

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit immunhistochemischen, immunfluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Methoden das Spermienmembran-Protein SP47 weiter zu charakterisieren. Hierzu war es notwendig, zunächst einen Antikörper gegen das Protein zu produzieren. Dazu diente das aus boviner Milch isolierte, homologe Protein MGP 53/57. Im Anschluß sollte die Lokalisation und die topographische Änderung des Proteins während der Spermienreifung und des Kapazitationsprozesses untersucht werden. Durch die Entwicklung eines Spermatozoon-Zona pellucida Bindungstests sollte zum einen eine mögliche Beteiligung von SP47 an der Zona-Bindung, zum anderen sollte eine Beeinflussung des Reifungsprozesses von Spermien durch die Zona im Hinblick auf das Protein SP47 getestet werden.

Als Untersuchungsmaterial standen bovine Milch, die Genitaltrakte von drei Ebern, Ejakulate verschiedener Eber und etliche Schweineovarien zur Verfügung. Für alle Versuche wurden polyklonale, gegen MGP53/57 bzw. SP47 gerichtete Antikörper verwendet.

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

Das Protein MGP 53/57 konnte aus boviner Milch isoliert werden. Nach Charakterisierung der Kohlenhydratseitenketten und partieller Deglycosilierung, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das Milchprotein hergestellt.

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte SP47 im Hoden und im gesamten Nebenhoden nachgewiesen werden. Im Western Blot von Gewebeextrakten war der Nachweis von SP47 in den gleichen Organen möglich. Dieses läßt den Schluß zu, daß SP47 sowohl im Hoden als auch im Nebenhoden synthetisiert und sezerniert wird.

In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie konnte das Protein SP47 im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes sowohl bei Spermatozoen aus Hoden- und Nebenhodenabschnitten als auch bei ejakulierten Spermatozoen ermittelt werden. Es wurde die Lokalisation und die topographische Änderung des Proteins während der Spermienreifung und des Kapa-

zitationsprozesses untersucht. Dabei traten unterschiedliche Intensitäten in der Fluoreszenz im apikalen Rand der Spermatozoen auf. Des Weiteren konnte eine Änderung der Lokalisation von SP47 durch eine Verlagerung des Signals in die gesamte akrosomale Region beobachtet werden. Diese Signalverlagerung trat verstärkt zum Ende des Kapazitationsprozesses und in umgekehrter Reihenfolge während der epididymalen Reifung auf. Im Verlauf der Nebenhodenpassage ist dieses Phänomen wahrscheinlich durch eine Maskierung des SP47-Antigens zu erklären. Die Signalveränderungen während des Kapazitationsprozesses sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß es während des Kapazitationsprozesses, bedingt durch die Veränderung der Spermienplasmamembran, zu einer Wanderung oder Demaskierung von SP47 in diesem Bereich kommt.

Die Ergebnisse der Vitalfärbung mit den Farbstoffen Propidiumjodid und Hoechst 33258 zeigten, daß nur die membranintakten Spermien eine SP47-spezifische Fluoreszenz aufweisen. Tote oder akrosomreagierte Spermatozoen weisen keine Fluoreszenz auf, so daß eine Beteiligung an der Gameteninteraktion ausgeschlossen werden kann.

Mit Hilfe des Spermatozoon-Zona pellucida Bindungstests konnte SP47 auf der Spermienoberfläche zum Zeitpunkt der Spermienbindung an die Zona pellucida und während der Kapazitation nachgewiesen werden. Auch hier konnten SP47-Fluoreszenzen am apikalen Rand und an der gesamten akrosomalen Region festgestellt werden. An akrosomreagierten Spermatozoen war SP47 nicht mehr nachweisbar.

Der Versuch SP47 an die Zona pellucida im Western Blot zu binden verlief negativ, so daß eine Beteiligung von SP47 an der Bindung des Spermatozoons an die Eizelle nicht belegt werden kann.

Die Musterverschiebungen in der Immunfluoreszenz weisen auf eine Beteiligung von SP47 während des Kapazitations- bzw. Akrosomreaktionsprozesses hin.

6 Summary

The aim of this study was a further characterisation concerning the sperm membrane protein SP47 by immunofluorescent microscopy and biochemical methods. For producing the necessary antibody the homologous protein MGP 53/57 was used, which was isolated from bovine milk. The localisation and the topographical changes of the protein during sperm maturation and capacitation was studied. By establishing a sperm-zona pellucida-binding-assay a possible role of SP47 in sperm zona interaction was tested. The influence of the zona pellucida on sperm maturation concerning SP47 was also tested.

Bovine milk, the genital parts of three boars, ejaculates of different boars and several pig ovaries were used for the examination.

Following results were achieved:

The protein MGP 53/57 was isolated from bovine milk. After characterisation of the carbohydrate chains and partial deglycosylation of the chains a polyclonal antibody was made against the milk protein.

SP47 was determined in the testis and in all parts of the epididymis by immunohistochemical studies. The existence of SP47 was also proved by western blots of tissue extracts. This leads to the conclusion that SP47 is synthesized and secreted in the testis as well as in the epididymis.

By using indirect immunofluorescent microscopy the protein SP47 was determined in the acrosomal part of the sperm's head, in sperm from the testis, in all parts of the epididymis and in ejaculated sperm as well. Investigations were done concerning the localisation and topographical changes of the protein during maturation and capacitation. Different intensities of fluorescence were found in the apical part of the sperm. Furthermore a change of the localisation of SP47 was found by a shift of the signal onto the whole region of the acrosome. The shift of this signal was mainly found at the end of the capacitation progress and vice versa

during epididymal maturation. This fact might be caused by masking of the SP47 antigene during epididymal maturation. The shift of the SP47 signal during capacitation process might belong to the fact that the changing of the plasma membrane leads to a migration or unmasking of SP47 in this area.

The results of the vital staining with propidium jodid and Hoechst 33258 have shown that only sperm with an intact membrane have a specific SP47-flourescence. Acrosome reacted or dead sperm showed no flourescence so that one can conclude that SP47 does not play a role in gamete interaction.

By using the sperm-zona pellucida-binding assay SP47 could be determined on the sperm's surface at the time of sperm binding to the zona pellucida and could also be determined during capacitation. In this binding assay flourescence of SP47 was shown at the apical part of the acrosome and on the whole acrosome region, too. SP47 was not detectable on acrosome reacted sperm.

It was impossible to bind SP47 to the zona pellucida in the western blot, so there is no proof of SP47 taking part in the interaction of sperm with the zona pellucida.

Different patterns of flourescence indicate that SP47 plays a role in capacitation and acrosome reacting.