

7 Zusammenfassung

Ziel vorliegender Arbeit war es, epididymisspezifische Gentranskripte beim Hund zu identifizieren. Zwecks dessen wurde die Strategie des differentiellen Screenings eingesetzt, bei dem als Subtraktionssonden canine Leber-, Lunge- und Hoden-cDNA sowie die schon bekannten CE1-, CE4- und CE5-Transkripte (canine Epididymisprodukte) verwendet worden waren. Alle Klone, die ausschließlich mit der epididymalen cDNA-Sonde Hybridisierungssignale zeigten, und nicht CE1, CE4 oder CE5 waren, wurden als „potentiell positive Kandidatenklone“ bezeichnet. Sie wurden ansequenziert und mittels einer Datenbankrecherche nach bekannten (Homologie >65%) bzw. unbekanntem Sequenzen eingeteilt. Insgesamt wurden 34 Teilsequenzen, die in der Regel bis zu 350 Bp gelesen wurden, als canine Homologe zu gelisteten GenBank-Einträgen, identifiziert. Sie stellen wahrscheinlich die Sequenzabschnitte der jeweiligen caninen Produkte dar. Außerdem wurden vier neue epididymisspezifische Gentranskripte näher charakterisiert. Entsprechend zu den schon bekannten caninen Transkripten, CE1, CE4 und CE5 und entsprechend zu den humanen Transkripten HE1-HE6 (humane Epididymisprodukte) wurden sie mit CE7, CE8, CE9 und CE10 benannt. Für alle Gene wurde die vollständige kodierende Sequenz durch das Zusammensetzen von Teilsequenzen entschlüsselt. Ihre Nukleinsäuresequenzen und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit den Eintragungen der Datenbanken verglichen. Nur das CE7-Transkript (Acc.no.AF045185) wies eine hohe Homologie zu einer schon bekannten Sequenz auf, seine 1523 Bp lange cDNA-Sequenz kodiert für das canine Homolog der GPX5 (Glutathionperoxidase5). GPX5 konnte auch schon vom Nebenhoden der Maus, der Ratte, dem Affen und dem Schwein charakterisiert werden. Ihr wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Spermienintegrität im Nebenhoden zugesprochen. Durch *In-situ*-Hybridisierung konnte für die CE7-mRNA nachgewiesen werden, daß sie im gesamten Nebenhoden mit einem Maximum in den Epithelzellen der proximalen Epididymis exprimiert wird.

Die CE8, CE9 und CE10-Transkripte sind Genprodukte, die bislang unbekannt waren. Ihre Expression im Nebenhoden wurde durch Northern Blot-Analysen sowie *In-situ*-Hybridisierungen nachgewiesen.

Mittels eines Northern Blots konnte nachgewiesen werden, daß die CE8-mRNA - Expression sich auf die Caput epididymis beschränkt. Liegt der Nebenhoden abdominal, ist das CE8-Transkript nicht mehr detektierbar. Die Sequenz von CE8 besteht aus 590 Bp. Die CE9-Sequenz besteht aus 1164 Bp. Durch Northern Blot-Analysen und *In-Situ*-Hybridisierung konnte aufgezeigt werden, daß sich die

Expression der CE9-mRNA auf die skrotale Caput epididymis beschränkt. Für dieses Transkript konnten Homologe durch Kreuzhybridisierung auf einem Northern Blot beim Hengst, Bullen und Kater nachgewiesen werden. CE10 ist ein hundespezifisches Produkt mit einer Sequenzlänge von 552 Bp. Die stärkste Expression befindet sich im skrotalen Nebenhodenschwanz, gefolgt von der Expression im Ductus deferens und der im Nebenhodenkörper. Bei abdominalen Lage der Epididymis ist die Expression auf den Ductus deferens beschränkt.

Alle charakterisierten Produkte gehören zu der Transkripte Klasse der mäßig-häufig exprimierten mRNAs.

In vorliegender Arbeit wurden einige Transkripte ansequenziert, für die Homologe in der Genbank existieren und es konnten einige interessante neue epididymis-spezifische Transkripte identifiziert werden. Die Frage ob die beschriebenen Gen-transkripte eine funktionelle Rolle bezüglich der Spermienreifung im Nebenhoden einnehmen, war nicht Aufgabe vorliegende Arbeit. Die funktionelle Charakterisierung dieser Gene bleibt also Gegenstand zukünftiger Forschungen .

8 Summary

Astrid Beiglböck:

Evidence for new epididymis-specific genes in the dog

The aim of this studies conducted in the current thesis was to identify epididymal-specific gene transcripts in the dog. A differential screening strategy was employed, utilizing as subtraction probes, canine liver-, lung- and testis-cDNA as well as the previously characterized CE1, CE4 and CE5 (canine Epididymis) transcripts. All clones showing hybridization signals exclusively with the epididymal cDNA-probe, and not being CE1, CE4 or CE5, were classified as 'potential positive candidates'. They were partially sequenced and divided by database investigation into known (homology >65%) and unknown sequences. 34 sequences of an average of 350 bp show homologies to known Genbank entries. These are suggested to represent the canine equivalents of the respective product. Four new canine epididymal-specific gene transcripts were investigated in detail. They were named CE7, CE8, CE9 and CE10 corresponding to CE1, CE4 and CE5 and to the human transcripts HE1-HE6 (human Epididymis). The full cDNA sequences of these clones were obtained and the predicted amino acid sequences were compared with known GenBank entries. Only the CE7 transcript (acc.no.AF045185) showed high homology to a known database sequence, the 1523 bp cDNA sequence being the canine equivalent of the GPX5 (Glutathione peroxidase5) which has previously been characterized from the epididymis of the mouse, rat, monkey and pig. This protein is thought to play an important role in maintaining sperm integration in the epididymis. Using in situ hybridization, the canine CE7 mRNA was shown to be expressed in the epithelial cells lining the epididymal duct and showed maximum expression in the proximal epididymis.

The CE8, CE9 and CE10 transcripts were considered new gene products and their epididymal expression was assessed using Northern blotting and in situ hybridization.

Using Northern blotting, the expression of the CE8 transcript was restricted to the caput epididymis and this signal was lost if the epididymis remained abdominal. The sequence of CE8 consists of 580 bp. The CE9 cDNA sequence has a length of 1164 bp and the expression of the mRNA is limited to the scrotal caput epididymis. By cross species Northern blotting it was possible to show homologous transcripts in stallion, bull and tom-cat. The CE10 cDNA appears to be dog specific and has a length of only 552 bp. Its expression is highest in the scrotal cauda epididymis

followed by the deferend duct and the corpus epididymis. In the abdominal epididymis the CE10 transcript is restricted to the deferend duct as determined by Northern blotting.

All of these characterized products belong to the moderate abundance class of mRNA.

The studies included in this thesis have identified some interesting new epididymal specific transcripts however it was not in the scope of this thesis to determine the possible functional roles of these gene transcripts in the epididymis. The functional characterization of these transcripts awaits future studies.