Aus dem Institut für Reproduktionsbiologie und der Klinik für Rinder
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Struktur-Funktionsbeziehungen spermienbindender Proteine des männlichen Reproduktionstrakts beim Säuger

Habilitationsschrift zur Erlangung der
VENIA LEGENDI
an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Mahnaz Ekhlasi-Hundrieser

Hannover 2010

Tag der nichtöffentlichen
wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juni 2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Vorwort

Liste der Publikationen

Verzeichnis der Abkürzungen

Einbuchstaben- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

1. Einleitung 1

1.1 Evolutionäre Aspekte der Befruchtung 1
1.2 Erwerb der Befruchtungskompetenz von Spermien 2
1.3 Das weibliche Spermienreservoir 7
1.4 Fertilisationsrelevante Proteine 10
1.4.1 Spermadhäsine – eine neue Klasse von sekretorischen Proteinen 10
1.4.1.1 Molekulare Charakterisierung und Expression von Spermadhäsinen 10
1.4.1.2 Spermadhäsine als multifunktionelle Proteine 13
1.4.2 Fibronektin Typ II-Modul Proteine 15
1.4.2.1 Fibronektin Typ II (Fn2)-Proteine des männlichen Genitaltrakts 16
1.4.2.2 Biologische Bedeutung der Fn2-Proteine 19
1.5 Ziele und Fragestellungen 20

2. Ergebnisse 21

2.1 Funktionelle Analysen zur Etablierung des weiblichen Spermienreservoirs beim Schwein 21
2.1.1 Charakterisierung kohlenhydratvermittelter Vorgänge des funktionellen Spermienreservoirs beim Schwein 22
2.1.2 Spermadhäsin AQN-1 als putatives Rezeptorprotein für die Etablierung des Spermienreservoirs im porzinen Eileiter 25
2.1.3 Punktmutationen im porzinen AQN-1 führen zu einem Verlust der Mannosebindungsfähigkeit 28
2.1.4 Schlussfolgerungen aus den Publikationen 1 bis 3 31
2.2 Struktur, molekulare Charakterisierung und Evolution von Fibronektin Typ II-Modul Proteinen 33
2.2.1 Strukturelle und molekulare Charakterisierung von equinen spermienbindenden Fibronektin Typ II-Modul Proteinen 33

2.2.2 Speziesübergreifende Untersuchungen zur Genomorganisation, Expression und Funktion spermienbindender Fibronektin Typ II-Modul Proteine 39
2.2.3 Schlussfolgerungen aus den Publikationen 4 und 5 44

3. Diskussion 48

3.1 Evolution von Reproduktionsgenen 49
3.2 Evolution von Reproduktionsgenen durch positiven Selektionsdruck 51
3.3 Struktur-Funktionsbeziehung sekretorischer Proteine des männlichen Genitaltrakts 56
3.3.1 Spermadhäsine 56
3.3.2 Fn2-Proteine 61
3.4 Biologische Funktionen der Spermadhäsine und Fibronektin TypII-Modul Proteine 66
3.5 Bindung von Spermien an Oligosaccharidstrukturen des Ovidukts: eine speziesspezifische Interaktion? 70

4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen 74

5. Literaturverzeichnis 78

6. Darstellungen der eigenen Anteile an den wissenschaftlichen Arbeiten 93

Anhang 95

Danksagungen

Vorwort

Die vorliegende Habilitationsschrift beinhaltet eine zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen über Struktur und Funktion sekretorischer Proteine des männlichen Genitaltrakts ausgewählter Säuger. Der Schrift liegen fünf wissenschaftliche Originalpublikationen zugrunde. Im Anhang befinden sich die Abstrakts der Publikationen und ihre entsprechenden Links.

Die zusammenfassende Besprechung der erzielten Resultate beginnt mit einer in die Thematik einführenden Einleitung. Die speziellen Fragestellungen, wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen der einzelnen Arbeiten werden im Abschnitt „Ergebnisse“ erläutert. Auf die Darstellung methodischer Details, die in den einzelnen Publikationen ausführlich beschrieben sind, wird dabei weitgehend verzichtet.

Im Abschnitt „Diskussion“ werden die eigenen Ergebnisse mit publizierten Daten verknüpfend betrachtet und diskutiert.

Eine zusammenfassende Betrachtung mit Schlussfolgerungen schließt sich an.

Im Literaturverzeichnis wurden die in den Abschnitten Einleitung, Ergebnisse und Diskussion aufgeführten Zitierungen aufgelistet.

Liste der Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind

Auf folgende Veröffentlichungen wird im Text Bezug genommen.

Publikation 1:

Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Töpfer-Petersen E. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation - studies in the pig.
Molecular Reproduction and Development 2002; 61:249-57.

Publikation 2:

Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsolova M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig.
Biology of Reproduction 2005; 73:536-45.

Publikation 3:

Ekhlasi-Hundrieser M, Calvete JJ, von Rad B, Hettel C, Nimtz M, Töpfer-Petersen E. Point Mutations abolishing the Carbohydrate-Binding Capability of Porcine Spermadhesin AQN-1.
Biochimica et Biophysica Acta 2008; 1784:856-62.

Publikation 4:

Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins.
Molecular Reproduction and Development 2005; 70:45-57.

Publikation 5:

Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Philipp U, Kuiper H, Leeb T, Mehta M, Kirchhoff C, Töpfer-Petersen E. Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related.
Gene 2007; 392:253-65.

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb	Abbildung
AQN	Spermadhäsin mit N-Terminus AQN
AWN	Spermadhäsin mit N-Terminus AWN
aSFP	acidic Seminal Fluid Protein
bp	Basenpaare
BSP	Bovine Seminal Plasma
bzw.	beziehungsweise
℃	Grad Celsius
ca	circa
cDNA	komplementäre DNA
CE	Canine Epididymis Protein
CRD	Carbohydrate Recognition Domain (Kohlenhydraterkennungsdomäne)
CRISP	Cysteine-Rich Secretory Protein
CUB	Complement Komponente [Clr/Cls], Embryonic Sea Urchin Protein, [Uegf]; und Bone Morphogenetic Protein, [Bmpf]
Da	Dalton
E. coli	Escherichia coli
ELSPBP1	Epididymal Sperm Binding Protein 1
eq	equine
Fuc	Fucose
Fn2	Fibronektin Typ II
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GNA	Galantus Nivalis Agglutinin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Human Epididymis Protein
Hex	Hexose
HSA	Homo sapiens
HSP	Horse Seminal Plasma Protein

IC50	50% inhibitorische Konzentration
IHGSC	International Human Genome Sequencing Consortium
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
M	Molar
Man	Mannose
Maldi-Tof-MS	Matrix-assisted Laser-Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry
m/z	mass/charge
mRNA	Messenger-RNA
ng	Nanogramm
N-Glykane	Asparagin gebundene Kohlenhydratstrukturen
OEA	Oviduct-Explant-Assay
O-Glykane	Serin oder Threonin gebundene Kohlenhydratstrukturen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pB1	Boar protein 1
PC	Phosphorylcholin
PDC-109	Ein 109 Aminosäuren umfassendes Protein mit N-Terminus Asparaginsäure (D) und C-Terminus Cystein (C)
pI	Isoelektrischer Punkt
PSP-I	Porzines Seminalplasmaprotein I
PSP-II	Porzines Seminalplasmaprotein II
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SBG	Sperm Binding Glycoprotein
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SP-1/2	Seminalplasma Protein 1 und 2
SPnew	Seminalplasma Protein (neu)
SSC	Sus scrofa
TBS	Tris Buffered Saline
UTV	Uterotubale Verbindung
ZAN	Zonadhäsin
ZP	Zona pellucida

Die englischen Begriffe sind im Text *kursiv* gedruckt.

Einbuchstaben- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

1. Einleitung

1.1 Evolutionäre Aspekte der Befruchtung

Im Laufe der Evolution wurden unterschiedliche Strategien und Mechanismen zur Erhaltung einer Spezies entwickelt. Beim Säugetier ist das Aufeinandertreffen der beiden haploiden Gameten der Beginn einer hochspezifischen Sequenz von zellulären Interaktionen, die mit der Bildung der diploiden Zygote und der Aktivierung des embryonalen Entwicklungssystems endet. Mit diesem natürlichen Ereignis werden zwei Ziele verfolgt. So wird neben der Erhaltung der Art auch das genetische Material neu kombiniert. Um dies zu gewährleisten, sind umfassende Zell-Zell-Interaktionen erforderlich. Darüber hinaus ist eine Vielzahl verschiedener molekularer Komponenten notwendig, um die Vereinigung haploider Gameten zu einer diploiden Zygote zu erzielen. Während bei niederen Vertebraten die Befruchtung von Eizellen z. T. außerhalb des Organismus erfolgt, nutzen die plazentaren Säuger das Prinzip der inneren Befruchtung, um die Entstehung und Entwicklung von Nachkommen zu garantieren. Ein befruchtungskompetentes Spermatozoon muss am richtigen Ort und zur richtigen Zeit auf eine ovulierte fertile Eizelle treffen. Für das Spermatozoon bedeutet dies einen langen Entwicklungs- und Reifungsprozess, der im männlichen und weiblichen Genitaltrakt ablaufen muss. Voraussetzungen für die Umsetzung dieses evolutionären Konzepts sind (komplizierte) anatomische und physiologische Anpassungen derjenigen Organe, in denen sich die Eizellen bzw. Spermien aus Vorläuferzellen bis zum Erlangen der Befruchtungsfähigkeit entwickeln, sowie der Begattungsorgane. So hat sich insbesondere die Funktion des männlichen Genitaltrakts im Verlauf der Evolution zum Säuger entscheidend verändert. Die Komplexität der Mechanismen und deren Regulation auf den verschiedenen Ebenen der Reifung von weiblichen und männlichen Gameten sind bisher nur teilweise verstanden. Trotzdem ist der Schluss berechtigt, dass die verschiedenen Mechanismen effektiv sind und somit der evolutionären Aufgabe, der Arterhaltung, gerecht werden.

1.2 Erwerb der Befruchtungskompetenz von Spermien

Im Unterschied zur Oogenese, die bereits während der Embryonalentwicklung initiiert wird, beginnt die Spermatogenese erst nach dem Erlangen der Geschlechtsreife im Hoden. Die Transformation der runden Spermatide zur hochpolarisierten, motilen Samenenzelle umfasst komplexe physiologische, biochemische und morphologische Differenzierungsschritte, die zu einem erheblichen Teil im Hoden verlaufen und durch das Genom des Spermatozoons reguliert werden. Bei den meisten Spezies mit interner Befruchtung besitzen die morphologisch ausdifferenzierten Spermien aus dem Hoden zunächst noch nicht die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung. Auch haben sie die Kompetenz zur Befruchtung der Eizelle noch nicht erworben. Die Spermien erlangen diese Fähigkeiten erst post-testikulär während eines physiologischen Reifungsprozesses. Dieser wird mit dem Beginn der Passage der Spermien durch den Nebenhoden initiiert. In Abhängigkeit von der Säuger-Spezies dauert die Passage ein bis zwei Wochen, wobei der Transport der Spermatozoen passiver Natur ist. In einer komplexen Sequenz räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmter Prozesse erwerben die Gameten wesentliche Elemente der Befruchtungsfähigkeit (Abb. 1). Während der epididymalen Reifung erreichen die Spermatozoen das Stadium der sog. “Befruchtungskompetenz in Ruhe“ (*silent fertilization competence*). Auch nach der Ejakulation und Deponierung im weiblichen Genitaltrakt befinden sich die Spermien in diesem Zustand. Während des Ejakulationsprozesses kommen die Spermien mit verschiedenen Proteinen des Seminalplasmas in Kontakt. Der Kontakt mit diesen in hohen Konzentrationen vorliegenden Proteinen ist für die Spermien im Ruhestadium essentiell. Diese Proteine können als Dekapazitationsfaktoren fungieren, die über Protein-Protein- oder Lipid-Protein-Interaktionen an die Spermienmembran binden. Sie tragen entscheidend zum Schutz und zur Stabilisierung der empfindlichen Spermatozoenmembran bei und verhindern die vorzeitige Akrosomreaktion in den unteren Regionen des weiblichen Genitaltrakts. Die resultierenden Proteinschichten blockieren zudem Membranrezeptoren für die Zona pellucida der Eizelle, an der der initiale Kontakt zwischen beiden Gameten abläuft.

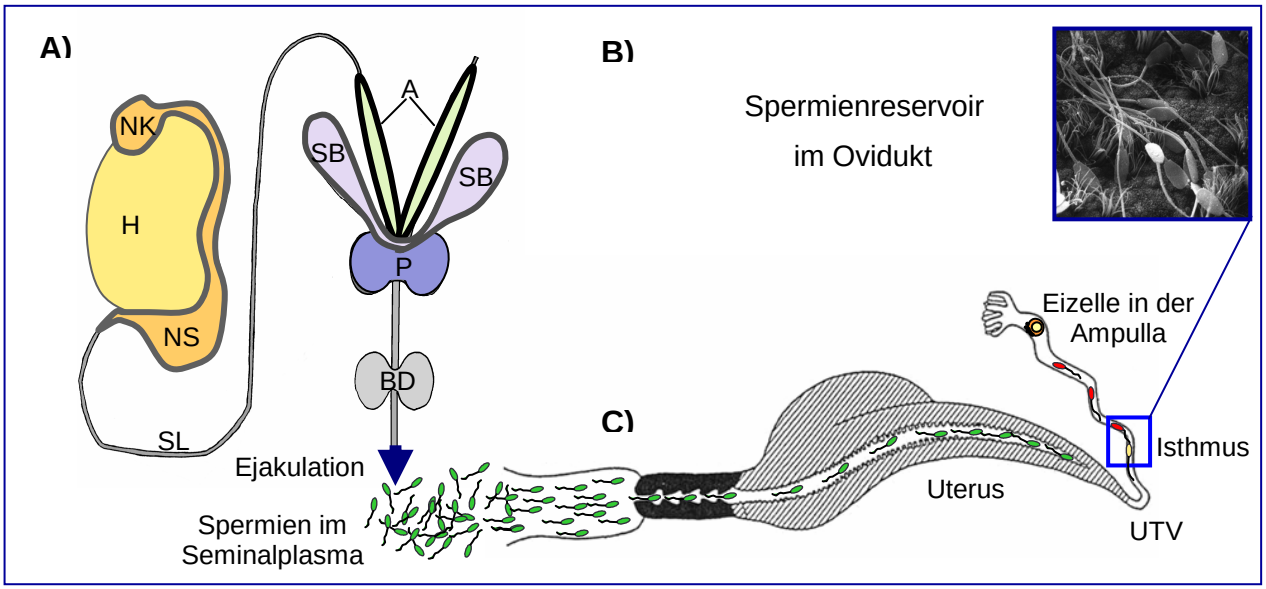


Abb. 1: Modell zum Erwerb der Befruchtungsfähigkeit von Säugerspermien.

(A) Während der post-testikulären Reifung erlangen die Spermien im männlichen Genitaltrakt das Stadium der „Befruchtungskompetenz in Ruhe“. Bei der Ejakulation kommen sie mit sekretorischen Proteinen des männlichen Genitaltrakts in Kontakt (B und C). Nach der Deponierung im weiblichen Genitaltrakt und Migration zum Ovidukt bindet die potentiell befruchtungsfähige Spermienpopulation an das Epithel des kaudalen Isthmus des Ovidukts und etabliert dort das funktionelle Spermienreservoir [Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der porzinen Spermien im kaudalen Isthmus des Ovidukts (TÖPFER-PETERSEN 1999)]. Kurz vor der Ovulation wird der Kapazitationsvorgang bei den Spermien induziert. In der Folge werden sie hyperaktiv, lösen sich vom Oviduktepithel und wandern zur Ampulle, dem Ort der Befruchtung. Im Verlauf der Migration vollenden die Spermien schrittweise die Kapazitation, und erreichen das „aktive Stadium der Befruchtungskompetenz“, das sie zur Befruchtung der Eizelle befähigt. Ejakulierte (grün) und kapazitierte (rot) Spermien sind markiert. H: Hoden, NK: Nebenhodenkopf, NS: Nebenhodenschwanz, SL: Samenleiter, A: Ampulle, SB: Samenblase, P: Prostata, BD: Bulbourethraldrüse, UTV: Uterotubale Verbindung.

Für den Erwerb der Befruchtungsfähigkeit müssen die ejakulierten Spermien im Eileiter des weiblichen Genitaltrakts vom stabilisierten Ruhezustand in das aktivierte (oder kapazitierte) Stadium der sog. “aktiven Befruchtungskompetenz“ (*active fertilization competence*) überführt werden (PETRUNKINA et al. 2007; EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2008b). Im Verlauf dieses Prozesses erfolgen physiologische und biochemische Modifikationen der Spermienmembran, die man in der Gesamtheit als Kapazitation bezeichnet. Während sich die Spermien im weiblichen Genitaltrakt bis sie den Ort der Befruchtung (Eileiter) erreichen in einem stabilisierten Ruhestadium befinden, kann der anschließende Kapazitationsvorgang als vollständige Umkehr dieses Mechanismus angesehen werden. Die Kapazitation

im weiblichen Genitaltrakt ist eine Besonderheit der Säugetiere und hängt höchstwahrscheinlich mit der Entwicklung zur inneren Befruchtung zusammen. Erst in diesem besonderen physiologischen Zustand sind die Voraussetzungen für die Bindung der Spermien an eine ovulierte Eizelle und für die sich anschließende Akrosomreaktion geschaffen.

Abhängig von der Spezies werden die Spermien bei der Kopulation in die Vagina (Scheidenbesamer: Rind, Schaf, Ziege und Primaten) oder durch das Zervixlumen in den Uterus (Uterusbesamer: Pferd, Schwein und Kameliden) deponiert. Die erste anatomische Barriere für diese Spermatozoen ist die uterotubale Verbindung (UTV). Nur ein geringer Anteil der Spermatozoen passiert die UTV und gelangt in den kaudalen Isthmus des Eileiters. Die wesentlichen Vorgänge der Kapazitation erfolgen offensichtlich in diesem Segment des Isthmus. Dieses Phänomen gilt unabhängig von der Deponierung des Samens höchstwahrscheinlich für alle Säuger (TÖPFER-PETERSEN et al. 1996).

Die Reifungsprozesse gehen mit umfassenden Remodellierungen der Plasmamembran der Spermien einher und führen zu Umstrukturierungen der Membran. Neben dem Verlust membrangebundener Glykoproteine bzw. Proteine erfolgt die Integration “neuer“ Proteine, deren Synthese außerhalb der Spermien stattfindet. Diese zeitlich und räumlich gut regulierten Modifikationen scheinen die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen ganz wesentlich zu beeinflussen. Daher wird die Aufnahme “exogener“ Proteine, die vom Nebenhoden und von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen synthetisiert und während der post-testikulären Reifung und Ejakulation in die Membran der Spermien integriert werden, als bedeutender Teilschritt der komplexen Reifungsprozesse angesehen. Für die spätere Interaktion der Spermien im weiblichen Genitaltrakt mit der ovulierten Eizelle scheint dieses Ereignis von fundamentaler biologischer Bedeutung zu sein.

Die molekularen Bindungsmechanismen exogener Proteine und deren Interaktion bzw. Integration mit der Spermienmembran unterscheiden sich und stehen in engem Zusammenhang mit ihrer Funktion. Bemerkenswert ist, dass Glykosylierungsmuster und die Ausbildung größerer Aggregate die Eigenschaften dieser Proteine modulieren, so dass sie in Abhängigkeit von ihrem Interaktionsmodus sehr unterschiedliche Funktionen ausüben können; sie können beispielsweise sowohl als Dekapazitationsfaktoren als auch als Rezeptoren für die Bindung an die Zona pellucida fungieren. So existieren Proteine, die über Lipid-Protein- oder spezifische Protein-Protein-Interaktion bzw. Ankerstrukturen (*positively regulating proteins*) selektiv an die Spermienmembran gebunden werden. Andere Proteine, die sich durch eher schwache Bindungseigenschaften auszeichnen, dienen zum Schutz der Spermienoberfläche und maskieren die befruchtungsrelevanten Bereiche (*negatively regulating proteins*). Sie werden in großen Mengen in verschiedenen Bereichen des männlichen Genitaltrakts produziert und tendieren zu hochmolekularer Aggregatbildung, die bei der Ejakulation eine dicke Proteinschicht um die akrosomale Region des Spermienkopfes bilden. Dadurch wird der Spermienkopf vor der vorzeitigen Akrosomreaktion und vor proteolytischen Attacken geschützt. Da die biologische Aufgabe darin besteht, diese funktionellen Bereiche zu einem späteren Zeitpunkt wieder “zugänglich“ zu machen, dürfen nur Proteine mit geeigneten Dissoziationseigenschaften gebunden werden.

Hinsichtlich der beteiligten Mechanismen für den Transfer bzw. Transport der Proteine von den Syntheseorten zu den Spermien ist die Aufnahme GPI-verankerter Proteine eingehend untersucht. Vom Epithel abgeschnürte Membranvesikel, sog. Epididysomen und Prostasomen, enthalten die entsprechenden zu interagierenden Proteine und fusionieren mit der Spermienmembran. Dies ist u. a. für die GPI-verankerten Proteine HE5 (CD52) des Menschen und für murine SPAM1 und Hyaluronidase gezeigt (KIRCHHOFF 1998, 1999; SULLIVAN et al. 2007; SOSTARIC et al. 2008). Weitere Mechanismen sind denkbar, jedoch noch nicht detailliert untersucht. In wieweit die Etablierung einer hohen Konzentration löslicher Proteine zu einer Bindung führt, ist im Einzelfall unklar. Auch könnten in diesem komplexen Geschehen Lipid-Trägerproteine eine wichtige Rolle spielen. Bindungen über

Protein-Proteinwechselwirkungen werden diskutiert und konnten nur in einigen Fällen gezeigt werden (DOSTALOVA et al. 1994b). Sehr gut untersucht ist der Bindungsmechanismus des bovinen lipidbindenden Seminalplasmaproteins BSP-A1/2 (PDC-109) an artifizielle Phospholipidvesikel und an die Spermienmembran (MÜLLER et al. 1998; EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2008b). Das initial an die Membran gebundene BSP-A1/2 erfährt eine Konformationsänderung und ist dadurch in der Lage, in die apolare Region der Lipiddoppelmembran zu interkalieren. In der Folge kommt es zunächst zu einer BSP-A1/2 vermittelten Immobilisierung der Membranen. Die Kenntnis der Interaktionsmechanismen der verschiedenen exogenen Proteine mit Spermatozoen und deren Nutzung könnten von Bedeutung für die Behandlung bestimmter Formen männlicher Infertilität sein (KIRCHHOFF 1998, 1999).

In den letzten Jahren wurde das epididymale Transkriptom/Proteom verschiedener Spezies untersucht. Dies führte zur Charakterisierung einer Vielzahl von Proteinen. Der größte Teil dieser Moleküle scheint für die Homöostase, die Aufrechterhaltung epididymaler Funktionen sowie für den Erhalt des für die Spermien notwendigen Mikromilieus von Bedeutung zu sein. Eine andere Gruppe von Proteinen hat maßgeblichen Anteil an der Degradation von Spermienproteinen. Eine vergleichsweise kleine Gruppe von Proteinen assoziiert zunächst mit der Spermienoberfläche und wird nachfolgend in die Membran integriert und spielt offensichtlich für die Spermatozoenfunktionen wie Kapazitation und Gameteninteraktion eine Rolle. Einige der spermienbindenden Proteine wie Gluthathion-Peroxidase und Gluthathion-S-Transferase beschützen die Spermatozoen vor oxidativem Stress bzw. vor einer Lipidperoxidation oder sind an der Eliminierung von defekten Spermatozoen (Ubiquitin) beteiligt (KIRCHHOFF 1999; DACHEUX et al. 2005; SULLIVAN et al. 2007).

1.3 Das weibliche Spermienreservoir

Bei einer Reihe von Tierarten wird eine Spermatozoenpopulation nach der Insemination im weiblichen Genitale in besonderen Organen oder Reservoiren gespeichert. Die Fähigkeit des weiblichen Tieres zur Spermienspeicherung gehört zur Fortpflanzungsstrategie einer Tierart und steht unter evolutionärem Selektionsdruck (BEDFORD et al. 1997, 1999; SUAREZ 1998; NEUBAUM u. WOLFNER 1999). Die Mechanismen der Spermienspeicherung bei Vertebraten können sehr unterschiedlich sein. Das konzeptionelle Verständnis basiert auf Modellen, die aus morphologischen und anatomischen Daten entwickelt wurden. Die Dauer der Spermienspeicherung bis zur Befruchtung einer Eizelle kann sehr kurz -Stunden und Tage- sein (z. B. Säuger), aber auch Monate oder gar Jahre (einige Schildkröten und Schlangen) betragen.

Beim plazentaren Säuger sind keine anatomischen Strukturen zur Spermienlagerung vorhanden. Stattdessen wird die Speicherfunktion über Adhäsionsmechanismen zwischen Spermium und Epithel in den Mucosafalten des Ovidukts gewährleistet (SUAREZ 1998; HUNTER 2002). Beim Säuger ist der kaudale Isthmus des Eileiters auf die Speicherfunktion spezialisiert und stellt das funktionelle Spermienreservoir sowohl bei Scheidenbesamern als auch bei Uterusbesamern dar (HUNTER et al. 1987). Hier werden die intakten befruchtungsfähigen Spermien unter Aufrechterhaltung ihrer Vitalität und Schonung der Energiereserven gelagert und ihr physiologischer Zustand (Kapazitation und Hyperaktivierung) zeitlich mit der Ovulation der Eizelle abgestimmt. Neben diesem zentralen Mechanismus tragen auch physikalische Vorgänge zur Fixierung der Spermien zwischen ödematisierten Isthmusfalten und viskösem Sekret bei und verhindern den Aufstieg der Spermien in der präovulatorischen Phase (SUAREZ 1999, 2002; HUNTER 2002). In der östrischen Phase schwellen die Falten des Oviduktepithels stark an, so dass nur ein enges mit Mucus gefülltes Lumen für die ankommenden Spermien vorhanden ist. Dadurch wird ein enger Kontakt von Spermien zu den Oviduktepithelzellen gewährleistet. Die im Lumen befindlichen Spermien unterliegen morphologischen Veränderungen vergleichbar eines Alterungsprozesses, während die an die Epithelzellen der Schleimhaut gebundenen Spermien vor einem Transport durch die

Zilien geschützt sind (BLANDAU u. GADDUM-ROSSE 1974; TÖPFER-PETERSEN et al. 2002, 2003).

Der Kapazitationsprozess mit seinen verschiedenen subzellulären Vorgängen ist Voraussetzung für die durch die Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion. Erst hiernach kann es zur Penetration und Fusion kommen. Anders als die morphologisch leicht differenzierbare Akrosomreaktion ist dieser Prozess von einer Reihe endogener Veränderungen begleitet. Wesentliche Ereignisse der Kapazitation sind (destabilisierende) Umstrukturierungen der Plasmamembran, die mit dem Verlust von Cholesterin einhergehen, der Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels, Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen und die Reorganisation der Spermienoberfläche. Die kapazitationsbedingten Veränderungen der Spermatozoen sind zwar essentiell für den Erwerb der Befruchtungsfähigkeit, wirken gleichzeitig aber destabilisierend auf die Zellen und führen zur Reduktion der Lebensdauer der Spermatozoen. Durchlaufen sie dieses bestimmte Zeitfenster, ohne auf eine Eizelle zu treffen, erleiden sie (auf jeden Fall) zwangsweise den Zelltod (HARRISON 1996; TÖPFER-PETERSEN et al. 2003). Durch die Interaktion zwischen Spermatozoen und Oviduktepithel (im Isthmus) werden die Lebensspanne der Spermatozoen verlängert und kapazitationsbedingte Veränderungen bis zum Zeitpunkt der Ovulation unterdrückt. So wird der intrazelluläre Kalziumgehalt auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten und die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen verhindert, um das Treffen der beiden Gameten zum richtigen Zeitpunkt zu garantieren (PETRUNKINA et al. 2001; TÖPFER-PETERSEN et al. 2002, 2003). Welche Signale zur Loslösung des Kontaktes mit dem Eileiterepithel und der Bewegung der kapazitierenden Spermatozoen in Richtung Eizelle führen, sind noch weitestgehend unbekannt. Zum Zeitpunkt der Ovulation beginnen die Spermatozoen zum Ort der Befruchtung, in die Eileiterampulle, zu migrieren. Flüssigkeitsstrom und Bewegung der Zilien der Epithelzellen unterstützen die Wanderung. Mit der Vollendung des Kapazitationsvorganges wird die Erkennung der weiblichen Gamete und die Bindung an die Zona pellucida der Eizelle ermöglicht und damit der eigentliche Befruchtungsvorgang eingeleitet.

Für das Überleben und die kontrollierte Initiierung der Kapazitation der Spermatozoen ist die direkte Kontaktaufnahme zwischen dem apikalen Teil des Spermatozoenkopfes und dem Epithel des Eileiteristhmus erforderlich. Studien an verschiedenen Säugetierspezies ergaben, dass der Kontakt zwischen den männlichen Gameten und den somatischen Zellen des Ovidukts durch Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen vermittelt wird. Erstmals wurde die Beteiligung von Kohlenhydratstrukturen an der Spermatozoen-Ovidukt-Bindung beim Hamster beobachtet. Die Bindung der Hamsterspermatozoen an das Oviduktepithel wird spezifisch durch Glykokonjugate mit terminaler Sialsäure wie Fetuin gehemmt. Gleichzeitig wurden auch Bindungsstellen für Sialsäure an ejakulierten Spermatozoen detektiert, während bei hyperaktivierten und sich ablösenden Spermatozoen eine Abnahme der Bindungsstellen beobachtet wurde (DEMOTT et al. 1995). Das weist darauf hin, dass exponierte Kohlenhydratseitenketten der apikalen Membran der Epithelzellen an oberflächenassoziierte Lektine der Spermatozoen binden. Die Beteiligung von Sialsäureresten an der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion wurde auch bei der Ratte nachgewiesen (CORTES et al. 2004). Beim Pferd hemmt Asialofetuin über seine terminalen Galaktosereste die Bindung von Spermatozoen an den Ovidukt (DOBRINSKI et al. 1996). Dieses Rezeptor-Ligand-Modell wird auch durch Untersuchungen beim Rind gestützt. Inhibitionsversuche im bovinen System haben gezeigt, dass Fucα1,4Galβ1,3GlcNAc (Lewis$_a$-Trisaccharid) den wirkungsvollsten Hemmstoff der Spermatozoen-Ovidukt-Bindung darstellt (LEFEBVRE et al. 1997; SUAREZ et al. 1998). IGNOTZ et al. (2001) haben Fucose als Zielstruktur auf der Epitheloberfläche des Eileiters für die Spermatozoen-Oviduktepithel-Interaktion nachgewiesen. Als Rezeptor für die fucosylierten Glykanstrukturen des Oviduktes wurde das Seminalplasmaprotein BSP-A1/2 (PDC-109) auf bovinen nicht kapazitierten Spermatozoen identifiziert. Kapazitation führt zum Verlust dieses Proteins und damit zur Loslösung vom Epithel (IGNOTZ et al. 2001; GWATHMEY et al. 2003). Daten über das homologe porzine Rezeptorsystem fehlten zu Beginn der Untersuchungen.

1.4 Fertilisationsrelevante Proteine

Aus der Gruppe der Moleküle, die an der Regulation von Spermienfunktionen beteiligt sind, wurden u.a. zwei Proteinfamilien, Spermadhäsine und Fibronektin-Typ II (Fn2)-Proteine als wesentliche molekulare Zielstrukturen bzw. Interaktionspartner identifiziert. Hierbei handelt es sich um niedermolekulare Sekretproteine, die post-testikulär in unterschiedlichen Regionen des männlichen Genitaltraktes produziert werden und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Spermienoberfläche in Kontakt treten. Sie können auf der Spermienoberfläche nachgewiesen werden und kommen in verschiedenen Konzentrationen im Seminalplasma vor. Letzteres ermöglicht die Isolierung dieser Proteine und deren strukturelle und funktionelle Charakterisierung.

1.4.1 Spermadhäsine – eine neue Klasse von sekretorischen Proteinen

Spermadhäsine repräsentieren eine neue Klasse von sekretorischen Proteinen, die ursprünglich aus dem porzinen Seminalplasma als Zona pellucida-bindende Proteine isoliert und bisher nur bei Huftieren nachgewiesen wurden. Die Proteinfamilie wurde nach der Spermienadhäsionsfähigkeit (Spermadhäsin) der porzinen Vertreter der Familie benannt. Ihre Primärstrukturen umfassen 111-133 Aminosäuren, wobei die Sequenzübereinstimmungen ca. 40-60% betragen. Ein wichtiges strukturelles Merkmal ist das Vorliegen von Cysteinen an homologen Positionen, die zwei konservierte intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Diese Proteine rückten aufgrund ihrer Kohlenhydratbindungseigenschaften und anderer Funktionen innerhalb eines Moleküls in den Mittelpunkt des Interesses der Reproduktionsforschung. Aufgrund ihrer biologischen Aktivität und Struktur wird den Spermadhäsinen eine bedeutende Rolle in mindestens drei verschiedenen Aspekten der Fertilisation zugedacht: Spermien-Ovidukt-Interaktion, Spermien-Kapazitation und Spermien-Eizell-Interaktion.

1.4.1.1 Molekulare Charakterisierung und Expression von Spermadhäsinen

Die Spermadhäsinfamilie hat mit fünf Vertretern beim Schwein ihre größte Vielfalt. Die Spermadhäsine AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I und PSP-II sowie ihre post-translational glykosylierten Isoformen machen etwa 90% des Gesamtproteinanteils

des porzinen Seminalplasmas aus. Die Bezeichnungen AQN-1, AQN-3 und AWN ergeben sich aus den ersten drei N-terminalen Aminosäuren des reifen Proteins. Bei den Proteinen PSP-I und PSP-II stehen die Abkürzungen für „*Porcine Seminal Plasma Protein*“.

Spermadhäsine werden strukturell einer Superfamilie bestehend aus 16 funktionell unterschiedlichen Proteingruppen zugeordnet, die alle gemeinsam die sog. CUB-Domäne besitzen (Abb. 2A). Ursprünglich wurde die CUB-Domäne durch den Vergleich von Proteinsequenzen der Komplementfaktoren *C1r/C1s*, des embryonalen Seeigel-Proteins *Uegf* und des Knochen-morphogenetischen-Proteins *bmpf* identifiziert (BORK u. BECKMANN 1993). Die CUB-Domäne umfasst in charakteristischer Weise 110 Aminosäuren mit einem konservierten hydrophoben Motiv, das ähnlich wie Immunglobuline antiparallele β-Faltblattstrukturen besitzt (BORK u. BECKMANN 1993). Anhand der Kristallstrukturen des PSP-I/PSP-II-Heterodimers und des bovinen Vertreters der Familie, des aSFP-Homodimers, wurde erstmalig der molekulare Aufbau der CUB-Domäne aufgeklärt (Abb. 2B) (ROMAO et al. 1997; ROMERO et al. 1997). Diese Erkenntnisse trugen wesentlich zur Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung dieser Proteine während der verschiedenen Phasen der Befruchtung bei.

Die Hauptsyntheseorte der porzinen Spermadhäsine sind die akzessorischen Drüsen des männlichen Genitaltrakts. Als einziges Spermadhäsin konnte AWN im Nebenhodenschwanz (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2002) und auf kaudalen Nebenhodenspermatozoen (DOSTALOVA et al. 1994b; SINOWATZ et al. 1995) nachgewiesen werden. Mittels Immunfluoreszenzverfahren wurde das Spermadhäsin AWN im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes lokalisiert. Insbesondere dieser Befund unterstützt die Annahme, dass Spermadhäsine eine wichtige Funktion bei der initialen Bindung zwischen den Gameten einnehmen bzw. vermitteln. Interessanterweise wird AWN als einziges Spermadhäsin auch im weiblichen Genitaltrakt des Schweins exprimiert (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2002).

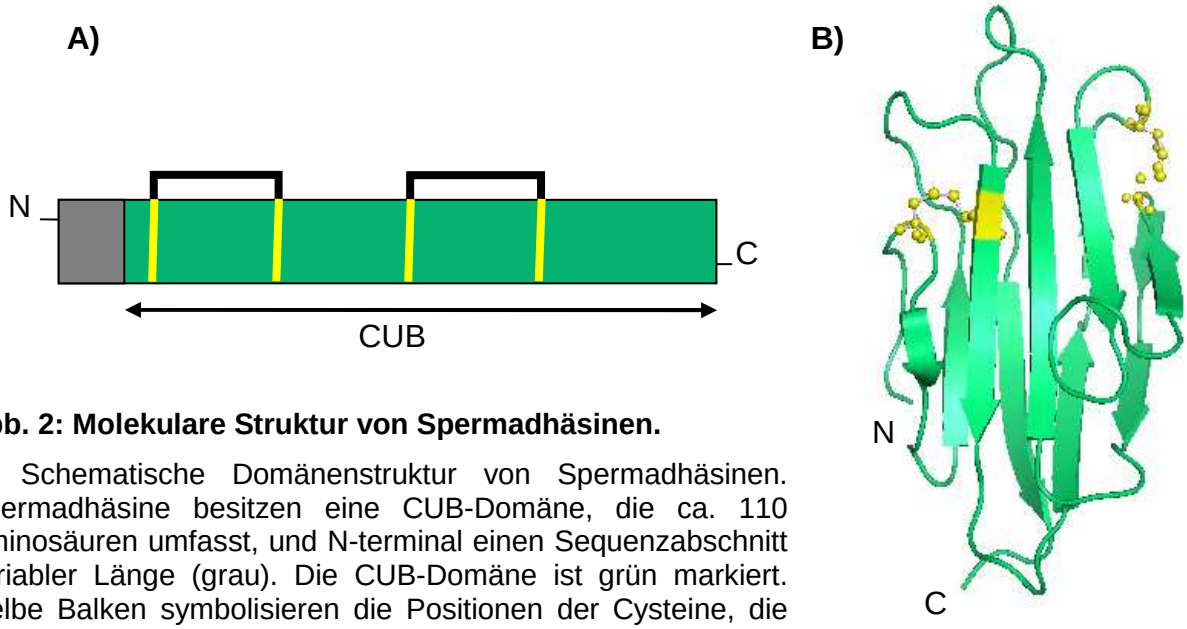


Abb. 2: Molekulare Struktur von Spermadhäsinen.

A) Schematische Domänenstruktur von Spermadhäsinen. Spermadhäsine besitzen eine CUB-Domäne, die ca. 110 Aminosäuren umfasst, und N-terminal einen Sequenzabschnitt variabler Länge (grau). Die CUB-Domäne ist grün markiert. Gelbe Balken symbolisieren die Positionen der Cysteine, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. B) Dreidimensionale Struktur des bovinen Spermadhäsins aSFP (Protein Data Bank, PDB, Accession Code 1sfp). Die Gesamtstruktur der Domäne besteht aus einem β-Sandwich mit zwei Blättern. Jedes Blatt enthält 2 parallele und 4 anti-parallele Stränge. Die an der Formierung von Disulfidbrücken beteiligten Cysteine stabilisieren die Gesamtstruktur des Proteins. Die Cysteine sind als Kugeln und deren Bindungen als Stäbe („ball & stick"-Modell) dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm „PyMol" erstellt. „N" und „C" symbolisieren die N- bzw. C-terminalen Bereiche des Proteins.

In anderen Spezies sind die Vielfalt und die Expressionsdichte der Spermadhäsine deutlich geringer. AWN-homologe Proteine wurden beim Pferd (HSP-7) (REINERT et al. 1996) und im Seminalplasma der Hausziege (*Capra hircus*; BSFP) (MELO et al. 2008) identifiziert. Beim Rind wurden zwei Spermadhäsine gefunden, die als SPADH1 (aSFP) und SPADH2 (Z13) bezeichnet wurden (WEMPE et al. 1992; TEDESCHI et al. 2000). Beim Schafbock wurde ein AQN-1-homologes Protein (RSP) isoliert (BERGERON et al. 2005), das auch der Spermadhäsinfamilie zugeordnet wurde. Außerhalb der Ungulaten sind bisher weder Spermadhäsinproteine noch deren Transkripte gefunden worden.

1.4.1.2 Spermadhäsine als multifunktionelle Proteine

Spermadhäsine zeichnen sich durch eine Reihe biologischer Interaktionen aus, die ihre besondere Funktion reflektieren. Sie können an Kohlenhydrate (Oligosaccharidstrukturen), an Glukosaminoglykane wie Heparin sowie an Proteinaseinhibitoren und Phospholipide binden. Drei Mitglieder dieser Familie, AWN, AQN-1 und AQN-3, sind als spermienbindende Proteine identifiziert worden, die an der Kapazitation und an kohlenhydratvermittelten Prozessen der Befruchtung beteiligt sind. Dabei differieren die Bindungsmechanismen der einzelnen Proteine an die Spermienoberfläche erheblich. AWN und AQN-3 binden nur in monomerer Form über die Phospholipide an die Spermienmembran (DOSTALOVA et al. 1995b). Bei AWN wurden innerhalb der Polypeptidkette zwei Sequenzabschnitte identifiziert (Aminosäure 6-12 und 104-108), die die Bindungsstellen für die Phosphorylethanolamine und die sog. Lipidbindungstasche darstellen (ENSSLIN et al. 1995). Die Bindung von AQN-1 an die Spermienmembran wird über das Lipid-bindende Protein pB1 vermittelt (CALVETE et al. 1997b).

Spermadhäsine besitzen eine ausgeprägte Aggregationstendenz. Während der Ejakulation bilden sie eine Proteinschicht um den empfindlichen Spermienkopf, stabilisieren damit den akrosomalen Bereich und schützen die Membran vor einer frühzeitigen Akrosomreaktion. Diese locker gebundene Spermadhäsinfraktion wird erst während der Passage durch den weiblichen Genitaltrakt (Eileiter) im Verlauf der Kapazitation wieder von der Spermienoberfläche abgelöst. Durch diese kontrollierte Dissoziation werden andere funktionelle Proteine auf der Spermienoberfläche zugänglich (TÖPFER-PETERSEN et al. 1995; TÖPFER-PETERSEN 1999).

Die Spermadhäsine PSP-I und PSP-II sind die häufigsten Proteine des porzinen Seminalplasmas, die als nicht-heparinbindende Heterodimere in glykosylierter Form vorliegen (CALVETE et al. 1995a). Sie besitzen proinflammatorische und immunostimulatorische Eigenschaften auf Lymphozyten *in vitro* und sind an der Regulation der Immunantworten im weiblichen Genitaltrakt beteiligt. Ihre biologische Funktion scheint eher in der Etablierung einer geeigneten Umgebung für den Embryo im weiblichen Genitaltrakt zu liegen (NIMTZ et al. 1999; ASSREUY et al. 2003).

In Anwesenheit von nicht-heparinbindenden Spermadhäsinen (PSP-I/PSP-II) werden die Lebensfähigkeit, Motilität und mitochondriale Aktivität der hochverdünnten Spermatozoenpopulation für mindestens 5 Stunden aufrechterhalten, während die heparinbindende Fraktion der Spermadhäsine (AWN, AQN-3 und AQN-1) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration eine Membranschädigung der Spermatozoen verursacht. Der positive Effekt von PSP-I/PSP-II auf die Funktion der hochverdünnten Spermatozoen scheint in der PSP-II Untereinheit zu kartieren. Eine Beteiligung seiner Glykanstrukturen scheint nicht notwendig zu sein. Diese schützende Eigenschaft von PSP-II ist für Kryokonservierungsverfahren sexsortierter Spermatozoen und für weitere biotechnologische Entwicklungen im Reproduktionsbereich von großer Bedeutung (CABALLERO et al. 2008).

Das bovine Spermadhäsin aSFP assoziiert vergleichsweise “locker“ während der Ejakulation an die Spermienoberfläche. Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass es während des Kapazitationsvorgangs vollständig von der Oberfläche entfernt wird (DOSTALOVA et al. 1994a). Dieses Protein zeigt weder Kohlenhydrat- noch Zona pellucida-Bindungseigenschaften, wodurch eine Beteiligung an der Gameten-Interaktion ausgeschlossen werden kann (DOSTALOVA et al. 1994a). Das Spermadhäsin aSFP scheint in physiologischen Konzentrationen die Spermatozoen durch Verminderung der Lipidperoxidation vor oxidativem Stress zu schützen (SCHÖNECK et al. 1996). Die antioxidative Fähigkeit von aSFP beruht auf dem Vorliegen von Isoformen mit unterschiedlichem Reduktionsstatus, wobei vollständig oxidierte, teilweise reduzierte und vollständig reduzierte Formen existieren (EINSPANIER et al. 1993). Weiterhin scheint aSFP dosisabhängig die Zellteilung und Progesteronsekretion von bovinen Granulosazellen zu stimulieren (EINSPANIER et al. 1991). Möglicherweise resultieren hieraus auch eine Schutzfunktion für die Spermien und stimulatorische Effekte auf die Ovulation (CALVETE u. SANZ 2007).

Eine besonders interessante Eigenschaft von porzinen Spermadhäsinen ist ihre Fähigkeit, spezifisch an Kohlenhydratstrukturen zu binden. Da sie keine strukturellen Ähnlichkeiten mit den bisher bekannten Lektinen aufweisen, repräsentieren sie eine vollkommen neue Klasse von Lektin-ähnlichen Proteinen. Die Kohlenhydrat-

bindungseigenschaften der Spermadhäsine verschiedener Spezies differieren erheblich. Während porzine Spermadhäsine ein breites Spektrum verschiedener Kohlenhydratstrukturen binden, zeigt das bovine Spermadhäsin, aSFP, keine Reaktivität mit Kohlenhydratstrukturen (DOSTALOVA et al. 1994a; TÖPFER-PETERSEN et al. 1995). Die porzinen Spermadhäsine binden Kation-unabhängig an Glykoproteine der Zona pellucida und andere Glykoproteine mit Dissoziationskonstanten im unteren mikromolaren Bereich. AWN, AQN-1 und AQN-3 zeigen ähnliche Bindungseigenschaften zu Strukturen mit terminalen Galβ1,3GlcNac und Galβ1,4GlcNac Sequenzen in O- und N-gebundenen Oligosacchariden; sie unterscheiden sich jedoch in ihren Affinitäten zu tri- und tetra-antennären N-Glykanen. Eine zusätzliche Sialysierung von Galaktose-Strukturen scheint die Bindungsaffinität von AWN zu erhöhen. AWN weist eine 50-fach höhere Bindungsaffinität für Galβ1,3GlcNac Sequenzen gegenüber N-Acetyllaktosamin-Resten in N-Glykanen auf (DOSTALOVA et al. 1995a; TÖPFER-PETERSEN 1999). Möglicherweise wird über die Galaktose-Bindungseigenschaft des oberflächenassoziierten AWN ein Kontakt zwischen Spermium und komplementären Kohlenhydratstrukturen der Eizelle erreicht. AWN konnte an Zona pellucida gebundenen Spermatozoen sowohl nach IVF (*In vitro* Fertilisation) als auch *in vivo* nach Insemination und Gewinnung des Embryos nachgewiesen werden, was für eine Beteilung von AWN an der Gameteninteraktion spricht (CALVETE et al. 1997a; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1998). Im Gegensatz zu AWN, AQN-3 und AQN-1 besitzt PSP-II eine hohe Affinität für Mannose-6-Phosphat, wobei die Bindung -anders als bei den anderen Spermadhäsinen- eine deutliche Abhängigkeit von divalenten Kationen aufweist (SOLIS et al. 1998).

1.4.2 Fibronektin Typ II-Modul Proteine

Fibronektin Typ II (Fn2)-Modul Proteine sind sekretorische Proteine unterschiedlicher Herkunft und Funktion. Die charakteristischen Fn2-Module wurden ursprünglich in dem extrazellulären Matrixprotein Fibronektin identifiziert (ESCH et al. 1983; SKORSTENGAARD et al. 1986). Typisch für das Fn2-Modul ist eine Abfolge von Aminosäuren mit der Konsensus-Sequenz $CX_2PFX_{8-9}WCX_{12-14}C$, die an konservierten Positionen Cysteine beinhaltet (CONSTANTINE et al. 1992).

Über dieses Strukturmotiv erfolgt die Interaktion mit Kollagen in der extrazellulären Matrix. Fn2-Module wurden auch in den Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie in Serinproteasen, Faktor XII und im Aktivator des Hepatozyten-Wachstumsfaktors gefunden. Phylogenetisch fällt auf, dass die Fn2-Module nur in Proteinen von Wirbeltieren vorliegen, während sie in Proteinen von Wirbellosen bislang nicht beobachtet wurden. Auch ergaben Genomanalysen von *Caenorabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* keine Hinweise auf das Vorliegen von Sequenzen, die Fn2-Module kodieren. Hieraus muss der Schluss gezogen werden, dass dieses Funktionsmotiv offensichtlich erst mit der Entwicklung der Vertebraten entstanden ist.

1.4.2.1 Fibronektin Typ II (Fn2)-Proteine des männlichen Genitaltrakts

Fn2-Proteine sind eine Klasse von Proteinen, die ubiquitär im männlichen Genitaltrakt von Säugetieren vorkommen. Bei Ungulaten sind sie dominante Proteine des Seminalplasmas, die während der epididymalen Passage und/oder später während der Ejakulation mit der Spermienoberfläche interagieren. Sie zeichnen sich durch zwei oder vier tandemartig angeordnete Fn2-Typ-Module aus, deren N-terminaler Bereich eine variable Zahl von Aminosäuren aufweist. Generell werden sie je nach der Anzahl ihrer Fn2-Typ-Module als kurze [zwei Fn2-Typ-Modul (1)Fn2-(2)Fn2)] oder als lange [vier Fn2-Typ-Modul (1)Fn2-(2)Fn2-(3)Fn2-(4)Fn2] Fn2-Proteine bezeichnet (Abb. 3).

Besonders intensiv sind die Fn2-Proteine des bovinen Seminalplasmas untersucht worden, die in ihrer Gesamtheit als BSPs (*Bovine Seminal Plasma Proteins*) bezeichnet werden. Ihre Primärstrukturen wurden bereits in den 80er Jahren aufgeklärt (ESCH et al. 1983; MANJUNATH et al. 1987; SEIDAH et al. 1987; SCHEIT et al. 1988). Zu dieser Proteinfamilie gehören BSP-A1/A2 und BSP-A3 und BSP-30K, die jeweils zwei hintereinander angeordnete Fn2-Module, (1)Fn2-(2)Fn2-Module, sowie kurze N-terminale A-Module aufweisen. Dabei unterscheiden sich BSP-A1 und BSP-A2 nur in ihrer Glykosylierung und werden auch als PDC-109 (*Protein with N-terminus aspartic acid, D, and carboxy terminus Cystein, having 109 amino acids*) zusammengefasst. Diese Proteine werden vorwiegend in der

Samenblase synthetisiert und binden erst während der Ejakulation über ihre Fn2-Module an Phosphorylcholin-haltige Phospholipide der Spermienmembran.

Röntgenkristallografische Untersuchungen von BSP-A1/2/Phosphorylcholin-komplexen trugen wesentlich zur Strukturaufklärung des (1)Fn2-(2)Fn2-Modulpaares und der Phosphorylcholin-Bindungsdomäne bei. Jede Fn2-Domäne besteht aus zwei doppelsträngigen anti-parallelen β-Faltblattabschnitten, die eine senkrechte Orientierung zueinander aufweisen und durch zwei konservierte Disulfidbrücken verbunden sind. In den untersuchten Kristallen liegt der Phosphorylcholin/Protein-Komplex als Dimer vor. Die Bindung von Phospholipiden wird über eine Kation-π-Interaktion zwischen der quaternären Aminogruppe des Cholins und dem invarianten Tryptophan sowie über Wasserstoffbrückenbindungen exponierter Tyrosinreste und der Phosphatgruppe vermittelt. Diese Untersuchungen charakterisierten die Phospholipid-Bindungstasche der kurzen Fn2-Proteine und lieferten das strukturelle Modell für den Mechanismus der Protein-Lipid-Interaktion (WAH et al. 2002).

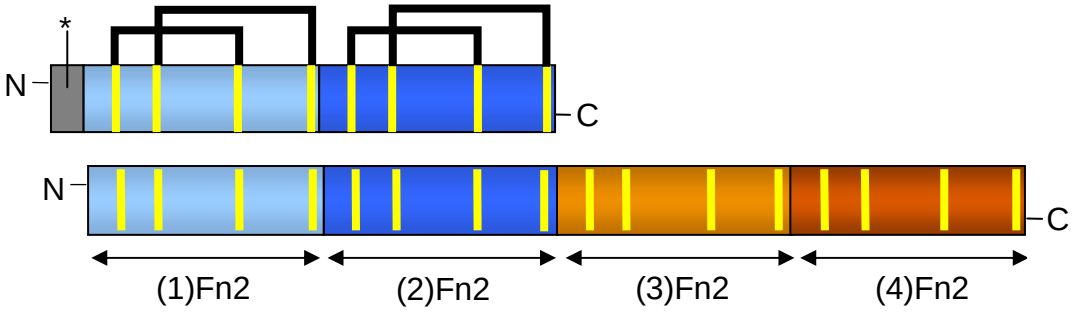


Abb. 3: Schematische Domänenstruktur von Fn2-Proteinen des männlichen Genitaltrakts verschiedener Säugerspezies.

Fn2-Proteine besitzen zwei oder vier tandemartig angeordnete Fn2-Module, die unterschiedlich lange und divergente N-terminale Bereiche mit verschiedenen Glykosylierungsmustern aufweisen. Die Module der (1)Fn2 und (2)Fn2 sind in den kurzen und langen Fn2-Proteinen hell- und dunkelblau markiert und die (3)Fn2 und (4)Fn2 der langen Proteine sind hell- und dunkelbraun dargestellt. Gelbe Balken symbolisieren die Positionen der Cysteine, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die N-terminale Verlängerung der kurzen Fn2-Proteine ist dunkelgrau markiert. (*) symbolisiert die Glykosylierungsstelle. „N“ und „C“ symbolisieren die N- bzw. C-terminalen Bereiche der Proteine.

BSP-ähnliche Proteine wurden vorwiegend bei Ungulaten gefunden. Artspezifisch weisen diese Proteine ca. 50-69% Sequenzidentität auf; die im Seminalplasma vorliegenden Mengen variieren von Spezies zu Spezies erheblich. In der Samenleiterampulle des Hengstes nachgewiesene Proteine SP-1 und SP-2 (Seminal plasma Protein; früher als *Horse Seminal plasma Protein*, HSP-1 und HSP-2, bezeichnet) besitzen ähnlich wie BSPs zwei tandemartig verknüpfte Fn2-Domänen.

Ein weiteres Protein mit zwei Fn2-Modulen (pB1) wurde im porzinen Seminalplasma allerdings in deutlich geringerer Menge als bei anderen Spezies gefunden (CALVETE et al. 1997b). Fn2-homologe Proteine wurden ebenfalls bei Ziege (GSP, *Goat Seminal Plasma Protein*), Bison (BiSV, *Bison Seminal Vesicle Protein*), Schafbock (RSP, *Ram Seminal plasma Protein*) und beim Kaninchen (REP52, *Rabbit Epididymal Protein* 52) detektiert (VILLEMURE et al. 2003; BOISVERT et al. 2004; BERGERON et al. 2005; NIXON et al. 2008).

Aus dem humanen und caninen Nebenhoden wurden weitere Vertreter der Fn2-Proteine identifiziert, die ursprünglich mit HE12 bzw. CE12 bezeichnet wurden, deren struktureller Aufbau sich von den bis dahin beschriebenen kurzen Fn2-Proteinen unterschied. Vom Nomenklatur-Kommitee der Human Genome Organisation (HUGO) wurde HE12 inzwischen als Epididymales Spermien-Bindendes Protein 1 (ELSPBP1) bezeichnet. Interessanterweise besitzen diese Proteine vier tandemartig angeordnete Fn2-Module, die als (1)Fn2-(2)Fn2-(3)Fn2-(4)Fn2-Modulstrukur beschrieben werden. Die ersten beiden Module weisen eine deutliche Ähnlichkeit zu den (1)Fn2-(2)Fn2-Modulen der BSPs sowie SP-1 und -2 auf. Die beiden zusätzlichen Domänen weichen dagegen in ihren Sequenzen erheblich ab und haben größere Ähnlichkeit mit den Fn2-Modulen der Gelatinasen oder Matrix-Metalloproteinasen bzw. mit dem Faktor XII. Kürzlich wurde ein verwandtes Protein (Se12, *Sus scrofa epididymal Protein* 12 oder ssELSPBP1) auch in der porzinen epididymalen Flüssigkeit nachgewiesen, das eine weitgehende Sequenzübereinstimmung mit den humanen und caninen Proteinen aufweist (SCHÄFER et al. 2003).

1.4.2.2 Biologische Bedeutung der Fn2-Proteine

Die biologische Aktivität der Fn2-Proteine wurde intensiv beim Rind untersucht. Studien belegen, dass die BSP-Proteine in entscheidender Weise an den Vorgängen der Befruchtung, insbesondere der Kapazitation, beteiligt sind. BSP-Proteine besitzen Gelatin-bindende Eigenschaften (MANJUNATH et al. 1987) und zeigen darüber hinaus eine spezifische Bindung an High-Densitiy-Lipoproteine (HDL), heparinähnliche Glykosaminoglykane sowie an Phospholipide (DESNOYERS u. MANJUNATH 1992, 1993; GASSET et al. 1997). Die feste Bindung an die Spermienmembran wird über die Phospholipid-Interaktion vermittelt; HDL- und Heparinbindung spielen eine Rolle bei der Aktivierung der Spermatozoen während der Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt. Ein Modell für die Rolle der BSPs wurde von MANJUNATH u. THERIEN (2002) entwickelt. Demnach potenzieren diese Proteine die Fähigkeit der Spermatozoen, den Kapazitationsprozess durchzuführen und in geeigneter Weise mit der Eizelle zu interagieren. Die Interaktion der Proteine mit der Spermienmembran moduliert dabei die Membraneigenschaften und vermittelt die Heparin- und HDL-induzierten Stimuli auf die Spermien. Schließlich sind die BSPs auch an der Etablierung des funktionellen Spermienreservoirs im weiblichen Genitaltrakt beteiligt (GWATHMEY et al. 2003). Dabei spielen kohlenhydratvermittelte Adhäsionsvorgänge eine Rolle; offensichtlich binden exponierte Glykane des Oviduktepithels an korrespondierende Oberflächenlektine des Spermatzoons (SUAREZ 2001; TÖPFER-PETERSEN et al. 2002). Als Rezeptor für das bovine Oviduktepithel wurde das BSP-A1/2 (PDC-109) identifiziert (GWATHMEY et al. 2003). Die Bindung an das Oviduktepithel, die strukturellen Veränderungen der Spermienmembran und die Heparin- und HDL-induzierte Stimulierung der Kapazitation erfolgen in der Region des Spermienreservoirs des Eileiters. Mehrere Studien stützen das Konzept einer Beteiligung von Fn2-Proteinen an diesen Vorgängen beim Rind. Über die funktionellen Eigenschaften der langen Fn2-Proteine und ihre biologische Rolle ist nur wenig bekannt.

1.5 Ziele und Fragestellungen

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren wesentliche Interaktionspartner, die an der Etablierung des Spermienreservoirs im porzinen Ovidukt beteiligt sind, nicht bekannt. Die vorgenommenen Studien hatten daher

- die Identifizierung der beteiligten Molekülsysteme (Rezeptor/Ligand) sowie
- deren Charakterisierung insbesondere deren Spezifität und Bindungsfähigkeit

zum Ziel. Die resultierenden Daten (Publikationen 1 bis 3) stellen einen erheblichen Erkenntniszugewinn im Hinblick auf die Identifizierung der Interaktionspartner und Mechanismen dar und beleuchten die Struktur-Funktionsbeziehung der beteiligten Proteine.

Fn2-Modul Proteine zeichnen sich durch einen modularen Aufbau aus. Neben kurzen 2-Modul-umfassenden Proteinen wurden auch lange 4-Modul-tragende Proteine beschrieben. Eigenschaften insbesondere der 4-Modul Proteine sind im Verlauf der Spermienreifung bislang nur unzureichend beschrieben worden. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen (Publikationen 4 und 5) wurden daher Fragen zur

- gewebespezifischen Expression dieser Proteine im equinen Modell und anderen Spezies,
- chromosomalen Lokalisation,
- evolutionären Verwandtschaft sowie zu
- Struktur und Bindungseigenschaften schwerpunktmäßig bearbeitet.

Hieraus resultierten wesentliche Erkenntnisse zu den verschiedenen Untersuchungsebenen.

2. Ergebnisse

2.1 Funktionelle Analysen zur Etablierung des weiblichen Spermienreservoirs beim Schwein

Der Eileiteristhmus dient beim Säuger als Spermienreservoir, in dem Spermatozoen unter Erhalt ihrer Viabilität in einem bestimmten Zeitfenster gespeichert werden. Während dieses Zeitraumes binden die Spermien an Oviduktepithelzellen. Alle nachfolgenden physiologischen und biochemischen Veränderungen der Spermien (Kapazitationsvorgang) und der Transport zum Ort der Befruchtung werden vom Ovidukt reguliert und mit dem Zeitpunkt der Ovulation koordiniert. Somit übernimmt der weibliche Reproduktionstrakt über die Modulation der Spermienfunktion(en) Einfluss auf die lokale und zeitliche Steuerung des Befruchtungsvorganges. Für die regulative Funktion des Ovidukts ist die direkte Kontaktaufnahme zwischen Spermatozoen und Eileiterepithelzellen notwendig. Erst durch die Bindung an das Epithel werden die Lebensfähigkeit der Spermien verlängert und kapazitations-bedingte Veränderungen unterdrückt. Es ist gezeigt worden, dass die Spermien-Oviduktbindung ein kohlenhydratvermittelter Prozess ist, bei dem komplexe Kohlenhydratstrukturen mit ihren komplementären Rezeptorproteinen interagieren und hierdurch die in den Eileiter eintretenden Spermatozoen an das Oviduktepithel binden. Der Eileiter begünstigt diese Prozesse und übt einen regulierenden Einfluss aus.

Nachfolgend befassen sich drei Publikationen mit der näheren Charakterisierung des komplementären Rezeptorsystems, das wesentlich an der Etablierung des weiblichen Spermienreservoirs beim Schwein beteiligt ist.

2.1.1 Charakterisierung kohlenhydratvermittelter Vorgänge des funktionellen Spermienreservoirs beim Schwein

(Publikation 1: Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig)

Lange Zeit war nicht klar, welche Gruppe(n) von molekularen Glykostrukturen an der Bindung der Spermien an das Oviduktepithel beteiligt sind. Der Befund, dass Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen in vergleichbarer Weise wie Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen die Bindung der männlichen Gameten an die Epithelzellen vermitteln, war ein wesentlicher Zugewinn an Information in diesem komplexen Geschehen (SUAREZ 2001). Allerdings waren die Struktur(en) und die Zusammensetzung der beteiligten Kohlenhydrate nicht detailliert untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, diejenigen Kohlenhydratstrukturen zu identifizieren, die eine Schlüsselrolle bei der Spermatozoen-Oviduktbindung beim Schwein spielen. Für die Beantwortung dieser Frage gelangte das Testverfahren "*Oviduct-Explant-Assay*" (OEA) zur Anwendung. Der OEA hat sich als ein geeignetes *in vitro* System erwiesen, der es erlaubt, die Bindungskapazität von Spermatozoen an das Oviduktepithel als quantitativen und reproduzierbaren Parameter zu erfassen; dabei wird die Bindung als Bindungsindex ausgedrückt. Der Bindungsindex ist als mittlere Zahl der gezählten und am Explant gebundenen Spermatozoen pro 0,01 mm^2 Fläche des Explants definiert. Bei den Explanten handelt es sich um kleine intakte Epithelgewebestücke mit sehr guter Zilienbewegung, die unmittelbar nach Schlachtung der Tiere gewonnen werden; sie weisen damit Bedingungen auf, die sehr nahe an der *in vivo* Situation sind. Umfassende Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe hatten im Vorfeld gezeigt, dass 1. im OEA die Bindung von Spermien in einem definierten Bereich linear mit der angebotenen Spermatozoenzahl korreliert und 2. insbesondere beim Schwein die Bindung unabhängig von Zyklusstand und Alter des Spendertieres ist (Petrunkina et al. 2001). Dies waren wesentliche Voraussetzungen, um die Bindung und Bindungsfähigkeit von Spermien an das Oviduktepithel zu charakterisieren und Hinweise auf die Vorgänge im lebenden Tier zu erhalten.

Für die Testung zur Kohlenhydratspezifität wurden zunächst natürlich vorkommende Glykane in der Form von Glykoproteinen mit bekannten Kohlenhydratstrukturen eingesetzt, die in Kompetitionsexperimenten im OEA auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht wurden. In ersten orientierenden Untersuchungen wurden die Modellglykoproteine Ovalbumin, Fetuin und Asialofetuin getestet. Ovalbumin zeigte eine signifikante inhibitorische Aktivität von IC50 ~ 1,3 µM. Fetuin hingegen, ein Glykoprotein mit sialysierten O-Glykanen und komplexen N-Glykanen, beeinträchtigte die Spermienbindung nicht. Das desialysierte Protein Asialofetuin zeigte mit IC50 ~ 18 µM eine um mindestens eine Größenordnung schwächere Inhibition als Ovalbumin. Diese Daten bestätigten, dass Kohlenhydrate an der Interaktion von Spermien an das Oviduktepithel beteiligt sind; auch untermauern sie Befunde früherer Untersuchungen (SUAREZ 2001).

Um den experimentellen Nachweis zu erbringen, dass der inhibitorische Effekt ursächlich auf die an Ovalbumin gebundenen Kohlenhydratstrukturen zurückzuführen ist, wurde das Modellglykoprotein Ovalbumin mit Trypsin gespalten und die resultierenden Glykopeptide mittels ConA-Affinitätschromatographie und RP-HPLC isoliert. Darüber hinaus wurden, um mögliche Peptidinteraktionen auszuschließen, die Glykananteile enzymatisch mit PNGase F von den Peptiden getrennt und die resultierenden Spaltprodukte über RP-HPLC aufgereinigt. Die massenspektrometrische Analyse im Maldi-ToF-MS ergab, dass der untersuchte Glykanpool vorwiegend aus zwei N-Glykanen vom Oligomannosyl-Typ $(Man)_5(GlcNAc)_2$ und $(Man)_6(GlcNAc)_2$ besteht. Neben diesen dominanten Kohlenhydratstrukturen wurden auch N-Glykane vom Hybrid-Typ $(Hex)_4(GlcNAc)_5$ identifiziert. Deren relative Anteile waren jedoch deutlich geringer.

Die Glykopeptide, Glykane und die deglykosylierte Peptidfraktion wurden im OEA auf ihr inhibitorisches Potential untersucht. Sowohl der Glykanpool als auch die isolierten Oligomannosyl-Typ Glykopeptide hemmten die Spermatozoen-Oviduktbindung mit 81% und 84% erheblich, während die deglykosylierten Peptide die Spermienbindung nicht beeinflussten. Glykopeptide vom Hybrid-Typ waren ebenfalls in der Lage, die Spermienbindung zu beeinträchtigen. Mit einem Wert von 75,9% war der

Hemmeffekt etwas geringer als mit Oligomannosyl-Typ Glykopeptiden. Zur Verifizierung der Befunde wurde Mannopentaose, das eine vergleichbare Struktur wie die Oligomannosylsequenz $(Man)_5(GlcNAc)_2$ aufweist, in diesem System auf sein inhibitorisches Potential untersucht. Mit einem Wert von IC50 ~ 0,8 µM ist die durch Mannopentaose vermittelte Inhibition nahezu identisch mit der durch Ovalbumin vermittelten Inhibition. Da in diesem Testsystem Kohlenhydrate mit endständigen Mannoseresten zu einer stärkeren Hemmung der Spermienbindung führten als Glykokonjugate mit geringeren terminalen Mannoseanteilen, verdeutlicht dieses Ergebnis, dass Glykane vom Oligomannosyl-Typ eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Bindung der Spermien an das Ovidukt beim Schwein einnehmen.

Die Beteiligung von Strukturen mit terminaler Galaktose ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, da auch Asialofetuin, das sowohl terminale Gal-GalNAc als auch Gal-GlcNAc Sequenzen enthält, eine geringgradige inhibitorische Aktivität aufwies. Beim Schwein scheint die Bildung des Spermatozoenreservoirs im Ovidukt im wesentlichen auf der kooperativen Interaktion von hoch affiner Bindung von Oligomannosyl-Strukturen oder nicht reduzierenden teminalen Mannoseresten und schwach affinen terminalen Galaktoseresten mit ihren komplementären Rezeptorproteinen zu beruhen. Sowohl die Glykokalix des Spermatozoons als auch das porzine Oviduktepithel sind reich an N- und O-Glykanen, sodass aufgrund dieser Untersuchung über die Lokalisierung des/der Rezeptorproteins/proteine und seiner Kohlenhydratliganden noch keine Aussage getroffen werden kann. Die Charakterisierung des Rezeptorsystems war Gegenstand der nachfolgenden Veröffentlichung.

2.1.2 Spermadhäsin AQN-1 als putatives Rezeptorprotein für die Etablierung des Spermienreservoirs im porzinen Eileiter

(Publikation 2: Spermadhesin AQN-1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig)

Die Interaktion von Spermatozoen und Oviduktepithelium ist ein essentielles, kohlenhydratvermitteltes Ereignis. Dabei exprimiert das porzine Oviduktepithelium ein komplexes Muster von Oligosaccharidstrukturen. In der vorangegangenen Publikation wurde eine Beteiligung von Oligomannosyl-Glykanen als wesentliche, signalvermittelnde Zielstrukturen an der Etablierung des Spermienreservoirs beim Schwein nachgewiesen. Somit blieb die Frage zu klären, welche an den Spermien gebundenen bzw. assoziierten Moleküle als Rezeptoren an der/den Interaktion/en beteiligt sind. Hinsichtlich der Natur des komplementären Rezeptormoleküls und seiner Lokalisation gab es beim Schwein wenig Hinweise. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass ejakulierte Spermatozoen eine signifikant höhere Bindungsfähigkeit an das Oviduktepithel aufweisen als epididymale Spermatozoen (TÖPFER-PETERSEN et al. 2002). Daraus konnte geschlossen werden, dass die molekularen Strukturen, möglicherweise Proteine, erst während der Ejakulation mit den Spermatozoen assoziieren. Beim Rind konnte ein oberflächenassoziiertes Spermienprotein (BSP-A1/2 oder PDC-109) als Oviduktrezeptor identifiziert werden (IGNOTZ et al. 2001). Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass auch beim Schwein oberflächenassoziierte Lektine/Proteine als Kandidaten für den/die Oviduktrezeptor/en in Frage kommen. Da porzine Spermadhäsine hinsichtlich Syntheseorte, Lokalisierung am Spermatozoon und Kohlenhydratspezifität gut charakterisiert waren, sollte die Rolle dieser Proteinfamilie an der Etablierung des Spermienreservoirs detailliert untersucht werden.

Beim Schwein können fünf Spermadhäsine aus dem Seminalplasma isoliert werden, von denen jedoch nur drei (AWN, AQN-1 und AQN-3) oberflächenassoziiert mit den Spermatozoen vorliegen. In eingehenden Studien in unserer Arbeitsgruppe wurde die Kohlenhydratbindung der Spermadhäsine untersucht. Dabei zeigte sich, dass die spermienbindenden Proteine Galaktose in Gal-GalNAc und Gal-GlcNAc Sequenzen, wie sie in O-Glykanen oder komplexen N-Glykanen vorkommen, mit

unterschiedlichen Affinitäten (Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-6} M bis 10^{-8} M) binden (DOSTALOVA et al. 1995a; CALVETE et al. 1996).

Diese Untersuchungen wurden im vorliegenden Ansatz durch Dot-Blot Analysen unter Einsatz von definierten Oligosaccharid-Neoglykoproteinen ergänzt. Dabei konnte die Bindung von Galaktosylstrukturen bestätigt und spezifiziert werden. So bindet AWN Galaktose sowohl in α- als auch β-glykosidischer Bindung, während AQN-1 bevorzugt Galaktose in β-glykosidischer Bindung und darüber hinaus auch Oligomannosylstrukturen erkennt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden AQN-1 als mannoseerkennendes Lektin und AWN als Prototyp eines galaktosebindenden Spermadhäsins in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

Mit dem Ziel, die *in vivo* Bedingungen zu imitieren, wurden kompetitive Hemmversuche mit diesen Spermadhäsinen im OEA durchgeführt. Die charakteristischen Unterschiede der Oligosaccharidbindungen von AQN-1 und AWN wurden auch im OEA bestätigt, denn die Bindung ejakulierter Spermien an Oviduktepithel wird in Gegenwart von AQN-1 (IC50 ~ 4,5 µM) signifikant inhibiert. Erwartungsgemäß wurde in diesem Testsystem eine Inhibition der Spermienbindung an Oviduktepithelzellen mit AWN nicht erzielt. Bei der Verwendung verschiedener Modellzucker wurde die Spermienbindung an das Oviduktepithel ausschließlich durch Mannopentaose (Mannosylrest) inhibiert. Dies spricht dafür, dass die Spermatozoen bevorzugt an exponierte Oligomannosylstrukturen des Epithels binden. Über Fluoreszenzmikroskopie konnten mannosebindende Strukturen an der apikalen Region des Kopfes ejakulierter Spermatozoen nachgewiesen werden.

Weitere Durchflusszytometrie- und OEA-basierte Experimente wurden durchgeführt, um wesentliche Funktionen für AQN-1 bzw. AWN herauszuarbeiten. Unter Kapazitationsbedingungen erfolgen Veränderungen in den saccharidbindenden Eigenschaften der Spermien. Während die Spermien vor der Kapazitation mannosereiche Oligosaccharide binden, geht diese Fähigkeit innerhalb von 30 Minuten nach Kapazitationsauslösung unter gleichzeitigem Erwerb einer galaktosebindenden Fähigkeit verloren. Diese Verschiebung zugunsten der stärkeren

Bindungsfähigkeit an galaktosereiche Strukturen korreliert mit einer deutlichen Abnahme von spermienassoziierten AQN1 und einer deutlichen Abnahme der Spermienbindung an Oviduktepithelzellen. Lektinhistochemische Untersuchungen und Western-Blot Analysen mit dem mannosedetektierenden Lektin GNA (Zuckerspezifität für α-Methylmannopyranosid) zeigten, dass Oviduktepithelzellen Oligomannosylstrukturen exprimieren. Dabei zeigten Isthmus und Ampulle eine geringfügig höhere Dichte an Lektinrezeptoren als Uterus und Uterotubale Verbindung (UTV). Isolierung und lektinologische Analysen der apikalen Membranfraktion des porzinen Ovidukts bestätigten das Vorliegen von Oligomannosylstrukturen, die als putative Liganden im Oviduktepithelium fungieren könnten.

Die vorliegenden Daten verdeutlichen die besonderen Kohlenhydratbindungs-eigenschaften von AQN-1 im weiblichen Genitaltrakt und stützen die Vorstellung, dass AQN-1 als putatives Rezeptorprotein die Bindung der Spermien an das Oviduktepithel vermittelt und essentielle Funktionen bei der Etablierung des porzinen Spermienreservoirs übernimmt. AQN-1 erfüllt alle Bedingungen für ein Kandidaten-rezeptormolekül: 1) AQN-1 assoziiert erst während der Ejakulation mit dem Spermatozoon, 2) es ist vorwiegend am Spermienkopf, der Kontaktstelle des Spermatozoons mit dem Oviduktepithel, lokalisiert, 3) es besitzt Mannosebindungs-eigenschaften und wird während der Kapazitation von der Oberfläche freigesetzt, ein Vorgang, der mit der Abnahme der Oviduktbindungseigenschaft des Spermatozoons einhergeht.

2.1.3 Punktmutationen im porzinen AQN-1 führen zu einem Verlust der Mannosebindungsfähigkeit

(Publikation 3: Point mutations abolishing the mannose-binding capability of porcine spermadhesin AQN-1)

Nach dem Einbringen von Spermatozoen erfolgt im weiblichen Genitaltrakt eine Sequenz kohlenhydratvermittelter Vorgänge. Beim Schwein wird die Bildung des funktionellen Spermienreservoirs durch die Interaktion von AQN-1 und exponierten Glykanen vom Oligomannosyl-Typ vermittelt. AWN und AQN-3 scheinen Teil des multiplen Rezeptorsystems zu sein, das für die Interaktion mit der Zona pellucida der Eizelle verantwortlich ist. PSP-I und PSP-II sind Spermadhäsine, die als Heterodimere in großer Menge im Seminalplasma vorliegen, jedoch nicht an Spermatozoen binden. Somit kann ihre Beteiligung an der Spermien-Ovidukt- bzw. Gameten-Interaktion ausgeschlossen werden.

Einige Spermadhäsine kommen auch als Glykoformen mit einer N-Glykosylierung an der Position Asn50 vor. Aus früheren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe resultierte, dass N-Glykosylierungen bei AWN und AQN-3 die Kohlenhydratbindung und damit auch die Spermien-Eizell-Erkennung bzw. -Bindung blockieren (CALVETE et al. 1994b). Beide Eigenschaften sind durch enzymatische Abspaltung des N-Glykans wieder herstellbar. Die Gesamtheit dieser Daten ließ vermuten, dass die an der Interaktion mit dem Oligosaccharidmolekül beteiligten Aminosäuren topologisch in der Umgebung von Asn50 liegen und durch komplexe Faltungen die Bindungstasche (*CRD, Carbohydrate Recognition Domain*) bilden. Der Sequenzvergleich der kohlenhydratbindenden Spermadhäsine zeigte sowohl auf der Ebene der Translationsprodukte als auch auf der Ebene der Transkripte eine ausgeprägte Sequenzübereinstimmung in dieser Region: AWN (^{49}LNLSCGKEYVE^{59}), AQN-1 (^{49}LNLACGKEYVE^{59}), AQN-3 (^{49}LNLTCGKEYLE^{59}), und PSP-II (^{49}LNLACGKEYVE^{59}). Nur die Sequenz des nicht Zona pellucida- und nicht kohlenhydratbindenden bovinen aSFP (^{50}LQLNCNKESLE^{61}) differiert (Abb. 4). Das Fehlen von Gly54 bei aSFP wies auf eine mögliche Beteiligung des Glycins an der Generierung der Kohlenhydraterkennungseigenschaft der Spermadhäsine hin.

Obwohl die dreidimensionale Struktur von zwei Vertretern der Spermadhäsinfamilie und damit der CUB-Domäne aufgeklärt wurde, ist es bisher nicht gelungen, die Bindungstasche (*CRD*) der Spermadhäsine durch Ko-Kristallisation mit Zuckern in der Röntgenstruktur darzustellen. Daher sollten in dieser Studie über gezielte Mutagenese Hinweise auf die intramolekulare Lokalisation und Struktur der Kohlenhydraterkennungsdomäne gewonnen werden.

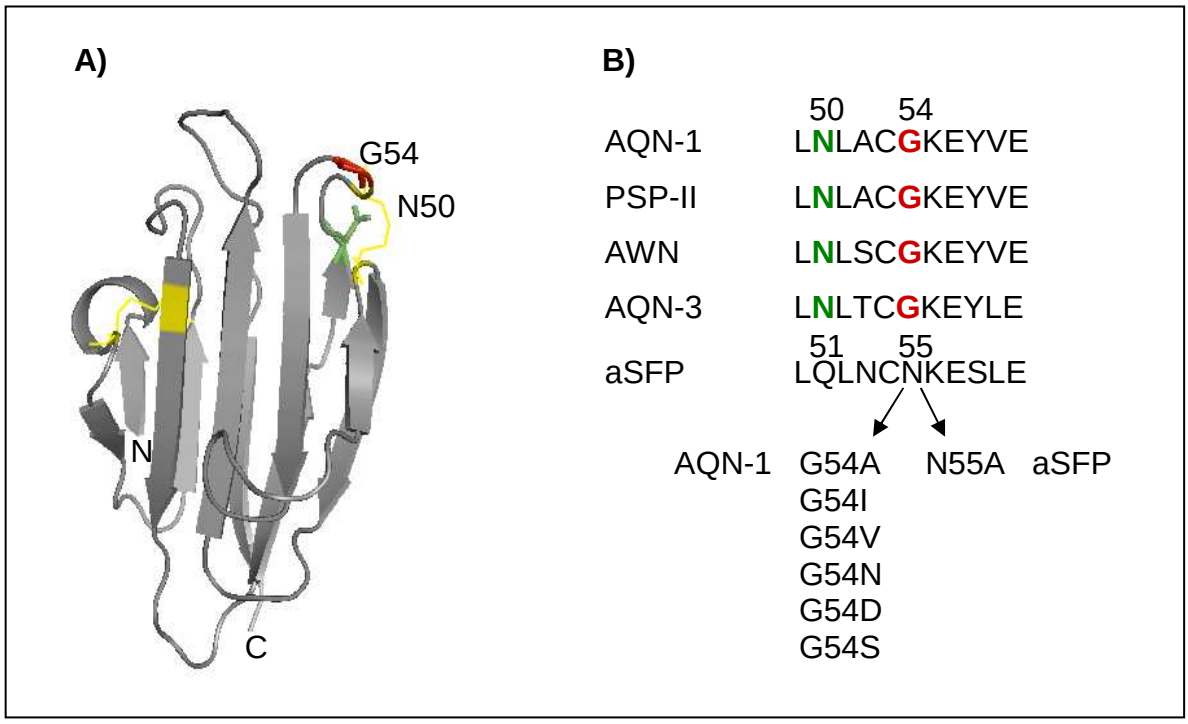


Abb. 4: Strukturmodell des porzinen Spermadhäsins AQN-1 und Sequenz des konservierten Oligopeptids innerhalb verschiedener Spermadhäsine.

A) Das räumliche Modell wurde aus den Kristallstruktur-Daten von PSP-I (Protein Daten Bank, PDB, Accession Code 1SPP) mit Hilfe des Programms „*Swissprot-Modelling*“ ermittelt (http://swissmodel.expasy.org/). Die intramolekularen Disulfidbrücken sind gelb markiert. Die Aminosäuren Asparagin (N, grün) an der Position 50 (N-Glykosylierungsstelle, im Falle des Vorliegens des NxT/S-Motivs) und Glycin (G, rot) an der Position 54 sind als „*Stick*“-Modell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm „PyMol“ erstellt. „N“ und „C“ symbolisieren den N- und C-terminalen Bereich des Proteins. B) Porzine kohlenhydratbindende Spermadhäsine AQN-1, AWN, AQN-3 und PSP-II besitzen an der Position 54 die Aminosäure Glycin, während das bovine nicht kohlenhydratbindende aSFP an dieser Position die Aminosäure Asparagin aufweist. Bei AQN-1 wurde die Aminosäure Glycin 54 durch verschiedene geladene und ungeladene Aminosäuren wie Alanin (G54A), Isoleucin (G54I), Valin (G54V), Asparagin (G54N), Asparaginsäure (G54D) und Serin (G54S) ausgetauscht, und bei aSFP wurde Asparagin durch Alanin (N55A) substituiert.

AQN-1 wurde als Ausgangsprotein für die Mutagenese ausgewählt, da es als einziges der Spermadhäsinfamilie eine nur geringe Neigung zur Oligomerisierung aufweist, und seine Kohlenhydratbindungseigenschaft sowie seine biologische Rolle als potentielles Rezeptormolekül bei der Etablierung des Spermienreservoirs im porzinen Eileiter gut untersucht sind (Publikationen 1 und 2). Über gezielte Mutagenese wurde bei AQN-1 die Aminosäure Glycin an Position 54 durch verschiedene ungeladene und geladene Aminosäuren ausgetauscht: G54A, G54I, G54V, G54N, G54D, und G54S. Bei aSFP wurde Asparagin an der korrespondierenden Position (55) durch Alanin ersetzt (N55A). Nachfolgend erfolgte die Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*), und die Bakterien synthetisierten die gezielt veränderten Proteine nach Induktion mit IPTG. Wildtyp und mutierte $(His)_6$-AQN-1- und $(His)_6$-aSFP-Fusionsproteine wurden aus *E. coli* Lysaten über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie isoliert. Die rekombinanten Proteine wurden nach der enzymatischen Abspaltung der $(His)_6$-tragenden Oligopeptide über RP-HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Die beobachteten Massen stimmten mit den erwarteten Massen überein. Weiterhin wurden die Mutationsstellen mit dem Verfahren des In-Gel-Verdaus und „*Mass fingerprinting*“ sowie MS/MS-Sequenzierung verifiziert. Ebenfalls wurde massenspektrometrisch überprüft, ob die vorliegenden vier Cysteine genauso wie die aus dem Seminalplasma isolierten Proteine an der Formierung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind. Nach den Reindarstellungen der verschiedenen AQN-1 bzw. aSFP Proteine wurden mit Mannose „*Enzyme-Linked Lectin Assays*“ durchgeführt. Das aus dem porzinen Seminalplasma isolierte AQN-1 und das aus *E. coli* isolierte rekombinante Wildtyp AQN-1 Protein zeigten gleiche Mannosebindungseigenschaften. Während die Substitutionen von Glycin durch unpolare Aminosäuren wie Alanin (G54A), Valin (G54V) und Isoleucin (G54I) zu keiner signifikanten Abnahme der Mannosebindungsaktivität führten, zeichneten sich Austausche mit nicht geladenen polaren Aminosäuren wie Serin (G54S) und Asparagin (G54N) sowie geladene polare Aminosäuren wie Asparaginsäure (G54D) durch den vollständigen Verlust der Mannosebindungsfähigkeit des mutierten AQN-1 aus.

Diese Daten zeigten, dass unterschiedliche Aminosäuren und somit unterschiedliche Seitenketten an der Position 54 die Mannosebindungseigenschaft von AQN-1 beeinflussen. Es wurde angenommen, dass die höhere Oberflächenzugänglichkeit von Aminosäuren mit polaren Seitenketten im Vergleich zu Aminosäuren mit unpolaren Gruppen eine sterische Hinderung bei den Monosaccharidbindungen verursacht. Andererseits zeigten rekombinantes Wildtyp aSFP sowie seine mutierte Form N55A (eine topologisch äquivalente Position zum porzinen Spermadhäsin G54) gleichermaßen wie das native aus dem Seminalplasma isolierte aSFP keine Mannosebindung. Hieraus resultiert, dass das alleinige Vorliegen der Aminosäure Glycin oder ähnlicher unpolarer Aminosäuren in dem konservierten 11-mer Peptid nicht automatisch zu einer Mannose/Galaktosebindungstasche führt. Offensichtlich müssen an weiteren Positionen Aminosäuren mit besonderen Eigenschaften bzw. Seitenketten vorliegen, um dem entsprechenden Protein kohlenhydratbindende Eigenschaften zu verleihen. Trotzdem resultiert aus den Untersuchungen auch die besondere Bedeutung von G54, denn dessen Substitution durch Aminosäuren mit polaren Seitenketten mindert die Mannosebindungsfähigkeit auf das charakteristische Niveau des nicht kohlenhydratbindenden aSFP.

2.1.4 Schlussfolgerungen aus den Publikationen 1 bis 3

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Oligomannosylreste dominierende Zuckerliganden für kohlenhydratvermittelte Spermatozoen-Oviduktinteraktionen beim Schwein sind. An ejakulierten porzinen Spermatozoen wurden Mannose-bindungstellen an der akrosomalen Region des Kopfes nachgewiesen, die als Bindungspartner für die exponierten Zuckerliganden des Ovidukts in Frage kommen. Als potentieller Kandidat bei der Spermien-Ovidukt-Interaktion wurde das Spermadhäsin AQN-1 identifiziert. Unter kapazitierenden Bedingungen vermindert sich der Bindungsindex für die Spermien-Oviduktbindung signifikant, begleitet von einem Verlust von Mannosebindung in der lebenden Zellpopulation und einem Verlust von porzinen Spermadhäsin AQN-1. Gleichzeitig werden Galaktose-bindungsstellen am Spermatozoon exponiert. Diese Daten stehen im Einklang mit der Modellvorstellung, dass es im Eileiter zu einer Sequenz von kohlenhydratvermittelten Ereignissen kommt, bei denen zunächst oberflächen-

gebundene Spermienlektine die Interaktion mit dem Oviduktepithel vermitteln, unter Kapazitationsbedingungen verloren gehen und so die Freisetzung vom Epithel unterstützen und in der Folge andere Kohlenhydratbindungsstellen deblockieren, die dann möglicherweise bei der Spermien-Zona-Interaktion involviert sind.

Für die Bindung von AQN-1 an Mannose ist es offensichtlich wichtig, dass es an der Position 54 (Glycin) innerhalb des konservierten 11-Aminosäuren umfassenden Sequenzmotivs zu keiner sterischen Hinderung in der Bindungstasche kommt. Der Austausch von Glycin gegen Serin, Asparagin und Asparaginsäure blockiert die Kohlenhydratbindung vollständig, während der Austausch von Glycin gegen Alanin, Valin und Isoleucin keinen negativen Effekt auf die Bindungseigenschaft des Proteins im Vergleich zum isolierten Protein aus dem Seminalplasma und dem Wildtyp aufwies. Eine sterische Hinderung wie sie vermutlich auch bei der Glykosylierung von Asparagin an der Position 50 durch die großen und flexiblen Zuckerketten in Frage kommt, scheint die wesentliche Ursache für die Bindungshemmung zu sein. Dieser Befund stützt die Annahme, dass Aminosäuren an der Position 54 (Gly54) bedeutsam für die Kohlenhydraterkennungsdomäne (*CRD*) der Spermadhäsine sind.

2.2 Struktur, molekulare Charakterisierung und Evolution von Fibronektin Typ II-Modul Proteinen

Im männlichen Genitaltrakt von Ungulaten existieren zwei Proteingruppen, die sich durch zwei bzw. vier tandemartig angeordnete Fn2-Module auszeichnen. Die Gruppe mit zwei Fn2-Modulen wird als kurze Form und die andere Gruppe mit vier Fn2-Modulen als lange Form der Fn2-Proteine bezeichnet. Während die Funktion der kurzen Proteine beim Rind besonders gut untersucht wurde, ist über die Expression und die Funktion der langen Form wenig bekannt. Bovine kurze Fn2-Proteine (BSP-Familie) zeichnen sich durch ihre phospholipid- und heparinbindenden Eigenschaften aus und sind an der heparinstimulierten Kapazitation der Spermien beteiligt. Während der Ejakulation interagieren mehrere Millionen dieser kleinen (15-30 kDa) sauren Moleküle mit zwei Fn2-Modulen mit den phosphorylcholinhaltigen Phospholipiden der Spermienmembran und sind hiernach an der Spermien-oberfläche nachweisbar. Sie scheinen beim Rind auch an der Etablierung des Spermienreservoirs im Ovidukt beteiligt zu sein.

In den folgenden beiden Publikationen wurden Fn2-Proteine unter besonderer Berücksichtigung funktioneller und struktureller Aspekte beim Pferd sowie evolutionärer Aspekte und Expressionsmuster bei verschiedenen Säugern untersucht.

2.2.1 Strukturelle und molekulare Charakterisierung von equinen spermienbindenden Fibronektin Typ II-Modul Proteinen

(Publikation 4: Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins)

Im Seminalplasma des Hengstes wurden mit SP-1 und SP-2 Heparin- und Phosphorylcholin (PC)-bindende Proteine identifiziert und charakterisiert, die strukturelle Ähnlichkeit mit den BSP-Proteinen des Rindes besitzen. Auch wenn die Art der Interaktionen von SP-1/2 Proteinen mit der Spermienmembran Ähnlichkeiten mit den Wechselwirkungsmustern von BSP-Proteinen aufweisen, ist es denkbar, dass PC-bindende Proteine bei verschiedenen Spezies unterschiedliche biologische

Funktionen während der komplexen Vorgänge der Befruchtung übernehmen. Aus diesem Grund wurden die Fn2-Proteine SP-1 und SP-2 des Hengstes auf den Ebenen der kodierenden Sequenzen, ihrer Expression und molekularen Struktur/Architektur mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Verfahren analysiert.

Mittels cDNA-Klonierung und Sequenzierung wurden aus der Ampulla des equinen Samenleiters SP-1-kodierende Transkripte erhalten. Da ausschließlich identische SP-1-Sequenzen resultierten, wurde hieraus der Schluss gezogen, dass SP-1-Proteine und ihre Isoformen identische Primärsequenzen besitzen und somit von einem Gen kodiert werden. Die Kodierung von SP-2-Proteinen scheint allerdings anders zu sein, denn im Verlauf der Klonierung von SP-2-kodierenden Transkripten wurde neben der kanonischen/beschriebenen Sequenz ein weiteres SP-2-ähnliches Transkript gefunden. Diese Sequenz wurde als SPnew bezeichnet (Genbankeintragung für Variante 1, AJ582013). Zusätzlich wurde ein Transkript gefunden, dessen Leserahmen einen zusätzlichen C-terminalen Aminosäureabschnitt besitzt (Genbankeintragung für Variante 2, AJ562014). Auf der Basis divergierender SP-2-Sequenzen wird für die Kodierung von equinen SP-2-Proteinen das Vorliegen einer Genfamilie, die mindestens zwei Gene umfasst, angenommen.

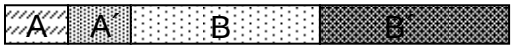
Ob diese Transkripte auch in translatierte Genprodukte überführt werden, war unklar. Aus diesem Grund wurden Fn2-Isoformen der SP-1-und SP-2-Proteine über etablierte Aufreinigungsverfahren, PC-Affinitätschromatographie der heparin-bindenden Fraktion des equinen Seminalplasmas, isoliert und nachfolgend proteinbiochemisch charakterisiert sowie mit massenspektrometrischen Verfahren analysiert. Während der Auftrennung der PC-bindenden Proteine über RP-HPLC resultierten vier Proteinfraktionen (P1-P4). Analysen der Proteinfraktionen P1 und P2 mittels SDS-PAGE ergaben singuläre Proteinbanden mit Molekülmassen von ca. 18 kDa. Mit dem gleichen Verfahren wurde für die Proteinfraktion P4 ein Protein mit einer Molekülmasse von ca. 14 kDa erhalten. Die Proteinfraktion P3 hingegen schien ein Proteingemisch zu sein und wurde deswegen nicht weiter analysiert.

Die mit diesen Verfahren durchgeführte qualitative und quantitative Analyse von Fn2-Proteinen des Seminalplasmas ergab keine Hinweise auf das Vorliegen größerer Mengen an SPnew-Proteinen, sodass es derzeit unklar ist, ob SPnew in dem Ausgangsmaterial in detektierbaren Mengen exprimiert wird.

Massenspektrometrische Untersuchungen (Maldi-ToF-MS) der Proteinfraktionen (P1, P2 und P4) vor und nach der chemischen Desialysierung bestätigten frühere Befunde, dass die Proteine P1, P2 und P4 in der Tat „saure Glykoproteine“ sind. Für die Proteinfraktion P1 wurde massenspektrometrisch eine mittlere Größe von m/z 16.500 ermittelt. Nach Desialysierung spaltete sich diese Ausgangsfraktion in Subfraktionen mit Größen von m/z 15,370 und m/z 15,660 auf. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Sialsäure eine Molekülmasse von ca. 300 Da aufweist, kann auf das Vorliegen von vier sialysierten Strukturen in der Ausgangsfraktion geschlossen werden. Diese Daten stimmen mit der berechneten Molekülmasse für die Struktur des reifen SP-1-Proteins überein, das als Polypeptid (13,905 Da) mit vier sialysierten O-gebundenen Gal-GalNAc Disaccharidketten (m/z 16,500) vorliegt. Zusätzlich existieren auch Formen mit nur einem (m/z 15,660) oder ohne N-Acetylneuraminsäurerest (m/z 15,370).

Für P2 wurde eine mittlere Molekülmasse von m/z 15,900 gemessen. Die chemische Abspaltung von Sialsäure ergab eine Proteinfraktion mit einer Molekülmasse von m/z 15,010. Dies reflektiert das Vorliegen von drei N-Acetylneuraminsäureresten, die an drei Gal-GalNAc Disaccharidketten (3 x 365 Da) gebunden sind. Interessanterweise resultiert nach der Subtraktion der Glykanmassen von m/z 15,010 eine Molekülmasse von m/z 13,912, die mit der Größe der Primärstruktur von SP-1 nahezu identisch ist. Die massenspektrometrische Analyse von P4 ergab ein Signal bei m/z 13,820 und nach der Desialysierung ein Signal bei m/z 13,290. Aus der Massendifferenz zwischen dem unbehandelten und desialysierten Protein konnte auf das Vorhandensein von zwei N-Acetylneuraminsäureresten geschlossen werden. Eine weitere Charakterisierung war mit diesem methodischen Ansatz nicht möglich.

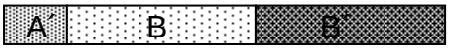
AA´BB´-Typ



A A´

SP-1 cDNA DLQTTGADHSATKVNPDQQLIMTKHSATVTPENKCVFPFNYR
SP-1 DLQTXGADHSAXKVNPDQQLIMXKHSAXVTPENKCVFPFNYR
P1 DLQTX
P2 DLQMT

A´BB´-Typ



A´

SP-2new cDNA DQQQIVNDHSSTRKPDNKCVFPFKYQ
SP-2 $D^{M}_{Q}QPIAXD^{H}_{L}SPX^{R}_{M}KPD^{N}_{Y}KC^{V}_{A}FPF^{N}_{Y}Y^{Q}_{R}$
P4 $D^{M}_{K}QPI$

Abb. 5: Schematischer Strukturaufbau von Fn2-Proteinen und N-terminalen Aminosäuresequenzabschnitten von equinen Fn2-Proteinen.

Die N-terminalen Verlängerungen der Fn2-Proteine sind mit A und A´ bezeichnet, und die Fn2-Domänenstrukturen sind mit B und B´ gekennzeichnet. Der N-terminale Aminosäuresequenzabschnitt von P2 weist eine hohe Sequenzübereinstimmung mit den korrespondierenden Sequenzen von SP-1 bzw. P1 (AA´BB´-Typ) auf, während der N-terminale Aminosäuresequenzabschnitt von P4 mit dem von SP-2 (A´BB´-Typ) übereinstimmt. P2 und P4 stellen Isoformen von SP-1 bzw. SP-2 dar. Die Sequenzen von SP-1 cDNA und SP-2new cDNA wurden aus cDNA-Sequenzen abgeleitet (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005b), hingegen wurden die SP-1- und SP-2-Sequenzen durch klassische Sequenzierung (Edman-Abbau) generiert (CALVETE et al. 1995b). Die Sequenzen von SP-1 cDNA (Accession-Nr. AJ582012), SP-1 (Accession-Nr. P81121, CALVETE et al. 1995b), SP-2 (CALVETE et al. 1995b), SP-2new cDNA (Accession-Nr. AJ582013) liegen in der Genbank vor. $^{M}_{Q}$, $^{H}_{L}$, $^{R}_{M}$, $^{N}_{Y}$, $^{V}_{A}$, $^{N}_{Y}$, $^{Q}_{R}$, $^{M}_{K}$: An den entsprechenden Positionen resultierten während der Sequenzierung nicht differenzierbare Mengen der angegebenen Aminosäuren. „X“ = nicht identifizierbare Aminosäure.

Bei der N-terminalen Sequenzierung von P4 wurde mit $D^{M}_{K}QPI$ (A´BB´-Typ) ein heterogenes Motiv identifiziert, das große Übereinstimmung mit der N-terminalen Sequenz von SP-2, $D^{M}_{Q}QPI$ (A´BB´-Typ), aufweist (CALVETE et al. 1995b). Bei P4 liegen an der Position 2 die Aminosäuren Methionin bzw. Lysin in äquimolaren Mengen vor. Daraus resultiert, dass P4 der Proteinfamilie SP-2 mit zwei O-Glykosylierungsstellen in dem einzigen Modul-A´ zuzurechnen ist (Abb. 5).

Im Genitaltrakt des Hengstes wurde mit EQ-12 (equines ELSPBP1, Epididymales Spermien-Bindendes Protein 1, gemäß der Nomenklatur der „*Human Genome Organization*“) ein Vertreter der langen Fn2-Proteine mit vier seriellen Fn2-Modulen identifiziert. Für dieses Protein und für die SP-1/2-Proteine wurden Expressionsstudien auf der Ebene der Transkripte (Northernblotanalyse und RT-PCR) und der Ebene der translatierten Genprodukte (Westernblotanalysen) aus verschiedenen Regionen des männlichen equinen Genitaltrakts vorgenommen. Equine ELSPBP1 (eqELSPBP1)-Transkripte wurden mittels Northern-Hybridisierung nur im Nebenhodenkörper und -schwanz nachgewiesen, während SP-spezifische Transkripte mit der gleichen Analytik vorwiegend in der Ampulla des Samenleiters und in sehr geringen Mengen im Nebenhodenschwanz beobachtet wurden. Mit dem sensitiveren RT-PCR Verfahren wurden SP-1-kodierende Sequenzen in allen Regionen des Nebenhodens gefunden, wobei im Nebenhodenkopf äußerst geringe Mengen vorhanden waren. In der Samenblase wurden ebenfalls nur geringe Mengen gefunden, während größere Transkriptmengen in der Samenleiterampulle vorlagen.

Um zu klären, ob die Transkripte auch in stabile Translationsprodukte überführt werden, wurden aus den verschiedenen Kompartimenten des männlichen Genitaltraktes Proteine (TBS und Chaps-Extrakte) extrahiert und Westernblot-analysen unter Verwendung des SP-1/2-Antikörpers und des CE12-Antipeptid-Antikörpers durchgeführt. Der CE12-Antipeptid-Antikörper ist gegen den Aminosäurebereich 142–161 von CE12 des Hundes (20-mer Oligopeptid, NH_2-SSFDENQQWKYCETNEYGGN-COOH, Accession-Nr. AJ278477) gerichtet. Dieses Peptid ist bei langen Fn2-Proteinen konserviert und liegt ebenfalls im equinen Fn2-Protein, eqELSPBP1, vor. Mit dem SP-1/2-Antikörper wurden in der Ampulla zwei Proteine mit 18 kDa und 14 kDa dargestellt, die höchstwahrscheinlich die beiden Proteine SP-1 und SP-2 repräsentieren. Im Nebenhoden wurden ein Protein mit 30 kDa sowie ein in sehr geringer Menge vorliegendes Protein von 18 kDa detektiert. Mit dem monospezifischen CE12-Antipeptid-Antikörper wurde in den Westernblotanalysen lediglich eine Reaktivität mit dem 30 kDa-Protein des Nebenhodens beobachtet, was höchstwahrscheinlich dem equinen Fn2-Protein mit vier Modulen (eqELSPBP1) entspricht. Diese Analysen verdeutlichen, dass der

SP-1/2-Antikörper sowohl die Fn2-Proteine der SP-1- und SP-2-Familie mit zwei Modulen als auch Fn2-Proteine mit vier Modulen detektiert. Damit stellt der SP-1/2-Antikörper ein essentielles Reagenz für den Nachweis von equinen Fn2-Proteinen dar.

Immunhistologische Untersuchungen des männlichen Genitaltraktes des Hengstes unter Verwendung des SP-1/2-Antikörpers zeigten starke Reaktionen im Zytoplasma von Hauptzellen und in der apikalen Epitheloberfläche entlang des gesamten epididymalen Bereichs sowie in der Samenleiterampulle. Die Basalzellen hingegen wiesen keine Reaktivität auf. Im Epithel der Samenblase wurden nur vereinzelt Bereiche mit geringer Expression von Fn2-Proteinen beobachtet. Interessanterweise wurde mittels Immunhistologie eine ausgeprägte Expression im Nebenhodenkopf beobachtet. Dieser Befund steht jedoch nicht im Einklang mit Ergebnissen, die aus RT-PCR und Westernblotstudien resultierten. Hierbei wurde lediglich eine schwache bzw. keine Expression beobachtet. Ob es sich um eine Kreuzreaktion mit Fn2-ähnlichen Proteinen handelt, kann derzeit nicht beantwortet werden. Möglicherweise existieren noch weitere unbekannte Fn2-Proteine, die anders als SP-1/2 und eqELSPBP1 in Nebenhodenkopf exprimiert werden.

Die Bindung von Fn2-Proteinen an Spermatozoen wurde über Immunfluoreszenz mit dem SP-1/2 Antikörper untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Spermien aus dem Hoden und Nebenhodenkopf noch keine Fn2-Proteine gebunden haben. Geringe Mengen an Fn2-Proteinen wurden erstmalig auf Spermien des Nebenhodenkörpers im Bereich des Postakrosoms und Mittelstücks beobachtet. Die Zunahme an Färbeintensität bei Spermien aus dem Nebenhodenschwanz reflektierte eine Zunahme der Bindung von Fn2-Proteinen in diesem Abschnitt. Dieses Bindungsmuster wurde auch bei ejakulierten Spermien gefunden, wobei ejakulierte Spermien noch größere Mengen an gebundenen Proteinen aufweisen. Mittels Westernblotanalysen mit dem SP-1/2 Antikörper und dem CE12-Antipeptid-Antikörper wurden in Proteinextrakten ejakulierter Spermien Fn2-Proteine mit zwei und vier Fn2-Modulen gefunden. Sie stehen im Einklang mit den Befunden nach Immunfluoreszenz. Der Nachweis des 30 kDa Fn2-Proteins (eqELSPBP1) bei

ejakulierten Spermien passt zu der Vorstellung, dass dieses Protein während der Nebenhodenpassage an die Spermien gebunden wird, während die Verstärkung des Fluoreszenzsignals nach Ejakulation auf die Assoziation der kurzen Fn2-Proteine (SP-1/2) zurückzuführen ist.

Die Bindung an Phosphorylcholin ist eine charakteristische Eigenschaft der bovinen kurzen Fn2-Proteine (BSP-A1/2). Es sollte geklärt werden, ob die orthologen equinen Fn2-Proteine und die equine Fn2-Proteinfamilie mit vier Modulen ebenfalls PC-bindende Eigenschaften besitzen. Um diese Frage zu beantworten, wurden PC-bindende Proteine mittels PC-Affinitätschromatographie aus Spermien des Nebenhodens und aus ejakulierten Spermatozoen isoliert und mit SP-1/2-Antikörper sowie CE12-Antipeptid-Antikörper im Westernblot analysiert. Mit diesem Ansatz wurde das Vorliegen von kurzen SP-1/2- und langen eqELSPBP1-Proteinen in den PC-bindenden Proteinfraktionen nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die equinen Fn2-Proteine zumindest hinsichtlich ihrer PC-Bindungseigenschaft ähnliche Strukturmotive besitzen müssen. Aufgrund seiner PC-Bindungseigenschaft gehört eqELSPBP1 somit auch zur Gruppe der lipidbindenden Proteine des equinen männlichen Genitaltrakts.

2.2.2 Speziesübergreifende Untersuchungen zur Genomorganisation, Expression und Funktion spermienbindender Fibronektin Typ II-Modul Proteine

(Publikation 5: Sperm-binding fibronectin type-II-module proteins are genetically linked and functionally related)

Fibronektin Typ II (Fn2)-Modul Proteine des männlichen Genitaltrakts zeichnen sich durch das Vorliegen von Fn2-Modulen aus. Dabei besitzen die meisten Proteine mit diesem charakteristischen Sequenzmotiv entweder zwei oder vier Fn2-Module. Nur wenige Varianten zeichnen sich durch den Besitz von drei Fn2-Modulen aus. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden Fragen zur Expression, biologischen Rolle und Evolution von Fn2-Modul Proteinen modellhaft für die porzinen Proteine pB1 (zwei Fn2-Module) und ELSPBP1-homologes Protein (vier Fn2-Module) bearbeitet. Erfolgt die Expression der entsprechenden Gene im männlichen Genitaltrakt

speziesspezifisch oder wurden expressionsregulierende Mechanismen speziesübergreifend konserviert und bilden die korrespondierenden Gene im Genom syntene Komplexe?

Die Untersuchungen zur Expression von *pB1* und *ELSPBP1-Homolog* wurden zunächst auf der Ebene der Transkripte mittels Northernblot durchgeführt. Dabei wurden pB1-Transkripte ausschließlich im Nebenhodenschwanz gefunden. Weder in anderen Regionen des Nebenhodens noch in Geweben des männlichen Genitaltrakts wurden mit diesem Detektionsverfahren pB1-Transkripte nachgewiesen. Demgegenüber wurden ELSPBP1-homologe Transkripte nur in Geweben des Nebenhodenkopfes beobachtet und nicht in Geweben außerhalb des Nebenhodenkörpers. Die Expression dieser beiden Gene scheint unter einer androgenen Kontrolle zu stehen, denn bei jungen und präpuberalen Tieren liegen lediglich sehr geringe Transkriptmengen vor. Gestützt wird diese Annahme durch Untersuchungen an kastrierten Schweinen. In den entsprechenden Nebenhoden-geweben ist keine Expression von *pB1* und *ELSPBP1-Homolog* nachweisbar. Erst mit der Applikation von Testosteron wurde die Expression dieser beiden Gene induziert. Bei der Maus wurden pB1-verwandte Transkripte im Nebenhodenkopf und -schwanz und somit in homologen Geweben wie beim Schwein beobachtet. Diese Expressionsmuster sprechen dafür, dass die Mechanismen zur Regulation der Expression von pB1 und seinen Homologen über die Speziesgrenze hinweg zumindest teilweise konserviert wurden.

Die Translationsprodukte der humanen und porzinen ELSPBP1 Gene wurden biochemisch analysiert und charakterisiert. Der CE12-Antipeptid-Antikörper (SAALMANN et al. 2001; EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005b) wurde für die Untersuchungen verwendet. Das von diesem Antikörper detektierte Sequenzmotiv liegt sowohl im humanen ELSPBP1 als auch in der porzinen ELSPBP1-Isoform a vor. Mit Westernblotstudien wurden in Proteinextrakten von humanen und porzinen Spermien Proteine mit 30 kDa (Mensch) bzw. 25 kDa (Schwein) dargestellt. Es wurde vermutet, dass die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität der ELSPBP1-Proteine Ausdruck unterschiedlicher, speziesspezifischer post-

translationaler Modifikationen sind. Um dies zu überprüfen, wurden zweidimensionale Elektrophoresen und anschließende Westernblotanalysen des humanen ELSPBP1 vorgenommen. Daraus resultierte ein typisches Glykosylierungsmuster aus mehreren sauren ELSPBP1-Glykoformen, deren Isoelektrische Punkte (pI) zwischen 4,5 und 6,2 liegen. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde mit dieser Feinanalytik auch für Nebenhodenflüssigkeit und Seminalplasma des Menschen beobachtet. Der errechnete pI-Wert (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) von humanen ELSPBP1 liegt bei ~6,9. Die enzymatische Abspaltung von N-Glykosylierungen mit PNGase F führte zur Reduktion der Molekülmasse des ELSPBP1-Proteins von ~30 kDa auf ~27 kDa und zu einer pI-Verschiebung auf einen dominanten Spot bei ~6,7. Das porzine ELSPBP1-Protein scheint keine N-Glykosylierungen zu besitzen, denn nach Inkubation mit PNGase F wurde keine Änderung in der elektrophoretischen Mobilität des Proteins beobachtet. Diese Daten verdeutlichen, dass das humane ELSPBP1-Protein als saures Glykoprotein vorliegt, während das porzine ELSPBP1-Protein keine N-gebundenen Glykane enthält.

Um die PC-Bindungseigenschaft des porzinen ELSPBP1 zu untersuchen, wurde das Protein mittels PC-Affinitätschromatographie aus ejakulierten Spermien isoliert und über RP-HPLC gereinigt. Dessen Nachweis erfolgte mittels Westernblot unter Verwendung des CE12-Antipeptid-Antikörpers. Das porzine ELSPBP1 wurde über RP-HPLC der PC-bindenden Fraktion bei 42,5% Acetonitril eluiert und mittels Dotblotanalyse identifiziert. Die massenspektrometrische Analyse (Maldi-Tof-MS) der entsprechenden Fraktion ergab ein Signal von m/z 23,700, das mit der berechneten molekularen Masse des nativen Proteins, Variante a, übereinstimmte. N-terminale Sequenzierungen (Edman Degradation) der immunreaktiven Fraktion bestätigten das Vorliegen (Asp^{26}-Thr-Lys-Thr^{29}) des nativen Proteins.

Aus dem porzinen Seminalplasma wurde bereits pB1, ein weiterer Vertreter der Fn2-Proteine mit zwei Modulen, isoliert. Dieses Protein kann ähnlich wie BSP-Proteine eine feste Bindung mit Phospholipiden der Plasmamembran ejakulierter Spermien eingehen und besitzt ebenfalls Heparinbindungseigenschaften

(CALVETE et al. 1997b). Ein wesentlicher Erkenntniszugewinn auf genetischer Ebene resultierte aus der Identifizierung von *ELSPBP1* im porzinen Genom (SCHÄFER et al. 2003). Bevor die Untersuchungen zur Lokalisation des ELSPBP1-Proteins auf der Spermienoberfläche vorgenommen wurden, erfolgte eine Überprüfung zur Spezifität des CE12-Antipeptid-Antikörpers, der für den Nachweis von ELSPBP1 zur Anwendung gelangte. Proteinextrakte ejakulierter porziner Spermien wurden im Westernblot mit dem CE12-Antipeptid-Antikörper analysiert. Dabei zeigte der CE12-Antipeptid-Antikörper nur eine Reaktivität mit ELSPBP1 aber nicht mit pB1. Da in diesem Versuchsansatz keine Kreuzreaktivität mit pB1 beobachtet wurde, konnte der Antipeptid-Antikörper für die Lokalisation von ELSPBP1 auf Spermien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

Immunzytologisch war ELSPBP1 weder auf Spermien des Nebenhodenkopfes und -schwanzes, noch auf ejakulierten Spermien nachweisbar. Demgegenüber standen Daten, die mit dem Westernblotverfahren generiert wurden, denn in SDS-Proteinextrakten aus Nebenhodenschwanzspermien und Chaps-Proteinextrakten aus ejakulierten Spermien wurde ELSPBP1 unter Verwendung des CE12-Antipeptid-Antikörpers detektiert. Das Problem der diskrepanten Befunde konnte in weiteren Experimenten gelöst werden, denn unter Kapazitationsbedingungen konnte ELSPBP1 nach einer 15-minütigen Inkubation der porzinen Spermien im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes nachgewiesen werden. Offensichtlich waren die antigenen Strukturen vor der Kapazitation „blockiert“ und wurden erst durch die kapazitierenden Prozesse zugänglich. Bei humanen ejakulierten Spermatozoen wurde ELSPBP1 überwiegend im Mittelstück der Spermien lokalisiert. Der Modus der ELSPBP1-Bindung bei humanen Spermien scheint dabei vergleichbar zu sein mit der porzinen ELSPBP1-Bindung am Spermienkopf. „Waschprozesse“ porziner und humaner Ejakulatspermien mit salzhaltigen Medien und nachfolgende Analysen extrahierter Proteine mittels Westernblot ergaben keine signifikanten Differenzen in den Proteinmengen. Hieraus resultiert, dass das humane und porzine ELSPBP1 ähnlich wie das equine ELSPBP1 über Phospholipide an die Spermatozoenmembran bindet.

Um die Frage nach der chromosomalen Lokalisation von pB1 und ELSPBP1-Homolog beantworten zu können, wurden sog. FISH-Analysen (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) durchgeführt. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte molekulare DNA-Sonden (pB1 und ELSPBP1-Homolog) mit porzinen Chromosomen hybridisiert, woraus die chromosomalen Lokalisationen der Fn2-Modul-kodierenden Sequenzen resultierten. Dieser experimentelle Ansatz wurde notwendig, weil noch keine vollständige Sequenz des porzinen Genoms verfügbar war. Die Gene für pB1 und ELSPBP1-Homolog sind benachbart und kartieren auf dem porzinen Chromosom 6 im Bereich 6q11–q12. Beim Menschen kartieren die homologen Sequenzen, ebenfalls benachbart, auf dem Chromosom 19, aber die kurzen Fn2-Proteine werden nicht exprimiert. Bei der Maus wurden pB1-verwandte Sequenzen auf Chromosom 7 gefunden. Obwohl im Genom der Maus und auch der Ratte ELSPBP1-verwandte Sequenzen offensichtlich fehlen, sind die chromosomalen Strukturen in der unmittelbaren Umgebung von pB1-ähnlichen Sequenzen bei Maus und Mensch konserviert. Möglicherweise liegt eine Syntenie vor. Der teilweise Erhalt dieser Gene in benachbarter Anordnung auf den verschiedenen Chromosomen von Mensch, Schwein und Maus reflektiert höchstwahrscheinlich die speziesübergreifende Bedeutung der Gene und ihrer Genprodukte während der Befruchtung.

Die Untersuchungen lieferten neben Genomstruktur und chromosomaler Lokalisation der Gene neue Erkenntnisse über Fn2-Modul Proteine bei Nutztieren und reflektieren darüber hinaus Aspekte zur Evolution von Genen, die für Proteine mit zwei bzw. vier Fn2-Modulen kodieren. Möglicherweise werden die beiden Gruppen von Fn2-Modul Proteinen durch paraloge Gene kodiert und sind durch den Besitz ähnlicher Module strukturell und funktionell verwandt. Damit einher gehen Vermutungen über eine ähnliche Genstruktur, ähnliche Regulationsmechanismen und möglicherweise die Existenz von direkt benachbarten Genen („*Gencluster*“) im Genom. Es ist durchaus vorstellbar, dass diese Module sich unter positivem Selektionsdruck rasch entwickelten, um möglichst neue Funktionen zu erwerben. Beide Proteingruppen sind in der Säugerevolution vermutlich durch wiederholte Genduplikationen auseinander hervorgegangen, wobei sich in den größeren Proteinen mit (1)Fn2-(2)Fn2-(3)Fn2-(4)Fn2-Modulstruktur die Sequenzen und damit verbunden

auch die Funktionen des (1)Fn2-(2)Fn2-Modulpaares der kleineren Proteine (BSP-A1/2 und pB1) wiederfinden. Modulpaare, die aus (3)Fn2-(4)Fn2 zusammengesetzt sind, zeigen keine Ähnlichkeit zu Proteinen mit dem Modulpaar (1)Fn2-(2)Fn2, sondern weisen Ähnlichkeiten zu Fn2-Modulen der Matrix-Metalloproteinasen, Faktor XII oder Gelatinasen auf. Dies spricht für eine Mobilität der entsprechenden kodierenden Exons im Genom und die Entwicklung des ELSPBP1 Gene durch das sog. „*Exon-Shuffling*“ (PATTHY 1999).

2.2.3 Schlussfolgerungen aus den Publikationen 4 und 5

Bei Ungulaten wurde die regionalisierte Expression von kurzen und langen Vertretern der Fn2-Proteinfamilie nachgewiesen. Als Hauptsyntheseort der kurzen Proteine mit zwei Fn2-Modulen wurde die Samenleiterampulle identifiziert. Demgegenüber wird das lange Fn2-Protein mit vier Fn2-Modulen nur im Nebenhoden produziert. Beim Menschen wird nur das lange Fn2-Protein exprimiert, während bei Maus und Ratte nur das kurze Fn2-Protein synthetisiert wird. Dies zeigt, dass die kurzen und langen Fn2-Typ-Proteine innerhalb des männlichen Reproduktionstrakts nicht nur bei Ungulaten, sondern höchstwahrscheinlich bei allen Säugern unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Beim Pferd resultierte aus molekularbiologischen und proteinchemischen Untersuchungen, dass die kurzen Fn2-Proteine vom A´BB´-Typ von einer SP-2-Genfamilie stammen, demgegenüber werden AA´BB´-Typ-Proteine von einem SP-1-Gen codiert. Sowohl Vertreter der langen als auch der kurzen Fn2-Proteine besitzen PC-Bindungsstellen und können bedingt durch die verschiedenen Syntheseorte nur in den entsprechenden Bereichen bzw. während der Ejakulation eine feste Bindung mit der Spermienoberfläche eingehen.

Die dreidimensionale Struktur von langen Fn2-Proteinen liegt noch nicht vor. Beim Rind ist die Kristallstruktur von BSP-A1/2 (Fn2-Protein mit zwei Modulen) als PC-gebundener Komplex aufgeklärt (WAH et al. 2002). Somit steht ein Strukturmodell für den Bindungsmodus der spermienbindenden Fn2-Modul Proteine zur Verfügung. Hiernach führt der Kontakt mit Lipiden zu einem Übergang der BSP-A1/2 Multimere in Homodimere, wobei die Cholinbindungsstellen der beiden Fn2-Module der beiden Monomere in einer besonderen Orientierung auf einer Seite

des Moleküls angeordnet werden. Die an der PC-Bindung beteiligten Aminosäuren von BSP-A1/2 in den Modulen 1 und 2 befinden sich bei equinen SP-1 und SPnew an homologen Positionen und reflektieren die Konservierung von Sequenzstrukturen für die PC-Bindungstasche. Hierzu zählen die an der Formierung von Disulfidbrücken beteiligten invarianten Cysteine sowie Trp47, Tyr30 und Tyr54 in (1)Fn2-Modul und Trp106, Tyr75 und Tyr100 in (2)Fn2-Modul von Monomer A sowie Trp93 und Tyr108 von Monomer B (Abb. 6). Die Bindung des Proteins mit Lipiden erfolgt im Wesentlichen über eine Kation-π-abhängige Interaktion zwischen dem Indolring der invarianten Aminosäure Tryptophan in den Fn2-Domänen sowie Wasserstoff-brückenbindungen exponierter Tyrosinreste und der quaternären Aminogruppe des Cholins. Der Sequenzvergleich der (1) und (2)Fn2-Module der humanen und porzinen sowie equinen ELSPBP1 Proteine mit bovinen BSP-A1/2 Proteinen verdeutlicht das Vorliegen konservierter Aminosäuren, die in die Phospholipidbindung involviert sind (Abb. 6). Dies impliziert, dass die experimentell dokumentierte PC-Bindung der kurzen und langen Fn2-Proteinfamilien über einen vergleichbaren Mechanismus erfolgt. Unter Einbeziehung der molekularen Struktur von BSP-A1/2 (http://Swissmodel.expasy.org) werden für die (1) und (2)Fn2-Module des humanen und porzinen sowie equinen ELSPBP1 vergleichbare topologische Anordnungen von Sekundärstrukturelementen angenommen.

Beim humanen, porzinen und equinen ELSPBP1 ist die Aminosäure Tyrosin an der Position 100 durch Phenylalanin (F) ersetzt, außerdem liegt im humanen ELSPBP1 an Position 108 ebenfalls Phenylalanin vor. Hierdurch können die an diesen Positionen vorhandenen Phenylalanine nicht zu Wasserstoffbindungen beitragen. Die höchstwahrscheinlich sehr ähnlichen dreidimensionalen Strukturen der beiden ersten Domänen und die Konservierung der an der Lipidbindung beteiligten Tryptophanreste reflektieren eine ähnliche Architektur der Cholinbindungstasche der speziesspezifischen ELSPBP1-Proteine. Der Nachweis von ELSPBP1 auf den humanen Spermien nach intensivem Waschen mit salzhaltigen Medien deutet auf einen cholinvermittelten Mechanismus bei der Bindung auf der Spermienoberfläche hin.

```
(1)Fn2-Modul            30                  47      54
                        ➡   ➡               ➡           ➡
BSP-A1/2        CVFPFVYRNRKHFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGRWKYCAQRDYAK
pB-1            CVFPFIYKGNLYFDCTLHDSTYYWCSVTTYYMKRWRYCRSTDYAR
SP-1            CVFPFNYRGYRYYDCTRTDSFYRWCSLTGTYSGSWKYCAATDYAK
SP-2new         CVFPFKYQGRQYYDCTRTDSFHRWCSLTENYSGKWRYCWAEDYAK
                        ⇨   ⇨               ⇨           ⇨
huELSPBP1       CVFPFTYKGSVYFTCTHIHSLSPWCATRAVYNGQWKYCQSEDYPR
ssELSPBP1       CVFPFNYKGFTYFSCTRTNSLSPWCATRAVYDGQWKYCLIEDYPR
eqELSPBP1       CVFPFVYKGSSYFSCTKTNSFFPWCATRAIYDRQWKNCLTEDYPR

(2)Fn2-Modul            75                  93      100     106 108
                        ➡   ➡               ➡           ➡
BSP-A1/2        CVFPFIYGGKKYETCTKIGSMWM-SWCSLSPNYDKDRAWKYC
pB-1            CALPFIFRGKEYDSCIKEGSVFSKYWCPVTPNYDQDRAWRYC
SP-1            CAFPFVYRGQTYDRCTTDGSLFRISWCSVTPNYDHHGAWKYC
SP-2new         CFFPFVYRGRTYHTCTTDGSFFLIPWCSVTPNYDRDGGWKYC
                        ⇨   ⇨               ⇨           ⇨
huELSPBP1       CIFPFIYRGKAYNSCISQGSFLGSLWCSVTSVFDEKQQWKFC
ssELSPBP1       CVFPFIYRGRSHRNCIVEGSFFGKLWCSVTSSFDEKQQWKYC
eqELSPBP1       CIFPFIYRGKSHDNCITEGSFFGKLWCSVTSSFDEKQQWKYC
```

Abb. 6: Konservierte Aminosäuren und kurze Sequenzabschnitte der (1) und (2)Fn2-Module des bovinen Fn2-Proteins, der equinen und porzinen Fn2-Proteine sowie des humanen Fn2-Proteins.

Die konservierten an der PC-Bindung beteiligten Aminosäuren Tyrosin (Y) und Tryptophan (W) sind grau unterlegt (WAH et al. 2002). Die weißen und grauen Pfeile kennzeichnen die Lokalisation von Sekundärstrukturelementen (WAH et al. 2002). Der Bindestrich (-) wurde als Längenausgleich eingefügt, um einen Vergleich der unterschiedlich langen Sequenzen zu ermöglichen. Die Sequenzen von BSP-A1/2 (bovines Fn2-Protein, Accession-Nr. NP_001001145 bzw. M22244), SP-1 (equines Fn2-Protein, Accession-Nr. AJ582012), SP-2new (equines Fn2-Protein, Accession-Nr. AJ582013), pB1 (porzines Fn2-Protein, Accession-Nr. AF047026 bzw. NP_998997), eqELSPBP1 (equines ELSPBP1, Accession-Nr. XP_001488617), ssELSPBP1 (*sus scrofa* bzw. porzines ELSPBP1, Accession-Nr. NM_214404) und huELSPBP1 (humanes ELSPBP1, Accession-Nr. NP_071425) liegen in der Genbank vor.

Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden ersten Fn2-Module der ELSPBP1-Proteine mit Fn2-Modulen der kurzen Proteine deutet darauf hin, dass die gemeinsame Eigenschaft dieser Proteine über N-terminale Bereiche dieser Moleküle vermittelt wird. Dies drückt sich bereits in der Spermienbindung beider Proteingruppen aus, die auf einer Interaktion mit den Phospholipiden der Spermienmembran beruht. Es wird spekuliert, dass die ELSPBP1-Proteine mit vier Fn2-Modulen die gemeinsamen Funktionen mit zwei Fn2-Modul Proteinen mittels ihrer neuen Module verstärken oder

aber zusätzliche bzw. ganz neue Funktionen hinzugewinnen könnten. Die funktionellen und strukturellen Verwandtschaftsbeziehungen der beiden ersten Fn2-Module von kurzen und langen spermienbindenden Proteinen werden durch eine phylogenetische Stammbaumanalyse gestützt. Darüber hinaus haben die genetischen Untersuchungen gezeigt, dass die kodierenden Gene für beide Fn2-Proteinklassen höchstwahrscheinlich durch Duplikationsereignisse aus einem gemeinsamen (Vorläufer-)Gen hervorgegangen sind.

Die androgenabhängige posttestikuläre Genexpression stellt eine weitere gemeinsame, hoch konservierte Eigenschaft dieser Proteine dar, während die Unterschiede in den regional regulierten Expressionsmustern entlang des Nebenhodens und distalen Bereichs des männlichen Genitaltraktes die differentiell koordinierte Bindung von kurzen und langen Fn2-Proteinen an Spermien widerspiegeln. Andererseits reflektieren die speziesspezifische Bindung von Fn2-Proteinen an unterschiedliche Bereiche der Spermienoberfläche sowie die beobachteten strukturellen Unterschiede zwischen diesen Proteinen die charakteristische speziesabhängige Bedeutung dieser Moleküle bei der Genese der männlichen Gameten.

3. Diskussion

Das Interesse an sekretorischen Proteinen des männlichen und weiblichen Genitaltrakts nahm in den letzten Jahren wegen ihrer herausragenden Bedeutung für die sexuelle Fortpflanzung stetig zu. Genitaltraktproteine determinieren die Eigenschaften und Funktionen der beiden morphologisch sehr unterschiedlichen Gameten und tragen wesentlich zur Effektivität des räumlich und zeitlich gut aufeinander abgestimmten, komplizierten Befruchtungsvorgangs bei. Dabei wird die Funktionalität dieser Proteine überwiegend durch ihre räumliche Struktur/Anordnung festgelegt. Sie resultiert aus der enormen kombinatorischen Vielfalt der verwendeten Aminosäurenreste in der Primärstruktur, posttranslationalen Modifikationen (z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Prozessierung etc.), sowie der Tatsache, dass diese Proteine in Abhängigkeit ihrer Konformation sehr unterschiedliche Strukturen und Funktionen übernehmen können. Diese Vielfältigkeit führt in der Summe zur Kommunikation mit anderen Biomolekülen, so dass verschiedene Signale aufgenommen und weitergeleitet werden.

Trotz der funktionellen Vielseitigkeit dieser Biomoleküle „arbeiten“ die individuellen Proteine mit hoher Präzision an ihren jeweiligen spezifischen Aufgaben, die in der Summe zur Befruchtung der Eizelle führen. Viele Studien zur Analyse der Funktion von Genitaltraktproteinen und der produzierten Sekretproteine wurden bei plazentaren Säugern, insbesondere bei Nagern und Lagomorphen, durchgeführt. Untersuchungen auf der Ebene der kodierenden Sequenzen und somit auf der Ebene des genetischen Materials wurden eher in geringem Umfang vorgenommen, da neben der Identifizierung und Charakterisierung von Genitaltraktproteinen die Analyse der Funktionen im Vordergrund stand. Mit der Sequenzierung von Genomen phylogenetisch unterschiedlicher Vertreter des Organismenreichs konnten nun aber zusätzlich Fragen nach der Expression, Struktur, Funktion, Homologie, Orthologie und insbesondere Evolution bearbeitet werden. Sie münden in ein deutlich vertieftes Verständnis der komplexen physiologischen Abläufe des Befruchtungsvorgangs sowie der Regulation und Expression dieser Proteine innerhalb der Organismen. Nachfolgend werden diese verschiedenen Aspekte diskutiert.

3.1 Evolution von Reproduktionsgenen

Sequenzvergleichsstudien haben ergeben, dass die an Reproduktionsvorgängen beteiligten Gene bzw. Genprodukte wesentlich divergenter sind als exprimierte Sequenzen/Gene in anderen Organen bzw. Geweben. Wegen der besonderen Wechselwirkungen und Interaktionen von reproduktionsrelevanten Zielstrukturen unterliegen diese Gene offensichtlich ganz anderen evolutionären Kräften. Entsprechend sind phylogenetische Studien dieser Gene von besonderer Bedeutung.

Während die Evolution immunologisch wichtiger Proteine zumeist mit den Erfordernissen der Immunabwehr des Wirts bzw. der Vermeidung derselben durch den Krankheitserreger erklärt werden kann, sind die treibenden Kräfte der Evolution reproduktionsrelevanter Proteine vielfältig und oft kaum voneinander abzugrenzen. Als Beispiele sind in diesem Zusammenhang Spermienkompetition, kryptische Wahl durch die Weibchen oder die Vermeidung von Polyspermie erwähnt. Zudem tragen bei Arten mit innerer Befruchtung zusätzlich immunologische Wechselwirkungen zur Evolution reproduktionsrelevanter Proteine bei (SWANSON u. VACQUIER 2002). Unabhängig von der Vielfalt der verschiedenen Erklärungsmodelle bleibt jedoch festzuhalten, dass hinter der Evolution zahlreicher reproduktionsrelevanter Proteine koevolutive Prozesse zwischen den Geschlechtern stehen.

Neue Gene entstehen durch eine Reihe molekularer Mechanismen, unter anderem durch Genduplikation. Dabei wird ein bereits vorhandenes Gen verdoppelt, so dass es nun in einer weiteren Kopie vorliegt. Da das neue Gen für den Erhalt und die Funktion des Organismus nicht essentiell ist, wirken sich Veränderungen in der vervielfältigten Sequenz oft nicht unmittelbar aus. Das duplizierte Gen verändert sich in der Regel schneller als die ursprünglich identische Sequenz. Dabei wird das neue Gen entweder eine neue Funktion übernehmen (Neofunktionalität), welches zur Beibehaltung der beiden Kopien führt, oder die ursprünglichen Funktionen werden in neue Duplikate (Subfunktionalität) aufgeteilt (RASTOGI u. LIBERLES 2005). Dabei scheint das Auseinanderlaufen von evolutiven Entwicklungslinien zu größeren Unterschieden (Divergenz) ein Erhaltungsmechanismus zu sein, bei dem einige

Schwesterkopien ihre ursprünglichen Funktionen beibehalten, während die anderen zum Erwerb neuer Funktionen evolvieren. Divergente Evolution kann bei einem einzelnen Gen in verschiedenen Spezieslinien vorkommen und zu ungleichmäßiger Evolutionsrate der Gene führen.

Neben der Duplikation von kodierenden Sequenzen entwickelten sich mit der Entstehung der Arten auch Pseudosequenzen. Der Verlust eines Gens im Sinne des Verlusts eines Genprodukts kann durch die Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons in kodierenden Sequenzabschnitten resultieren oder durch den Verlust eines oder mehrerer Exons verursacht werden. Diese Mechanismen sind sehr intensiv bei Genen, die für Zona pellucida Proteine kodieren, untersucht worden. Studien an Vertretern der Fische, Vögel und verschiedenen Säugern ergaben, dass insbesondere der Mechanismus der Generierung von Pseudosequenzen aus kodierenden Sequenzen dominierte und die erreichte Evolutionsstufe einer Spezies mit der Zunahme der inneren Befruchtung korrelierte. Systematische Untersuchungen der ZP-Gene in verschiedenen Spezies führten zur Identifikation der *ZPAX*-Pseudosequenzen in den Genomen von Rind, Opossum und einigen Primaten. Darüber hinaus wurden *Zp1*-Pseudosequenzen in den Genomen von Hund und Rind gefunden, und *Zp4*-Pseudogene konnten im Mausgenom nachgewiesen werden (GOUDET et al. 2008). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Evolution von Vertebraten von einem progressiven Verlust an kodierenden ZP-Genen begleitet war (GOUDET et al. 2008). Ähnliche Befunde resultierten für das OVGP1 (*Oviduct-specific glycoprotein 1*), das sog. „Oviduktin“, das eine physiologische Rolle bei der Befruchtung spielt (KILLIAN 2004). Ebenfalls mit dem Ansatz der vergleichenden Sequenzanalyse wurde „eine Spur“ des *Ovgp1*-Pseudogens im Rattengenom gefunden. Dieser Befund erklärte das Fehlen von Ratten-*Ovgp1* im phylogenetischen Baum (SWANSON et al. 2003). Interessanterweise resultierte durch das Inaktivieren dieses Gens (Null-Mutation) kein Effekt auf die weibliche Reproduktion (ARAKI et al. 2003). Somit scheint dieses Gen nur bei Primaten unter positivem Selektionsdruck evolviert zu sein.

3.2 Evolution von Reproduktionsgenen durch positiven Selektionsdruck

Die Fülle von Nukleotidsequenzen ermöglicht Abschätzungen darüber unter welchem Selektionsdruck einzelne Gene im Lauf der Zeit evolvierten (SABETI et al. 2006). Bei kodierenden Sequenzen wird häufig der relative Anteil funktioneller Austausche zur Analyse der Sequenzevolution herangezogen. Demnach resultiert ein Ratenverhältnis nichtsynonymer oder sinnverändernder (dn) und synonymer oder stiller Mutationen (ds) >1 aus einer Selektion auf Aminosäureaustausche und damit aus einem Prozess, der auch als positive Selektion bezeichnet wird. Umgekehrt werden dn/ds-Werte <1 als Signaturen negativer Selektion, also als Ergebnis einer Selektion gegen Aminosäureaustausche, aufgefasst. Die dn/ds-Werte von ~1 deuten schließlich auf einen als „neutrale Evolution“ bezeichneten Vorgang hin, der auf die Abwesenheit von Selektion hinweist. In ähnlicher Weise kann das Ratenverhältnis radikaler und konservativer Aminosäureaustausche zur Beurteilung der evolutionären Vergangenheit kodierender Sequenzen herangezogen werden (HUGHES et al. 1990). Andere Verfahren nutzen wiederum Polymorphismen, insbesondere „*Single Nucleotide Polymorphisms*“ (SNPs), zur Analyse der Evolution ausgewählter Sequenzen (SABETI et al. 2006, 2007; VOIGHT et al. 2006).

Mittlerweile wurde die Evolution zahlreicher proteinkodierender Sequenzen unter Einbeziehung verschiedener Vertreter des Tierreichs (Viren, Algen und Vertebraten) mit biomathematischen Algorithmen untersucht. Dabei zeigte sich, dass besonders immun- und reproduktionsrelevante Proteine bzw. deren kodierende Gene infolge positiver Selektion rasch und adaptiv evolvierten. Als Beispiele aus dem Bereich der Reproduktionsbiologie sind das gut untersuchte „Bindin“ des Seeigels und das „Lysin-VERL (*Vitelline Envelope Rezeptor for Lysin*)-System“ der Gattung *Haliotis* ("Seeohren") der marinen Invertebraten erwähnt. Bei Haliotis unterliegt der Spermienligand Lysin durch einen rasch evolvierenden Rezeptor der Eihülle einer positiven Selektion (dn/ds>1) (SWANSON u. VACQUIER 2002).

Die Genomsequenzen von Mensch, Maus und Ratte zeigten eine Konservierung von ca. 80% der kodierenden orthologen Gene bei Säugern. Die restlichen 20% der Gene bei Säugern resultieren aus Genduplikationen und -verlusten, die bei den

Speziesvergleichen beobachtet wurden. Dazu gehören die Gene für die Odorant-Rezeptoren sowie die Gene, die eine Funktion in der Immunabwehr oder in der Befruchtung übernehmen und zur Gruppe der sog. schnell evolvierenden Gene („*fast evolving genes*“) zählen (IHGSC 2004).

CRISPs (Cystein-reiche sekretorische Proteine), Spermadhäsine und Fibronektin Typ II-Modul Proteine können beispielhaft als Vertreter für schnell evolvierende Gene angeführt werden. CRISPs haben sich im Laufe der Evolution stark verändert und kommen u.a. ubiquitär im männlichen Genitaltrakt des Säugers vor. Diese Proteingruppe gehört zur CAP-Superfamilie. Die Abkürzung für CAP steht für CRISPs, Antigen 5 von Insektengift und Proteine der „*pathogenesis-related* 1“-Familie (PR-1). Diese drei Proteinfamilien besitzen eine gemeinsame PR-1 Domäne. CAP-Proteine sind bei Pilzen, Pflanzen und Tieren weit verbreitet und werden als Antwort auf Stress bei PR-1 Pflanzen induziert (BOL et al. 1990). Typisch für CRISPs ist der Besitz von 16 konservierten Cysteinresten, die überwiegend im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die bislang bekannten drei Formen von CRISP-Proteinen (CRISP1, CRISP2 und CRISP3) wurden bei allen untersuchten Säugern nachgewiesen. *CRISP1* wird hauptsächlich im Nebenhoden exprimiert und ist in die Fusion der Gameten involviert (COHEN et al. 2000). Die Expression von *CRISP2* erfolgt überwiegend im Hoden. Es wird spekuliert, dass CRISP2 die Zell-Zell-Interaktionen zwischen den spermatogenen Vorläufern (Spermatozyten) und Sertolizellen im Hoden unterstützt (MAEDA et al. 1999). *CRISP3* wird bei den meisten Säugern in geringen Mengen nicht nur im Genitaltrakt, sondern auch in Speicheldrüsen und in Immunzellen exprimiert. Bei Mensch und Maus wurde die Rolle von CRISP3 auch mit Immunantworten in Zusammenhang gebracht (UDBY et al. 2002).

Die testikuläre Expression von CRISP-Proteinen reflektiert die Neofunktionalität dieser Gene nach der Duplikation des exprimierten Gens in der Speicheldrüse, bevor die Trennung von Mensch und Nager erfolgte. Interessanterweise wurden homologe cysteinreiche Peptide in Schlangengiften gefunden, welche zu modifizierten Produkten der Speicheldrüse zählen und andere funktionelle Eigenschaften besitzen

als in der Reproduktion. Nach der Duplikation subfunktionalisierten das CRISP2- und CRISP3-Gen, um eine gewebespezifische Expression zu erlangen. Der phylogenetische Stammbaum von CRISP weist auf den Verlust mehrerer entwicklungslinienspezifischer Gene hin. Wenn alle duplizierten Gene vorhanden wären, würden insgesamt vier CRISP-Proteine sowohl beim Menschen als auch bei der Maus existieren (HUMINIECKI u. WOLFE 2004).

Beim Hengst wird CRISP3 im Gegensatz zu anderen untersuchten Säugern in sehr großen Mengen im Genitaltrakt produziert. Aufgrund ihrer gewebespezifischen Expressionsmuster und ihrer biologischen Rolle im Verlauf der Befruchtung werden *CRISP*-Gene als aussichtsreiche Kandidatengene für die Fertilität des Hengstes angesehen. In der CRISP-Genfamilie wurden Polymorphismen identifiziert. Darunter wurden vier nichtsynonyme Polymorphismen bei *CRISP3* identifiziert. Ein SNP in CRISP3 führt zu der Aminosäuresubstution E208K, der eine signifikante Assoziation mit der Fertilität Hannoverscher Warmbluthengste aufweist (HAMANN et al. 2007). Es ist bemerkenswert, dass diese Substitution innerhalb der Kohlenhydrat-erkennungsdomäne des Schlangengift-CRISP, Triflin, vorliegt. Diese Region ist an den Protein-Protein-Interaktionen zwischen Triflin und Ryanodin-Rezeptoren der Skelettmuskulatur beteiligt und verursacht dadurch die Blockierung der Ionenkanäle (YAMAZAKI et al. 2003; SHIKAMOTO et al. 2005).

In früheren Studien wurden die Nukleinsäuresequenzen von fünf porzinen Spermadhäsinen (AWN, AQN-1, AQN-3, PSP-I und PSP-II) generiert (KWOK et al. 1993; EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2002). Während beim Schwein diese fünf Mitglieder der Spermadhäsinfamilie identifiziert wurden, sind beim Rind nur zwei Spermadhäsine (aSFP und Z13) und beim Pferd nur das AWN-Homolog nachgewiesen worden. Obwohl umfassende Untersuchungen von der Proteinanalytik bis hin zur Entwicklung eines Modells über die räumliche Struktur der Spermadhäsine vorgenommen wurden (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998), fehlten Daten zu den kodierenden Nukleotidsequenzen und zur Organisation der Spermadhäsingene. Die Charakterisierung porziner Spermadhäsingene erfolgte in Zusammenarbeit mit zwei anderen Arbeitsgruppen (HAASE et al. 2005).

Hierdurch wurde die Lokalisation der Spermadhäsingene auf dem porzinen Chromosom 20 (20q22) bestimmt. Die orthologen Sequenzen befinden sich beim Menschen auf Chromosom 10 (10q26).

Aufgrund der Sequenzübereinstimmungen der porzinen Gene wird angenommen, dass die hohe Anzahl an Spermadhäsingenen beim Schwein durch mehrfache Duplikationsereignisse der Ausgangssequenzen entstanden ist. Inaktive Kopien bzw. Pseudosequenzen von Spermadhäsinen wurden im menschlichen Genom sowie Schimpansen- und Hundegenom detektiert. Offensichtlich wurde die gesamte Region des hypothetischen Ursprungsgens im Maus- und Rattengenom deletiert. Zur Prüfung dieser Annahme wurde die Region mit konservierter Syntenie, die von DMBT1- und C10orf120-Genen flankiert wird, zwischen Schwein und Nagern verglichen. Daraus resultierte, dass bei Nagern die Distanz zwischen *DMBT1* und *C10orf120* lediglich 16 kb beträgt. Dieser kurze Abstand zwischen den beiden flankierenden Sequenzen lässt vermuten, dass das Spermadhäsingen bei Nagern aus der ursprünglichen Umgebung entfernt wurde. Es scheint sich bei den Spermadhäsinen um eine Gruppe von Genen zu handeln, die nur bei Ungulaten exprimiert werden, während sie bei Primaten und Nagern fehlen bzw. im Laufe der Evolution durch Mutationen in den kodierenden Sequenzabschnitten andere Funktionen übernommen haben oder inaktiviert wurden.

Die sehr hohe Divergenz der fünf Spermadhäsingene verdeutlicht, dass diese Gene höchstwahrscheinlich infolge positiver Selektion evolviert sind. Die Abschätzung synonymer oder stiller Mutationen bei fünf Spermadhäsinen (ds~0,58) lag höher als die ds-Werte für sechs ausgewählte Gene beim Rind und Schwein (ds~0,29). Somit wurde der Ursprung der porzinen Spermadhäsingenfamilie vor die Aufspaltung von Rind und Schwein datiert. Die nichtsynonyme Divergenz (dn) zwischen den Genpaaren ist ein Hinweis für ihre funktionelle Konservierung. Die dn/ds-Verhältnisse von porzinen Spermadhäsinen zeigten höhere Werte als die dn/ds-Verhältnisse für eine Reihe von Referenzgenen zwischen Rind und Schwein. Dies reflektiert höchstwahrscheinlich die geringere funktionelle Einschränkung oder eine beschleunigte Evolution einiger Genabschnitte (HAASE et al. 2005).

Die Analyse der Genomstruktur und der chromosomalen Lokalisation der Gene für humane und porzine Fn2-Proteine zeigte, dass die kodierenden Gene für ELSPBP1 (vier Fn2-Domäne)- und pB1(zwei Fn2-Domäne)-homologe Gene in den chromosomalen Regionen von HSA 19q und SSC 6q11-q21 dicht benachbart kartieren. Das Fehlen von ELSPBP1-homologen Sequenzen in der syntenen Region von Maus-Chromosom 7 lässt vermuten, dass beide Proteingruppen in der Säugerevolution aus Genduplikationsereignissen hervorgegangen sind. Einer anderen Hypothese folgend sind die ELSPBP1-homologen Gene bei den Nagern erst nach der Trennung der Nager von anderen Tiergruppen deletiert. Beide Proteinklassen werden von Mosaikgenen kodiert, wobei jedes Exon für eine bestimmte Fn2-Domäne kodiert. Dabei finden sich die (1)Fn2-(2)Fn2-Modulpaare der kleineren Proteine (BSP-A1/2 und pB1) in den größeren Proteinen mit vier Fn2-Modulstruktur wieder. Die (3)Fn2- und (4)Fn2-Modulpaare zeigten keine Ähnlichkeit zu zwei Fn2-Modul Proteinen, sondern wiesen Ähnlichkeiten zu Fn2-Modulen der Matrix-Metalloproteinase, Faktor XII oder Gelatinase auf. Dies kann als Hinweis dafür angesehen werden, dass ELSPBP-Gene höchstwahrscheinlich durch Neukombination von Exons („*Exon shuffling*“) entstanden sind. Nach diesem Prinzip kann durch die Rekombination von Exons eine große Proteinvielfalt mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften geschaffen werden (PATTHY 1999).

In den letzten Jahren sind weitere Spermienproteine verschiedener Organismen identifiziert worden. Durch Proteomstudien steigt die Zahl der identifizierten Spermienproteine ständig. Evolutionäre Sequenzanalysen der Spermienproteome von Insekten (*Drosphila melanogaster*) und Vertebraten haben ebenfalls die adaptive Evolution der funktionell unterschiedlichen Reproduktionsproteine verdeutlicht (DORUS et al. 2006; PALUMBI 2009). Als weiteres Ergebnis dieser umfangreichen Analyse resultierte, dass der Umfang des Spermienproteoms trotz der großen phylogenetischen Distanz der untersuchten Arten in übereinstimmender Weise bei einigen tausend Proteinen liegt (NAABY-HANSEN et al. 1997; JOHNSTON et al. 2005; LI et al. 2007). Bisher ist allerdings nur ein Teil bestimmt worden.

3.3 Struktur-Funktionsbeziehung sekretorischer Proteine des männlichen Genitaltrakts

Die räumliche Struktur sekretorischer Proteine des männlichen Genitaltrakts beinhaltet Sequenzabschnitte, Domänen, die die Eigenschaften dieser Proteine wesentlich determinieren. Besonders umfassend sind die drei Proteinfamilien Spermadhäsine, Fibronektin-Typ II (Fn2)-Modul Proteine und Cystein-reiche sekretorische Proteine (CRISPs) untersucht worden. Diese Proteingruppen repräsentieren Prototypen, deren Domänen in der Natur weit verbreitet sind und somit in sehr vielen Organismen vorkommen. Wegen ihrer leichten Zugänglichkeit im Seminalplasma sind die Proteine des männlichen Genitaltrakts besonders gut geeignet, um die Struktur und Funktion dieser Domänen zu untersuchen und um Erkenntnisse über die biologische Bedeutung dieser Proteine zu gewinnen. In der vorliegenden Arbeit werden aufgrund des eigenen Schwerpunkts Beziehungen zwischen Struktur und Funktionen von Spermadhäsinen und Fn2-Proteinen diskutiert.

3.3.1 Spermadhäsine

Auf der Basis ihrer molekularen Architektur werden Spermadhäsine einer Superfamilie von ontogenetisch regulierten und funktionell unterschiedlichen Proteinen zugeordnet, deren gemeinsames Element das Vorliegen der sog. CUB-Domäne ist. Die CUB-Domäne stellt ein strukturelles Modul dar, das in Mosaikproteinen mit sich selbst oder mit anderen Domänen vergesellschaftet vorkommen kann. Spermadhäsine bilden eine eigene Subgruppe, weil sie im Wesentlichen aus einer CUB-Domäne aufgebaut sind. Einblicke in die räumliche Struktur resultierten erstmalig aus Röntgenstrukturanalysen des porzinen PSP-I/PSP-II-Komplexes sowie des bovinen aSFP (ROMAO et al. 1997; ROMERO et al. 1997). Kennzeichnend ist eine sog. „*β-barrel*“ Struktur mit zwei Blättern, wobei jedes Blatt vier antiparallele β-Stränge und zwei parallele β-Stränge beinhaltet (Abb. 2B).

Porzine Spermadhäsine weisen innerhalb der CUB-Domäne beträchtliche Sequenzübereinstimmungen auf. Während die konservierten Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Valin und Leucin) nach „innen“ gerichtet sind und zur Stabilisierung und Aufrechthaltung der CUB-Domäne beitragen, sind die in der hochkonservierten Region vorliegenden Aminosäuren mit polaren Seitenketten nach „außen“ gerichtet und können dadurch die Ligandenbindungsfähigkeit (z. B. Kohlenhydrat-, Heparin- und Lipidbindung) beeinflussen. Auffallend ist ein 11-Aminosäuren umfassendes Sequenzmotiv (Positionen 49-59), das in allen porzinen Spermadhäsinen konserviert ist (Abb. 4B). Interessanterweise blockiert die Glykosylierung von Asparagin an Position 50 die Kohlenhdyratbindung vollständig. Das spricht dafür, dass die Kohlenhydratbindungstasche (*CRD*, *Carbohydrate Recognition Domain*) topologisch um die Position 50 lokalisiert ist.

Die Beteiligung der Spermadhäsine an kohlenhydratvermittelten Interaktionen des Befruchtungsprozesses wurde in zahlreichen Studien gezeigt (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998). Eigene Untersuchungen trugen wesentlich zur Charakterisierung der Kohlenhydraterkennungsdomäne (*CRD*) in diesen Proteinen bei (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2008a). Der Austausch von Gly54 in der konservierten Region gegen Aminosäuren mit nichtpolaren Ketten (Alanin, Valin und Isoleucin) beeinflusste die Bindungsfähigkeit von AQN-1 an Kohlenhydrate nicht. Hingegen führte der Austausch von Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten (Serin und Asparagin) oder Aminosäuren mit geladenen polaren Seitenketten (Asparaginsäure) zu einer Abnahme der Kohlenhydratbindung auf das Niveau des nicht kohlenhydratbindenden aSFP. Dies steht im Einklang mit dem molekularen Aufbau, bei welchem die Seitenketten der Aminosäuren in Abhängigkeit ihrer Ladung in der drei-dimensionalen Struktur unterschiedlich ausgerichtet sind. Polare Seitenketten sind nach „außen“ exponiert und können damit über sterische Effekte die Bindung von Kohlenhydraten beeinflussen (Publikation 3) (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2008a). Dieses Ergebnis bestätigt die Lokalisation der Kohlenhydratbindungstasche in der Umgebung des hochkonservierten Sequenzmotivs. Wie Untersuchungen an aSFP-Mutanten zeigten, ist die Aminosäure an der Position (Gly54) nicht unmittelbar an der Kohlenhydratbindung beteiligt; die Art der an dieser Position befindlichen

Aminosäure beeinflusst jedoch wesentlich die Bindungseigenschaft. Es ist anzunehmen, dass die Kohlenhydratbindungstasche topologisch in den mannose-/galaktosebindenden Spermadhäsinen (AWN, AQN-3 und AQN-1) konserviert ist. Die bisher bekannten Elemente der *CRD* der Spermadhäsine weisen keine Ähnlichkeiten mit den Kohlenhydraterkennungsdomänen bekannter Lektine auf, auch weicht sie von der (Man-6-P)-Bindungsstelle des Spermadhäsins PSP-II ab. Basierend auf der Röntgenstruktur des PSP-I/PSP-II-Heterodimers wurde Arg43 als determinierende Aminosäure für die Interaktion mit der Phosphatgruppe identifiziert. Die Man-6-P-Bindungsstelle liegt in der Dimerisierungsoberfläche des Komplexes; dies erklärt das Fehlen einer Bindung im PSP-I/PSP-II-Komplex (SOLIS et al. 1998). Räumlich ist die Man-6-P-Bindungsdomäne am Molekul entgegengesetzt zu der Mannose-/Galaktosebindungstasche angeordnet (Abb. 7).

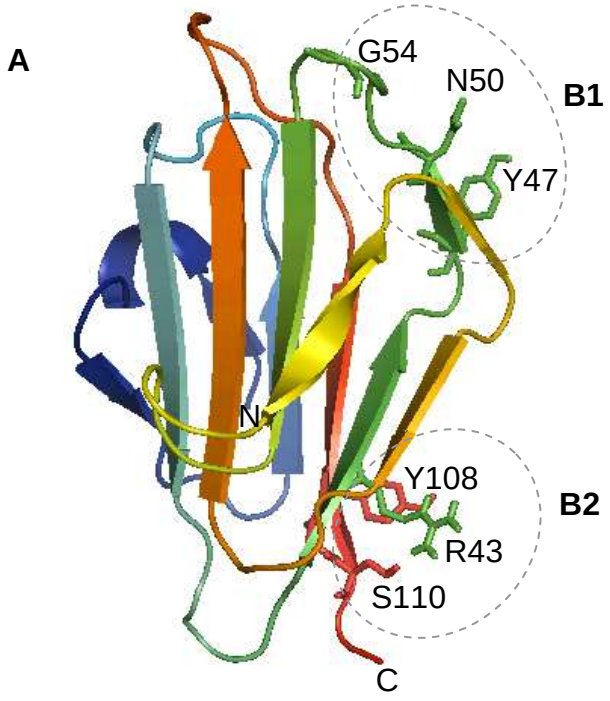


Abb. 7: Topologische Unterschiede der Kohlenhydraterkennungsdomänen von porzinen Spermadhäsinen.

Modell der dreidimensionalen Struktur porziner Spermadhäsine, das auf der Basis der röntgenkristallographischen Untersuchungen von PSP-II (Protein Data Bank, PDB, Accession Code 1spp) entwickelt wurde (A). Intramolekulare Lokalisation und relevante Aminosäuren der Kohlenhydraterkennungsdomänen von AQN-1, AQN-3 und AWN (B1) und PSP-II (B2). Die Abbildung wurde mit dem Programm „PyMol“ erstellt. „N“ und „C“ symbolisieren die N- bzw. C-terminalen Bereiche des Proteins.

Es ist in diesem Zusammenhang interessant, dass PSP-II trotz eines Glycins an der Position 54 innerhalb des hochkonservierten Sequenzmotivs keine Mannose- oder Galaktosebindung aufweist. Dies bedeutet, dass sich im Verlauf der Evolution spermadhäsinabhängig intramolekular nicht äquivalente Fähigkeiten bzw. Eigenschaften der Kohlenhydratbindung entwickelten und manifestierten, und möglicherweise in der Folge unterschiedliche biologische Aktivitäten/Funktionen determinierten.

Die Primärstrukturen der Spermadhäsine verschiedener Spezies erlauben eine Aufteilung in zwei Gruppen (Abb. 8). Während eine Gruppe (Schwein und Hengst) in dem konservierten 11-mer Peptid G54 besitzt, zeichnet sich die zweite Gruppe (Rind und Hausziege) durch Asn54 aus. Auch wenn beim Menschen das Spermadhäsingen durch vorzeitige Stopp-Codons inaktiviert wurde, kodiert interessanterweise in der korrespondierenden Nukleotidsequenz an der homologen Position die Aminosäure Glycin. Die humane Sequenz ist also der Gruppe 1 zuzuordnen. Wie gezeigt werden konnte, schließt der Austausch an Position 54 durch eine polare Aminosäure wie Asparagin eine Kohlenhydratbindung (Mannose/Galaktose) aus. Die Vertreter der Gruppe 2 sind demnach nicht kohlenhydratbindend im Sinne der porzinen AWN, AQN-1 und AQN-3. Die Anwesenheit von Glycin oder unpolaren Aminosäuren in dieser Position ist jedoch nicht zwangsweise mit einer Kohlenhdyratbindung verknüpft, sondern stellt nur eine Option dar. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Architektur der *CRD* der Spermadhäsine vollständig aufzuklären. Die bisherigen Daten lassen jedoch auf einen neuartigen Typ von lektinähnlichen Proteinen schließen.

```
                                                                  Proteinname
---------------------AWNRRSRSCGGVLRDPPGKIFNSDGPQKDCVWTIKVKPH  39  AWN_HORSE
-MKLAAPSLALLLSTATLVSGAWNRRSRSCGGVLRDPPGKIFNSDGPQKDCVWTIKVKPH  59  AWN_PIG
---------------------AQNKGSDDCGGFLKNYSGWISYYKALTTNCVWTIEMKPG  39  AQN3_PIG
MKLGSAIPWALLFSTATLISTGWGLDYHACGGRLTDDYGTIFTYKGPKTECVWTLQVDPK  60  PSP1_PIG
---------------------AQNKGPHKCGGVLRNYSGRISTYEGPKTDCIWTILAKPG  39  AQN1_PIG
MKLGTAIPWALLLSTATLVSTARINGPDECGRVIKDTSGSISNTDRQKNLCTWTILMKPD  60  PSP2_PIG
---------------------SPLVAPSDCGGHYTDEYGRIFNYAGPKTECVWIIELNPG  39  A8MWX8_HUMAN
MKLSSVIPWALLLSTATVDSMDWLPRNTNCGGILKEESGVIATYYGPKTNCVWTIQMPPE  60  SPAD1_BOVIN
----------------DSTDGLLVKDKYLCGDLYGEEYGVIFPYLGLKTECLWTIKMDPL  44  Z13_BOVIN
MKLSSVIPWALLLSTATLVSTESDEDTRKCGGVHRDFSGRISSSFSWGPKCTWTILLKSG  60  A1Z183_CAPHI
-----------------------------CGGVHRDFSGRISSSFSWGPKCTWTILLKSG  31  A1Z181_CAPHI
-----------------------------CGGVLRDFSGRISSSFSWGPKCTWTILLKSG  31  Q07A05_CAPHI
-----------------------------CGGVLRDFSGRISSSFSWGPKCTWTILLKSG  31  A1Z182_CAPHI

FHVVIAIPPLN---LSCGKEYVELLDGPPGSEIIGKICGGISLVFRSSSNIATIKYLRTS  96  AWN_HORSE
FHVVLAIPPLN---LSCGKEYVELLDGPPGSEIIGKICGGISLVFRSSSNIATIKYLRTS  116 AWN_PIG
HKIILQILPLN---LTCGKEYLEVRDQRAGPDNFLKVCGGTGFVYQSSHNVATVKYSRDS  96  AQN3_PIG
YKLLVSIPTLN---LTCGKEYVEILEGAPGSKSLGKFCEGLSILNRGSS-GMTVKYKRDS  116 PSP1_PIG
SRVFVAIPYLN---LACGKEYVEVQDGLPGAGNYGKLCSGIGLTYQSSSNALSIKYSRTA  96  AQN1_PIG
QKVRMAIPYLN---LACGKEYVEVFDGLLSGPSYGKLCAGAAIVFLSTANTMTIKYNRIS  117 PSP2_PIG
EIVTVAIPDLKPRGFACGKEYVEVLDGPPGSESLDRICKAFSTFYYSSSNIITIKYSREP  99  A8MWX8_HUMAN
YHVRVSIQYLQ---LNCNKESLEIIDGLPGSPVLGKICEGSLMDYRSSGSIMTVKYIREP  117 SPAD1_BOVIN
YRILLTVRDVH---ENCNKESLEIIEGPPESSNSRKICDTSHAEYTSCTNTMTVKYTRKP  101 Z13_BOVIN
YTVVLTIPFLS---LNCNEEDVEIIDGLPDSTTFGRFCSGGPLVFKSSSNVMTVKYYRSS  117 A1Z183_CAPHI
YTVVLTIPFLS---LNCNEEDVEIIDGLPDSTTFGRFCSGGPLVFKSSSNVMTVKYYRSS  88  A1Z181_CAPHI
YTVVLTIPFLS---LNCNEEDVEIIDGLPDSTTFGRLCSGGPLVFKSSSNVMTVKYYRSS  88  Q07A05_CAPHI
YTVVLTIPFLS---LNCNEEDVEIIDGLPDSTTFGKFCSGGPLVFKSSSNVMTVKYYRSS  88  A1Z182_CAPHI

GQRASPFHIYYYADPEGPLPFPYFERQTIIATEKNIP  133  AWN_HORSE
GQRASPFHIYYYADPEGPLQFPYFDRQTIIATEKNIP  153  AWN_PIG
HHPASSFNVYFYGIPQGAKA-----------------  117  AQN3_PIG
GHPASPYEIIFLRDSQG--------------------  134  PSP1_PIG
GHSASSFDIYYYGDS----------------------  112  AQN1_PIG
GNSSSPFLIYFYGSSPGSEY-----------------  138  PSP2_PIG
SHPPTFFEIYYFVDA----------------------  115  A8MWX8_HUMAN
EHPASFYEVLYFQDPQA--------------------  135  SPAD1_BOVIN
NHPAPDFFLIFRRVL----------------------  117  Z13_BOVIN
NQPVSPFDIFYYERPTA--------------------  135  A1Z183_CAPHI
NQPVSPFDIFYYERPSA--------------------  106  A1Z181_CAPHI
NQPVSPFDIFYYERPQA--------------------  106  Q07A05_CAPHI
NQPVSPFDIFYYERPQA--------------------  106  A1Z182_CAPHI
```

Abb. 8: Alignment der Aminosäuresequenzen der Spermadhäsine von Schwein, Pferd, Rind, Hausziege und Mensch.

In dem konservierten 11-mer Peptid besitzen die Spermadhäsine beim Schwein und Hengst sowie beim Menschen an der Position 54 die Aminosäure Glycin (Gruppe 1, grau), während beim Rind und Hausziege an der korrespondierenden Position die Aminosäure Asparagin (Gruppe 2, farbloses Kästchen) vorliegt. Das 11-mer Peptid ist durch schwarze Pfeile eingegrenzt. Die N-Glykosylierungsstelle ist beim equinen Spermadhäsin und bei den porzinen Spermadhäsinen unterstrichen. Bindestriche (-) wurden als Längenausgleich eingefügt. Die Anordnung der Sequenzen wurde mit ClustalW (http://www.uniprot.org) erstellt. *HORSE* = Pferd; *PIG* = Schwein; *HUMAN* = Mensch; *BOVIN* = Rind; *CAPHI* = Hausziege. AWN_Horse (P80720), AWN_PIG (P26776), AQN3_PIG (P24020), PSP1_PIG (P35495), AQN1_PIG (P26322), PSP2_PIG (P35496), A8MWX8_HUMAN (A8MWX8), SPAD1_BOVIN (P29392), Z13_BOVIN (P82292), A1Z183_CAPHI (A1Z183), A1Z181_CAPHI (A1Z181), Q07A05_CAPHI (Q07A05), A1Z182_CAPHI (A1Z182).

Interessanterweise haben die Evolutionsstudien der letzten Jahren gezeigt, dass die Gemeinsamkeiten in der Evolution der immun- und reproduktionsrelevanten Proteine über eine allgemein beschleunigte Sequenzevolution infolge positiver Selektion hinausgehen (WOELK u. HOLMES 2001; ZHU et al. 2002; CHOISY et al. 2004; HERLYN u. ZISCHLER 2005a). So wurde gezeigt, dass bei diesen Proteingruppen nicht nur einzelne Aminosäurepositionen, sondern auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungs-, Glykosylierungs- und Myristylierungsmuster positiver Selektion unterliegen (HERLYN u. ZISCHLER 2005b). Der Zusammenhang von posttranslationaler Modifikation und positiver Selektion wurde intensiv am Modell Zonadhesin (ZAN) untersucht, das als Spermienligand bei plazentaren Säugern identifiziert wurde und artspezifisch an die Zona pellucida der Eizelle bindet (HARDY u. GARBERS 1995). Bei Schwein, Rind, Kaninchen und Primaten besteht der ZAN-Vorläufer aus zwei oder drei MAM-Domänen, einer mucinähnlichen Domäne, einer unvollständigen und vier vollständigen D-Domänen, einem transmembranen Segment sowie einem kurzen cytoplasmatischen Teil (GAO u. GARBERS 1998; LEA et al. 2001; HERLYN u. ZISCHLER 2008). Die Analyse der ZAN-kodierenden Sequenzen erbrachte deutliche Hinweise, wonach die positive Selektion einzelner Codonpositionen Veränderungen im Phosphorylierungs- und Glykosylierungs- sowie Myristylierungsmuster antreibt (HERLYN u. ZISCHLER 2005a, b). Aufgrund dieser Untersuchungen kann die Hypothese formuliert werden, dass Glykosylierung und Kohlenhydratbindung charakteristische Eigenschaften porziner und equiner Spermadhäsine sind, die im Laufe der Evolution unter positivem Selektionsdruck standen. Hingegen wurden bei Rind und Hausziege diese Eigenschaften nach einem „*Knock out*“-ähnlichen Prinzip ausgeschaltet, so dass die entsprechenden Proteine in der Folge andere Funktionen übernahmen.

3.3.2 Fn2-Proteine

Fn2-Proteine des männlichen Genitaltrakts setzen sich überwiegend aus zwei (BB´-Einheiten) bzw. vier modulartigen Einheiten zusammen, die verschieden lange N-terminale Bereiche (AA´-Einheiten) aufweisen und darüber hinaus durch den Umfang ihrer Glykosylierung differieren (Abb. 3). Wichtige Struktur- und Ligandenbindungseigenschaften dieser Proteine wurden bei bovinen und equinen

sowie porzinen Vertretern der Fn2-Proteine untersucht (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2008b).

Eigene Untersuchungen beim Hengst weisen auf verschiedene Iso- bzw. Glykoformen von Fn2-Proteinen (SP-1 und SP-2) hin, die aus alternativem mRNA-Spleißen und/oder unterschiedlichen Glykosylierungen resultierten (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005b). Die aus den cDNAs abgeleiteten Aminosäure-sequenzen stimmten mit den Sequenzierungen auf Proteinebene für das equine SP-1 und das partiell sequenzierte SP-2 überein (CALVETE et al. 1995b). Bei den aus den cDNAs abgeleiteten Aminosäuresequenzen von SPnew und SP-2 wurden geringe Unterschiede beobachtet. Dieser Befund könnte auf das Vorliegen unterschiedlicher Genotypen bei den untersuchten Hengststämmen hindeuten. Er könnte aber auch das Resultat der Klonierung verschiedener sequenzähnlicher SP-2-kodierender Gene sein. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von SPnew und SP-1 zeigte, dass die Sequenzen in den beiden Fn2-Modulen 66% und in den N-terminalen Extensionen 50% Identität aufweisen. Die Aminosäuren Thr27 bei SP-1 sowie Thr12 bei SP-2 im A´-Modul sind O-glykosyliert (CALVETE et al. 1995b). Interessanterweise ist diese Position bei SPnew konserviert, während die O-Glykosylierungsstelle Thr22 bei SP-1 bzw. Thr7 bei SP-2 an der korrespondierenden Position von SPnew im A´-Modul durch Asn substituiert wurde. Dieser Aminosäureaustausch führt nicht zur Entstehung eines N-Glykosylierungsmotivs, das normalerweise aus Asn-X (jede Aminosäure außer Prolin)-Ser/Thr gebildet wird. Massenspektrometrische Analysen nativer und desialysierter SP-1 Proteine erbrachten das Vorliegen des typischen AA´BB´-Modul-Musters, das die Iso-/Glykoformen mit vier und drei O-Glykanen aufweisen. Hingegen resultierten mit demselben Verfahren Iso/Glykoformen für die SP-2-Familie, die eher dem A´BB´-Modul-Muster entsprechen. Sequenzierungen des N-terminalen Bereichs von SP-2 und seinen Isoformen verdeutlichen das Vorliegen eines komplexen Gemischs von SP-2-Isoformen. Insbesondere variieren die Aminosäuresequenzen in der A-Domäne zwischen den Spezies und den verschiedenen Isoformen. Der Grad der Glykosylierung der SP-1/2-Proteine scheint einen indirekten Einfluss auf den Aggregatzustand dieser Proteine zu haben (CALVETE et al. 1995b).

Bei Fn2-Proteinen mit vier Modulen wie ELSPBP1-Proteine fehlt der N-terminale Bereich mit dem AA´-Modul-Muster. Sequenzierungen der ersten N-terminal gelegenen Aminosäuren der reifen ELSPBP1-Proteine zeigten, dass sie unmittelbar auf die Signalsequenz folgen (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2007). In den Primärstrukturen der Fn2-Proteine mit vier Domänen existiert mit Asn-Cys-Thr ein konserviertes Glykosylierungsmotiv innerhalb des (4)Fn2-Moduls. Programmbasierte theoretische Vorhersagen (www.cbs.dtu.dk/service/NetNGlyc) gehen nicht von einer Glykosylierung aus. Möglicherweise wird die Beteiligung von Cys in diesem Motiv als N-glykosylierungshemmend angesehen. Eigene Untersuchungen zeigten jedoch eine deutliche N-Glykosylierung des humanen Proteins, denn das native ELSPBP1 verminderte seine relative Molekülmasse erheblich nach der Abspaltung von N-Glykanen mit PNGase F. Nach Inkubation des porzinen ELSPBP1 mit PNGase F wurden keine Unterschiede in der Migration während der Elektrophorese beobachtet. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass offensichtlich das humane ELSPBP1 saure N-Glykane besitzt. Die biologische Bedeutung der N-Glykosylierung des humanen ELSPBP1 ist allerdings noch nicht verstanden.

Die kurzen Fn2-Proteine des männlichen Genitaltrakts wurden bei Rind (BSP-A1/2), Hengst (SP-1/2) und Schwein (pB1) über ihre Phospholipidbindungseigenschaften charakterisiert. Mit der Ko-Kristallisation eines Komplexes bestehend aus BSP-A1/2 mit Phosphorylcholin (BSP-A1/2/PC-Komplex) ist es WAH et al. (2002) erstmals gelungen, die Struktur des (1)Fn2-(2)Fn2-Modulpaares und der PC-Bindungsdomäne modellhaft aufzuklären. In dem Kristall liegt der Komplex als Dimer vor. Charakteristisch ist eine Kation-π-Interaktion zwischen der quaternären Ammoniumgruppe des Cholins und dem Tryptophan sowie Wasserstoff-brückenbindungen zwischen exponierten Tyrosinresten und der Phosphatgruppe. Eine solche Art der Cholinbindung wurde auch bei den auf der Zelloberfläche lokalisierten Virulenzfaktoren von Pneumokokken beschrieben, die über eine Cholinbindungsregion am C-Terminus mit der Zellwand der Pneumokokken verankert sind (FERNANDEZ-TORNERO et al. 2001; HERMOSO et al. 2005). Dies ist ein Hinweis auf die konvergente Evolution von Cholinbindungsmechanismen, die in strukturell nicht verwandten Proteinen vorkommen (CALVETE u. SANZ 2007).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der (1) und der (2)Fn2-Module der langen und der kurzen Fn2-Proteine bei verschiedenen Spezies weist auf das Vorliegen konservierter Aminosäuren hin, die an der Lipidbindung beteiligt sind. Unter Einbeziehung der dreidimensionalen Struktur von BSP-A1/2 wurde ein vergleichbarer struktureller Aufbau der Sekundärstrukturelemente für die langen Fn2-Proteine angenommen. Die postulierte molekulare Struktur der beiden ersten Module und die konservierten lipidbindenden Aminosäuren deuten auf einen ähnlichen Aufbau der Cholinbindungstasche bzw. ähnliche Ligandbindungsfähigkeit der langen ELSPBP1-Proteine hin. Die PC-Bindungsfähigkeit wurde für die equinen, porzinen und bovinen Vertreter der langen Fn2-Proteine *in vitro* gezeigt, und somit das Vorliegen einer PC-Bindungstasche in diesen Molekülen nachgewiesen (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005b, 2007; SAHIN et al. 2009). Auch für das humane ELSPBP1 wird eine Interaktion mit PC angenommen. Wegen der mangelnden Verfügbarkeit biologischen Materials aus Nebenhoden konnte dieser Nachweis experimentell bislang noch nicht erbracht werden. Insgesamt scheint die feste cholinvermittelte Bindung von Fn2-Proteinen an die Membran eine gemeinsame Eigenschaft der beiden Fn2-Proteinfamilien zu sein. Dies stützt die Annahme, dass sich die kurzen und langen Fn2-Proteine in der Säugerevolution durch Modulduplikationen aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelten und spätere mutative Ereignisse zu einer „Trennung kurzer und langer Fn2-Proteine“ führten.

Die Lipidbindungsfähigkeit von kurzen Fn2-Proteinen wurde bei bovinen (BSP-A1/2) und equinen (SP-1/2) Vertretern dieser Proteinfamilie biophysikalisch untersucht. Am Modell der künstlichen Lipidvesikel wurde gezeigt, dass BSP-A1/2 sehr schnell ($t_{1/2}$ ~84 msec) an die Lipidschicht mit einem Verhältnis von etwa 10 Lipidmolekülen pro Proteinmolekül in einem biphasischen Prozess bindet (MÜLLER et al. 1998; GASSET et al. 2000). Wesentlich langsamer ($t_{1/2}$ ~850 msec) interkaliert das Protein mit dem apolaren/hydrophoben Teil der Lipidschicht, welches eine Immobilisierung der Membran verursacht und bei hohen Konzentrationen zu einer Störung der Membranstruktur führt. Die Bindung an Membranen scheint nur ein Teilschritt der biologischen Aufgabe zu sein, denn in einigen Modellsystemen wie humanen Erythrozytenmembranen und epididymalen bovinen Spermatozoen wurde gezeigt,

dass BSP-A1/2 eine Extraktion von gemischten Lipid-Proteinkomplexen aus der Membran induzieren kann (GREUBE et al. 2001) (Abb. 9). Für die Lipidextraktion sind die selektiven Interaktionen der beiden Fn2-Domänen notwendig, so dass hauptsächlich Phosphatidylcholin und Cholesterin entfernt werden. Hieraus resultieren wesentliche Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Membran.

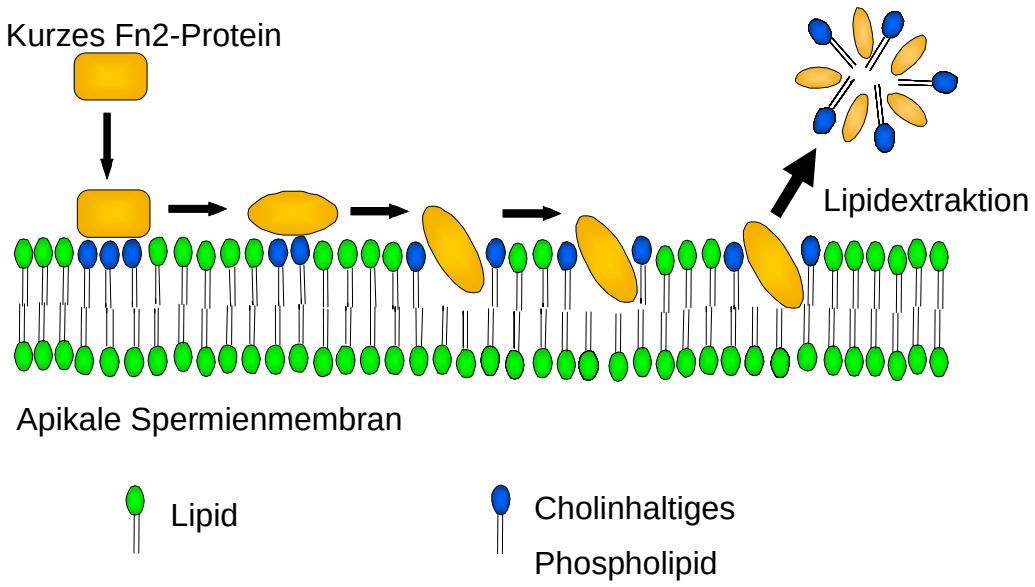


Abb. 9: Modell der Interaktion von kurzen Fn2-Proteinen mit der Spermienmembran.

Nach der spezifischen Bindung kurzer Fn2-Proteine an PC-haltige Lipide erfolgen Konformationsänderungen und die Interkalation mit der apolaren Region der Lipid-doppelmembran. Dies führt zu einer Versteifung der Membran. In der Folge kommt es zu einer Extraktion von gemischten Lipid-Proteinkomplexen aus der Membran, wobei vorwiegend PC und Cholesterin entfernt werden. Cholesterin ist im Bild nicht dargestellt.

In diesem experimentellen Lipidbindungsmodell wurden auch die Interaktionen des equinen Fn2-Proteins SP-1/2 mit der Spermatozoenmembran untersucht (GREUBE et al. 2001). Dabei scheinen die Interaktionen der beiden homologen Proteine mit der Membran nahezu identisch zu sein. Allerdings unterscheiden sich beide Proteine im Ausmaß der Membranimmobilisierung und Lipidextraktion. Dieser Effekt ist bei SP-1/2 deutlich geringer als bei BSP-A1/2. SP-1/2 kann unter vergleichbaren Bedingungen kaum Lipide aus Erythrozytenmembranen extrahieren. Diese differenten Eigenschaften im Interaktionsmodus lassen sich über strukturelle Unterschiede der equinen und bovinen Fn2-Proteine erklären. Möglicherweise wird

die Interaktion von Fn2-Proteinen mit der Membran durch den Glykosylierungsgrad bzw. das Glykosylierungsmuster der Proteine beeinflusst. BSP-A1/2 besitzt nur eine Glykosylierungsstelle im N-terminalen Bereich des Proteins (A-Domäne), während SP-1/2 zwei Glykosylierungsstellen in der homologen Region (A-Domäne) und weitere zwei Glykosylierungen in der A´-Domäne aufweist (Publikation 4) (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005b). Es wird spekuliert, dass der höhere Glykosylierungsgrad von SP-1/2 die Lipidinteraktionen mit der Membran beeinträchtigt, und es in der Folge zu einer sterischen Hinderung kommt. Darüber hinaus können Protein-Lipid-Interaktionen indirekt durch vorangegangene Oligomerisierungen des Proteins beeinflusst werden. Solche Effekte wurden für die Heparinbindungsfähigkeit des equinen SP-1-Proteins beschrieben (CALVETE et al. 1995b).

3.4 Biologische Funktionen der Spermadhäsine und Fibronektin TypII-Modul Proteine

Spermadhäsine und Fn2-Proteine gehören unterschiedlichen Proteinklassen an, die nicht nur auf genetischer und struktureller Ebene, sondern auch funktionell umfassend charakterisiert wurden. Diese oberflächenassoziierten Proteine schützen den empfindlichen akrosomalen Bereich des Spermienkopfes und spielen bei der Regulation der Kapazitation eine wesentliche Rolle. Beide Proteinfamilien weisen sowohl PC-bindende als auch heparinbindende Eigenschaften auf. Porzines Spermadhäsin AQN-1 und bovines Fn2-Protein BSP-A1/2 können mit bestimmten Oligosacchariden des Oviduktepithels interagieren und hierdurch ganz wesentlich zur Etablierung des Spermienreservoirs im kaudalen Isthmus des Oviduktes beitragen. Für die porzinen Spermadhäsine AWN und AQN-3 konnte eine Beteiligung an der Gameteninteraktion gezeigt werden.

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Befunde über die kurzen Fn2-Proteine wurde folgendes Modell für bovine Vertreter dieser Proteine, BSP-A1/2, entwickelt: Danach werden die kurzen Fn2-Proteine im männlichen Genitaltrakt sezerniert und assoziieren mit den cholinhaltigen Phospholipiden der Spermienmembran, die einen erheblichen Anteil an ungesättigten Fettsäuren besitzt (GREUBE et al. 2001).

Auch für die Extraktion des Cholesterins aus der Samenzelle wird BSP-A1/2 verantwortlich gemacht. Obwohl dieses Protein nicht direkt mit Cholesterin interagiert, gibt es Hinweise, dass die Mobilität von Cholesterin in einer PC-Umgebung eingeschränkt wird (MÜLLER et al. 2002). Neben der Phospholipidbindung weisen die Fn2-Proteine auch eine spezifische Bindung an Heparin oder heparinähnliche Glykosaminglykane auf, die in hohen Konzentrationen in der Follikel- und Oviduktflüssigkeit des weiblichen Genitaltrakts produziert werden (CALVETE et al. 1999). Dabei hat die Heparinbindung einen stimulierenden Effekt auf die Kapazitation der bovinen Spermien (THERIEN et al. 2005).

Die Bindungsaktivität der Fn2-Proteine scheint eine spezifische Eigenschaft der (1) und (2)Fn2-Domäne zu sein (FAN et al. 2006). Mechanistisch vermittelt eine Fn2-Domäne die „lose“ Bindung vom Protein an Phospholipide und/oder weitere an der Lipidextraktion der Spermienoberfläche beteiligte Moleküle wie Glykosaminglykane und „*High-Density Lipoprotein*“ (HDL), während die andere Domäne an der Adhäsion des Fn2-Proteins durch die feste Bindung an Phosphatidylcholine der Spermienmembran involviert ist (FAN et al. 2006). Es wird angenommen, dass diese Eigenschaften bei der Bindung von heparinähnlichen Glukosaminglykanen und/oder HDL des weiblichen Genitaltrakts an spermienassoziierte Fn2-Proteine beteiligt sind und schließlich den Kapazitationsvorgang auslösen (THERIEN et al. 2001).

Obwohl die Interaktionen von equinen und porzinen Fn2-Proteinen mit den Phosphorylcholinen der entsprechenden Spermienmembranen ähnlich erfolgen wie bei den bovinen Proteinen, kann nicht von ähnlichen biologischen Funktionen dieser Proteine ausgegangen werden. Im Vergleich zu bovinen Fn2-Proteinen zeigten die equinen Fn2-Proteine SP-1/2 einen deutlich geringeren Einfluss auf die Immobilisierung und Lipidextraktion aus der Spermienmembran. Eine Deutung dieser Daten für den Kapazitationsprozess der Spermien beim Pferd steht noch aus. Equines SP-1/2 wurde in eigenen Untersuchungen auf Spermien aus Nebenhoden-körper und –schwanz sowie auf ejakulierten Spermien nachgewiesen (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005b), während bovines BSP-A1/2 nur auf ejakulierten

Spermien detektiert wurde (CALVETE et al. 1994a). Es ist durchaus vorstellbar, dass SP-1/2 an der Regulation der Spermienmotilität beteiligt ist.

Interessanterweise wurde im porzinen System gezeigt, dass das Fn2-Protein pB1 ähnlich wie das bovine Fn2-Protein BSP-A1/2 den Kapazitationsprozess bei den Nebenhodenspermien in Abwesenheit von Heparin induzieren kann (LUSIGNAN et al. 2007). Es ist noch nicht beschrieben, ob die heparinähnlichen Glykosaminglykane und HDL der porzinen Oviduktflüssigkeit die Kapazitation bei porzinen Spermien auslösen können. Da die Kapazitation von porzinen Spermien in Abwesenheit von Heparin erfolgt, ist es denkbar, dass pB1 ähnlich wie BSP-A1/2 über die Stimulation des Cholesterin- und PC-Effluxes die Kapazitation induziert. Die an bovinen, equinen und porzinen Fn2-Proteinen erhobenen Befunde weisen darauf hin, dass Proteine aus der gleichen Proteinklasse trotz sehr ähnlicher Strukturen bei verschiedenen Tierarten speziesspezifische Funktionen ausüben können.

Das Vorkommen von sowohl kurzen als auch langen Fn2-Proteinen scheint spezifisch für Ungulaten zu sein. Die langen Fn2-Proteine (ELSPBP1) binden während der Passage der Spermien durch den Nebenhoden über die PC-Bindungsstellen an die Spermienmembran. Weitere Fn2-Proteine (BSPs) assoziieren während der Ejakulation mit den Phospholipiden der Spermienmembran und maskieren den von ELSPBP1 gebundenen Bereich des Spermienkopfes. Dabei unterscheiden sich die Bindungsregionen auf den Spermien. Während beim Rind und Hengst die kurzen sowie die langen Fn2-Proteine hauptsächlich an der postakrosomalen Region und am Mittelstück des Spermiums binden, wurde das lange Fn2-Protein (ELSPBP1) bei den porzinen Spermien lediglich im akrosomalen Bereich detektiert. Erst nach der Kapazitation und Entfernung von BSPs von der Spermienoberfläche wird das Epitop von ELSPBP1 für die Immunreaktion zugänglich gemacht (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2007; SAHIN et al. 2009). Die tierartspezifische Bindung von Fn2-Proteinen an unterschiedliche Bereiche der Spermienoberfläche sowie die beobachteten strukturellen Unterschiede zwischen diesen Proteinen reflektieren die charakteristische Bedeutung dieser Moleküle für die Spermienfunktion bei den verschiedenen Spezies (GREUBE et al. 2004; EKHLASI-

HUNDRIESER et al. 2007). Die langen Fn2-Proteine können mit hoher Wahrscheinlichkeit mit zwei zusätzlichen Domänen ganz neue Funktionen hinzugewinnen.

Aktuelle Studien innerhalb der Arbeitsgruppe über die Funktion von langen Fn2-Proteinen erbrachten deutliche Hinweise darauf, dass das bovine ELSPBP1 einen regulierenden Effekt auf die Kontrolle des Zellvolumens hat und somit in bedeutender Weise in die Volumenregulation der reifenden Spermien involviert ist (SAHIN et al. 2009). ELSPBP1 wird im Nebenhoden exprimiert und interagiert mit den PC-haltigen Membranen von Nebenhodenspermien. Da die kurzen und langen Fn2-Proteine ähnliche strukturelle und PC-bindende Eigenschaften besitzen, wurde das in großen Mengen verfügbare kurze Fn2-Protein (BSP-A1/2) für die Untersuchungen zur Regulation des Zellvolumens eingesetzt. Bovine Spermien aus Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz weisen Unterschiede in den volumetrischen Eigenschaften auf. Nach einer hypotonen Belastung kommt es bei den Nebenhodenkörper- und Nebenhodenschwanzspermien zu einer primären Vergrößerung des Zellvolumens, die bei weiterer Inkubation der Spermien unter hypotonen Bedingungen durch die Aktivierung von Ionenkanälen wieder abnimmt. Spermien aus dem Nebenhodenkopf sind hingegen nicht in der Lage, das Zellvolumen nach der primären Schwellung zu reduzieren (YEUNG et al. 2004). Erst nach Zugabe von Fn2-Proteinen können Nebenhodenkopfspermien auf den hypotonen Stress reagieren und ihr Zellvolumen regulieren (SAHIN et al. 2009). Es wird angenommen, dass die Bindung des Fn2-Proteins BSP-A1/2 an Phosphorylcholine der Spermienmembran die frühzeitige Aktivierung von Transportmechanismen bzw. Ionenkanälen beeinflussen kann. Die vorzeitige Aktivierung kann den unkontrollierten Influx von intrazellulären Ionen wie Na^+ und Cl^- verursachen. Ein an diese Aufnahme gekoppelter Wassertransport könnte die Ursache für das vergrößerte isotone Zellvolumen bei den Nebenhodenkopfspermien sein. Fn2-Proteine scheinen an der Regulierung des Aktivierungsprozesses der Ionenkanäle beteiligt zu sein. Der Aktivierungsprozess erfolgt durch spezifische Signalübertragungswege, die anhand von Änderungen in den Protein-phosphorylierungsmustern erfasst werden können. Bislang sind sie jedoch noch nicht

umfassend untersucht worden. Ob ELSPBP1-Proteine bei anderen Spezies ähnliche Funktionen übernehmen, bedarf weiterer Untersuchungen.

3.5 Bindung von Spermien an Oligosaccharidstrukturen des Ovidukts: eine speziesspezifische Interaktion?

Die Beteiligung unterschiedlicher Oligosaccharidstrukturen an den Spermien-Ovidukt-Interaktionen wurde bei verschiedenen Säugern gezeigt. So wurden die Bedeutung von Sialsäure bei Hamster und Ratte, Galaktose beim Pferd, Fucose beim Rind und Oligomannosylstrukturen beim Schwein als Bindungsstrukturen für die Spermienproteine beschrieben (DEMOTT et al. 1995; LEFEBVRE et al. 1995; GREEN et al. 2001; WAGNER et al. 2002). Darüber hinaus zeigten Bindungsstudien im homologen und heterologen System, dass Bindungskinetiken und Bindungseigenschaften nicht grundlegend verschieden sind. Diese Aussagen resultierten aus Bindungsstudien von Hundespermatozoen an kanine und porzine Oviduktexplante. Da die Hundespermatozoen über die Speziesgrenze hinweg in vergleichbarer Dichte gebunden wurden, scheinen bei diesen Spezies sehr ähnliche Mechanismen an der Spermatozoenbindung beteiligt zu sein.

An Oviduktepithel gebundene Spermatozoen zeigten unabhängig von dem Kontakt mit kaninem oder porzinem Oviduktepithel keine oder nur eine geringe Tyrosin-phosphorylierung der Spermienproteine im Kopfbereich (PETRUNKINA et al. 2004). Tyrosinphosphorylierungen der Spermienproteine im Schwanzbereich, die mit der Hyperaktivierung korrelieren (PACEY et al. 1995), nahmen im homologen und im heterologen System mit der gleichen Geschwindigkeit zu (PETRUNKINA et al. 2004). Diese Ähnlichkeit ist bemerkenswert, da Schwein und Hund sehr unterschiedliche Sexualzyklen haben. Auch in einem Modell, in dem Bindungsmechanismen von humanen Spermien an Oviduktepithelien von Mensch, Rind und Makake untersucht wurden, resultierten keine speziesspezifischen Effekte bei der Bindung der Spermien (ELLINGTON et al. 1998). Die Bindungsmechanismen von Spermienproteinen an Oligosaccharide des Oviduktepithels und darauf folgende vitalitätserhaltende sowie kapazitationsverzögernde Effekte des Ovidukts auf die Spermien scheinen somit unter *in vitro*-Bedingungen speziesunabhängig sehr ähnlich zu erfolgen.

In vivo allerdings dürfte die Regulation dieser Prozesse je nach Tierart sehr unterschiedlich ablaufen. So ist beispielsweise die speziesabhängige, variierende Lebensdauer von Spermien im weiblichen Genitaltrakt wahrscheinlich nicht nur auf differentielle Eigenschaften von Spermien zurückzuführen, sondern auch auf die unterschiedliche Feinregulation speziesübergreifender und spezieswirksamer Mechanismen im funktionellen Spermienreservoir.

Oligosaccharide bestehen aus Monosaccharidbausteinen, die auf unterschiedliche Weise miteinander verbunden werden können. Wie bei anderen Biomolekülen ist die Art ihrer Verknüpfung essentiell für die Speicherung und Übertragung von Informationen. Während die Bausteine der Nukleinsäuren und Proteine in linearer Anordnung vorliegen, können Oligosaccharide in vielfache Richtungen verzweigen. Dadurch besitzen die Oligosaccharide eine enorme strukturelle Vielfalt, die eine hohe Heterogenität zur Folge hat und für biologische Funktionen der Zelle von essentieller Bedeutung sind (GABIUS et al. 2004). Lektinologische Analysen des Ovidukts führten zum Nachweis einer Vielzahl verschiedener Oligosaccharidstrukturen, die vom Epithel exprimiert und von verschiedenen Spermienlektinen spezifisch erkannt werden können (WALTER u. BAVDEK 1997). Diese flexiblen Oligosaccharidketten des Oviduktepithels dienen offensichtlich dazu, die ankommenden Spermatozoen im Isthmus einzufangen und die Funktion eines sog. „*Catchers*“ zu übernehmen. Durch den Kontakt mit den Spermatozoen werden deren Spermienköpfe in der Nachbarschaft einer mukösen Oberfläche zurückgehalten. Sie scheinen nicht in später erfolgende befruchtungsrelevante Ereignisse involviert zu sein (TÖPFER-PETERSEN et al. 2008).

Obwohl keine signifikanten speziesspezifischen Unterschiede zwischen dem Einfluss der Spermien-Ovidukt-Interaktionen im heterologen und homologen System *in vitro* auf die Spermienfunktionen vorliegen, wurden in den homologen Systemen unterschiedliche Rezeptorsysteme identifiziert und charakterisiert. Beim Rind wird die Spermien-Ovidukt-Interaktion über das spermienassoziierte Fn2-Protein BSP-A1/2 mit den Fucosestrukturen des Ovidukts vermittelt. Kürzlich wurde eine Gruppe von Glykoproteinen, sog. Annexine, identifiziert, die als putative Rezeptoren im Ovidukt

exprimiert werden und höchstwahrscheinlich an der Etablierung des Spermienreservoirs beteiligt sind. Mit lektinologischen Verfahren wurde gezeigt, dass Annexine Fucosestrukturen enthalten, wodurch sie mit den kurzen Fn2-Proteinen auf der Spermienoberfläche interagieren könnten (IGNOTZ et al. 2007).

Beim Schwein wurden Oligomannosylglykane als dominierende Strukturen auf dem Oviduktepithel nachgewiesen, die an der Etablierung des Spermienreservoirs beteiligt sind (WAGNER et al. 2002). Als Rezeptorkandidat für die Bindung an Oligomannosylstrukturen des Ovidukts wurde das an die Spermienoberfläche assoziierte Spermadhäsin AQN-1 identifiziert (EKHLASI-HUNDRIESER et al. 2005a). Ergänzend zu diesen Befunden wurden kürzlich innerhalb der Arbeitsgruppe membranassoziierte Glykoproteine des porzinen Ovidukts detektiert, die als bevorzugte Bindungspartner für Spermatozoen fungieren. Hierzu zählen die Glykoproteine LAMP1 und LAMP2 (*Lysosome-Associated Membrane Glycoproteins 1/2*) und ein unbekanntes Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 130 kDa. Zusätzlich wurde ORP-150 (*Oxygen-Regulated Glycoprotein*) als „minor“ Komponente der Spermienbindungspartner identifiziert (TÖPFER-PETERSEN et al. 2008). LAMP1/2 sind dominierende Glykoproteine der lysosomalen Membran, die auch auf der Zellmembran vieler Zellen exprimiert werden (FUKUDA 1991). Beide Glykoproteine sind an der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt (MCKENZIE et al. 2003) und werden für die Adhäsion an das vaskuläre Endothel (KANNAN et al. 1996) sowie für Adhäsionsprozesse der Tumorinvasion und Metastasierung (SARAFIAN et al. 1998; OCHWAT et al. 2004) verantwortlich gemacht. Die Glykanprofile dieser Proteine enthalten sowohl Oligomannosylstrukturen als auch komplexe oder hybride Strukturen. Die LAMP-Glykoproteine befinden sich in der Schleimhautoberfläche des Oviduktepithels und kommen zusammen mit dem unbekannten 130 kDa Glykoprotein und deren exponierten Oligomannosylstrukturen als potentielle Bindungspartner für die oberflächenassoziierten Proteine der Spermatozoen in Betracht (TÖPFER-PETERSEN et al. 2008).

In der letzten Zeit wurden weitere Glykoproteine im porzinen Oviduktepithel identifiziert und charakterisiert, die bei der Etablierung des Spermienreservoirs beteiligt sind. Dazu gehört das SBG (*Sperm binding glycoprotein*), das Galaktosestrukturen enthält und als potentieller Bindungspartner beim Schwein angesehen wird (MARINI u. CABADA 2003; TEIJEIRO et al. 2008). Dabei scheint SBG eine Rolle bei der negativen Selektion von Spermien zu übernehmen. Dieses Glykoprotein wurde im Lumen des Ovidukts lokalisiert. Dort wurden auch die Spermienpopulationen mit veränderter Plasmamembran detektiert. Die biologische Funktion von SBG scheint mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Veränderung der akrosomalen Integrität bei denjenigen Spermien zu liegen, die sich in der Zeit vor dem Erreichen des Ovidukts in der Initialphase des Kapazitationsprozesses befinden (TEIJEIRO et al. 2008). Das Oviduktepithel exprimiert zahlreiche Glykoproteine, die über ihre unterschiedlichen Oligosaccharidstrukturen mit der Spermatozoenmembran interagieren und damit einen wesentlichen Beitrag zur positiven und negativen Selektion von Spermiensubpopulationen im weiblichen Genitaltrakt und zur Etablierung eines Spermienreservoirs leisten.

4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Während der Passage der Spermien durch den Nebenhoden finden komplexe Veränderungen und Modifikationen der Spermienoberfläche statt. Die kontinuierliche Umstrukturierung der Spermienoberfläche determiniert den Interaktionsmodus von exogenen Proteinen mit den Spermien. Dabei assoziiert eine Reihe von sekretorischen Proteinen, die im Nebenhoden und auch in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen produziert werden, fest mit der Spermienoberfläche, teilweise werden sie auch in die Zellmembran integriert. Andere Proteine gehen zu verschiedenen Zeitpunkten des posttestikulären Reifungsprozesses eine lockere Bindung mit der Spermienmembran ein. Am Ende dieser komplexen Umstrukturierungen resultieren Spermatozoen, die die Fähigkeit erworben haben, eine Eizelle zu befruchten.

Spermadhäsine und Fn2-Proteine sind wesentliche Proteinfamilien des männlichen Genitaltrakts, deren Mitglieder unterschiedliche Funktionen im Hinblick auf die komplexen Vorgänge der Befruchtung einer Eizelle übernehmen (Abb. 10). Strukturell unterscheiden sich die beiden Proteinfamilien erheblich. So besitzen Spermadhäsine als gemeinsames strukturelles Merkmal die CUB-Domäne. Auch wurden sie bisher nur bei Spezies beobachtet, die taxonomisch zur Gruppe der Ungulaten zählen. Hauptsyntheseorte sind die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Sie assoziieren an die Spermienmembran und besitzen ähnlich wie Lektine kohlenhydratbindende Eigenschaften; darüber hinaus sind Spermadhäsine auch an der Interaktion mit der Zona Pellucida beteiligt. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit und ausgeprägten Sequenzübereinstimmung besitzen porzine Spermadhäsine signifikant unterschiedliche Funktionen im Verlauf der Fertilisation. Während AQN-1 komplexe Oligomannosylstrukturen bindet, die auch von Oviduktepithelzellen exprimiert werden, bindet AWN vorwiegend Oligosaccharidstrukturen mit terminaler Galaktose. Die Bindungsfähigkeit von Spermien an Oligomannosylstrukturen sowie die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mit AQN-1 lassen es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass AQN-1 als putatives Rezeptormolekül die Bindung von Spermien nach der Deponierung im weiblichen Genitaltrakt an das Oviduktepithel vermittelt.

Somit scheint AQN-1 nicht nur entscheidend an der Oviduktbindung, sondern auch an der Etablierung/Formierung eines funktionellen Spermienreservoirs beteiligt zu sein. Vergleichbare Funktionen können AWN und den anderen porzinen Spermadhäsinen nicht zugedacht werden.

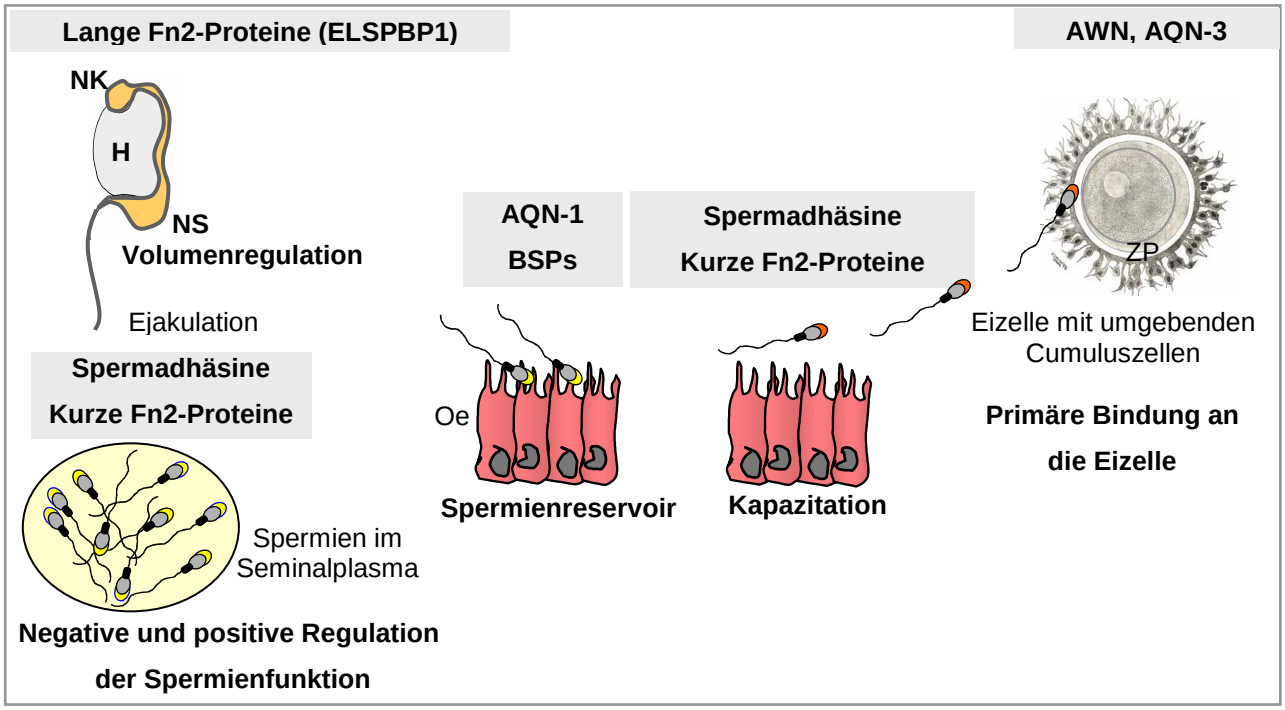


Abb. 10: Biologische Rolle der sekretorischen Proteine des männlichen Genitaltrakts.

Bovines ELSPBP1 bindet während der posttestikulären Reifung an die Spermatozoen und ist am Erwerb der Volumenregulationsfähigkeit der reifenden Spermien beteiligt. Während beim Schwein das Spermadhäsin AQN-1 die Interaktionen zwischen den Spermien und Oligosacchariden des Oviduktepithels vermittelt, wird diese Funktion beim Rind von den Fn2-Proteinen BSP-A1/2 übernommen. Beide strukturell verschiedenen Proteine sind in die Etablierung des funktionellen Spermienreservoirs im weiblichen Genitaltrakt sowie in die Vorgänge der Kapazitation involviert. Während der Kapazitation werden spermienassoziierte Spermadhäsine bzw. Fn2-Proteine von der Spermienoberfläche freigesetzt, und in der Folge lösen sich die Spermien vom Oviduktepithel. Die porzinen Spermadhäsine AWN und AQN-3 unterstützen die Gameteninteraktionen bei der primären Bindung der Spermien an die Oligosaccharidstrukturen der Eizelle. Beim Rind ist der Rezeptorkomplex für die primäre Bindung an die Eizelle noch nicht bekannt. H: Hoden; NK: Nebenhodenkopf; NS: Nebenhodenschwanz; Oe: Oviduktepithel; ZP: Zona pellucida.

Die Mannosebindung von AQN-1 wird durch die Kohlenhydraterkennungsdomäne determiniert. Diese Eigenschaft scheint in einem 11-Aminosäuren umfassenden Sequenzmotiv lokalisiert zu sein. Substitution der Aminosäure Gly54 innerhalb dieses Motivs durch geladene Aminosäuren führt zu einem Verlust der Mannosebindungsfähigkeit, hingegen führt der Austausch von Gly54 durch Aminosäuren mit ungeladenen Seitengruppen zur Erhaltung der selektiven Zuckerbindungsfähigkeit. Eine sterische Hinderung wie sie vermutlich bei der Glykosylierung von Asp50 durch die flexiblen Zuckerketten in Frage kommt, scheint die Ursache für den Verlust der Bindungsfähigkeit zu sein. Offensichtlich sind die an Position 54 vorliegenden Aminosäuren (Gly54) bedeutsam für die Kohlenhydrat-erkennungsdomäne der Spermadhäsine.

Charakteristisch für Fn2-Proteine ist das Vorliegen von zwei bis vier tandemartig angeordneten Fn2-Domänen. Anders als bei den Spermadhäsinen wurden Fn2-Proteine bei einer umfassenden Zahl von Säugern nachgewiesen. Diese beiden verschiedenen Proteinklassen weisen synergistische Modi der Bindung an die Spermienmembran auf, um optimale Voraussetzungen für die Bindung deponierter Spermien im weiblichen Genitaltrakt zu schaffen, damit ein funktionelles Spermienreservoir etabliert werden kann. Bei Säugern (Mensch, Maus, Ratte und Ungulaten) wurde speziesabhängig eine regionalisierte Expression der kurzen und langen Vertreter der Fn2-Proteinfamilien nachgewiesen. Als Hauptsyntheseort von kurzen Proteinen wurde die Samenleiterampulle identifiziert. Demgegenüber wird das lange Fn2-Protein nur im Nebenhoden produziert. Die Bindung langer Fn2-Proteine an Phosphorylcholin wurde erstmals für Pferd und Schwein gezeigt. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der kurzen und langen Fn2-Proteine innerhalb des männlichen Genitaltrakts können Vertreter der beiden Fn2-Proteine nur in den entsprechenden Synthesebereichen bzw. während der Ejakulation mit Phosphorylcholinen der Spermienmembranen eine feste Bindung eingehen. Im Ovidukt binden beide Proteinfamilien (Spermadhäsine und kurze Fn2-Proteine) an unterschiedliche Glykoproteine. So interagiert das porzine AQN-1 mit dem oligomannosyltragenden LAMP1/2, während beim Rind BSP-A1/2 und fucosetragende Annexine als Interaktionspartner nachgewiesen wurden.

Da die beteiligten Molekülsysteme auch im heterologen System funktionell interagieren, scheint die Hauptfunktion darin zu bestehen, die ankommenden Spermien im Eileiter einzufangen, wobei der Spermienkopf nahe an die Mukosaschicht gebracht wird.

Während Spermadhäsine und Fn2-Proteine strukturell divergieren, zeichnet sich aus funktioneller Sicht eine konvergente Entwicklung ab. Die Identifizierung speziesspezifischer Interaktionspartner (AQN-1 und Oligomannosylstrukturen beim Schwein; BSP-A1/2 und fucosehaltige Glykane beim Rind), reflektiert, dass sich bei Schwein und Rind strukturell verschiedene Molekülsysteme entwickelt haben und mechanistisch an der Etablierung/Formierung eines funktionellen Spermienreservoirs beteiligt sind. Eine Annahme ist, dass die beiden Proteinfamilien über ihre Interaktionen initial vergleichbare Effekte vermittelt haben und dadurch der Verlust einer Proteinklasse aus physiologischer Sicht keine Nachteile für das Individuum bzw. die Tiergruppe zur Folge hatte. Einer anderen Hypothese folgend entwickelte sich die funktionelle Konvergenz später, und wurde erst durch den Verlust spermadhäsinähnlicher Sequenzen (Deletion von kodierenden Sequenzen oder Umwandlung in Pseudosequenzen) nach der Trennung der beiden Spezies innerhalb des bovinen Genoms notwendig. In der Folge wurden Funktionen, die ursprünglich von Spermadhäsinen vermittelt wurden (bei der sich allmählich entwickelnden Rinderspezies) von Fn2-Proteinen übernommen. Porzine Spermadhäsine und bovine Fn2-Proteine sind somit als funktionelle Äquivalente anzusehen.

5. Literaturverzeichnis

ARAKI, Y., M. NOHARA, H. YOSHIDA-KOMIYA, T. KURAMOCHI, M. ITO, H. HOSHI, Y. SHINKAI u. Y. SENDAI (2003):
Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization.
Biochem J 374, 551-557

ASSREUY, A. M., N. M. ALENCAR, B. S. CAVADA, D. R. ROCHA-FILHO, R. F. FEITOSA, F. Q. CUNHA, J. J. CALVETE u. R. A. RIBEIRO (2003):
Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells.
Biol Reprod 68, 1836-1841

BEDFORD, J. M., O. B. MOCK u. D. M. PHILLIPS (1997):
Unusual ampullary sperm crypts, and behavior and role of the cumulus oophorus, in the oviduct of the least shrew, Cryptotis parva.
Biol Reprod 56, 1255-1267

BEDFORD, J. M., O. B. MOCK, S. K. NAGDAS, V. P. WINFREY u. G. E. OLSON (1999):
Reproductive features of the eastern mole (Scalopus aquaticus) and star-nose mole (Condylura cristata).
J Reprod Fertil 117, 345-353

BERGERON, A., M. VILLEMURE, C. LAZURE u. P. MANJUNATH (2005):
Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma.
Mol Reprod Dev 71, 461-470

BLANDAU, R. J. u. P. GADDUM-ROSSE (1974):
Mechanism of sperm transport in pig oviducts.
Fertil Steril 25, 61-67

BOISVERT, M., A. BERGERON, C. LAZURE u. P. MANJUNATH (2004):
Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins.
Biol Reprod 70, 656-661

BOL, J., LINTHORST HJM u. C. BJC (1990):
Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection.
Ann Rev Phytopathol 28, 113-138

BORK, P. u. G. BECKMANN (1993):
The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins.
J Mol Biol 231, 539-545

CABALLERO, I., J. M. VAZQUEZ, E. M. GARCIA, I. PARRILLA, J. ROCA, J. J. CALVETE, L. SANZ u. E. A. MARTINEZ (2008):
Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa.
Theriogenology 70, 1352-1355

CALVETE, J. J., M. RAIDA, L. SANZ, F. WEMPE, K. H. SCHEIT, A. ROMERO u. E. TÖPFER-PETERSEN (1994a):
Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa.
FEBS Lett 350, 203-206

CALVETE, J. J., D. SOLIS, L. SANZ, T. DIAZ-MAURINO u. E. TÖPFER-PETERSEN (1994b):
Glycosylated boar spermadhesin AWN-1 isoforms. Biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites, and effect of glycosylation on ligand binding.
Biol Chem Hoppe Seyler 375, 667-673

CALVETE, J. J., K. MANN, W. SCHÄFER, M. RAIDA, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1995a):
Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits.
FEBS Lett 365, 179-182

CALVETE, J. J., K. MANN, W. SCHÄFER, L. SANZ, M. REINERT, S. NESSAU, M. RAIDA u. E. TÖPFER-PETERSEN (1995b):
Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities.
Biochem J 310 (Pt 2), 615-622

CALVETE, J. J., E. CARRERA, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1996):
Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics.
Biol Chem 377, 521-527

CALVETE, J. J., M. ENSSLIN, J. MBURU, A. IBORRA, P. MARTINEZ, K. ADERMANN, D. WABERSKI, L. SANZ, E. TÖPFER-PETERSEN, K. F. WEITZE, S. EINARSSON u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1997a):
Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows.
Biol Reprod 57, 735-742

CALVETE, J. J., M. RAIDA, M. GENTZEL, C. URBANKE, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1997b):
Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1.
FEBS Lett 407, 201-206

CALVETE, J. J., M. A. CAMPANERO-RHODES, M. RAIDA u. L. SANZ (1999):
Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109.
FEBS Lett 444, 260-264

CALVETE, J. J. u. L. SANZ (2007):
Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins.
Soc Reprod Fertil Suppl 65, 201-215

CHOISY, M., C. H. WOELK, J. F. GUEGAN u. D. L. ROBERTSON (2004):
Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes.
J Virol 78, 1962-1970

COHEN, D. J., D. A. ELLERMAN u. P. S. CUASNICU (2000):
Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion.
Biol Reprod 63, 462-468

CONSTANTINE, K. L., M. MADRID, L. BANYAI, M. TREXLER, L. PATTHY u. M. LLINAS (1992):
Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b. A collagen-binding type II domain.
J Mol Biol 223, 281-298

CORTES, P. P., P. A. ORIHUELA, L. M. ZUNIGA, L. A. VELASQUEZ u. H. B. CROXATTO (2004):
Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface.
Biol Reprod 71, 1262-1269

DACHEUX, J. L., S. CASTELLA, J. L. GATTI u. F. DACHEUX (2005):
Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation.
Theriogenology 63, 319-341

DEMOTT, R. P., R. LEFEBVRE u. S. S. SUAREZ (1995):
Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium.
Biol Reprod 52, 1395-1403

DESNOYERS, L. u. P. MANJUNATH (1992):
Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid.
J Biol Chem 267, 10149-10155

DESNOYERS, L. u. P. MANJUNATH (1993):
Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices.
Arch Biochem Biophys 305, 341-349

DOBRINSKI, I., S. S. SUAREZ u. B. A. BALL (1996):
Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro.
Biol Reprod 54, 783-788

DORUS, S., S. A. BUSBY, U. GERIKE, J. SHABANOWITZ, D. F. HUNT u. T. L. KARR (2006):
Genomic and functional evolution of the Drosophila melanogaster sperm proteome.
Nat Genet 38, 1440-1445

DOSTALOVA, Z., J. J. CALVETE, L. SANZ, C. HETTEL, D. RIEDEL, C. SCHÖNECK, R. EINSPANIER u. E. TÖPFER-PETERSEN (1994a):
Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa.
Biol Chem Hoppe Seyler 375, 457-461

DOSTALOVA, Z., J. J. CALVETE, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1994b):
Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa.
Biochim Biophys Acta 1200, 48-54

DOSTALOVA, Z., J. J. CALVETE, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1995a):
Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics.
Eur J Biochem 230, 329-336

DOSTALOVA, Z., J. J. CALVETE u. E. TÖPFER-PETERSEN (1995b):
Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface.
Biol Chem Hoppe Seyler 376, 237-242

EINSPANIER, R., A. EINSPANIER, F. WEMPE u. K. H. SCHEIT (1991):
Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid.
Biochem Biophys Res Commun 179, 1006-1010

EINSPANIER, R., W. AMSELGRUBER, F. SINOWATZ, T. HENLE, R. ROPKE u. D. SCHAMS (1993):
Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (Bos taurus).
J Reprod Fertil 98, 241-244

EKHLASI-HUNDRIESER, M., F. SINOWATZ, I. GREISER DE WILKE, D. WABERSKI u. E. TÖPFER-PETERSEN (2002):
Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts.
Mol Reprod Dev 61, 32-41

EKHLASI-HUNDRIESER, M., K. GOHR, A. WAGNER, M. TSOLOVA, A. PETRUNKINA u. E. TÖPFER-PETERSEN (2005a):
Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig.
Biol Reprod 73, 536-545

EKHLASI-HUNDRIESER, M., B. SCHÄFER, C. KIRCHHOFF, O. HESS, S. BELLAIR, P. MÜLLER u. E. TÖPFER-PETERSEN (2005b):
Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins.
Mol Reprod Dev 70, 45-57

EKHLASI-HUNDRIESER, M., B. SCHÄFER, U. PHILIPP, H. KUIPER, T. LEEB, M. MEHTA, C. KIRCHHOFF u. E. TÖPFER-PETERSEN (2007):
Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related.
Gene 392, 253-265

EKHLASI-HUNDRIESER, M., J. J. CALVETE, B. VON RAD, C. HETTEL, M. NIMTZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (2008a):
Point mutations abolishing the mannose-binding capability of boar spermadhesin AQN-1.
Biochim Biophys Acta 1784, 856-862

EKHLASI-HUNDRIESER, M., P. MÜLLER u. E. TÖPFER-PETERSEN (2008b):
Male secretory proteins - Sperm tools for fertilisation.
In: Biology of male germ cells, GLANDER HJ, GRUNEWALD S, PAASCH U (Eds.). Shaker Verlag, Aachen, 173-210

ELLINGTON, J. E., A. E. JONES, C. M. DAVITT, C. S. SCHNEIDER, R. S. BRISBOIS, G. A. HISS u. R. W. WRIGHT, JR. (1998):
Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers.
Hum Reprod 13, 2797-2804

ENSSLIN, M., J. J. CALVETE, H. H. THOLE, W. D. SIERRALTA, K. ADERMANN, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1995):
Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN.
Biol Chem Hoppe Seyler 376, 733-738

ESCH, F. S., N. C. LING, P. BOHLEN, S. Y. YING u. R. GUILLEMIN (1983):
Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma.
Biochem Biophys Res Commun 113, 861-867

FAN, J., J. LEFEBVRE u. P. MANJUNATH (2006):
Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals.
Gene 375, 63-74

FERNANDEZ-TORNERO, C., R. LOPEZ, E. GARCIA, G. GIMENEZ-GALLEGO u. A. ROMERO (2001):
A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA.
Nat Struct Biol 8, 1020-1024

FUKUDA, M. (1991):
Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking.
J Biol Chem 266, 21327-21330

GABIUS, H. J., H. C. SIEBERT, S. ANDRE, J. JIMENEZ-BARBERO u. H. RUDIGER (2004):
Chemical biology of the sugar code.
Chembiochem 5, 740-764

GAO, Z. u. D. L. GARBERS (1998):
Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains.
J Biol Chem 273, 3415-3421

GASSET, M., J. L. SAIZ, J. LAYNEZ, L. SANZ, M. GENTZEL, E. TÖPFER-PETERSEN u. J. J. CALVETE (1997):
Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes.
Eur J Biochem 250, 735-744

GASSET, M., L. MAGDALENO u. J. J. CALVETE (2000):
Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109.
Arch Biochem Biophys 374, 241-247

GOUDET, G., S. MUGNIER, I. CALLEBAUT u. P. MONGET (2008):
Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates.
Biol Reprod 78, 796-806

GREEN, C. E., J. BREDL, W. V. HOLT, P. F. WATSON u. A. FAZELI (2001):
Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro.
Reproduction 122, 305-315

GREUBE, A., K. MÜLLER, E. TÖPFER-PETERSEN, A. HERRMANN u. P. MÜLLER (2001):
Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes.
Biochemistry 40, 8326-8334

GREUBE, A., K. MÜLLER, E. TÖPFER-PETERSEN, A. HERRMANN u. P. MÜLLER (2004):
Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2.
Biochemistry 43, 464-472

GWATHMEY, T. M., G. G. IGNOTZ u. S. S. SUAREZ (2003):
PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir.
Biol Reprod 69, 809-815

HAASE, B., C. SCHLÖTTERER, M. EKHLASI-HUNDRIESER, H. KUIPER, O. DISTL, E. TÖPFER-PETERSEN u. T. LEEB (2005):
Evolution of the spermadhesin gene family.
Gene 352, 20-29

HAMANN, H., R. JUDE, H. SIEME, U. MERTENS, E. TOPFER-PETERSEN, O. DISTL u. T. LEEB (2007):
A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses.
Anim Genet 38, 259-264

HARDY, D. M. u. D. L. GARBERS (1995):
A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor.
J Biol Chem 270, 26025-26028

HARRISON, R. A. (1996):
Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals.
Reprod Fertil Dev 8, 581-594

HERLYN, H. u. H. ZISCHLER (2005a):
Identification of a positively evolving putative binding region with increased variability in posttranslational motifs in zonadhesin MAM domain 2.
Mol Phylogenet Evol 37, 62-72

HERLYN, H. u. H. ZISCHLER (2005b):
Sequence evolution, processing, and posttranslational modification of zonadhesin D domains in primates, as inferred from cDNA data.
Gene 362, 85-97

HERLYN, H. u. H. ZISCHLER (2008):
The molecular evolution of sperm zonadhesin.
Int J Dev Biol 52, 781-790

HERMOSO, J. A., L. LAGARTERA, A. GONZALEZ, M. STELTER, P. GARCIA, M. MARTINEZ-RIPOLL, J. L. GARCIA u. M. MENENDEZ (2005):
Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce.
Nat Struct Mol Biol 12, 533-538

HUGHES, A. L., T. OTA u. M. NEI (1990):
Positive Darwinian selection promotes charge profile diversity in the antigen-binding cleft of class I major-histocompatibility-complex molecules.
Mol Biol Evol 7, 515-524

HUMINIECKI, L. u. K. H. WOLFE (2004):
Divergence of spatial gene expression profiles following species-specific gene duplications in human and mouse.
Genome Res 14, 1870-1879

HUNTER, R. H., B. FLECHON u. J. E. FLECHON (1987):
Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study.
Tissue Cell 19, 423-436

HUNTER, R. H. (2002):
Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs.
Reprod Domest Anim 37, 186-190

IGNOTZ, G. G., M. C. LO, C. L. PEREZ, T. M. GWATHMEY u. S. S. SUAREZ (2001):
Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir.
Biol Reprod 64, 1806-1811

IGNOTZ, G. G., M. Y. CHO u. S. S. SUAREZ (2007):
Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir.
Biol Reprod 77, 906-913

IHGSC (2004):
Finishing the euchromatic portions of the human genome.
Nature 431, 931–945.

JOHNSTON, D. S., J. WOOTERS, G. S. KOPF, Y. QIU u. K. P. ROBERTS (2005):
Analysis of the human sperm proteome.
Ann N Y Acad Sci 1061, 190-202

KANNAN, K., R. M. STEWART, W. BOUNDS, S. R. CARLSSON, M. FUKUDA, K. W. BETZING u. R. F. HOLCOMBE (1996):
Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium.
Cell Immunol 171, 10-19

KILLIAN, G. J. (2004):
Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development.
Anim Reprod Sci 82-83, 141-153

KIRCHHOFF, C. (1998):
Molecular characterization of epididymal proteins.
Rev Reprod 3, 86-95

KIRCHHOFF, C. (1999):
Gene expression in the epididymis.
Int Rev Cytol 188, 133-202

KWOK, S. C., D. YANG, G. DAI, M. J. SOARES, S. CHEN u. J. P. MCMURTRY (1993):
Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: new members of the spermadhesin family.
DNA Cell Biol 12, 605-610

LEA, I. A., P. SIVASHANMUGAM u. M. G. O'RAND (2001):
Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding.
Biol Reprod 65, 1691-1700

LEFEBVRE, R., P. J. CHENOWETH, M. DROST, C. T. LECLEAR, M. MACCUBBIN, J. T. DUTTON u. S. S. SUAREZ (1995):
Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle.
Biol Reprod 53, 1066-1074

LEFEBVRE, R., M. C. LO u. S. S. SUAREZ (1997):
Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition.
Biol Reprod 56, 1198-1204

LI, L. W., L. Q. FAN, W. B. ZHU, H. C. NIEN, B. L. SUN, K. L. LUO, T. T. LIAO, L. TANG u. G. X. LU (2007):
Establishment of a high-resolution 2-D reference map of human spermatozoal proteins from 12 fertile sperm-bank donors.
Asian J Androl 9, 321-329

LUSIGNAN, M. F., A. BERGERON, M. H. CRETE, C. LAZURE u. P. MANJUNATH (2007):
Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family.
Biol Reprod 76, 424-432

MAEDA, T., J. NISHIDA u. Y. NAKANISHI (1999):
Expression pattern, subcellular localization and structure--function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells.
Dev Growth Differ 41, 715-722

MANJUNATH, P., M. R. SAIRAM u. J. UMA (1987):
Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography.
Biosci Rep 7, 231-238

MANJUNATH, P. u. I. THERIEN (2002):
Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation.
J Reprod Immunol 53, 109-119

MARINI, P. E. u. M. O. CABADA (2003):
One step purification and biochemical characterization of a spermatozoa-binding protein from porcine oviductal epithelial cells.
Mol Reprod Dev 66, 383-390

MCKENZIE, M. E., A. I. MALININ, C. R. BELL, A. DZHANASHVILI, E. D. HOROWITZ, B. R. OSHRINE, D. ATAR u. V. L. SEREBRUANY (2003):
Aspirin inhibits surface glycoprotein IIb/IIIa, P-selectin, CD63, and CD107a receptor expression on human platelets.
Blood Coagul Fibrinolysis 14, 249-253

MELO, L. M., D. I. TEIXEIRA, A. HAVT, R. M. DA CUNHA, D. B. MARTINS, C. H. CASTELLETTI, P. R. DE SOUZA, J. L. FILHO, V. J. FREITAS, B. S. CAVADA u. G. RADIS-BAPTISTA (2008):
Buck (Capra hircus) genes encode new members of the spermadhesin family.
Mol Reprod Dev 75, 8-16

MÜLLER, P., K. R. ERLEMANN, K. MÜLLER, J. J. CALVETE, E. TÖPFER-PETERSEN, K. MARIENFELD u. A. HERRMANN (1998):
Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles.
Eur Biophys J 27, 33-41

MÜLLER, P., A. GREUBE, E. TÖPFER-PETERSEN u. A. HERRMANN (2002):
Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids.
Eur Biophys J 31, 438-447

NAABY-HANSEN, S., C. J. FLICKINGER u. J. C. HERR (1997):
Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa.
Biol Reprod 56, 771-787

NEUBAUM, D. M. u. M. F. WOLFNER (1999):
Wise, winsome, or weird? Mechanisms of sperm storage in female animals.
Curr Top Dev Biol 41, 67-97

NIMTZ, M., E. GRABENHORST, H. S. CONRADT, L. SANZ u. J. J. CALVETE (1999):
Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms.
Eur J Biochem 265, 703-718

NIXON, B., R. C. JONES u. M. K. HOLLAND (2008):
Molecular and functional characterization of the rabbit epididymal secretory protein 52, REP52.
Biol Reprod 78, 910-920

OCHWAT, D., D. HOJA-LUKOWICZ u. A. LITYNSKA (2004):
N-glycoproteins bearing beta1-6 branched oligosaccharides from the A375 human melanoma cell line analysed by tandem mass spectrometry.
Melanoma Res 14, 479-485

PACEY, A. A., N. DAVIES, M. A. WARREN, C. L. BARRATT u. I. D. COOKE (1995):
Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx.
Hum Reprod 10, 2603-2609

PALUMBI, S. R. (2009):
Speciation and the evolution of gamete recognition genes: pattern and process.
Heredity 102, 66-76

PATTHY, L. (1999):
Genome evolution and the evolution of exon-shuffling--a review.
Gene 238, 103-114

PETRUNKINA, A. M., J. FRIEDRICH, W. DROMMER, G. BICKER, D. WABERSKI u. E. TÖPFER-PETERSEN (2001):
Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca2+ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells.
Reproduction 122, 469-480

PETRUNKINA, A. M., K. SIMON, A. R. GÜNZEL-APEL u. E. TÖPFER-PETERSEN (2004):
Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct?
Theriogenology 61, 1617-1634

PETRUNKINA, A. M., D. WABERSKI, A. R. GÜNZEL-APEL u. E. TÖPFER-PETERSEN (2007):
Determinants of sperm quality and fertility in domestic species.
Reproduction 134, 3-17

RASTOGI, S. u. D. A. LIBERLES (2005):
Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization.
BMC Evol Biol 5, 28

REINERT, M., J. J. CALVETE, L. SANZ, K. MANN u. E. TÖPFER-PETERSEN (1996):
Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family.
Eur J Biochem 242, 636-640

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., A. IBORRA, P. MARTINEZ u. J. J. CALVETE (1998):
Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida.
Reprod Fertil Dev 10, 491-497

ROMAO, M. J., I. KOLLN, J. M. DIAS, A. L. CARVALHO, A. ROMERO, P. F. VARELA, L. SANZ, E. TÖPFER-PETERSEN u. J. J. CALVETE (1997):
Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 A resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family.
J Mol Biol 274, 650-660

ROMERO, A., M. J. ROMAO, P. F. VARELA, I. KOLLN, J. M. DIAS, A. L. CARVALHO, L. SANZ, E. TÖPFER-PETERSEN u. J. J. CALVETE (1997):
The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold.
Nat Struct Biol 4, 783-788

SAALMANN, A., S. MUNZ, K. ELLERBROCK, R. IVELL u. C. KIRCHHOFF (2001):
Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules.
Mol Reprod Dev 58, 88-100

SABETI, P. C., S. F. SCHAFFNER, B. FRY, J. LOHMUELLER, P. VARILLY, O. SHAMOVSKY, A. PALMA, T. S. MIKKELSEN, D. ALTSHULER u. E. S. LANDER (2006):
Positive natural selection in the human lineage.
Science 312, 1614-1620

SABETI, P. C., P. VARILLY, B. FRY, J. LOHMUELLER, E. HOSTETTER, C. COTSAPAS, X. XIE, E. H. BYRNE, S. A. MCCARROLL, R. GAUDET, S. F. SCHAFFNER ET AL. (2007):
Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations.
Nature 449, 913-918

SAHIN, E., A. M. PETRUNKINA, M. EKHLASI-HUNDRIESER, C. HETTEL, D. WABERSKI, R. A. HARRISON u. E. TÖPFER-PETERSEN (2009):
Fibronectin type II-module proteins in the bovine genital tract and their putative role in cell volume control during sperm maturation.
Reprod Fertil Dev 21, 479-488

SARAFIAN, V., M. JADOT, J. M. FOIDART, J. J. LETESSON, F. VAN DEN BRULE, V. CASTRONOVO, R. WATTIAUX u. S. W. CONINCK (1998):
Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells.
Int J Cancer 75, 105-111

SCHÄFER, B., H. H. VON HORSTEN, J. L. DACHEUX, W. HOLTZ u. C. KIRCHHOFF (2003):
Cloning and characterization of boar epididymal secretory proteins by homology to the human.
Reprod Domest Anim 38, 111-118

SCHEIT, K. H., M. KEMME, G. AUMULLER, J. SEITZ, G. HAGENDORFF u. M. ZIMMER (1988):
The major protein of bull seminal plasma: biosynthesis and biological function.
Biosci Rep 8, 589-608

SCHÖNECK, C., J. BRAUN u. R. EINSPANIER (1996):
Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation.
Theriogenology 45, 633-642

SEIDAH, N. G., P. MANJUNATH, J. ROCHEMONT, M. R. SAIRAM u. M. CHRETIEN (1987):
Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin.
Biochem J 243, 195-203

SHIKAMOTO, Y., K. SUTO, Y. YAMAZAKI, T. MORITA u. H. MIZUNO (2005):
Crystal structure of a CRISP family Ca2+ -channel blocker derived from snake venom.
J Mol Biol 350, 735-743

SINOWATZ, F., W. AMSELGRUBER, E. TÖPFER-PETERSEN, J. J. CALVETE, L. SANZ u. J. PLENDL (1995):
Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract.
Cell Tissue Res 282, 175-179

SKORSTENGAARD, K., M. S. JENSEN, P. SAHL, T. E. PETERSEN u. S. MAGNUSSON (1986):
Complete primary structure of bovine plasma fibronectin.
Eur J Biochem 161, 441-453

SOLIS, D., A. ROMERO, M. JIMENEZ, T. DIAZ-MAURINO u. J. J. CALVETE (1998):
Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family.
FEBS Lett 431, 273-278

SOSTARIC, E., M. AALBERTS, B. M. GADELLA u. T. A. STOUT (2008):
The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm.
Anim Reprod Sci 107, 237-248

SUAREZ, S. S. (1998):
The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation.
Biol Reprod 58, 1105-1107

SUAREZ, S. S., I. REVAH, M. LO u. S. KOLLE (1998):
Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca2+-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide.
Biol Reprod 59, 39-44

SUAREZ, S. S. (1999):
Regulation of sperm transport in the mammalian oviduct.
Cache River Press, Vienna, IL, USA

SUAREZ, S. S. (2001):
Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals.
Cells Tissues Organs 168, 105-112

SUAREZ, S. S. (2002):
Formation of a reservoir of sperm in the oviduct.
Reprod Domest Anim 37, 140-143

SULLIVAN, R., G. FRENETTE u. J. GIROUARD (2007):
Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit.
Asian J Androl 9, 483-491

SWANSON, W. J. u. V. D. VACQUIER (2002):
The rapid evolution of reproductive proteins.
Nat Rev Genet 3, 137-144

SWANSON, W. J., R. NIELSEN u. Q. YANG (2003):
Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins.
Mol Biol Evol 20, 18-20

TEDESCHI, G., E. OUNGRE, M. MORTARINO, A. NEGRI, G. MAFFEO u. S. RONCHI (2000):
Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin.
Eur J Biochem 267, 6175-6179

TEIJEIRO, J. M., M. O. CABADA u. P. E. MARINI (2008):
Sperm binding glycoprotein (SBG) produces calcium and bicarbonate dependent alteration of acrosome morphology and protein tyrosine phosphorylation on boar sperm.
J Cell Biochem 103, 1413-1423

THERIEN, I., A. BERGERON, D. BOUSQUET u. P. MANJUNATH (2005):
Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation.
Mol Reprod Dev 71, 97-106

THERIEN, I., D. BOUSQUET u. P. MANJUNATH (2001):
Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation.
Biol Reprod 65, 41-51

TÖPFER-PETERSEN, E., J. J. CALVETE, L. SANZ u. F. SINOWATZ (1995):
Carbohydrate-and heparin-binding proteins in mammalian fertilization.
Andrologia 27, 303-324

TÖPFER-PETERSEN, E., M. ENßLIN u. D. WABERSKI (1996):
Kapazitation.
Fertilität 12, 183-189

TÖPFER-PETERSEN, E., A. ROMERO, P. F. VARELA, M. EKHLASI-HUNDRIESER, Z. DOSTALOVA, L. SANZ u. J. J. CALVETE (1998):
Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives.
Andrologia 30, 217-224

TÖPFER-PETERSEN, E. (1999):
Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization.
Hum Reprod Update 5, 314-329

TÖPFER-PETERSEN, E., A. WAGNER, J. FRIEDRICH, A. PETRUNKINA, M. EKHLASI-HUNDRIESER, D. WABERSKI u. W. DROMMER (2002):
Function of the mammalian oviductal sperm reservoir.
J Exp Zool 292, 210-215

TÖPFER-PETERSEN, E., A. PETRUNKINA, M. EKHLASI-HUNDRIESER u. D. WABESRKI (2003):
Funktion des weiblichen Spermienreservoirs beim Säugetier.
Andrologie 19, 173-180

TÖPFER-PETERSEN, E., M. EKHLASI-HUNDRIESER u. M. TSOLOVA (2008):
Glycobiology of fertilization in the pig.
Int J Dev Biol 52, 717-736

UDBY, L., J. CALAFAT, O. E. SORENSEN, N. BORREGAARD u. L. KJELDSEN (2002):
Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils.
J Leukoc Biol 72, 462-469

VILLEMURE, M., C. LAZURE u. P. MANJUNATH (2003):
Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma.
Reprod Biol Endocrinol 1, 39

VOIGHT, B. F., S. KUDARAVALLI, X. WEN u. J. K. PRITCHARD (2006):
A map of recent positive selection in the human genome.
PLoS Biol 4, e72

WAGNER, A., M. EKHLASI-HUNDRIESER, C. HETTEL, A. PETRUNKINA, D. WABERSKI, M. NIMTZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (2002):
Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig.
Mol Reprod Dev 61, 249-257

WAH, D. A., C. FERNANDEZ-TORNERO, L. SANZ, A. ROMERO u. J. J. CALVETE (2002):
Sperm coating mechanism from the 1.8 A crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex.
Structure 10, 505-514

WALTER, I. u. S. BAVDEK (1997):
Lectin binding patterns of porcine oviduct mucosa and endometrium during the oestrous cycle.
J Anat 190 (Pt 2), 299-307

WEMPE, F., R. EINSPANIER u. K. H. SCHEIT (1992):
Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein.
Biochem Biophys Res Commun 183, 232-237

WOELK, C. H. u. E. C. HOLMES (2001):
Variable immune-driven natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV).
J Mol Evol 52, 182-192

YAMAZAKI, Y., F. HYODO u. T. MORITA (2003):
Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins.
Arch Biochem Biophys 412, 133-141

YEUNG, C. H., M. ANAPOLSKI, I. SETIAWAN, F. LANG u. T. G. COOPER (2004):
Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile c-ros transgenic Mice.
J Androl 25, 216-223

ZHU, D., H. MCCARTHY, C. H. OTTENSMEIER, P. JOHNSON, T. J. HAMBLIN u. F. K. STEVENSON (2002):
Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma.
Blood 99, 2562-2568

6. Darstellungen der eigenen Anteile an den wissenschaftlichen Arbeiten

Publikation 1:

A. Wagner, M. Ekhlasi-Hundrieser, C. Hettel, A. Petrunkina, D. Waberski, M. Nimtz, E. Töpfer-Petersen. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig. Molecular Reproduction and Development 2002; 61(2):249-57.

Eigene Beiträge: Konzeption und Planung der Untersuchungen gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen, Durchführung der Vorarbeiten, Einarbeitung und Betreuung der Doktorandin Frau A. Wagner, Methodische und praktische Unterstützung der proteinchemischen Untersuchungen. Auswertung der gesamten proteinchemischen Untersuchungen. Erstellen des gesamten Manuskripts gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen.

Publikation 2:

M. Ekhlasi-Hundrieser, K. Gohr, A. Wagner, M. Tsolova, A. Petrunkina, E. Töpfer-Petersen. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. Biology of Reproduction 2005; 73(3):536-45.

Eigene Beiträge: Konzeption und Planung der Untersuchungen gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen. Durchführung der Vorarbeiten, praktische und wissenschaftliche Betreuung der Doktorandinnen Frau K. Gohr, Frau A. Wagner und Frau M. Tsolova. Auswertung der proteinchemischen Untersuchungen mit Ausnahme der Durchflusszytometrie. Eigenständiges Erstellen des gesamten Manuskripts.

Publikation 3:

M. Ekhlasi-Hundrieser, J.J. Calvete, B. Von Rad, C. Hettel, M. Nimtz, E. Töpfer-Petersen. Point mutations abolishing the mannose-binding capability of boar spermadhesin AQN-1. Biochimica et Biophysica Acta. 2008; 1784(5):856-62.

Eigene Beiträge: Selbständige Konzeption, Planung und Auswertung aller dargestellten Untersuchungen, Durchführung der Experimente (mit Ausnahme der massenspektrometrischen Peptidsequenzierungen und Quantifizierungen der freien Cysteinresten sowie der Disulfidbrücken), Einarbeitung sowie praktische und wissenschaftliche Betreuung aller Arbeiten, die von der Doktorandin Frau B. von Rad durchgeführt wurden. Eigenständiges Erstellen des gesamten Manuskripts.

Publikation 4:

M. Ekhlasi-Hundrieser, B. Schäfer, C. Kirchhoff, O. Hess, S. Bellair, P. Müller, E. Töpfer-Petersen. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. Molecular Reproduction and Development 2005; 70(1):45-57.

Eigene Beiträge: Konzeption und Planung der Untersuchungen gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen, Durchführung der proteinchemischen Untersuchungen, Durchführung der molekularbiologischen Experimenten gemeinsam mit Frau Dr. B. Schäfer, Einarbeitung sowie praktische und wissenschaftliche Betreuung aller Arbeiten, die von der Doktorandin Frau S. Bellair durchgeführt wurden, Auswertung der Ergebnisse (in Zusammenarbeit mit Frau Prof.´in Kirchhoff). Erstellen des gesamten Manuskripts gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen.

Publikation 5:

M. Ekhlasi-Hundrieser, B. Schäfer, U. Philipp, H. Kuiper, T. Leeb, M. Mehta, C. Kirchhoff, E. Töpfer-Petersen. Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related. Gene. 2007; 392(1-2):253-65.

Eigene Beiträge: Konzeption und Planung der Untersuchungen gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen, Durchführung der proteinchemischen Untersuchungen, Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse (in Zusammenarbeit mit Frau Prof.´in Kirchhoff). Erstellen des gesamten Manuskripts gemeinsam mit Frau Prof.´in Töpfer-Petersen.

ANHANG

Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind

(Publikationen 1-5)

Publikation 1:

Molecular Reproduction and Development 2002; 61:249-57.

Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation - studies in the pig.

Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Töpfer-Petersen E.
Institute of Reproductive Medicine, School of Veterinary Medicine Hannover, Germany.

Competitive inhibition of sperm to explants of the oviductal epithelium was used to study the complementary receptor system that may be involved in the establishment of the oviductal sperm reservoir in the pig. Sperm binding to the oviductal explants is expressed as Binding Index (BI = sperm cells/0.01 mm(2)). From a set of glycoproteins with known oligosaccharide structures, only asialofetuin and ovalbumin showed inhibitory activity, indicating that ovalbumin may block high affinity binding sites (IC(50) congruent with 1.3 microM) and asialofetuin low affinity sites (IC(50) congruent with 18 microM) of the complementary receptor systems, whereas fetuin carrying terminal sialic acid has no effect. Ovalbumin glycopeptides were isolated by Con A affinity chromatography and reverse-phase HPLC following tryptic digestion. Glycopeptides and enzymatically released glycans were analyzed by MS, and were shown to represent preferentially the two high mannose type glycans (Man)(5)(GlcNAc)(2) and (Man)(6)(GlcNAc)(2), and as a minor component the hybrid type glycan (Hex)(4)(GlcNAc)(5). Glycopeptides (84% inhibition) and glycans (81% inhibition) significantly reduced sperm-oviduct binding at a concentration of 3 microM, whereas the deglycosylated peptides showed no inhibitory activity. Mannopentaose (IC(50) congruent with 0.8 microM) representing the oligomannose residue of the high mannose glycans of ovalbumin was as effective as ovalbumin. These data indicate that the carbohydrate-based mechanisms underlying the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig is the result of the concerted action of at least the high-affinity binding sites for oligomannose or nonreducing terminal mannose residues and low-affinity binding of galactose.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803561

Publikation 2:

Biology of Reproduction 2005; 73:536-45.

Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig.

Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsolova M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. Institute of Reproductive Medicine, School of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30559 Hannover, Germany.

Sperm are stored in the isthmic region of the oviduct under conditions that maintain viability and suppress early capacitation steps until ovulation occurs. The initial contact between sperm and oviductal epithelium is mediated by carbohydrate-protein interactions. In the pig, the carbohydrate recognition system has been shown to involve oligomannosyl structures. The spermadhesins AWN and AQN1 are the dominant porcine carbohydrate-binding sperm proteins. The objective of this study was to demonstrate that AQN1 contributes to sperm binding to the oviductal epithelium. AQN1 showed a broad carbohydrate-binding pattern as it recognizes both alpha- and beta-linked galactose as well as Manalpha1-3(Manalpha1-6)Man structures, whereas AWN bound only the galactose species. Binding of ejaculated sperm to oviductal epithelium was inhibited by addition of AQN1 but not by AWN. Mannose-binding sites were localized over the rostral region of the sperm head. Flow cytometry showed that, under capacitating conditions, the population of live sperm was shifted within 30 min toward an increase in the proportion of cells with low mannose- and high galactose-binding. The loss of mannose-binding sites was accompanied by the loss of AQN1 in sperm extracts and the significant reduction in the sperm-oviduct binding. The oviductal epithelium was shown by GNA-lectin histochemistry and by SDS-PAGE and lectin blotting of the apical membrane fraction to express mannose components that could be recognized by AQN1. These results demonstrate that the sperm lectin AQN1 fulfils the criteria for an oviduct receptor in the pig and may play a role in the formation of the oviductal sperm reservoir.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15888732

Publikation 3:

Biochimica et Biophysica Acta 2008; 1784:856-62.

Point Mutations abolishing the Carbohydrate-Binding Capability of Porcine Spermadhesin AQN-1.

Ekhlasi-Hundrieser M, Calvete JJ, von Rad B, Hettel C, Nimtz M, Töpfer-Petersen E. Department of Reproductive Biology, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 2, 30559 Hannover, Germany.

The mannose-binding capability of recombinant wild-type boar spermadhesin AQN-1 and of its site-directed mutants in the highly-conserved region around of the single glycosylation site (asparagine 50) of some spermadhesins, where the carbohydrate binding site has been proposed to be located, was checked using a solid-phase assay and a biotinylated mannose ligand. Substitution of glycine 54 by amino acids bearing an unipolar side chain did not cause significant decrease in the mannose-binding activity. However, amino acids with uncharged polar side chains or having a charged polar side chain abolished the binding of biotinylated mannose to the corresponding AQN-1 mutants. The results suggest that the higher surface accessibility of amino acids possessing polar side chains compared to those bearing nonpolar groups may sterically interfere with monosaccharide binding. The location of the mannose-binding site in AQN-1 appears to be topologically conserved in other heparin-binding boar spermadhesins, i.e., AQN-3 and AWN, but departs from the location of the mannose-6-phosphate-recognition site of PSP-II. This indicates that different spermadhesin molecules have evolved non-equivalent carbohydrate-binding capabilities, which may underlie their distinct patterns of biological activities.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18359302

Publikation 4:

Molecular Reproduction and Development 2005; 70:45-57.

Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins.

Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E.
Department of Reproductive Biology, University of Veterinary Medicine Hannover, Bünteweg 2, 30559 Hannover, Germany.

Phospholipid-binding proteins in the male genital tract are characterized by differing numbers Fn-2 modules (B-domain) carrying N-terminal extensions (A-domain) of variable length. In the stallion, three different proteins were identified, SP-1, SP-2, and EQ-12. SP-1 and SP-2 of the AA'BB'- and ABB'-type, respectively, are major proteins of the seminal plasma. Here we report the cDNA sequences of SP-1, and of a new member of the SP-2 family (SPnew) and the partial characterization of their iso- and glycoforms. The phosphorylcholine (PC)-binding ability of the long Fn-2 protein, EQ-12, with four tandemly arranged Fn-2 modules was determined by PC-affinity chromatography. Expression patterns of EQ-12, and the SP-proteins were studied by means of RT-PCR, Northern blot analysis and immunological approaches indicating differential expression along the male reproductive tract. The vast majority of the short SP-1 and SP-2 proteins are produced by the ampulla whereas EQ-12 originates from the epididymis. Indirect immunofluorescence microscopy of sperm isolated from different regions of the epididymis and Western blot analysis indicate that both, the long and the short Fn-2 proteins associate to the sperm surface during post-testicular maturation. Sperm binding of Fn-2 proteins at the post-acrosome and midpiece was at first detected in the corpus epididymis. Enhanced fluorescence intensity after ejaculation point to an increased number of molecules bound to the sperm surface. The function of these proteins is discussed in regard to their structure-function relationships.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15515052

Publikation 5:

Gene 2007; 392:253-65.

Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related.

Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Philipp U, Kuiper H, Leeb T, Mehta M, Kirchhoff C, Töpfer-Petersen E.
Department of Reproductive Biology, University of Veterinary Medicine Hannover, Bünteweg 2, 30559 Hannover, Germany.

Fibronectin type II (Fn2) module-containing proteins in the male genital tract are characterized by different numbers of Fn2 modules. Predominantly two classes exist which are distinct by having either two or four Fn2 modules. Minor variants with three Fn2 modules were also found in the human and the porcine epididymis. To reveal their relationship, mRNAs and proteins of representatives of these classes were studied in human, in Sus scrofa, and in rodents. Adult boars expressed members of both classes, i.e. ELSPBP1 and pB1, in subsequent regions of the epididymis, and both were under androgenic control. Human and rodent epididymides, on the other hand, alternatively contained only representatives of one of these two classes, i.e. ELSPBP1 in the human and two different pB1-related counterparts in rodents. ELSPBP1 and pB1-related genomic sequences were closely linked in chromosomal regions HSA 19q and SSC 6 q11-q21; conserved synteny between these regions is well established. On the other hand, in a syntenic region on mouse chromosome 7, ELSPBP1-related sequences were lacking. Tight binding to the sperm membrane via a choline-mediated mechanism was a common feature of the two classes of Fn2-module proteins, suggesting related function(s). However, differences in their regionalized expression patterns along the male genital tract as well as in association sites on the sperm surface suggested a species-specific sequential order in sperm binding.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307309

Danksagungen

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Prof.´in Dr. Edda Töpfer-Petersen für die seinerzeit herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe innerhalb des Instituts für Reproduktionsbiologie (ehemals Reproduktionsmedizin), das entgegengebrachte Vertrauen und die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit. Die Diskussionen über wissenschaftliche Fragen, ihr permanentes Engagement sowie ihre konstruktive Unterstützung auf verschiedenen Ebenen habe ich über die Jahre als sehr stimulierend und produktiv empfunden. Sie bildeten die Grundlage für die Weiterentwicklung von Ideen und Hypothesen auf dem Gebiet der Reproduktionsbiologie, und trugen ganz wesentlich zur Erstellung der vorliegenden Arbeit bei. Sicherlich war es eine besondere Fügung, eine solch gute Lehrmeisterin gehabt zu haben.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Bollwein danke ich für die freundliche Aufnahme in die von ihm geleitete Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover und die damit verbundene intensive Unterstützung und Förderung, eine weitere experimentelle Arbeitsgruppe in dieser Klinik auszurichten und zu etablieren.

Frau Prof.´in Dr. Christiane Kirchhoff, Frau PD Dr. Anna Petrunkina, Herrn Prof. Dr. Tosso Leeb und Herrn Prof. Dr. Juan Calvete danke ich für vielseitige Unterstützung und Kooperation bei der Durchführung gemeinsamer Forschungsvorhaben.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Frau Prof.´in Dr. Anne-Rose Günzel-Apel für ihre umfassende fachliche Beratung und Hilfsbereitschaft.

Frau Prof.´in Dr. Christine Wrenzycki und Herrn Prof. Dr. Burkhard Meinecke sei gedankt für fachliche Beratungen und stete Diskussionsbereitschaft.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Christiane Hettel bedanken, nicht nur für ihre engagierte technische Assistenz über die vielen Jahre hinweg bei sämtlichen Projekten, sondern auch für ihre Freundschaft.

Mein Dank gilt auch Frau Margret Schäfer für ihre freundliche Unterstützung bei vielen organisatorischen Aufgaben und Frau Christine Kochel für ihre technische Hilfsbereitschaft. Allen anderen MitarbeiterInnen und ehemaligen DoktorandInnen des Instituts für Reproduktionsbiologie sowie der Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken der Tierärztlichen Hochschule Hannover möchte ich danken, die zum Gelingen der verschiedenen Untersuchungen beigetragen haben.

Gedankt sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Institut für Reproduktionsbiologie und der Klinik für Rinder für die umfassende finanzielle Unterstützung in Form von Personal- und Sachmitteln.

Schließlich und endlich danke ich Joachim und Shayan, die mir während der gesamten Zeit mit viel Geduld und intensivem Engagement motivierend zur Seite standen.