierung der Proteine, und die vollständige Sequenz wurde durch ihre proteolytische Spaltung und Sequenzierung der Bruchstücke ermittelt. Anschließend wurde geprüft, ob die Cysteine-reste in Disulfidbrücken gebunden waren oder isoliert vorlagen.

So konnte die vollständige Sequenz von HSP-1 (Hep<sup>+</sup> und Hep<sup>-</sup>) und HSP-7 ermittelt werden.

HSP-1 Hep<sup>+</sup> hatte eine Masse von 16604,6 Da und vier Disulfidbrücken. Die Sequenzen beider Formen von HSP-1 (Hep<sup>+</sup> und Hep<sup>-</sup>) waren identisch. HSP-1 (Hep<sup>+</sup> und Hep<sup>-</sup>) hatte an den Positionen 5, 12, 22 und 27 je ein O-glykosiliertes Threonin. Allerdings bestand die Glykosylierung von HSP-1 Hep<sup>+</sup> aus vier Ketten, die NeuNAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc enthielten, während die von HSP-1 Hep<sup>-</sup> aus einem Disaccharid Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc und drei GalNAc bestand. Die N-terminale Sequenz von HSP-2 zeigte starke Ähnlichkeit mit der von HSP-1, wenn am N-Terminus von HSP-1 die ersten 15 Aminosäuren, von denen zwei glykosiliert waren, ausgelassen wurden. Allerdings wurden an einigen Positionen von HSP-2 (Hep<sup>+</sup> und Hep<sup>-</sup>) zwei Aminosäuren gefunden, was auf mindestens zwei Isoformen hinweist. Die beiden Glykosylierungsstellen von HSP-2 stimmten mit denen von HSP-1 an den Positionen 22 und 27 überein, und die Struktur der Zuckerketten entsprach der von HSP-1 Hep<sup>+</sup>. Die Aminosäure- und Zuckeranalysen von HSP-2 Hep<sup>+</sup> und HSP-2 Hep<sup>-</sup> stimmten überein.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit der Proteindatenbank des MIPS ergab, daß HSP-1 und HSP-2 homolog zu den bovinen Seminalplasmaproteinen der PDC-109-Familie waren. Wie diese wiesen sie am C-Terminus zwei untereinander homologe Muster vom Fibronectin-Typ-II auf, und am N-Terminus waren zwei (HSP-1) bzw. eine (PDC-109 und HSP2) homologe Aminosäureketten zu finden, die alle Glykosylierungsstellen des Proteins aufwiesen und nur in dieser Proteinfamilie vorkommen.

HSP-1 und HSP-2 aus beiden Fraktionen banden nach der Isolierung mittels rp-HPLC nicht an Heparin. Außerdem war dasselbe Protein (HSP-2) sowohl in der Heparin bindenden als auch in der nicht Heparin bindenden Fraktion zu finden. Daraufhin wurde zunächst der Aggregationszustand der Proteine in beiden Fraktionen durch Ausschlußchromatographie untersucht. Dabei lagen HSP-1 und HSP-2 aus der Heparin bindenden Fraktion zusammen in einem in einem Aggregat von 90 kDa vor und behielten ihre Heparinbindungsfähigkeit. Alle anderen Proteine wurden bei 15 kDa als Monomere eluiert und banden bei der Rechromatographie nicht an Heparin. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Heparinbindung durch die Oligomerisation vermittelt wird, die wiederum durch die Glykosylierung der Proteine beeinflusst wird.

Die Aminosäuresequenz von HSP-7 war bis auf drei Aminosäuren identisch mit AWN-1, einem Heparin und Zona pellucida bindenden Protein des porcinen Seminalplasmas, das der Familie der Spermadhäline angehört. Seine Masse

betrug 14775 Da, das Protein war nicht glykosiliert und hatte zwei Disulfidbrücken.

Aufgrund der hohen Übereinstimmung mit AWN bestand eine starke Kreuzreaktivität mit Anti-AWN. Durch die Inkubation von HSP-7 mit equiner Zona pellucida und anschließender Darstellung des HSP-7 mit Anti-AWN konnte die Bindung von HSP-7 an die art eigene Zona pellucida nachgewiesen werden.

Außerdem wurde mit Anti-AWN auf gewaschenen ejakulierten und epididymalen Hengst spermien aus Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz im Bereich des Äquatorialssegmentes eine deutliche Immunfluoreszenz nachgewiesen. Auch auf allen Spermien aus dem Rete testis und auf einem Teil der Spermien aus Hodenparenchym wurde diese Anti-AWN-Bindung dargestellt. In der Immunhistologie an Präparaten aus den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens sowie des Hodens wurde eine starke Anti-AWN-Bindung im Nebenhodenkopf am Epithel der Tubuli recti festgestellt sowie eine schwächere und nach distal abnehmende an den Stereozilien des Epithels des Ductus epididymis in Nebenhodenkopf und -körper. Außerdem konnte eine Anti-AWN-Bindung an einigen z.T. benachbarten Spermato gonien in den Tubuli seminiferi festgestellt werden.

Zur Klärung einer möglichen Funktion der charakterisierten Proteine HSP-1 und HSP-7 bei der Kapazitation/Akrosomreaktion, Bindung an die Eileiterepithelzellen und Spermien-Zona pellucida-Bindung sind noch weiterführende Untersuchungen nötig.

## 7 SUMMARY

Markus Reinert

### **Structure of heparin-binding proteins in the equine seminal plasma and immunohistochemical localization of AWN-epitopes**

In the present work heparin-binding proteins in the equine seminal plasma were characterized structurally and their ligand-binding ability was analysed. Furthermore HSP-7, which was also found on epididymal sperms, was immunohistochemically examined.

In the bull, heparin-binding proteins of the fibronectin type-II family (PDC-109, BSP-A3, BSP-30K) are important for capacitation. In the pig, the heparin- and carbohydrate-binding proteins of the spermadhesin-family are thought to play an important role in the interaction of sperm and zona pellucida. Also in the equine seminal plasma, heparin-binding proteins have been found. CALVETE et al. (1994 a) analysed the N-terminal sequences of the major proteins HSP-1 and HSP-2 and described a structural similarity between both. Also, they described an equine spermadhesin named HSP-7 in the heparin-binding fraction. This protein showed a strong immunohistochemical cross-reactivity with Anti-AWN, a monospecific, polyclonal antibody against the spermadhesin AWN in the porcine seminal plasma. This antibody also bound to equine spermatozoa.

First, the equine seminal plasma was divided into its heparin-binding (Hep+) and not heparin-binding (Hep-) fraction using heparin affinity chromatography. HSP-1 and HSP-2 were found in both fractions, while HSP-7 was found only in the heparin-binding fraction. Further purification of the proteins was performed by phosphorylcholin affinity chromatography, gelatine affinity chromatography and rp-HPLC. The molecular mass was determined using SDS-PAGE-electrophoresis and mass spectrometry. The chemical characterization of the proteins was performed by amino acid analysis, carbohydrate analysis and N-terminal sequencing. The complete amino acid sequence was determined with proteolytic degradation and sequencing of the fragments. Subsequently it was examined, whether the cystein-residues were bound in disulphide-bonds.

With this methods, the complete sequences of HSP-1 (Hep+ and Hep-) and HSP-7 could be determined.

HSP-1 Hep+ was a 16604,6 Da protein containing 4 disulphide-bonds. The sequences of HSP-1 Hep+ and Hep- were identical. Nevertheless, in heparin-binding HSP-1 O-glycosylated threonine was found at the positions 5,12,22 and 27, most probably glycosylated with NeuNAc(a2-3)Gal(b1-3)GalNAc oligosaccharides, whereas non-heparin-binding HSP-1 contained a disaccharide Gal(b1-3)GalNAc and three GalNAc residues. The N-terminal sequence of HSP-2 showed strong similarities with HSP-1, if the first 15 amino acids (two of them glycosylated) of the N-terminus of HSP-1 were cut. The fact that two amino acids were found at some positions of HSP-2 (Hep+ and Hep-) indicates the existence of at least two isoforms. The two glycosylation sites of HSP-2 were identical with the ones of HSP-1 at position 22 and 27, with a structure most probably identical with those of HSP-1 Hep+. The analyses of amino acids and carboanhydrates of HSP-2 Hep+ and HSP-2 Hep- gave identical results.

A comparison of the amino acid sequences with the protein sequences deposited in the data bank of the MIPS showed that HSP-1 and HSP-2 were structurally related to the bovine seminal plasma proteins of the PDC-109 family. They shared the invariant residues found in the fibronectin type-II modules, but the sequence of the N-terminal extention contained two (HSP-1) or one (PDC-109 and HSP-2) structurally related peptides found only in these proteins. The mentioned peptides contained all the glycosylated residues of the proteins.

Neither HSP-1 nor HSP-2 of both fractions isolated by rp-HPLC retained heparin-binding activity. Furthermore, HSP-2 was found in a heparin-binding and a non-heparin-binding fraction. Therefore, the aggregation states of the proteins in both fractions were examined using size exclusion chromatography. HSP-1 and HSP-2 from the heparin-binding fraction formed a 90 kDa heparin-bound aggregate with the ability to bind heparin. All other proteins were eluted as monomers at 15 kDa and did not have heparin-binding ability. It could be concluded, that the heparin-binding activity is determined by oligomerization, which for its part is influenced by the glycosylation of the proteins.

The amino acid sequence of HSP-7 was (except three amino acids) identical with AWN-1 of the porcine seminal plasma. The molecular mass of HSP-7 was

14775 Da, the protein was not glycosylated and contained two disulphide-bonds. Because of the high structural similarity with AWN a strong cross reactivity with anti-AWN could be seen.

It was possible to demonstrate the binding of HSP-7 to equine zona pellucida after coincubation of HSP-7 and equine zona pellucida followed by binding of anti-AWN to HSP-7. Furthermore a distinct indirect immunofluorescence could be shown on washed, ejaculated and epididymal spermatozoa from caput, corpus and cauda epididymis using anti-AWN. This immunofluorescence by anti-AWN-binding could also be shown on all spermatozoa from the rete testis and on some spermatozoa from the testis. By means of the immunohistochemical staining of tissue slides cut from different sections of the epididymis and testis, a distinct immunoreaction of the epithel of tubuli recti in the caput epididymis and a weaker anti-AWN binding at the stereocilia of the epithel of ductus epididymis in caput and corpus epididymis could be shown. Also, an anti-AWN binding on some spermatogonia in the tubuli seminiferi was found.

To explain the function of the now characterized proteins HSP-1 and HSP-7 in capacitation / acrosome reaction, binding to oviductal epithel cells and spermatozoa-zona pellucida binding, further investigations will be necessary.