

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war, die Glycerolkinase im Hengstspermatozoon mit immunologischen, biochemischen Methoden zu charakterisieren und mit immunfluoreszenzmikroskopischen Methoden das Enzym zu lokalisieren. Es wurde der Versuch gemacht, das Enzym im kompetitiven Elisa zu quantifizieren. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt; bei zu starken Abweichungen Dreifachbestimmungen

Als Untersuchungsmaterial dienten die Ejakulate von 7 verschiedenen Hengsten des niedersächsischen Landgestüts, wobei die Gefriertauglichkeit der Hengstejakulate berücksichtigt wurde. Es wurden 4 Hengste mit gut gefriertauglichen Ejakulaten ausgewählt und 3 Hengste mit schlecht einfrierbarem Ejakulat.

Folgende Ergebnisse wurden in dieser Arbeit erzielt:

Für alle Versuche wurde ein polyklonaler, gegen GK gerichteter Anti-GK- Antikörper verwendet, der aus spezifisch pathogen freien Hühnern gewonnen wurde. Die Glycerolkinase im Hengstspermatozoon konnte immunologisch und biochemisch charakterisiert und topographisch mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden. Eine Messung der Enzymaktivität war nicht möglich, da das Protein aufgrund starker Bindungen an Strukturen, die noch nicht bestimmt worden sind, nicht zu extrahieren war. Es konnte lediglich die Menge des Proteins im kompetitiven ELISA bestimmt werden.

Im Westernblotting konnte die Glycerolkinase im Hengstspermium identifiziert werden mit einem Molekulargewicht von 100-120 kDa. Nach der Reduktion präsentierte sich die Bande im Bereich von 66 kDa. Dies macht deutlich, daß sich das Protein aus zwei Untereinheiten zusammensetzt.

In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die GK topographisch lokalisiert werden. Es war eine deutliche Fluoreszenz im postakrosomalen Bereich und im Mittelstück sichtbar, mit einer starken Abschwächung zum Hauptstück des ejakulierten Spermatozoons. Die Hemmung mit der käuflichen GK war positiv; ebenso die Kontrolle. Hierdurch konnten Kreuzreaktionen des Antikörpers ausgeschlossen werden.

Die Lokalisation stimmt mit den Ergebnissen überein, die von WESTHOFF u. KAMP (1997) bei der GAPDH gemacht wurden. Die GAPDH ist ein glycolytisches Enzym. Die Lokalisation des Proteins ist ähnlich wie bei der GK. Es befindet sich im Säugerspermatozoon in der fibrillären Hülle im Hauptstück und in der fibrillären Hülle in der mitochondrialen Scheide im Mittelstück.

Im kompetitiven ELISA konnte das Enzym im Hengstspermatozoon quantifiziert werden. Es erfolgten die Auswertungen der ELISA von 4 Hengsten, deren Ejakulat gut einfrierbar war und von 3 Hengsten deren Ejakulat nicht eingefroren werden konnte. Es wurde nach einer möglichen Korrelation mit der Kryokonservierung gesucht. Dieser Versuch ergab keinen Hinweis. Die Ergebnisse variierten sehr bei den Hengsten mit gut und bei den schlecht einfrierbaren Spermien. Es wurde nur die Menge der GK bestimmt, dies muß nicht unbedingt mit der enzymatischen Aktivität übereinstimmen. Hier sollten noch weitere Versuche zur Isolierung der Glycerolkinase folgen.

7 Summary

It was the intention of this paper to provide evidence of the glycerolkinase in the spermatozoae of the stallion to characterize the protein with biochemical and immunological methods and to localize the enzyme with immunoelectron microscopy. Furthermore it was made the attempt to quantify the enzyme in competitive elisa.

The samples used for this research were the ejaculates of seven stallions provided by the niedersächsisches Landesgestüt under special regard of its deep freezing capacities.

The ejaculates of four of the stallions had excellent capacity for deep freezing and the ejaculates of the remaining three stallions had a poor capacity for deep freezing.

The following results were achieved:

For every experiment that was performed a polyclonal, anti-GK-antibody directed against Glycerolkinase, extracted from chicken, was used. The glycerolkinase in spermatozoae of the stallion could be characterized immunologically and biochemically and topographically localized with the help of immunofluorescencemicroscopy. A reading of enzyme activities was not possible, since the protein could not be extracted, due to the strong bond to structures that has not been determined yet. Only the quantity of competitive elisa could be determined.

By westernblotting the glycerokinase has been identified in equine sperm exhibiting an apparent molecularmass of 100-120 kDa. After reduction an 66 kDa band appears indicating that the protein is build up two subunits.

With the method of the indirect immunofluorescence microscopy the GK could be topographically localized. There was a clearly visible fluorescence in the postacrosomal area and in the midpiece. The inhibition with commercially available GK was positive as well as the controls. By this method crossreaction of the antibody could be ruled out. The localisation corresponds with the results of WESTHOFF u. KEMP (1997) concerning GAPDH. The GAPDH is also a glycolytic enzyme. The localization of the enzyme is similar to the GK. It is found in the fibrous sheath in the principal piece and in the fibrous sheath in the mitochondrial sheath in the middle piece of the mammal spermatozoa.

In the competitive ELISA the enzyme could be quantified in the spermatozoa of the stallion. The elisa of four stallions with ejaculates with good deep freezing capacities and three stallions with ejaculates with poor deep freezing capacities could be evaluated. It was tried to find the correlation concerning cryoconserving. The experiment gave no indication for a correlation. There were considerable variations in the results of the stallions with excellent deep freezing capacities and the stallions with poor deep freezing capacities. Merely the quantity of GK could be determined, so that this has not necessarily to correspond with the enzymatic activity. Here certainly should follow further isolation experiments.