

Kapitel 5

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Anzucht einer Oviduktepithelzellkultur vom Schwein zu etablieren und erste Untersuchungen zur Spermatozoen-Oviduktepithelzell-Interaktion durchzuführen. Die Zellkultur soll als Standardmodell dienen, um die Interaktion zwischen Spermatozoen und Eileiterepithel im Detail klären zu können. Daher ist es wichtig, daß die Kultur die Charakteristika, die das Epithel in vivo kennzeichnen, ebenfalls ausprägt.

Zunächst wurden verschiedene Kultivierungssysteme getestet, von denen sich die Anzucht der Oviduktepithelzellen auf einer Beschichtung aus Matrigel, einer Extrazellulärmatrix, als vorteilhaft herausstellte. Die Kultivierungsdauer bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers konnte auf ein Minimum von fünf Tagen reduziert werden. Als Kulturgefäße waren Lab-Tek Chamber Slides bzw. Zellkultureinsätze mit einer Membran für die Elektronenmikroskopie besonders geeignet. Die Lab-Tek Slides konnten nach Anzucht der Zellen problemlos zur Konkubation mit Spermatozoen als auch zu Nachweisen von Cytokeratin, Vimentin und AWN eingesetzt werden. Die Charakterisierung der Kultur erfolgte mittels elektronenmikroskopischer und immunhistochemischer Verfahren. Weiterhin wurde versucht, die Lektine ConA, SnA, ACA, AAA und MAA an die Zelloberfläche zu binden, um die Glykocalyx der kultivierten Zellen zu untersuchen. Im zweiten Schritt wurde mit komplementären Zuckern inkubiert, um durch die Inhibition die Spezifität der Bindung zwischen Lektin und Oviduktepithelzelle zu überprüfen. Zudem

wurde die Anwesenheit des Spermadhäsins AWN auf der Oberfläche der Zellen ohne Vorinkubation und nach Inkubation mit Spermien bzw. Seminalplasma durch Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen AWN (s. Kap. 3.2.7) nachgewiesen. Gegenstand der Untersuchungen waren weiterhin die Auswirkungen der Kokultivierung von Spermien und Eileiterepithelzellkultur auf die Erhaltung der Spermienmotilität, sowie das Bindungsverhalten der Spermien an die Kultur. Dazu wurden jeweils drei Ejakulate von drei Ebern gewonnen. Durch einen Swim-up selektierte, motile Spermien wurden während 6 stündiger Koinkubation mit einer Oviduktepithelzellkultur beobachtet. Durch raster- und transmissionsmikroskopische Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die kultivierten Oviduktepithelzellen epitheltypische Charakteristika in Form von Tight Junctions, Desmosomen und einem geschlossenen Zellverband aufwiesen. Nach erfolgter Adhäsion der Zellen waren Mikrovilli und Zilien als Bildungen der Oberfläche zu erkennen. Immunhistochemisch konnten die Intermediärfilamente Cytokeratin und Vimentin nachgewiesen werden. Durch die Kokultivierung der Eberspermatozoen mit der Oviduktepithelzellkultur blieb die Motilität der an die Kultur gebundenen Spermien während der ersten 6 Stunden Inkubationsdauer signifikant höher erhalten als im Medium allein und im konditionierten Medium, das 24 Stunden mit der Oviduktepithelzellkultur koinkubiert worden war. Entscheidend für die Erhaltung der Motilität war die Bindung an die kultivierten Zellen. Ungebundene Spermien unterschieden sich in ihrer Motilität nicht signifikant von Spermien in den beiden Medien. Im Vergleich zu gebundenen Spermien war ihre Motilität signifikant geringer. Das Bindungsverhalten war starken Schwankungen unterworfen, die weder Gesetzmäßigkeiten im Verlauf der Inkubation noch eine Wiederholbarkeit der Kurven im Bezug auf die Eber erkennen ließen. Neben den Oligosacchariden α -D-N-Acetyl-Glucosamin bzw. α -D-Mannopyranosid und N-Acetyl-Neuraminsäure- α -(2-6)-Galaktose, die durch die Bindung von Lektinen mit diesen Zuckerspezifitäten an die Oviduktepithelzellkultur, in großer Menge auf der Epithelzelloberfläche nachgewiesen wurden, wurde auch das Spermadhäsins AWN exprimiert (Methode s. Kap. 3.2.7. Die Inkubation mit Seminalplasma bzw. Spermien schien die Menge an AWN noch zu erhöhen, was auf eine zusätzliche Bindung an die Kultur oder eine verstärkte Expression hinwies.

Als Schlußfolgerung dieser Untersuchung kann festgestellt werden, daß die kultivierten

Zellen epithelialer Natur sind. Sie zeigen neben den typischen Charakteristika aber auch Entdifferenzierungsanzeichen, wie z.B. der Nachweis von Vimentinfilamenten andeutet. Die starke Bindung der Lektine ConA und SnA im Vergleich zu der weniger ausgeprägten Bindung der Lektine ACA, AAA und MAA, sowie der Nachweis des Spermidins AWA bilden erste Schritte zur Erforschung der kohlenhydratvermittelten Interaktion zwischen Spermatozoen und Oviduktepithel.

Kapitel 6

Summary

Astrid Nolte

Establishment of an oviductal epithelial cell culture and first investigations on the interaction between spermatozoa and oviductal epithelial cells in the pig

The aim of this work was to establish a culture system for porcine oviduct epithelial cells as a model to elucidate the interactions between spermatozoa and oviductal epithelium. Therefore it is important that the cells keep expressing the characteristic features of oviductal epithelium during culture. Additionally first experiments on the interaction between spermatozoa and porcine oviductal epithelial cells were made.

Some different culture systems were tested. Growing cells on Matrigel as an extracellular matrix showed advantages as the time until the monolayer was confluent could be reduced to five days. Lab-Tek Chamber Slides and tissue culture inserts, both coated with Matrigel, were found to be appropriate for culturing the cells. The membranes of the inserts were used for electron microscopy, while the Chamber Slides were successfully employed for staining procedures and sperm coinubation. Oviduct epithelial cell monolayers were characterized by use of electron microscopy and immunocytochemistry. To study the glycocalyx of the cultured cells the lectins ConA, SnA, ACA, AAA and MAA were tried to bind to the surface. In a second step saccharides complementary to these lectins should inhibit the lectin binding. Furthermore the presence of AWN, a porcine spermadhesin, on

the epithelial cell surface was examined in cells alone, in cells cultured with seminal plasma and cells cultured with spermatozoa by use of polyclonal antibodies against AWN (see chapter 3.2.7). Effects of coculture between spermatozoa and oviduct epithelial cells on the maintenance of sperm motility were investigated. Sperm attachment to oviduct epithelial cells during the first 6 hours of coculture was investigated. 3 ejaculates from each of 3 boars were used for the experiments after selecting motile spermatozoa by swim-up.

As shown by scanning and transmission electron microscopy the cultured oviductal epithelial cells showed tight junctions, desmosoms and close associations between cells, which are referred to as typical features of epithelial cells as well as the polarization and microvilli and cilia, which are both formed by the surface. The cultured cells had both cytokeratin and vimentin filaments as detected by immunocytochemical staining. Sperm motility was significantly maintained for a longer time and a higher level by coculture with oviduct epithelial cell monolayers during the observed incubation period compared to those incubated with medium alone or conditioned medium. The better maintenance of sperm motility was due to the attachment of the sperm to oviductal epithelium. Motility of sperm swimming free in the medium above the cultured epithelial cells did not differ significantly from motility of sperm incubated in both medium and conditioned medium, but showed a significantly lower motility compared to attached sperm. Attachment to oviduct epithelial cells varied widely not only between boars but as well between the 3 ejaculates from each boar. A difference between boars concerning the rate of sperm attached to the cells therefore could not be recognized. The glycocalyx of oviductal epithelial cells contained the complementary oligosaccharides to the lectins ConA and SnA in a great amount while the lectins MAA, ACA and especially AAA were bound in a very small amount. Furthermore the spermadhesin AWN was found on the epithelial cells both without incubation and after incubation with seminal plasma and sperm. The stronger staining in oviductal epithelial monolayers incubated with sperm or seminal plasma indicated that additional AWN might have been bound to the cell surface or was expressed by the oviductal cells.

The conclusion to be drawn from these experiments are that all the oviductal cells

cultured were of epithelial origin and kept their epithelial nature during cultivation for the first 7-8 days although features of dedifferentiation e.g. the presence of vimentin filaments were evident. With detecting of AWN expression and investigation of the oligosaccharides in the cell glycocalyx first steps were made to characterize the surface of oviductal epithelium and thereby to investigate the mechanisms of the interaction between spermatozoa and oviductal binding.