

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es einen Assay zu Untersuchung der Spermien-Ovidukt-Interaktion beim Schwein zu etablieren. Darüber hinaus sollten auch erste experimentelle Untersuchungen über die Beteiligung von Glykoproteinen an der Spermien-Eileiterbindung durchgeführt werden. 1 - 0,5 mm große Oviduktepithelstücke, sogenannte „Explante“, wurden von Schlachtschweinen gewonnen und mit Eberspermien 15 min bei 39° C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Explante mit einer, an das Mikroskop gekoppelten Videokamera, gefilmt und die gebundenen Spermien ausgezählt. Es wurde ein rechnerisches Modell zur Ermittlung der Anzahl gebundene Spermien pro 0,01 mm² der Explantfläche (Bindungsindex, BI) entwickelt.

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Explante die bekannten Kennzeichen des Oviduktepithels besitzen und die Spermien nachweislich fest an den Zilien des Oviduktepithels binden.

Der Einfluß verschiedener Parameter auf den Bindungsindex wurde untersucht. Die Anzahl der inkubierten Spermien war direkt korreliert mit der Anzahl der gebundenen Spermien pro 0,01 mm² Explantfläche. Weder der Reproduktionsstatus der weiblichen Spendertiere (Jungsau, Altsau), die Lokalisation der Explantentnahme (Isthmus, Ampulle) noch der Zyklusstand (Östrus, Interöstrus) hatte einen signifikanten Einfluß auf den Bindungsindex.

Individuelle Eber wiesen unterschiedliche Bindungsindices auf. Der Bindungsindex war zudem negativ korreliert mit morphologisch Parametern (% morphologisch abweichende Formen und % Plasmotropfen) betrifft. Ejakulierte Spermatozoen hatten einen signifikant höheren Bindungsindex als Spermatozoen, die aus dem Nebenhoden gewonnen wurden. Eine dosisabhängige, kompetitive Hemmung der Spermienbindung war festzustellen, nach Zugabe steigender Mengen von Proteinen der heparinbindenden Spermadhäsion Fraktion. Dies sind erste Hinweise auf die Beteiligung von Seminalplasmaproteinen bei der Interaktion von Spermien mit den Eileiterepithelzellen beim Schwein.

In weiteren kompetitiven Hemmungsstudien wurden verschiedene Modellglykoproteine, die bei der Interaktion von Spermien mit dem Eileiterepithel beteiligt sein könnten, vergleichend eingesetzt. Hierbei zeigten Ovalbumin, α 3- α 6-Mannopentaose und der Zucker Laktose die deutlichste Hemmung. Ebenfalls eine Hemmung erzeugten Fetuin, Asialofetuin und Galaktose. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß zwei mögliche Bindungsmechanismen bei der Spermien-Epithelzell-Interaktion beteiligt sein könnten, zum einen die Bindung über Mannose und zum anderen über Galaktose.

Histochemisch wurde mittels Lektinbindungen versucht, nähere Informationen über die exprimierten Glykoproteine der Oviduktepithelzellen zu erhalten. Die Lektine ECA und PNA sowie RCA zeigen sich zyklusabhängig. Alle anderen eingesetzten Lektine, ACA, ConA, MAA, SNA, AAA und DSA zeigten sich nicht zyklusabhängig. Einige dieser Lektine binden mannosereiche Strukturen und andere binden spezifisch an Galaktose. Dies sind Hinweise dafür, daß diese Oligosaccharide vom Oviduktepithel exprimiert werden.

Es ist festzustellen, daß der porcine Explant-Assay für Studien der Spermien-Oviduktepithelzell-Interaktion geeignet ist. Die Abhängigkeit der Spermien-Oviduktexplantbindung von individuellen Ebern und morphologischen Spermienparametern deutet auf eine selektive Bindungsfähigkeit des Oviduktes hin.

Mithilfe dieses Assays konnten erste Hinweise gewonnen werden auf die Beteiligung von Seminalplasmakomponenten und verschiedenen Kohlenhydraten bei der Formierung des Spermienreservoirs. Hierbei scheinen als „low-affine“ Bindungskomponente Galaktose und als „high-affine“ Bindungskomponente Mannose beteiligt zu sein.

6 Summary

Renate Gehlhaar

Establishment of a porcine oviductal explant assay to study spermatozoa oviductal interaction

The aim of this thesis was to establish a sperm explant binding assay in pig. Further studies included investigations of the protein-carbohydrate interaction in sperm binding to the oviduct. 1 - 0.5 mm pieces out of the oviduct termed „explants“ were recovered from slaughtered pigs and coincubated with boar sperm for 15 min at 39° C and 5 % CO₂. By videomicroscopy the number of sperm that bound to the epithelium was recorded. The optimised mathematical approach for calculating standardised sperm number per 0.01 mm² explant surface (bindingindex, BI) was established.

By electronmicroscopy pictures the characteristics of oviductal epithelium could be shown and one can see that the sperm tightly bind to the epithelium.

The influence of different parameters concerning the bindingindex was studied. A linear dependence between the number of coincubated sperm and the sperm number bound to the epithelium per 0.01 mm² of the explant was found. There was no difference in binding affinity neither between isthmus and ampulla nor between gilts and sows. The cycle stage of the sow did not influence the binding affinity.

Individual boars showed remarkable influence on the binding index. Noteworthy negative correlation was found between binding index and percentage of morphologically abnormal sperm (%) and sperm with plasma droplets (%). Moreover it could be shown that ejaculated sperm, compared with epididymal sperm, showed significantly higher binding affinity.

In a competitive inhibition study, seminal plasma proteins of the spermadhesin family inhibited attachment of ejaculated sperm that was treated with the swim-up procedure to the explants in concentration depending manner. This is a supporting evidence for involvement of seminal plasma proteins in sperm-oviductal interaction in pig.

Different glycoproteins were tested in competitive binding assays to study if they were involved in protein-carbohydrate interaction in sperm-oviductal binding. Ovalbumine, α 3-6 α -mannopentaose and lactos inhibited the sperm binding very well indicating that they are high-affine structures whereas, fetuin, asialofetuin and galactose only seem to have low-affine binding structures to the oviductal epithelium of pigs.

Histochemically lectins were used to get information about glycoproteins that might be expressed by oviductal epithelial cells. ECA, PNA and RCA were found and they are expressed in different concentrations depending on the cycle stage of the sow. The lectins ACA, Con A, MAA, SNA, AAA and DSA also were found, but they were not influenced by the cycle stage of the sow. Some of these lectins bind to mannose and some to galactose. This indicates that these oligosaccharides are expressed by oviductal epithelial cells.

Finally it may be claimed that this assay can be used for studies concerning sperm-oviductal interaction. Dependence of sperm-oviductal binding concerning individual boars and the number of morphologically abnormal sperm indicates a selective binding ability of the oviduct. By using this assay evidences for involvement of seminal plasma proteins and carbohydrates in forming a sperm reservoir is demonstrated. One can differ between the low-affine structure galactose and the high-affine structure mannose.