

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, mit immunhistochemischen, immunfluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Methoden die Lokalisation der equinen Seminalplasmaproteine HSP-1 und HSP-3 im Genitalapparat und an Spermien des Hengstes nachzuweisen. Weiterhin sollte das Verhalten der spermiegebundenen Fraktion beider Proteine in der Kokultur von Hengstspermien mit Oviduktepithelzellen (OEC) von Stute und Schwein untersucht werden, um Aussagen über ihre physiologische Funktion zu erhalten.

Als Untersuchungsmaterial standen die Genitaltrakte von fünf Warmbluthengsten, Ejakulate verschiedener fertiler Hengste, ein Stuten- und verschiedene Schweineeileiter zur Verfügung. Für alle Untersuchungen wurden polyklonale gegen HSP-1 bzw. HSP-3 gerichtete Antikörper verwendet.

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnten HSP-1 und HSP-3 im gesamten Nebenhoden, Samenleiter, Samenleiterampulle und Samenblase nachgewiesen werden. Im Western Blot von Gewebeextrakten und Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen war der Nachweis von HSP-1 und HSP-3 in den gleichen Organen möglich. Zusätzlich konnte eine schwach positive Immunreaktion für HSP-3 im Hodenextrakt beobachtet werden. Dies läßt den Schluß zu, daß beide Proteine in den immunpositiven Organen synthetisiert und sezerniert werden.

In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden HSP-1 und HSP-3 im postakrosomalen Bereich und am Mittelstück von Hengstspermien nachgewiesen. HSP-1 war erstmals an Spermien aus dem Nebenhodenkörper und HSP-3 erstmals an Spermien aus dem Nebenhodenkopf zu beobachten. Die gebundene Menge beider Proteine nahm bei Nebenhodenschwanzspermien auf das auch bei ejakulierten Spermien gefundene Niveau zu. Diese Daten zeigen, daß sich HSP-1 und HSP-3 während der Nebenhodenpassage an die Spermien anlagern.

HSP-1 und HSP-3 waren im postakrosomalen Bereich von Hengstspermien nach zwei Stunden Kokultur mit equinen OEC bzw. sechs Stunden Kokultur mit porzinen OEC in der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu verringerte sich die am Mittelstück gebundene Menge beider Proteine in 24 Stunden Kokultur kaum. Diese Ergebnisse deuten auf eine zweigeteilte Funktion der spermienas-

soziierten Fraktion von HSP-1 und HSP-3 hin. Der am Mittelstück der Spermien gebundene Anteil beider Proteine ist möglicherweise im Rahmen der Nebenhodenreifung an der Erlangung der Vorwärtsmotilität beteiligt. Das im postakrosomalen Bereich der Spermien assoziierte HSP-1 scheint eine Funktion als Dekapazitationsfaktor zu haben. Im Gegensatz dazu ist das im postakrosomalen Bereich gebundene HSP-3 vermutlich an der Gameteninteraktion beteiligt. Der aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen stammende, nicht spermienassoziierte Anteil beider Proteine scheint hingegen eine Schutz- und Pufferfunktion für die Spermien während der Ejakulation und der Wanderung im weiblichen Genitale zu haben. Die Absicherung dieser Hypothesen zur Funktion von HSP-1 und HSP-3 bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

## 6 SUMMARY

**Oliver Hefß**

### **Localization and function of equine seminal plasma proteins HSP-1 and HSP-3**

The aim of this work was to localize the equine seminal plasma proteins HSP-1 and HSP-3 in the genital tract and on spermatozoa of the stallion by immunohistochemistry, immunofluorescence microscopy and biochemical methods. Furthermore the behaviour of the sperm-bound fraction of both proteins was observed during coculture of stallion spermatozoa with oviduct epithelial cells (OEC) to obtain information about their physiological function.

The genital tracts of five standardbred stallions, ejaculates from various stallions, the oviduct from one mare and oviducts of various pigs were used for this study. All experiments were carried out using polyclonal antibodies directed against HSP-1 or HSP-3.

By means of immunohistochemistry HSP-1 and HSP-3 could be detected in the tissue of the whole epididymis, vas deferens, ampulla and seminal vesicle. HSP-1 and HSP-3 could be shown for these organs by western blotting of tissue extracts and secretions of the accessory sex glands. Furthermore extracts of testis demonstrated a weak immunopositive reaction for HSP-3. Therefore it can be concluded that both proteins were synthesized and secreted by the immunopositive organs.

Using indirect immunofluorescence microscopy HSP-1 and HSP-3 could be detected in the post acrosomal region and on the middlepiece of stallion spermatozoa. HSP-1 could be first shown on spermatozoa from corpus epididymis and HSP-3 could first be shown on spermatozoa from caput epididymis. The sperm-bound amount of both proteins increased on spermatozoa from cauda epididymis to the level found on ejaculated sperm. These data show that HSP-1 and HSP-3 bind to spermatozoa during the epididymal passage.

HSP-1 and HSP-3 could not be detected on the postacrosomal region of stallion spermatozoa after two hours coculture with OEC from the mare or six hours coculture with OEC from sow using immunofluorescence microscopy. In contrast the amount of both proteins associated to the middlepiece decreased only minimally during 24 hours of coculture. These results suggest two different functions of the sperm-bound fraction of HSP-1 and HSP-3. The middlepiece-bound part of both proteins is possibly involved in the attainment of forward motility of spermatozoa during epididymal maturation. HSP-1

associated to the postacrosomal region seems to have a function as a decapacitation factor. In contrast the postacrosomal-bound HSP-3 is probably involved in gamete interaction. The non-sperm-bound part of both proteins secreted by the accessory sex glands seems to have a general protective function for the spermatozoa during ejaculation and migration through the female genitaltract. To prove these hypothesis for function of HSP-1 and HSP-3 further research needs to be done.