

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Familie von Säugetierproteinen, die zusammenfassend als Cystein-reiche sekretorische Proteine (CRISP) bezeichnet werden. Im männlichen Genitaltrakt des Pferdes konnten drei Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert und mittels eines polyklonalen aviären Antikörpers detektiert werden. Sie assoziieren im Verlauf der Spermienreifung in Hoden und Nebenhoden und während der Ejakulation an die Spermienoberfläche. Sie binden dort insbesondere im Bereich des Postakrosoms und des Mittelstück des Spermischwanzes sehr fest und werden weder bei der Uteruspassage im weiblichen Genitaltrakt noch bei in-vitro-Kapazitation und Akrosomreaktion oder bei Behandlung mit 0,5 M Natriumchlorid-haltigem Medium von der Spermienoberfläche entfernt.

Um die mutmaßliche Rolle der CRISP-Proteine auch im equinen Reproduktionsgeschehen zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein biochemischer Test zur quantitativen Bestimmung der CRISP-Proteinkonzentration in Hengtspermien etabliert.

Es konnte gezeigt werden, daß die Anzahl spermiengebundener CRISP-Proteinmoleküle, die mittels eines kompetitiven Inhibitionstests auf der Basis eines ELISA-Essays bestimmt wurden, mit der Fertilität von Hengsten korreliert. Eine Proteinkonzentration von mehr als 18900 CRISP-Molekülen pro Spermium korreliert mit einer überdurchschnittlichen Befruchtungsfähigkeit des Hengstes. Die Einbeziehung dieses neuen biochemischen Spermienparameters (CRISP-Moleküle/Spermium) zusätzlich zu den konventionellen Spermienparametern kann die Vorhersage des Fertilitätspotentials deutlich verbessern. Der ELISA stellt damit eine Alternative zu aufwendigen funktionellen Tests wie beispielsweise dem Hemizonabindungs-Assay (HZA) dar.

Darüberhinaus konnten Unterschiede im Proteilmuster sowohl auf Expressions- als auch auf Transkriptionsebene bei Hengsten unterschiedlicher Fertilität aufgezeigt werden.

Die deutlichste Abweichung war in den skrotalen Hoden- und Nebenhodengewebe eines unilateral-kryptorchiden Hengstes festzustellen. Hier konnte gezeigt werden, daß im gesamten Nebenhodentrakt die Transkription von CRISP-1 im Gegensatz zu skrotal gelegenen Geweben fertiler Hengste unterbleibt. Im abdominalen Hoden scheint zumindest eine Modifikation des exprimierten CRISP-2 zu unterbleiben.

Die genauere Klärung dieser Vorgänge bedarf noch weiterer zukünftiger Untersuchungen.

6 SUMMARY

Alexandra Reineke (2000): The meaning of CRISP-proteins in stallion fertility

This thesis is occupied with a family of mammalian proteins, the so called cysteine-rich secretory proteins (CRISP). In the horse male genital tract three members of this protein family have been identified and detected by using an monospecific avian antibody that recognizes all members of the equine CRISP family.

CRISP proteins associate to the sperm surface during sperm maturation while they pass the testis and epididymis and when they get ejaculated. They appear to be tightly bound to the sperm surface at the postacrosomal region of the sperm head and the tail midpiece, surviving the passage through the uterus in the female genital tract, in vitro capacitation and acrosome reaction and also extensive washing at high salt concentrations (0,5 M NaCl). To ensure if CRISP proteins play an important role in equine reproduction a competitive inhibition ELISA assay has been established to determine the number of tightly bound CRISP molecules on the sperm surface. It could have been shown that the concentration of CRISP proteins in equine sperms correlates with the fertility of stallions. Protein concentration of more than 18900 molecules per sperm cell correlates with good pregnancy rates. Together with conventional sperm parameters this new biochemical marker (CRISP molecules/sperm cell) allows a better prediction of the stallions fertility rate in vivo and seems to be an alternative to other expensive and time-consuming functional tests such as the hemizona assay (HZA) for example.

It also could have been shown that there are differences in the protein pattern on the level of expression and transcription in stallions with different fertility. The clearest deviation was shown in the testis and epididymis of an unilateral cryptorchide stallion. It could have been shown that in the whole epididymal tract the transcription of CRISP-1 does not take place in contrast to the scrotal tissues of fertile stallions. In the abdominal testis it seems to fail at least a modification of the expressed CRISP-2.

For a precise clarification of these processes further research needs to be done.