

Identifikation von polysialylierten Glykoproteinen im
Nebenhoden der Ratte sowie auf humanen und bovinen
Spermien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Oliver Hendrik Busch
aus Cloppenburg

Gießen 2016

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Steger

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. vet. Knut Stieger

Tag der Disputation: 16.02.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polysialinsäuren und ihre Struktur, Synthese und Funktionen.....	1
1.2	Bekannte polysialylierte Glykoproteine.....	3
1.2.1	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> – NCAM	3
1.2.2	Thrombospondin-Rezeptor / CD36-Molekül.....	5
1.2.3	Spannungsabhängige Natrium-Kanäle	6
1.2.4	<i>Synaptic Cell Adhesion Molecule</i> - SynCam 1	7
1.2.5	Polysialyliertes Neuropilin-2 auf Dendritischen Zellen.....	9
1.3	Polysialylierung – Polysialyltransferasen ST8SialI+IV	10
1.3.1	Autopolysialylierung von ST8SialIV und ST8SialI.....	13
1.4	Anatomie und Funktion von Hoden und Nebenhoden	14
1.4.1	Histologischer Aufbau von Hoden und Nebenhoden.....	14
1.4.2	Das Keimepithel	15
1.4.3	Spermatogenese	17
1.4.4	Spermatozoon – Histologie.....	19
1.4.5	Nebenhoden – Reifung der Spermatozoen.....	21
2	Zielsetzung.....	24
3	Material	25
3.1	Probenmaterial	25
3.2	Antikörper	25
3.3	Enzyme.....	26
3.4	Geräte.....	27
3.5	Verbrauchsmaterialien	29
3.6	Chemikalien	29
4	Methoden	31
4.1	Proteinanalytische Methoden	31
4.1.1	Aufbereitung von frischem Ejakulat – Swim Up	31
4.1.2	Lyse und Homogenisierung von Rattenhoden und -nebenhoden.....	32
4.1.3	Affinitätspräzipitation mit <i>Dynabeads® Protein A</i>	32
4.1.4	Degradierung von PolySia mittels Endoneuraminidase N.....	36
4.1.5	Spaltung der N-Glykane mittels PNGase F.....	36
4.1.6	SDS-Page – Gelelektrophorese.....	36
4.1.7	Proteinübertragung per Western Blot.....	40
4.1.8	Immunfärbung und Entwicklung von Western Blots	41

4.2	Massenspektrometrische Analysen.....	42
4.2.1	Vorbereitung der Probe	42
4.2.2	Nano-LC gekoppelte MALDI-TOF/TOF-Analyse.....	44
4.2.3	Identifizierung der polysialylierten Glykosylierungsstellen.....	47
4.3	Verfahren der High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	47
4.4	Immunhistologische Untersuchungen humaner und boviner Spermien	49
5	Ergebnisse	52
5.1	Optimierung der Affinitätspräzipitation.....	52
5.1.1	Lyse und Eluierung.....	53
5.1.2	<i>Western Blotting</i> – Semi Dry.....	53
5.2	Nachweis von PolySia in Rattenhoden und –nebenhoden	55
5.3	Visualisierung der Sialinsäureketten in Rattenhoden und –nebenhoden mittels HPLC.....	57
5.4	Proteinidentifizierung	59
5.4.1	Identifizierung mittels Summenspektren	60
5.4.2	MALDI-TOF-MS/MS-Analyse einzelner Massen.....	64
5.4.3	Identifizierung der polysialylierten Glykosylierungsstelle.....	67
5.5	Western Blot gegen NCAM und ST8Sia2.....	69
5.6	Lokalisation von ST8Siall und NCAM auf Spermien	71
6	Diskussion.....	75
6.1	Vorangegangene Untersuchungen	76
6.2	Neue Ergebnisse	80
7	Zusammenfassung.....	89
8	Summary.....	91
9	Abkürzungsverzeichnis:.....	92
10	Abbildungsverzeichnis	93
11	Literaturverzeichnis.....	95
12	Publikation	99
13	Eidesstattliche Erklärung	100
14	Danksagung	101
15	Tabellarischer Lebenslauf	102

1 Einleitung

1.1 Polysialinsäuren und ihre Struktur, Synthese und Funktionen

Der Begriff der Sialinsäuren beschreibt die mehr als 50 Derivate der 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) [Sato 2004]. Da sie erstmals 1936 von Blix aus Rinder-submaxillarmucin isoliert werden konnten, wurden die Derivate mit dem Oberbegriff der Sialinsäure (sialos = griech. Speichel) zusammengefasst [Blix, Gottschalk et al. 1957]. Die Sialinsäure besteht aus einem Gerüst von neun Kohlenstoffatomen mit einer Ketogruppe an der C-2-Position, sowie einer Aminogruppe an der C-5-Position. Die einfachste Variante der Sialinsäure, und gleichzeitig die am häufigsten vorkommende, ist die *N*-Acetylneuraminsäure. Durch Substitution einer oder mehrerer Hydroxylgruppen an Position C-4, C-6, C-7, C-8 oder C-9 mit Acetyl-, Methyl-, Lactoyl-, Phosphat- oder Sulfatgruppen kommt es zur Ausbildung der verschiedenen Derivate. Neben der Neu5Ac zählen 5-*N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure (KDN) zu den drei am stärksten vertretenen Varianten [Blix, Gottschalk et al. 1957; Manzi, Dell et al. 1990; Muhlenhoff, Eckhardt et al. 1998; Sato 2004] (**Abbildung 1**).

Der erste Nachweis einer Polysialinsäure (PolySia) im Gewebe von Säugetieren konnte 1982 im Gehirn von Ratten erzielt werden [Finne 1982]. Ein Polymer aus mehr als 8 Sialinsäuren wird als Polysialinsäure bezeichnet, wobei diese in Säugetieren auf rein homopolymeren Strukturen aus α -2,8-verknüpften Sialinsäuren bestehen.

Unter physiologischen Bedingungen bei neutralen pH-Werten ist die Carboxygruppe am C1 Ende jeder Sialinsäure deprotoniert und PolySia zeigt eine hohe Kapazität für die Bindung von Wasser, sowie eine negative Ladung. Dadurch erhöht PolySia den hydrodynamischen Radius um das Trägerprotein und bildet eine Hülle um das Proteinrückrat. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des interzellulären Spalts und der damit einhergehenden Lösung von Zell-Zell-Kontakten [Johnson, Fujimoto et al. 2005; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013] (**siehe Abbildung 2**).

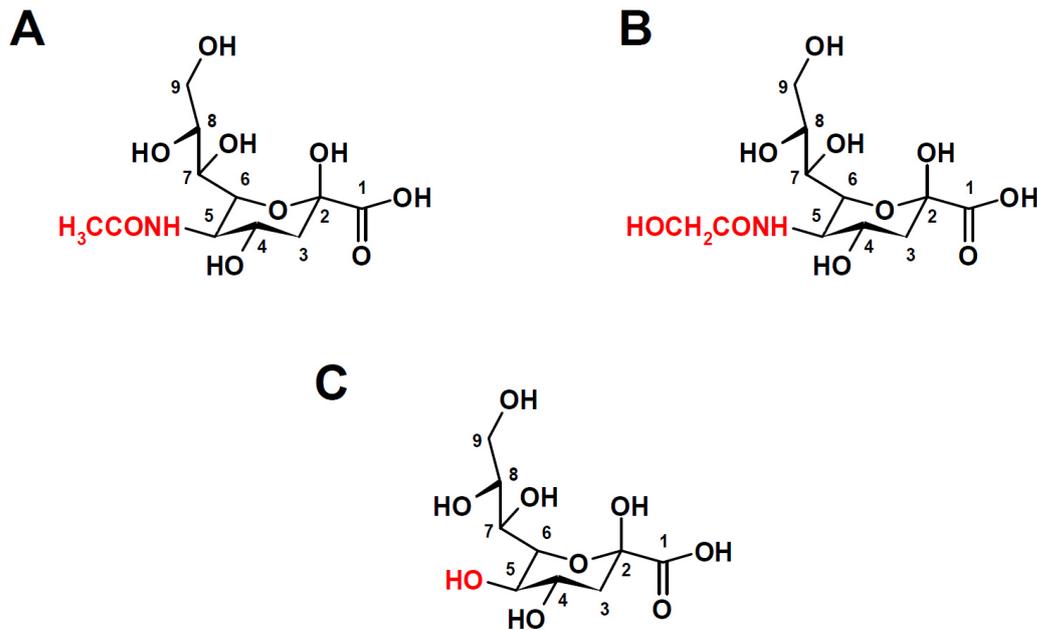


Abbildung 1. Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren: (A) N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), (B) N-Glykolylnuraminsäure (Neu5Gc) und (C) Deaminoneuraminsäure (KDN); entnommen aus der Kummulativdissertation *Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in vivo* von Galuska, S.P., Gießen 2008.

Dieser Effekt wurde zuerst als posttranslationale Modifikation des *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) nachgewiesen, welches bei der Entwicklung des vertebralen Nervensystems eine entscheidende Rolle spielt. So reguliert polysialyliertes NCAM (PSA-NCAM) sowohl im embryonalen/postnatalen, als auch im adulten Gehirn, über homophile und heterophile Interaktionen die Zelladhäsion, Signalwirkung, Migration und Plastizität im zentralen Nervensystem (ZNS) [Muhlenhoff, Eckhardt et al. 1998]. Im embryonalen Gehirn lässt sich PolySia erstmals am 9. Tag (E9) nachweisen, annähernd zeitgleich zur Expression von NCAM am 8. Tag (E8). Im Laufe der embryonalen Entwicklung kommt es zu einer leichten Steigerung zwischen E10,5 - E14. Bis zum 9. postnatalen Tag (P9) bleibt das PolySia-Level überwiegend konstant und sinkt anschließend bis P17 um fast 70% ab. Obwohl die Expression von PolySia im adulten ZNS auf ein Minimum von 10% der ursprünglichen Menge herabgesenkt wird, werden dennoch in Bereichen mit bestehender Bildung von Neuronen, wie z.B. im Hippocampus oder der subventrikulären Zone, größere Mengen an PolySia exprimiert [Rutishauser 1996; Rutishauser and Landmesser 1996; Muhlenhoff, Eckhardt et al.

1998; Galuska, Geyer et al. 2008; Oltmann-Norden, Galuska et al. 2008; Muhlenhoff, Oltmann-Norden et al. 2009].

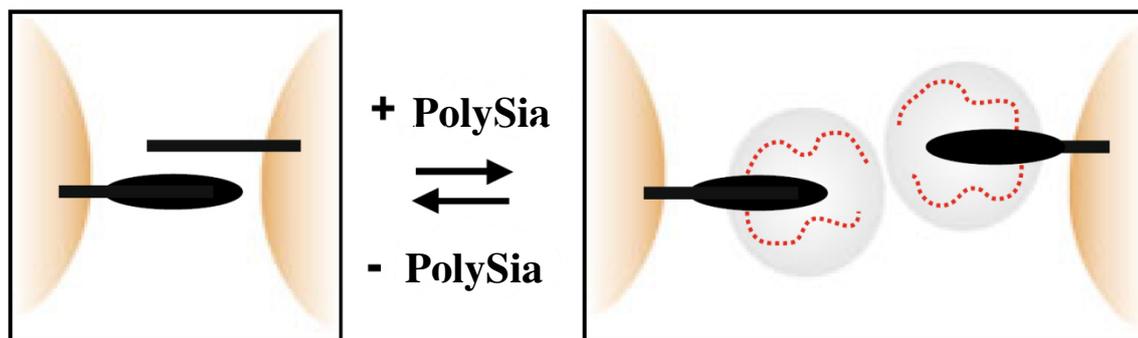


Abbildung 2. Effekt des hydrodynamischen Radius von PolySia auf den interzellulären Spalt; modifiziert nach *Polysialic Acid: Versatile Modification of NCAM, SynCAM 1 and Neuropilin-2*, nach Mühlenhoff et al. 2013 [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Zwei im Golgi-Apparat lokalisierte Polysialyltransferasen (ST8SiaIV und ST8SiaII) sind für die Biosynthese von PolySia, sowie die Modifikation der Träger-Glykoproteine verantwortlich. Neben NCAM, als mengenmäßig am stärksten polysialyliertes Glykoprotein bei Säugetieren, konnten das *Synaptic Cell Adhesion Molecule* SynCAM1 im Maushirn, CD36 in menschlicher Milch, Natrium-Kanäle im Rattenhirn und Neuropilin-2 auf menschlichen Dendritischen Zellen als Träger identifiziert werden [Zuber, Lackie et al. 1992; Yabe, Sato et al. 2003; Galuska, Rollenhagen et al. 2010; Rey-Gallardo, Escribano et al. 2010].

1.2 Bekannte polysialylierte Glykoproteine

1.2.1 Neural Cell Adhesion Molecule – NCAM

Das *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) ist ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Familie der Adhäsionsmoleküle, bestehend aus fünf Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen, sowie zwei Fibronectin Typ-III Wiederholungen. Durch alternatives Splicen entstehen drei mögliche Isoformen (NCAM-180, -140 und -120), wobei NCAM-180 und NCAM-140 als Akzeptoren für eine Polysialylierung dienen können [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013]. NCAM weist sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, von denen die fünfte und sechste Stelle an der Ig-5-Domäne (Asn-430 und Asn-459)

der Polysialylierung dienen. Die angrenzende Ig-4-Domäne und der Fibronectin-1-TypIII (FN1) sind essenziell für die Transferierung der PolySia auf NCAM. Ob sie ausschließlich der Stabilisierung bzw. Herstellung der benötigten Konformation dienen, oder direkt polysialyliert werden, bleibt unklar [Galuska, Geyer et al. 2008; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013] (**Abbildung 3**).

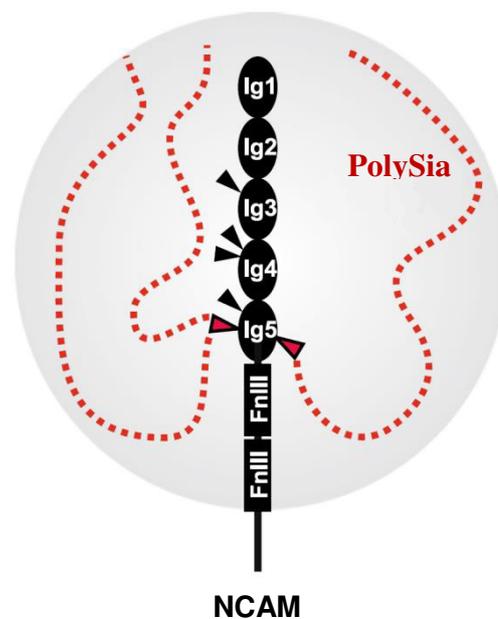


Abbildung 3. Schematische Darstellung von polysialyliertem NCAM: Die extrazelluläre Domäne von NCAM besteht aus fünf Ig-Domänen (Ig1 bis Ig5), gefolgt von zwei Fibronectin-Typ III Wiederholungen (FnIII). N-Glykane (▶) finden sich an sechs N-Glykosylierungsstellen, wobei nur die fünfte und sechste Stelle (▶) polysialyliert werden können; modifiziert nach *Polysialic Acid: Versatile Modification of NCAM, SynCAM 1 and Neuropilin-2*, Muhlenhoff et al. 2013 [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

NCAM wurde im Rahmen der Entwicklung des zentralen Nervensystems als wichtiger Regulator nachgewiesen. NCAM liegt auf der Zelloberfläche und ist als Teil der Glykokalyx an der Interaktion mit anderen Zellkontakten beteiligt. Die Modifizierung durch PolySia führt zu einer Hydratisierung und einer stark negativen Ladung, wodurch die Interaktion von NCAM mit anderen Zellen reguliert wird. PolySia weist aufgrund der Hydratisierung ein deutlich größeres Volumen auf, als das Trägerprotein NCAM, dadurch wird der Kontakt mit der Oberfläche anderer Zellen durch PolySia verringert. Dies ermöglicht die Plastizität und damit die Veränderung und Entwicklung von strukturellem Gewebe. Die intensive Erforschung der Funktion von NCAM bzw. PolySia-NCAM zeigten, dass NCAM unter anderem an der Regulation der Neuroblast-Migration, dem Neuriten-Wachstum, der Axon-Steuerung und der Faszikulation

beteiligt ist. Zudem ist es ein entscheidender Regulator der Synaptogenese und synaptischen Plastizität [Rutishauser 2008; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Die Synthese von PolySia und anschließende Modifikation von NCAM erfolgt im Golgi-Apparat durch die Polysialyltransferasen ST8SiaIV und ST8SiaII. Ihre Expression reguliert im sich entwickelnden ZNS die Menge an produziertem PolySia-NCAM. ST8SiaIV- oder ST8SiaII-defiziente Mäuse zeigten Verzögerungen im postnatalen Wachstum des ZNS, frühzeitigen postnatalen Tod und eine verstärkte Häufigkeit in der Ausbildung eines Hydrozephalus. Da diese Retardierung durch Ausschalten des Gens zur NCAM-Expression umgangen werden kann, steht die Hypothese, dass PolySia NCAM abschirmt und damit eine unkontrollierte Entwicklung des ZNS unterdrückt [Nelson, Bates et al. 1995; Rutishauser 1996; Rutishauser and Landmesser 1996; Muhlenhoff, Eckhardt et al. 1998; von Der Ohe, Wheeler et al. 2002; Bonfanti 2006; Hildebrandt, Muhlenhoff et al. 2007; Galuska, Geyer et al. 2008; Oltmann-Norden, Galuska et al. 2008; Rutishauser 2008; Muhlenhoff, Oltmann-Norden et al. 2009].

1.2.2 Thrombospondin-Rezeptor / CD36-Molekül

Das humane CD36-Molekül (Thrombospondin-Rezeptor) ist ein integriertes Membranprotein, welches auf den Zelloberflächen verschiedener Zelltypen, wie z.B. Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten oder Brustepithelzellen zu finden ist. CD36 gehört zur Klasse B der Scavenger Rezeptoren. Es interagiert mit verschiedenen Liganden, darunter Kollagen, Thrombospondinen, den Lipoproteinen LDL, HDL und VLDL, oxidierten Phospholipiden oder langkettigen Fettsäuren. Da Thrombospondine an einer Vielzahl von Adhäsionsvorgängen beteiligt sind, vermutet man bei CD36 eine wichtige Rolle als Zell-Adhäsions-Molekül. Weitere Funktionen hat es mitunter bei der Malariainfektion durch *Plasmodium falciparum*, Thrombozytopenien, Tuberkulose [Tandon, Kralisz et al. 1989; Ockenhouse, Klotz et al. 1991; Silverstein, Baird et al. 1992; Calvo, Gomez-Coronado et al. 1998; Podrez, Poliakov et al. 2002; Derre, Pypaert et al. 2007].

Yabe *et al.* konnten α 2-8 verknüpfte PolySia auf einer löslichen Form von CD36 in humaner Milch, sowie der Milch von Mäusen nachweisen. PolySia war dabei nur auf Milch CD36 zu identifizieren, nicht auf Thrombozyten CD36. Die Polysialinsäuren sind dabei O-glykosidisch mit CD36-Molekül gekoppelt. Die höchste Menge an Milch CD36

wurde während des Kolostrums gemessen. Im Verlauf der Laktation erreichte sie ihr Minimum einen Monat nach der Geburt. Anschließend nahm die Menge wieder zu und erreichte eine Konstanz drei bis sechs Monate nach der Geburt. Die Menge an PolySia in humaner Milch zeigte im Verlauf des Kolostrums hin zur Laktation bis in den sechsten Monat nach der Geburt nur einen leichten Anstieg, wobei das Verhältnis PolySia zu CD36 ein Maximum im 1. Monat nach der Geburt erreichte [Yabe, Sato et al. 2003].

Die Funktion von Milch CD36 ist bis jetzt ungeklärt. Milch CD36 ist in die Membran der Fettkügelchen integriert, welche von den Brustepithelzellen sekretiert werden. Yabe *et al.* vermuten in der PolySia einen protektiven Schutz vor pathogenen Viren und Bakterien in der Muttermilch, um eine Infektion der Neugeborenen zu verhindern. Die Glykosylierung wirke sich zudem auf die Bindeeigenschaften von CD36 zu oxidierten LDL aus. Diese alternative Bindung könnte das Neugeborene vor der Aufnahme von schädlichen Substanzen schützen. Zudem wird die Milch als reiche Quelle von Sialinsäuren zur Versorgung des Neugeborenen diskutiert, um die Entwicklung des neuronalen Systems zu gewährleisten [Yabe, Sato et al. 2003].

1.2.3 Spannungsabhängige Natrium-Kanäle

James und Angew *et al.* konnten 1987 erstmals Protein-verknüpfte PolySia im Elektropilax des Aals *E. electricus* nachweisen. Dabei handelt es sich um ein Organ, welches in der Lage ist, elektrische Spannungen zu erzeugen, die an das umliegende Wasser abgegeben werden können. Das Protein konnte als α -Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals identifiziert werden. Ähnliche Untereinheiten konnten auch in Natriumkanälen erregbarer Membranen des Nervensystems von Insekten, des Nervensystems von Aalen und im Gehirn und Herz von Ratten nachgewiesen werden [James and Agnew 1987; Zuber, Lackie et al. 1992].

1992 konnten Zuber *et al.* darstellen, dass die Immunreaktivität von α -2,8-verknüpfter PolySia im Rattenhirn nicht immer mit einer Kolo-kalisation von NCAM einhergeht. So konnten sie im Bulbus olfactorius und im akzessorischen Bulbus olfactorius keinerlei Reaktivität für NCAM nachweisen, bei deutlichen Signalen für PolySia. Anhand der Immunpräzipitation von Synapsenmembranen und Antikörpernachweis nach SDS-Page wurde auch im Rattenhirn die α -Untereinheit der Natriumkanäle als Träger der PolySia identifiziert. Die Desialylierung dieser Untereinheiten führt zu einer deutlich

verringerten Leitfähigkeit der Kanäle. Daher wird die Modulation der elektrophysikalischen Eigenschaften der Natriumkanäle durch PolySia diskutiert [Zuber, Lackie et al. 1992].

1.2.4 *Synaptic Cell Adhesion Molecule* - SynCAM 1

Das *Synaptic Cell Adhesion Molecule* SynCAM 1 gehört ebenso wie NCAM zur Superfamilie der Immunglobuline und ist ein weiteres polysialyliertes Glykoprotein. Der extrazelluläre Part besteht aus drei Ig-Domänen mit sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen, sowie mehreren möglichen O-Glykosylierungsstellen. SynCAM 1 ist im Gehirn im Bereich der Synapsen lokalisiert und stellt einen potenten Faktor in der Einleitung der neuronalen Synapsenformierung, indem es den synaptischen Spalt durch homo- und heterophile Transinteraktion mit SynCAM 2 überbrückt [Biederer, Sara et al. 2002; Galuska, Rollenhagen et al. 2010; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Im Hirn von Mäusen konnte eine polysialylierte Subfraktion von SynCAM 1 identifiziert werden. Während der Entwicklung des Gehirns nimmt die Menge an PolySia-SynCAM 1 drastisch ab, wobei die Gesamtmenge von SynCAM 1 konstant bleibt. Das PolySia-SynCAM 1 ist im perinatalen Gehirn ausschließlich auf NG2-Zellen zu finden, welche als multipotente Progenitorzellen für Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen dienen [Galuska, Rollenhagen et al. 2010].

Die Polysialylierung von SynCAM 1 erfolgt *in vivo* ausschliesslich durch die Sialyltransferase ST8SiaII [Rollenhagen, Kuckuck et al. 2012]. Die Polysialinsäuren sind auf SynCAM 1 im sich entwickelnden Gehirn an die dritte von sechs N-Glykosylierungsstellen gebunden (**siehe Abbildung 4b**). PolySia ist dabei selektiv an das N-Glykan von Asn-116 in der ersten Ig-Domäne gekoppelt. Die erste Ig-Domäne ist in homo- und heterophile Interaktionen von SynCAM 1 involviert. Bindet sie PolySia, kommt es *in vitro* zur vollständigen Unterbindung von homophilen Verknüpfungen, was für eine entscheidende Rolle von PolySia als Regulator von SynCAM 1-Interaktionen spricht [Biederer 2006; Galuska, Rollenhagen et al. 2010; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Da SynCAM 1 speziell auf NG2-Zellen zu finden ist, wird vermutet, dass SynCAM 1 eine entscheidende Rolle bei der synaptischen Verknüpfung von NG2-Zellen und Neuronen spielt. So würde PolySia, ähnlich wie bei NCAM, als Regulator bei den

Interaktionen von SynCAM 1 dienen. Da PolySia die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die AMPA Glutamat-Rezeptoren in die offene Konformation wechseln - über die die NG2-Zellen synaptische Informationen erhalten – könnte PolySia-SynCAM 1 die Kommunikation zwischen NG2-Zellen und Neuronen regulieren [Galuska, Rollenhagen et al. 2010].

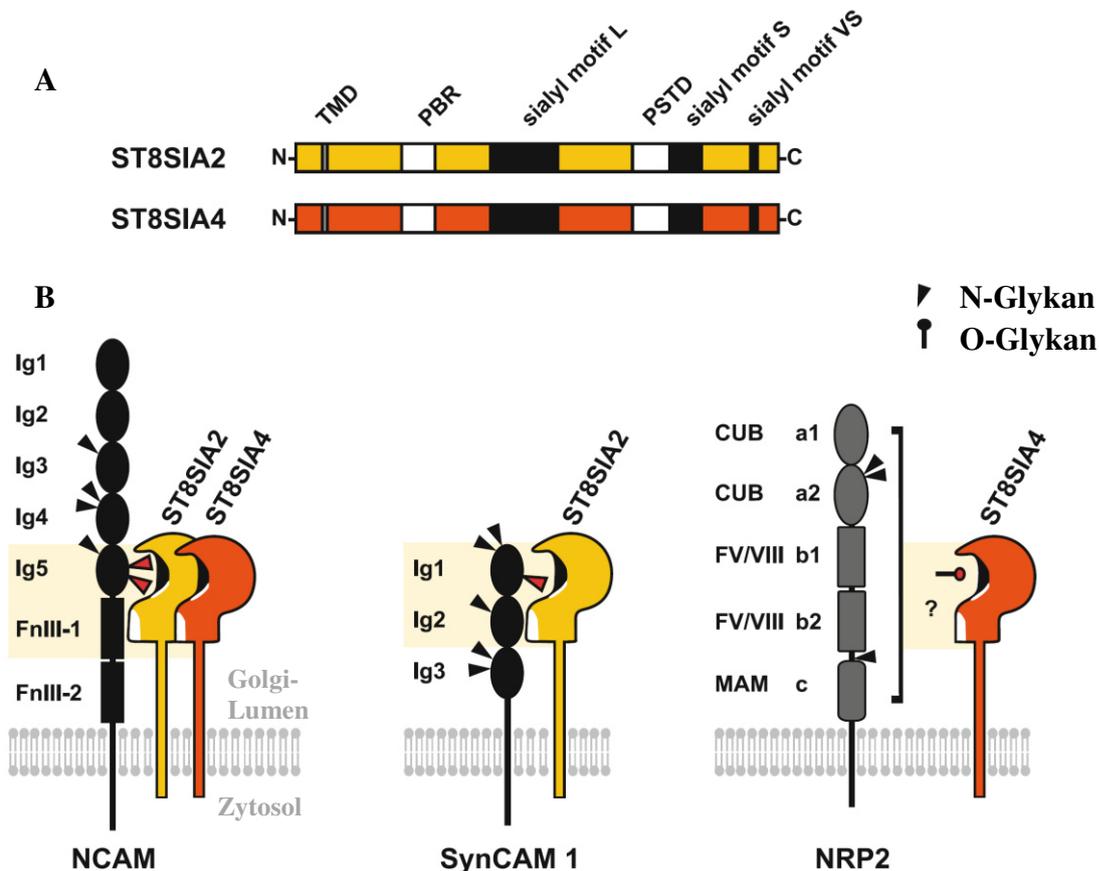


Abbildung 4. (A) Schematische Darstellung von ST8SiaII und ST8SiaIV: Beide PolySTen besitzen einen kurzen N-terminalen Teil im Zytosol, eine transmembrane Domäne (TMD), den Stamm und das C-terminale katalytische Ende. Das *large* (L), *short* (S) und *very short* (VS) *sialyl motif* sind in allen Sialyltransferasen von Säugetieren zu finden. Beide Polysialyltransferasen besitzen zwei spezifische Domänen, die *polybasic region* (PBR) und die *polyST spezific domain* (PSTD). **(B) Struktur und Interaktion von NCAM, SynCAM 1 und NRP2 mit ihren PolySTs:** NCAM und SynCAM 1 sind jeweils an N-Glykanen (▶) polysialyliert. NCAM an der 5. Und 6. Glykosylierungsstelle (▶), SynCAM1 an der 3. Stelle (▶). NRP-2 ist o-glykosidisch poly-sialyliert, genauere Interaktionen der ST8SiaIV mit NRP-2 sind jedoch ungeklärt. Mod. nach *Polysialic Acid: Versatile Modification of NCAM, SynCAM and Neuropilin-2*; von Mühlhoff M. 2013 [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

1.2.5 Polysialyliertes Neuropilin-2 auf Dendritischen Zellen

Neuropilin-2 (NRP-2) spielt wie NCAM eine Rolle bei der Steuerung des axonalen Wachstums im sich entwickelnden neuronalen System. Ebenso fördert es die Proliferation, Migration und Angiogenese von vaskulären Endothelzellen. Zudem wurde es auf lymphatischem Endothel lokalisiert, sowie neuroendokrinen Zellen des menschlichen Verdauungstrakts, den Inselzellen des Pankreas und verschiedenen malignen Zellen. Auf aus Monozyten entwickelten, humanen dendritischen Zellen konnte eine polysialylierte Form von NRP-2 identifiziert werden, die nicht auf isolierten Monozyten zu finden ist. Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems. Die unausgereiften DCs (iDC) bleiben solange inaktiv, bis es im Verlauf der Bindung eines Pathogens zur Migration der iDC in die umliegenden Lymphknoten kommt, was die Reifung zu Antigen-präsentierenden Zellen auslöst [Curreli, Arany et al. 2007; Pellet-Many, Frankel et al. 2008; Bax, van Vliet et al. 2009; Parker, Guo et al. 2012; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Während der Reifungsprozesse kommt es zu ausgeprägten Veränderungen im Bereich der Expression von glykosylierten Genen. So konnte ein Anstieg des Transkriptionslevels von ST8SiaIV nachgewiesen werden, der einherging mit der Zunahme an PolySia. Als Träger der an O-Glykane gebundenen α 2,8-verknüpften Sialinsäureketten konnte Neuropilin-2 (NRP-2) identifiziert werden. Die Expression sowohl von PolySia, als auch von NRP-2 steigt im Verlauf der Entwicklung der dendritischen Zellen aus Monozyten, hin zu ihrer Reifung. Dabei scheint ST8SiaIV möglicherweise die einzige Polysialyltransferase zu sein. Die molekularen Voraussetzungen für die Polysialylierung von NRP-2 sind im Gegensatz zu NCAM und SynCAM 1 weitgehend unklar. Es ist bekannt, dass NRP-2 einen extrazellulären Teil aus fünf Domänen besitzt und PolySia über eine oder mehrere O-Glykosylierungsstellen bindet, allerdings bleibt unklar, welche dies sind (**siehe Abbildung 4b**) [Curreli, Arany et al. 2007; Pellet-Many, Frankel et al. 2008; Bax, van Vliet et al. 2009; Rey-Gallardo, Escribano et al. 2010; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass NRP-2 auf humanen mDCs als zwei Isoformen NRP-2a und -2b vorliegt, die beide polysialyliert sind. Das Herunterregulieren der NRP-2 Expression oder der Polysialylierung über die Sialyltransferase ST8SiaIV führte dabei zu einer deutlichen Verringerung der Migration von ausgereiften dendritischen Zellen in das sekundäre lymphatische Gewebe. Die

Chemotaxis der mDCs wird dabei von PSA-NRP-2 über den chemokinen Liganden (CCL21) mit seinem Rezeptor CCR7 induziert. PolySia konnte als essentieller Partner für die Chemotaxis von mDCs identifiziert werden, da es die direkte Verknüpfung mit dem basischen C-Terminus des CCL21 eingeht, und es dadurch zur Ausbildung des CCR7/PSA-NRP2/CCL21-Komplexes kommt. Dieser Komplex ermöglicht die gesteuerte Migration in die lymphatischen Organe und Lymphknoten [Curreli, Arany et al. 2007; Bax, van Vliet et al. 2009; Rey-Gallardo, Escribano et al. 2010; Rey-Gallardo, Delgado-Martin et al. 2011].

Neben der Steuerung der CCL21-induzierten Chemotaxis der mDC besteht die Hypothese, dass die Polysialylierung von NRP-2 eine Art Schutzschild für die sich differenzierenden dendritischen Zellen bildet, bis die Migration in das lymphatische Gewebe abgeschlossen ist, und eine ungewollte Zell-Zell-Interaktion mit vaskulären oder lymphatischen Endothelzellen verhindert werden konnte. Dort könnte PolySia das Ausmaß an Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten beeinflussen, da nachgewiesen werden konnte, dass der Verdau der PolySia der dendritischen Zellen zu einer gesteigerten Aktivierung von T-Lymphozyten führt. Auch wenn NRP-2 das am stärksten polysialylierte Protein auf dendritischen Zellen ist, so konnte doch nachgewiesen werden, dass weitere polysialylierte Proteine vorhanden sind [Curreli, Arany et al. 2007; Bax, van Vliet et al. 2009; Rey-Gallardo, Escribano et al. 2010; Rey-Gallardo, Delgado-Martin et al. 2011].

1.3 Polysialylierung – Polysialyltransferasen ST8SiaII+IV

Die Polysialyltransferasen ST8SiaIV und ST8SiaII sind die einzigen bekannten Transferasen, die in der Lage sind NCAM zu polysialylieren. Mittlerweile ist bekannt, dass auch SynCAM 1 von ihnen polysialyliert wird, wobei in vivo ausschliesslich ST8SiaII als Akteur nachgewiesen wurde [Rollenhagen, Kuckuck et al. 2012]. Im Fall von Neuropilin-2 ist es gegensätzlich und möglicherweise ausschließlich ST8SiaIV [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

ST8SiaII und ST8SiaIV gehören beide zu den Typ-II-Membranproteinen und verknüpfen Sialinsäuren über eine tri-antennäre Struktur eines N-Glykans mit NCAM. Die erste Sialinsäure ist dabei über eine α -2,3- oder α -2,6-Verbindung mit einer β -Galaktose verknüpft. Jede weitere Sialinsäure des Polymers ist α -2,8-verbunden, daher auch die Bezeichnung α -2,8-Sialyltransferasen (**siehe Abbildung 5**). Die

Polysialyltransferasen gehören wie auch andere Sialyltransferasen bei Säugetieren zu den Golgi-residenten Typ II Transmembranproteinen, können jedoch auch auf exprimierenden Zellen und bei Überexpression im extrazellulären Raum gefunden werden. Sie besitzen einen kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Schwanz, eine Stammregion und einen langen katalytischen Anteil im Golgilumen. Die Sialylmotive *large* (L), *small* (S) und *very small* (VS) sind ein fester Bestandteil der Sialyltransferase-Familie und sind in die Bindung des Substrats involviert. Zwei spezifische katalytische Domänen wurden mit der *polysialyltransferase domain* (PSTD) und der *polybasic region* (PBR) identifiziert. Die PSTD ist wichtig für die katalytische Aktivität, PBR bindet NCAM und scheint damit ein entscheidender Faktor in der Akzeptor-Substrat-Erkennung zu spielen (**siehe Abbildung 4a**) [Muhlenhoff, Eckhardt et al. 1996; Close and Colley 1998; Nakayama, Angata et al. 1998; Nakata, Zhang et al. 2006; Foley, Swartzentruber et al. 2009; Zapater and Colley 2012; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

Die am weitesten geklärte molekulare Interaktion der PolySTen mit ihrem Substrat liegt mit NCAM vor. Sowohl ST8SiaII, als auch ST8SiaIV sind in der Lage NCAM zu polysialylieren. Beide Polysialyltransferasen sind unabhängig voneinander in der Lage, NCAM zu polysialylieren. Dabei unterscheidet sich die Länge von PolySia *in vivo* nicht. Untersuchungen zeigten Kettenlängen von über 90 Sialinsäuren auf NCAM. Sowohl ST8SiaII als auch ST8SiaIV waren dabei in der Lage, entsprechend lange Sialinsäureketten zu transferieren, obwohl ST8SiaIV bevorzugt kurzkettiges PolySia erzeugte. Dabei wurde ein synergetischer Effekt nachgewiesen, wenn beide Polysialinsäuretransferasen aktiv waren [Galuska, Geyer et al. 2008]. Es konnte allerdings ein deutlicher Effizienzunterschied zwischen ST8SiaIV und ST8SiaII nachgewiesen werden. So konnte bei Knock-out-Mäusen für ST8SiaIV bzw. ST8SiaII gezeigt werden, dass Mäuse mit nur einer Transferase nur bedingt den Verlust der anderen Transferase kompensieren können. ST8SiaIV *-/-* Mäuse zeigen zwar keinen Rückgang der gesamten PolySia-Menge, ST8SiaII *-/-* Mäuse weisen im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Mäusen jedoch eine um 40% verringerte PolySia-Menge auf. Dies schlägt sich auch in der Masse an nichtpolysialyliertem NCAM wieder, welche bei ST8Sia2 *-/-* Mäusen bei 45% der gesamten NCAM-Menge lag, bei ST8SiaIV *-/-* Mäusen nahezu bei 0%. Dies zeigt, dass nur ST8SiaII in der Lage ist, ST8SiaIV zu kompensieren, jedoch nicht *vice versa* [Seidenfaden, Gerardy-Schahn et al. 2000; Galuska, Oltmann-Norden et al. 2006; Galuska, Geyer et al. 2008].

NCAM bindet PolySia an der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle, welche auf der 5. Ig-Domäne liegt. Beide Polysialyltransferasen synthetisieren an der sechsten N-Glykosylierungsstelle unabhängig voneinander und zeigen bei der Polymerisation die gleiche Effizienz. Die Polysialylierung der fünften N-Glykosylierungsstelle erfolgt zwar in Synergie von PST und STX, jedoch wird der Großteil an PolySia an das sechste N-Glykan gekoppelt. Dabei werden meist zwei Polysialinsäuren an ein N-Glykan gebunden, es sind jedoch auch drei oder mehr Ketten vorstellbar. Die Synergie beläuft sich zudem auch auf die Synthese von langkettigen Polysialinsäuren. So liegt die Gesamtmenge an langen Polymeren bei Wildtyp-Mäusen um 50% höher als bei Mäusen mit einer Mutation der Transferaseexpression (**siehe Abbildung 4a+b**) [Galuska, Geyer et al. 2008; Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

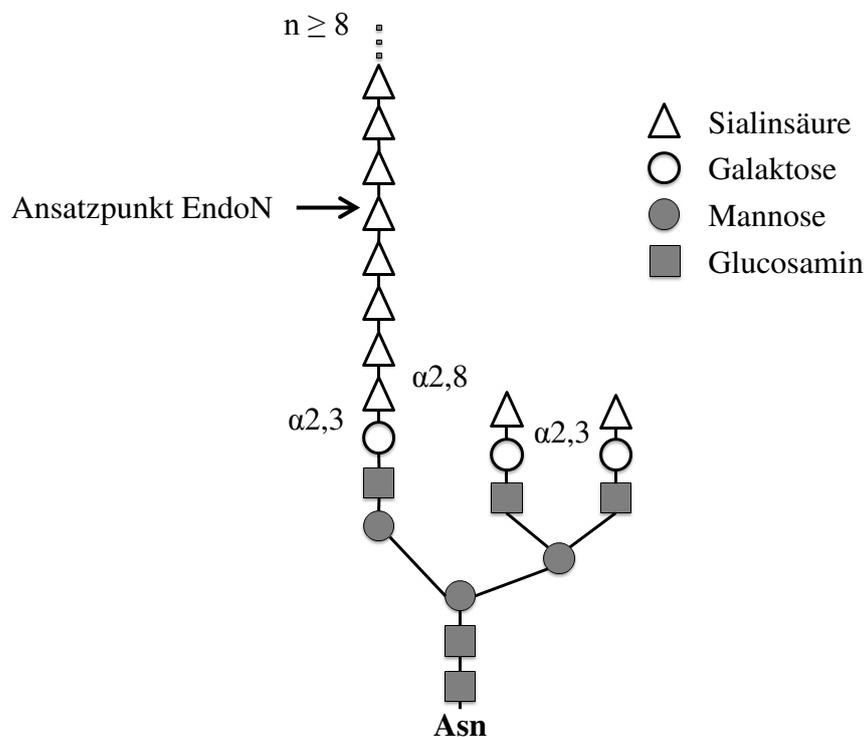


Abbildung 5. Polysialinsäure. Typische Struktur einer Polysialinsäure N-verbunden an einer Glycosylierungsstelle z.B. des *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM). Der triantennäre Aufbau durch Mannose und Glucosamin ist endständig an Galaktose gekoppelt. An die $\alpha 2,3$ -verbundene Sialinsäure mit Galaktose folgt die $\alpha 2,8$ -verbundene Sialinsäurekette ($n \geq 8$). Mod. nach *Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interaction*; von Rutishauser U. 1996 [Rutishauser and Landmesser 1996].

1.3.1 Autopolysialylierung von ST8SiaIV und ST8SiaII

NCAM ist zwar das Glykoprotein mit der größten Menge an gebundenem PolySia, allerdings sind sowohl ST8SiaIV als auch ST8SiaII in transferierten Zellen in der Lage, sich selber zu polysialylieren (Autopolysialylation). ST8SiaIV fünf mögliche N-Glykosylierungsstellen auf, von denen die Oligosaccharide an der Säureamidgruppe von Asn-74 und Asn-119 kritisch für die Autopolysialylierung von ST8SiaIV sind. Asn-74 ist dabei direkter Akzeptor von PolySia, Asn-119 scheint lediglich die Konformität und damit die Möglichkeit der Bindung der Sialinsäuren zu stabilisieren. Hinzu kommt noch Asn-219 als möglicher Akzeptor für PolySia (siehe **Abbildung 6**).

ST8SiaII besitzt 6 potentielle N-Glykosylierungsstellen, wobei die an Asn-89, Asn-219 und Asn-234 gekoppelten Oligosaccharide essentiell für die Autopolysialylierung von ST8SiaII sind. Mutiert man eine dieser Stellen, sinkt die Effektivität der Autopolysialylation drastisch. Das Oligosaccharid an Asn-89 trägt dabei den Hauptanteil an PolySia. Die Autopolysialylierung der Polysialyltransferasen ist zwar keine Voraussetzung für die Polysialylierung von NCAM, scheint jedoch *in cellulo* die Effizienz dieser zu verbessern (siehe **Abbildung 6**) [Close, Tao et al. 2000; Close, Wilkinson et al. 2001].

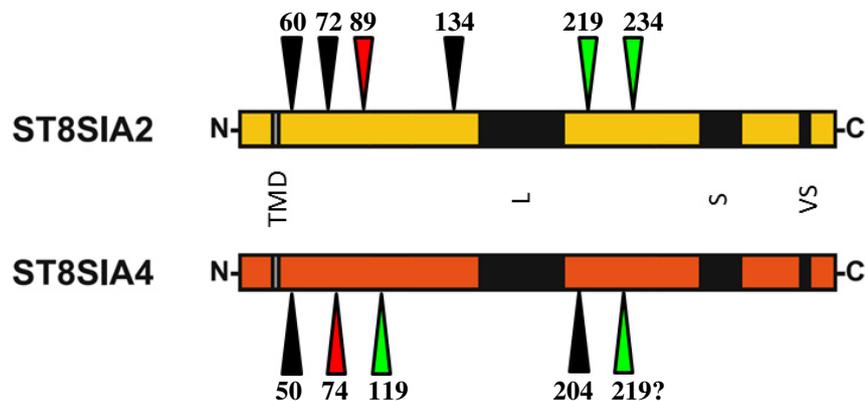


Abbildung 6. Glykosylierungsstellen für die Autopolysialylierung von ST8SiaII und ST8SiaIV: Glykosylierungsstellen (schwarze Pfeile), Domänen der Autopolysialylierung (grüne Pfeile), Dominante Domänen der Autopolysialylierung (rote Pfeile). ST8SiaII und ST8SiaIV sind mit Asn89 und Asn74 hauptsächlich an je einer Domäne polysialyliert, allerdings besitzen beide mit Asn219 und 234, bzw. Asn119 und ggf. Asn219 noch weitere Stellen, an der eine Autopolysialylierung gegeben ist. Adaptiert von *The polysialyltransferase ST8SiaII/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule* von Close B. 2001 [Close, Wilkinson et al. 2001] und *Polysialic Acid: Versatile Modification of NCAM, SynCAM and Neuropilin-2*; von Mühlenhoff M. 2013 [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

1.4 Anatomie und Funktion von Hoden und Nebenhoden

Der Hoden dient bei Säugetieren sowohl der Reproduktion über die Bildung der Spermien im Keimepithel, als auch der Bildung des männlichen Geschlechtshormons Testosteron durch die Leydig-Zellen. Nach der Bildung der Spermatozoen durch das Keimepithel in den Tubuli seminiferi folgt die Speicherung und Reifung in den Ductuli efferentes im Nebenhoden [Welsch 2010].

Die Hoden sind paarig angelegt und werden vom Hodensack (Skrotum) und den Hodenhüllen umgeben. Der außen liegenden Skrotalhaut folgen, neben der Tunica dartos, die Fascia spermatica externa, der M. cremaster, die Fascia spermatica interna und die Tunica vaginalis testis. Diese umfasst mit ihrer parietalen (Periorchium) und viszeralen Wand (Epiorchium) die spaltförmige Höhle (Cavitas serosa scroti), welche den Hoden fasst komplett umschliesst. Dorsal grenzt die Cavitas serosa scoti an den Samenstrang, der aus dem Nebenhoden (Epididymis) hervorgeht (siehe Abbildung). Die Zone der Anheftung mit dem Samenstrang wird als Mesorchium bezeichnet (**siehe Abbildung 7**) [Holstein 2008; Welsch 2010].

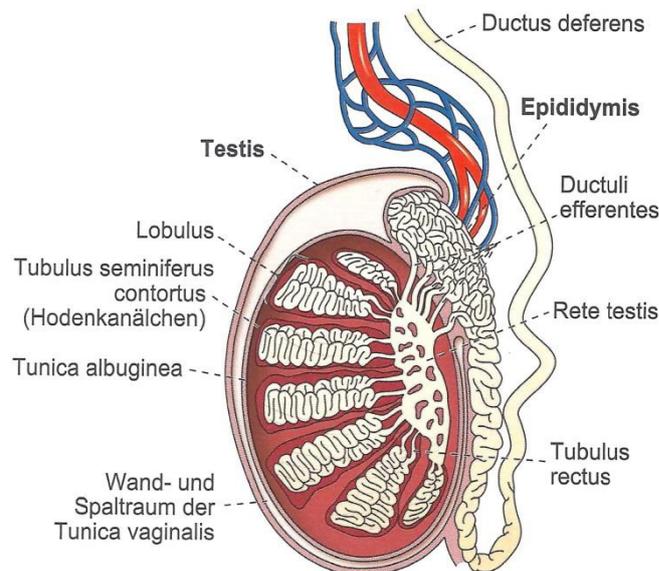


Abbildung 7. Anatomie des menschlichen Hodens, entnommen aus Welsch Lehrbuch Histologie 2010.

1.4.1 Histologischer Aufbau von Hoden und Nebenhoden

Das von der Tunica albuginea umschlossene Hodenparenchym besteht aus etwa 370 Hodenläppchen, den Lobuli testis. Die Lobuli testis wiederum sind durch

bindegewebige Septen voneinander getrennt, dabei verjüngen sie sich von ihrer breiten Basis im Bereich der Tunica albuginea konisch zur Rete testis hin [Holstein 2008].

Ein Lobulus testis besteht aus den sogenannten Tubuli seminiferi contorti, oder auch Samenkanälchen, die stark geknäult zwischen den Septen aufgewunden sind. Diese enthalten das zur Spermatogenese nötige Keimepithel und das Stützgewebe aus Sertoli-Zellen. Die ca. 30-70 cm Tubuli entspringen und enden in der Rete testis und erreichen in ihrer Gesamtheit eine Länge von bis zu 600 m. Das umgebende Interstitium enthält die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen, sowie Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven (**siehe Abbildung 7**) [Holstein 2008; Welsch 2010].

1.4.2 Das Keimepithel

Das Keimepithel enthält die sich zu Samenzellen entwickelnden Keimzellen und die Stütz- bzw. Sertoli-Zellen. Bei der Entwicklung zu Samenzellen (Spermatogenese) durchlaufen die Keimzellen mehrere Stadien, dabei stehen sie durch Interzellularbrücken miteinander in Verbindung, wodurch innerhalb eines Entwicklungsstadiums identische Zellgruppen, oder auch Klone, entstehen. So entstehen aus den Vorläuferzellen (Spermatogonien) im Laufe der Spermatogenese acht Spermatozyten mit weitgehend identischem genetischem Material. Während der Differenzierung der Keimzellen werden mehrere Reifeteilungen durchlaufen, wodurch die Chromosomen auf einen haploiden Satz reduziert werden. Gleichzeitig wird die Spermatogonie im Verlauf ihrer Differenzierung komplexen Transformierungen unterworfen, die aus vorhandenen Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat neue Zellkompartimente wie das Akrosom hervorbringen (**siehe Abbildung 8**) [Holstein 2008; Welsch 2010].

Gestützt werden die Keimzellen dabei durch die Sertoli-Zellen, dem einzigen somatischen Zelltyp neben den Keimzellen, die sich ausgehend von der Basallamina bis ins Lumen der Tubuli erstrecken. Durch ihre lamellenartigen Fortsätze umschließen sie die umliegenden Keimzellen, stützen das Keimepithel und versorgen es während der Spermatogenese. Gleichzeitig teilen die Sertoli-Zellen das Keimepithel in zwei Kompartimente ein. Durch Zonula occludens mit benachbarten Sertoli-Zellen in der Nähe der Basalmembran, wird ein basales Kompartiment von einem adluminalen unterschieden, die sogenannte Blut-Hoden-Schranke. Unterhalb der Zonula occludens bleibt eine Kommunikation mit dem subepithelialen Bindegewebe bestehen, wohingegen

in Richtung Lumen eine immunologische Einwirkung vollständig verhindert wird. Dies ermöglicht eine Ausreifung der Keimzellen ohne entsprechende Immunreaktion durch den Körper, oder Einwirkungen von mutagenen Substanzen [Hess and Renato de Franca 2008; Holstein 2008; Welsch 2010].

Neben der Stützfunktion und der Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, dienen die Sertoli-Zellen zudem der Abgabe der ausgereiften Spermatozoen in das Tubuluslumen, Spermatozoen, und der anschließenden Phagozytose des Residualkörpers aus Mitochondrien, Ribosomen und weiteren Organellen des Spermatozoid-Zytoplasmas. Sollte es während der Spermatogenese zudem zu Degenerationen von Spermatozoen oder Spermatozoen kommen, wird diese ebenso durch die Sertoli-Zellen phagozytiert. Neben den genannten Aufgaben der Sertoli-Zellen ist bekannt, dass die Anzahl der Sertoli-Zellen direkt mit der maximalen Produktion von Spermien korreliert. Da bisher in keiner Säugetierspezies eine Proliferation von Sertoli-Zellen nach der Pubertät nachgewiesen werden konnte, und Sertoli-Zellen nur eine bestimmte Anzahl an Keimzellen stützen und versorgen können, diktiert sie indirekt die Größe der Hoden, sowie die Spermatogenese. Dabei variiert die Dichte an Sertoli-Zellen im Keimepithel zwischen einzelnen Säugetierspezies deutlich (von 15% bei Mäusen, bis zu 40% bei Menschen). Im Umkehrschluss weisen Spezies mit geringer Dichte an Sertoli-Zellen und größerer Versorgungsrate an Keimzellen die bessere Effizienz der Spermatogenese auf [Hess and Renato de Franca 2008; Holstein 2008; Welsch 2010].

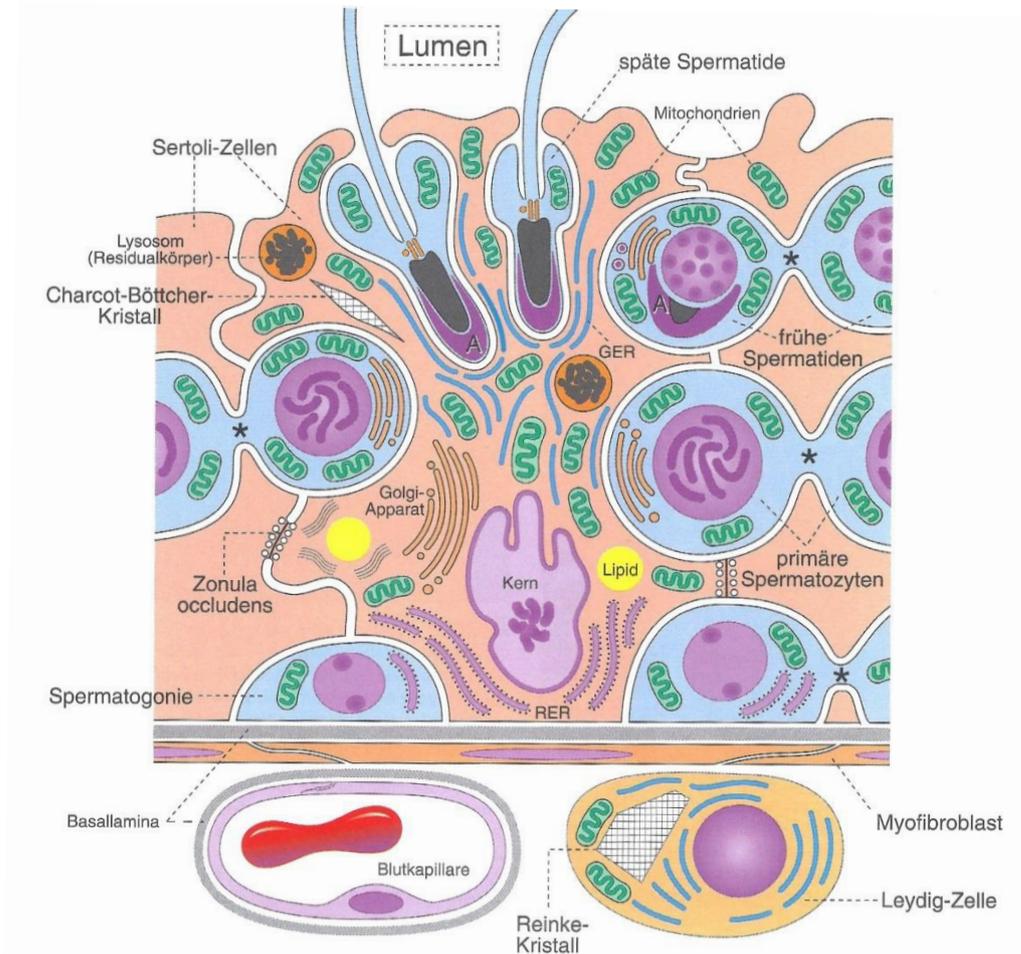


Abbildung 8. Schema des Keimepithels des Hodens mit Sertoli- und Keimzellen, sowie ihrer basalen Versorgung. Die Zonula occludens bilden die sog. Blut-Hoden-Schranke, die das basale und das adluminal Kompartiment des Keimepithels trennt. Dargestellt ist die Entwicklung der Spermatozoen aus ihren Vorläuferzellen, den Spermatozyten, die an der Basallamina verbleiben. Entnommen aus Welsch Lehrbuch der Histologie 2010.

1.4.3 Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein komplexer biologischer Prozess, welcher aus diploiden Spermatozyten haploide Keimzellen differenziert. Diese setzt sich aus den drei Phasen der Vermehrung (Spermatozytogenese), der Reifung und der Spermio-genese zusammen. Während der ersten Phase, der Spermatozytogenese, bilden sich aus den Stamm-Spermatozyten zwei Arten von Spermatozyten, die A-Spermatozyten und die B-Spermatozyten, welche beide sowohl den mütterlichen, als auch den väterlichen Chromosomensatz enthalten. Der diploide Chromosomensatz hat somit einen DNA-Gehalt von $2n$. Die A-Spermatozyten gehen direkt aus den Urspermatozyten hervor und teilen sich mitotisch in zwei Tochterzellen auf, von denen eine, als genetisch zur Stammzelle identische Spermatozyt, an der Basalmembran verbleibt, die zweite

Tochterzelle, oder B-Spermatogonie, tritt in die Phase der Reifung ein und teilt sich weiter. In den folgenden Stadien behalten die reifenden Keimzellen einen Verbund über Zytoplasmabrücken, wodurch die Klone der B-Spermatogonie die Entwicklungsstadien zeitgleich durchlaufen (**siehe Abbildung 9**) [Holstein 2008; Welsch 2010].

Aus der Mitose der B-Spermatogonien gehen die Spermatozyten I hervor, welche vor Eintritt der Prophase ihren DNA-Gehalt auf $4n$ verdoppeln. Während dieses Stadiums durchwandern die Spermatozyten die Blut-Hoden-Schranke der Sertoli-Zellen und wandern in das luminale Kompartiment, welches die folgende Meiose vor Einflüssen durch Mutagene und das Immunsystem schützt. In der ersten Reifeteilung entstehen aus je einer Spermatozyte I mit noch diploidem Chromosomensatz zwei haploide Tochterzellen ($2n$), die Spermatozyten II. In dieser bedeutenden Phase kommt es zudem zur chromosomalen Rekombination zwischen den homologen Chromosomenpaaren und somit zum Crossing-over von väterlicher und mütterlicher DNA. Die erste Reifeteilung verläuft sehr langsam, bis zur Anaphase vergehen ca. 20 Tage, anschließend gehen die Spermatozyten II nach nur wenigen Stunden in die zweite Reifeteilung über. Wie bei einer Mitose trennen sich die Chromatiden auf die Tochterzellen auf, wodurch der DNA-Gehalt pro entstandener Spermatozyte bei $1n$ liegt [Holstein 2008; Welsch 2010].

Im Laufe der dritten Phase der Spermatogenese, der Spermio-genese, kommt es zur Differenzierung der Spermatozyten in Spermatozoen. Dabei kommt es zu keiner weiteren Zellteilung, sondern zur Transformierung der Zelle samt Zellorganellen. Erst in diesem Stadium lösen sich die Zytoplasmabrücken der Klone wieder auf. Die Spermatozyten liegen dabei in der Nähe vom Lumen des Samenkanälchens.

Auch die Spermio-genese kann in drei Differenzierungen unterteilt werden: die Kernkondensation, die Akrosombildung und die Entwicklung der Geißel. Während der Kernkondensation wird das Karyoplasma auf ein Minimum des vorherigen Volumens kondensiert, dabei nimmt der Kern eine ovale bis paddelförmige Form an. Die Form des Spermatozytenkerns weist dabei interspezifische Unterschiede auf. Die Bildung des Akrosoms geht aus dem Golgi-Apparat hervor. Dabei entwickelt sich aus dem Golgi-Apparat ein Akrosombläschen, das sich während der Spermio-genese, einer Kappe gleich, über etwa zwei Drittel der Kernoberfläche stülpt. Das Akrosom enthält das lytische Enzym Acrosin enthält. Dieses ermöglicht die Proteolyse der Glykoproteinschicht der Eizelle (Zona pellucida), um das Eindringen des Spermatozoons in das Zytoplasma der Eizelle zu ermöglichen. Nah des Golgi-Apparats befinden sich auch die zwei Zentriolen aus denen der Geißelapparat hervorgeht. Aus

ihnen gehen die neun peripheren Doppeltubuli und die zwei zentralen Tubuli (9x2+2 Muster=Axonema) hervor, welche die zentrale Struktur in der Motilität der Spermatozoen darstellen.

Nach dem Abschluss der Transformation kommt es zur Spermiatio, dabei wird die ausgereifte Spermatide in das Lumen der Tubuli seminiferi contorti abgegeben, in diesem Stadium werden die Keimzellen als Spermatozoen bezeichnet.

1.4.4 Spermatozoon – Histologie

Das ausgereifte humane Spermatozoon ist etwa 60 µm lang und wird in einen Kopf und den Schwanz unterteilt. Den Großteil des Spermienkopfes nimmt der Zellkern ein, der vom Akrosom zu etwa zwei Drittel bedeckt ist. Dieses enthält hydrolytische Enzyme (z.B. Acrosin), die der Penetration der *Zona pellucida* der Oozyte dienen.

Der Schwanz besteht aus einem Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück. Das etwa 2 µm lange Halsstück enthält das proximale und distale Zentriol, von denen das Axonem mit seiner 9x2+2-Struktur aus Mikrotubuli ausgeht. Daran anschließend folgt der ca. 6 µm lange Mittelteil, welcher den Anfangsteil der Kinozilie enthält, diese sind von einem Ring aus Mitochondrien umgeben. Das Hauptstück ist mit 45µm der längste Teil der Geißel und besteht aus dem Kinozilium mit seiner faserigen Scheide. Das ringförmige Verbindungsstück zwischen Mittel- und Hauptstück wird als Anulus bezeichnet. Das Endstück ist wiederum nur ca. 5-7 µm lang und hat eine unregelmäßige Anordnung der Mikrotubuli, deren Zahl sich zur Spitze hin weiter reduziert und sich die Geißel somit verjüngt.

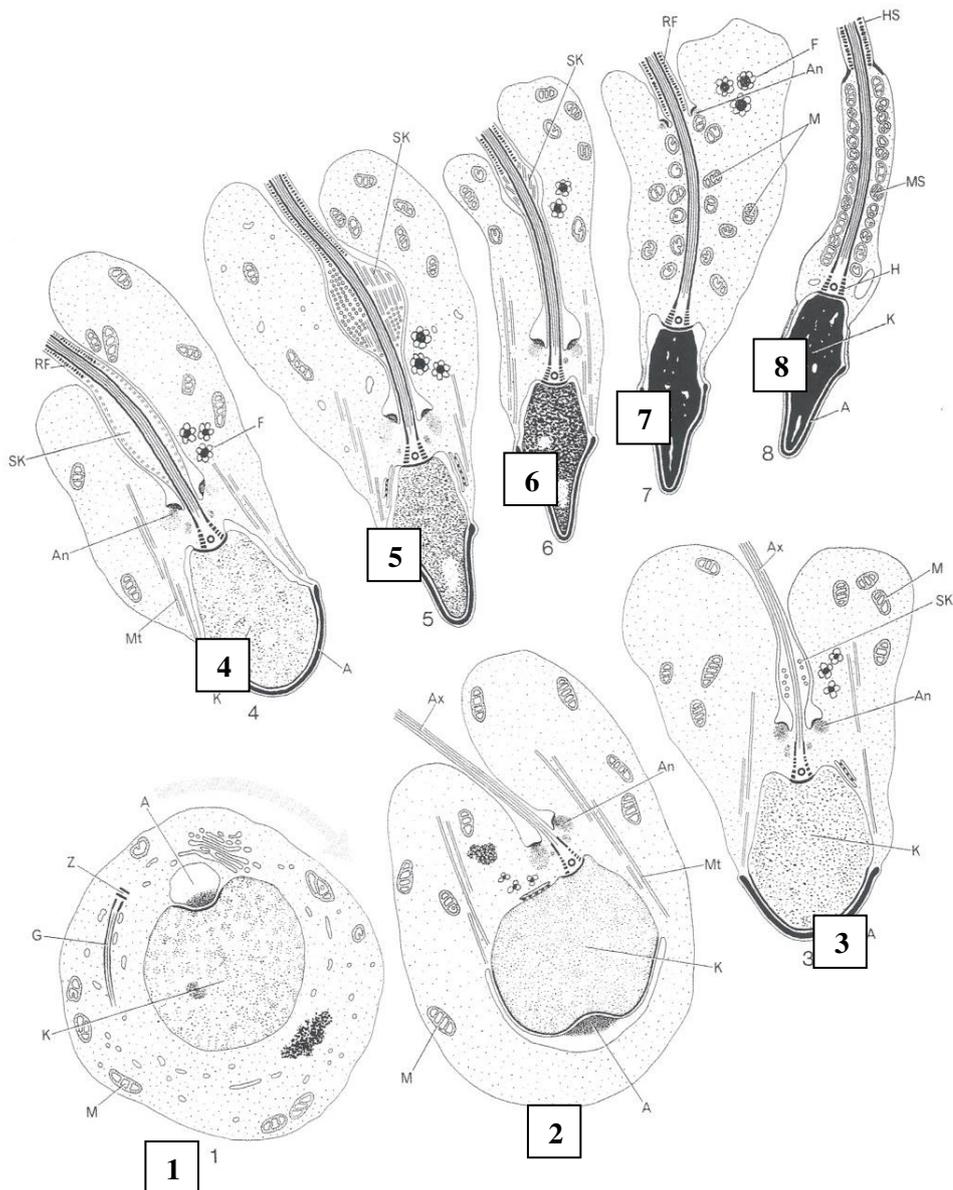


Abbildung 9. Schema der Spermatogenese: (1) Frühe Spermatide mit rundlichem Kern (K), Akrosombläschen (A), Geißelanlage (G), Zentriol (Z), Mitochondrien (M). Im Verlauf der Entwicklung rotieren Kern und Akrosombläschen (Pfeil), sodass die Geißelanlage sich am entgegengesetzten Kernpol implantiert. (2) Die Akrosomblase (A) hat sich über dem Kern (K) ausgebreitet. Mikrotubuli (Mt) gehen von ihrem Rand aus. Die Schwanzanlage ist implantiert. Ein Streifenkörper nimmt beide Zentriolen auf. Ein Anulus (An) umgibt das Mikrotubulusbündel (=Axonema) (Ax) der Geißel. (3) Die Akrosomblase ist mit akrosomaler Substanz gefüllt. Am Schwanz ist ein spindelförmiger Körper (SK) sichtbar. (4) Der Spermatidenkern zeigt eine ovale Form. Der spindelförmige Körper ist vergrößert. An seinem Ende haben sich Ringfasern (RF) entwickelt, die das Axonema umgeben. Bläschenförmige Zytoplasmastrukturen (F). (5) Das Karyoplasma des Spermatidenkerns ist grob-granulär. Der spindelförmige Körper enthält Mikrotubuli. (6) Das Karyoplasma ist verdichtet, der spindelförmige Körper hat an Volumen abgenommen. (7) Der Spermatidenkern zeigt eine starke Verdichtung des Karyoplasmas mit wenigen Vakuolen. Der Anulus ist am Axonema bis zum Beginn der Ringfasern gewandert und markiert jetzt den Beginn des Hauptsücks der Geißel. Die Mitochondrien gruppieren sich um das Axonema und bilden die Mitochondrienscheide des Mittelstücks. (8) Reife Spermatozoen mit kappenförmigem Akrosom, konischem Kern, Halsstück (H), Mittelstück (MS), Hauptstück (HS), Anulus, Ringfasern. *Übernommen aus Welsch Lehrbuch Histologie 2010.*

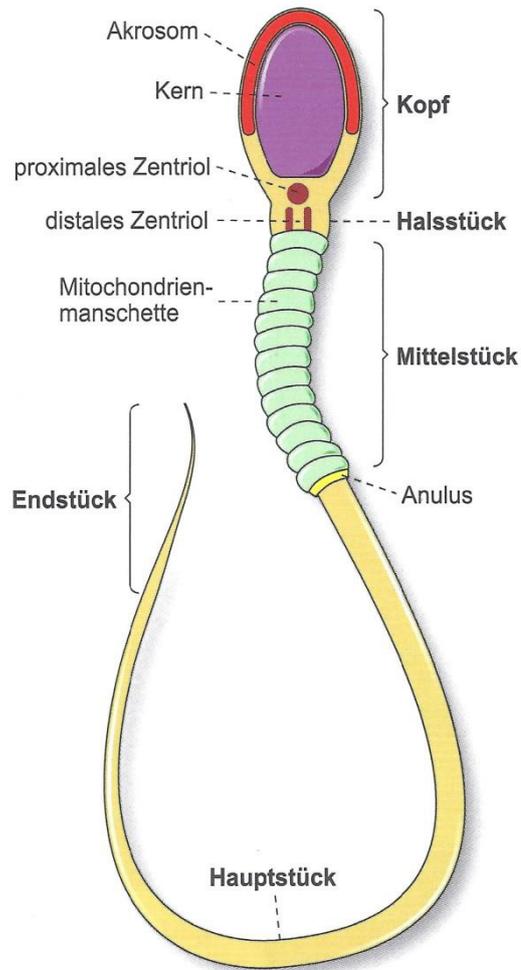


Abbildung 10. Schematischer mikroskopischer Aufbau eines reifen Spermiums. Entnommen aus *Welsch Lehrbuch der Histologie 2010*

1.4.5 Nebenhoden – Reifung der Spermatozoen

Der Nebenhoden, *Epididymis*, liegt dem Hoden an der Hilumseite an und bedeckt diese vom kaudalen bis zum kranialen Pol. Umgeben vom Skrotum, wird er zusätzlich von einer *Tunica albuginea* überzogen. Im Nebenhoden enden die *Ductuli efferentes* aus der *Rete testis* des Hoden. Der Hauptteil besteht aus dem Nebenhodengang, dem *Ductus epididymis*. Am kaudalen Hodenpol geht dieser in den *Ductus deferens* über [Robaire 2006; Holstein 2008; Welsch 2010].

Spermatozoen aus den Samenkanälchen oder den proximalen Anteilen des Nebenhodens sind noch nicht in der Lage, sich an die *Zone pellucida* des Eies zu binden, noch es zu befruchten. Erst der Transit durch den Nebenhoden führt zur Ausreifung der Spermien [Tulsiani, Skudlarek et al. 1993].

Die vier Hauptfunktionen des Nebenhodens sind der Transport der Spermatozoen, die Entwicklung der Spermienbeweglichkeit, die Ausreifung der Befruchtungsfähigkeit und das Aufrechterhalten der benötigten Umgebung zur Ausreifung und Speicherung der Spermatozoen im Lumen des *Ductus epididymis*. Ein Großteil der Modifikationen der Spermatozoen betrifft die Zelloberfläche, auf der verschiedenste Prozesse stattfinden, darunter die Modifikation, Addition und Elimination von Proteinen, Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung, der Zunahme an Disulfidbindungen oder die Relokalisation von Oberflächenantigenen. Die Interaktionen resultieren dabei aus dem Kontakt mit dem epididymalen Milieu und dem Kontakt mit dem Epithel des Nebenhodens. Vesikel, abgesondert vom Nebenhodenepithel, die sogenannten Epididymosomen, enthalten die Kompartimente und Proteine, die für die Modifikation und Ausreifung der Spermatozoen benötigt werden. Die Sekretion von Glykoproteinen durch das Epithel und die Bindung auf der Spermatozoenmembran konnte als Maskierung von Antigenen identifiziert werden, welche die reifenden Spermatozoen vor der körpereigenen Phagozytose schützen [Lassalle and Testart 1994; Sullivan, Frenette et al. 2007; Naaby-Hansen 2012].

An der Spermienoberfläche konnten bis jetzt 300 verschiedene Proteine über Vektorlabeling nachgewiesen werden. Die davon etwa 50 bis 150 glykosylierten Proteine, welche die extrazelluläre Membran bedecken, bilden die Glykokalyx. Im Gegensatz zu den meisten somatischen Zellen, sind bei der Spermienglykokalyx die Kohlenhydratstrukturen nicht zwingend fest. Während einige Komponenten der Membran mit der Lipiddoppelschicht über transmembrane oder glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Verbindungen verknüpft sind, existieren auch oberflächliche elektrostatische und hydrophobe Interaktionen. Da der Großteil an extrazellulären Membranproteinen glykosyliert ist, wird vermutet, dass die Interaktionen der Spermatozoen mit ihrem Umfeld über die Einwirkung der Glykokalyx abläuft [Schroter, Osterhoff et al. 1999].

Die aus dem Hoden geschwemmten Spermatozoen werden durch eine Reihe sekretorischer Prozesse immobilisiert. Dazu sondert das Nebenhodenepithel ein leicht saures Sekret ab. Zugleich wird die vom Hoden abgegebene Flüssigkeit durch die Stereozilien des Epithels resorbiert. Der Transport durch das Lumen des Nebenhodens dauert beim Menschen durchschnittlich 12 Tage. Da die Flüssigkeitsbewegung im *Ductus epididymis* gering ist und die Stereozilien unbeweglich sind, wird vermutet, dass ein hydrostatischer Druck ausgehend vom Hoden für den Transport verantwortlich ist.

Weitere Mechanismen, wie konzentrische rhythmische Muskelkontraktionen werden diskutiert [Robaire 2006; Holstein 2008].

Die Ausreifung der Fruchtbarkeit der Spermatozoen während des Transits durch den Nebenhoden konnte noch nicht ausreichend geklärt werden, jedoch zeigten mehrere Studien, dass die Fertilität der Spermien im Laufe des Transits steigt. Die entsprechende Differenzierung der Spermatozoen liegt laut Studien im proximalen Teil des Nebenhodens [Moore and Akhondi 1996; Robaire 2006].

Spermatozoen aus dem Hoden sind entweder unbeweglich, oder zeigen nur leichte Zuckungen der Geißel, Spermien aus dem Kopf des Nebenhodens schwimmen schon in kreisförmigen Mustern, jedoch erst im kaudalen Teil des Nebenhodens zeigen sie effektive Vorwärtsbestrebungen [Robaire 2006].

Im kaudalen Teil des Nebenhodens wird der Großteil der Spermatozoen gespeichert, dies kann auch über die normale Transitzeit von 12 Tagen hinaus bis hin zu 30 Tagen erfolgen. Dabei ist die Menge der gespeicherten Spermien beim Menschen in etwa vergleichbar mit der Zahl der Spermatozoen im Ejakulat, unabhängig davon, ob eine sexuelle Abstinenz erfolgt. Da sowohl die Speicherung als auch die Ausreifung der Spermien bei 2°C unter der Körpertemperatur erfolgen müssen, bietet der kaudale Nebenhoden den größten Abstand zum Körperkern, sollte die Temperatur trotzdem zu stark steigen, ermöglicht der *Musculus cremaster* des Skrotums über Kontraktion und Relaxation eine Regulierung dieser [Robaire 2006; Holstein 2008].

Neben den genannten Reifeprozessen konnten bei verschiedenen Spezies weitere Veränderungen der Spermatozoen nachgewiesen werden, wie das Abschnüren des zytoplasmatischen Vesikels, Differenzierungen des Akrosoms sowie viele biochemische Änderungen, wie die Stabilisierung der Chromatinstruktur [Moore and Akhondi 1996].

2 Zielsetzung

Vorangegangene Untersuchungen in der internen Arbeitsgruppe durch Herr Sören Bäumner im Rahmen seiner Dissertation konnten den Nachweis von PolySia-Ketten auf Glykoproteinen boviner und humaner Spermien erbringen. Dabei zeigten sich Kettenlängen von an die 46 Sialinsäuren auf bovinen respektive etwa 49 auf humanen Spermien. Die immunhistologische Untersuchung von PolySia auf bovinen und humanen Spermien konnte eine Lokalisation im postakrosomalen Bereich der Spermienköpfe zeigen (**siehe Abbildung 36**). Als Folge dieser Ergebnisse stellte sich die Frage für die vorliegende Arbeit, welche Glykoproteine polysialyliert vorliegen.

Folgende Ziele wurden dieser Dissertation zu Grunde gelegt:

- Auf welchen Glykoproteinen befinden sich die Sialinsäurepolymere?
- Findet sich PolySia auch im Hoden und Nebenhoden (Untersuchung an Ratte)?
- Sind die PolySia-Ketten N- oder O-glykosidisch mit den Glykoproteinen verknüpft und wo befinden sich die polysialylierten Glykosylierungsstellen am Proteinrückrat?
- Wo sind die polysialylierten Glykoproteine auf dem Spermium lokalisiert?

3 Material

3.1 Probenmaterial

Rattenhoden

Die frisch präparierten Rattenhoden und –nebenhoden wurden von Frau Bärbel Fühler aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Klaus T. Preissner des Biochemischen Instituts Gießen zur Verfügung gestellt. Die tiefgefrorenen Hoden wurden bis zur Verwendung bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

Bovines Ejakulat

Das bovine Ejakulat wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Axel Wehrend der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Veterinärmedizin in Gießen zur Verfügung gestellt. Das frisch gewonnene Ejakulat wurde direkt nach dem Absamen der Bullen bis zur weiteren Aufbereitung bei 37°C gelagert.

Humanes Ejakulat

Humanes Ejakulat wurde eigens zur Verfügung gestellt und bis zur Verwendung bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Für histologische Untersuchungen wurde frisches Ejakulat für 1 Stunde bei 37°C gelagert und anschließend weiterverarbeitet.

3.2 Antikörper

Primärantikörper

Anti-PolySia (735)

Monoklonaler Antikörper, der spezifisch α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Oligomere ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäureresten erkennt [Hayrinen, Bitter-Suermann et al. 1989]. Von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn aus dem Institut für Medizinische Mikro-biologie, Hannover zur Verfügung gestellt.

Anti-NCAM (123C3)	Monoklonaler Antikörper (aus Maus) gegen NCAM (<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>), erkennt die 180 und 140 kD Isoform. Von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hannover zur Verfügung gestellt.
Anti-ST8Sia2 (Firma Sigma)	Monoklonaler Antikörper gegen Alpha-2,8-sialyltransferase 8B, produziert in der Maus speziell gegen humane Antigene.
Anti-PolySia (biotinylierte EndoN)	Inaktivierte Endoneuraminidase N gegen PolySia, welche mit Biotin gekoppelt eine Bindung mit Streptavidin als Sekundärantikörper ermöglicht. Von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hannover zur Verfügung gestellt.

Sekundärantikörper

Polyklonaler Ziege Anti-Maus Ig, HRP konjugiert	Dako
Polyklonaler Ziege Anti-Maus IgG, Rhodamin Red TM -Red-X konjugiert	Dianova
Polyklonaler Ziege Anti-Maus IgG, FITC konjugiert	Dianova
Streptavidin, Rhodamin Red TM -Red-X oder FITC konjugiert	Dianova

3.3 Enzyme

EndoN	Die Endoneuraminidase N stammt aus einem <i>Enterobakterien</i> K1 Phagen und wird uns von der Arbeitsgruppe um Frau Prof.
-------	--

Rita Gerardy-Schahn aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hannover zur Verfügung gestellt.

Inaktivierte EndoN

Durch zwei Punktmutationen (Alanin an den Positionen 596 und 647 durch Arginin ersetzt) wird die Endoneuraminidase N inaktiviert. Von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hannover zur Verfügung gestellt.

PNGaseF

Die N-Glykosidase F (Roche) wird im *Flavobacterium meningosepticum* kloniert und in *E. coli* exprimiert. Sie spaltet alle Arten von Asparagin-gebundenen N-Glykanen.

Enzympuffer:

	<u>Firma</u>
- Glykoprotein Denaturierungs-Puffer	BioLabs
- 10% NP-40	BioLabs

Protease-Inhibitor Tabletten

cOmplete ULTRA Tablets, Roche

Trypsin

Trypsin Gold, Promega

3.4 Geräte

Geräte:

	<u>Firma</u>
Analysenwaage	Mettler
Blockthermostat	HLC
Blotkammer	Kreutz Labortechnik
Blotapparatur „Mini-Protean“	Bio-Rad

Elektrophorese-Spannungsquelle	Pharmacia
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Flüssigkeitschromatograph (LC)	Dionex
Gefrierschrank -20°C	Bosch
Homogenisator	Janke & Kunkel
HPLC	Knauer
Kühlschrank	Bosch
Lyophilisator	Christ
Magnet-Rührer	Hartenstein
MALDI-TOF	Bruker Daltonics
MALDI-Targets	
- MTP 384 ground steel	Bruker Daltonics
- PAC HCCA	Bruker Daltonics / Eppendorf
pH-Meter	Knick
Reinstwasseranlage	Millipore
Scanner	Brother
Schüttelinkubator „The Belly Dancer“	Stovall
Speedvac RC 10.22	Jouan
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX
Ultraschallstab	Branson SONIFIER
Vortexer	Heidolph
Wärmeschrank	Memmert
Wasserbad	Eppendorf
Zellkultur Multiwellplatte (Swim Up)	Greiner
Zentrifugen:	
- Tischzentrifuge „Galaxy“	VWR
- Kühlzentrifuge „Universal“	Hettich

3.5 Verbrauchsmaterialien

<u>Materialien:</u>	<u>Firma</u>
Deckgläser	ROTH
Filme	
- Biomax XAR film	Kodak
- Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare
Filterpapier	Whatman
Molekulargewichtsmarker	
<i>PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
[kDa] 250; 130; 95; 72; 55; 36; 28; 17; 10	
<i>PageRulerTM Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
[kDa] 170; 130; 95; 72; 55; 43; 34; 26; 17; 10	
Objektträger	ROTH
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
PVDF-Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße	
- 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf
- 15 ml	Greiner
- 50 ml	Sarstedt
Zentrifugen-Filtereinheiten 0,2 µM Nylon	VWR

3.6 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Aldrich
Acetonitril	Merck
Acrylamid	Roth
Aprotinin	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ammoniumbikarbonat	Fluka Analytical
Blockpuffer Roti [®] -Block	Roth

BSA (bovine serum albumin)	Roth
Chemilumineszenz SuperSignal [®] West Dura	Thermo Scientific
Coomassie Brilliant Blue Staining Solution	Bio-Rad
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dynabeads Protein A	Invitrogen
Essigsäure	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma
Formaldehyd 36,5-38%	Sigma
Glycin	Roth
Isopropanol	Merck
Iodacetamid	Fluka Analytical
Kalziumchlorid	Merck
Laemmli Sample Puffer	Bio-Rad
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Merck
Natriumbicarbonat	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natrium-Deoxycholat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natrium-Lactat	Sigma
Natrium-Pyruvat	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphorsäure	Merck
ProteaseMax [™]	Promega
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
TEMED	Roth
Triethylamin	Merck
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck
Tris Ultra Quality	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Sigma

4 Methoden

4.1 Proteinanalytische Methoden

4.1.1 Aufbereitung von frischem Ejakulat – Swim Up

TALP – Modifiziertes Tyrode-Medium

2,0 mM	CaCl ₂
3,1 mM	KCl
0,4 mM	MgCl ₂
100 mM	NaCl
25 mM	NaHCO ₃
0,3 mM	NaH ₂ PO ₄
1,0 mM	Na-Pyruvat
10,0 mM	HEPES
21,6 mM	Na-Lactat-Lösung
20 % (v/v)	FBS

Das frisch gewonnene Ejakulat wird bis zur zeitnahen Aufbereitung bei 37°C gelagert. Um eine Trennung der vitalen von den devitalen Spermien zu erzielen, erfolgt eine Schichtung in einer Multiwellplatte von je 1 ml Ejakulat unter 5 ml TALP. Danach inkubiert der Swim Up im Brutschrank bei 37°C unter einem CO₂-Milieu von 5% über 60 min. Zur Gewinnung der vitalen Spermien wird ca. 3 ml Überstand entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Abzentrifugieren der Proben bei 300 × g über 10 min., wird der Überstand an Medium verworfen und das Pellet aus vitalen Spermien zur Weiterverarbeitung mit Lysepuffer versetzt, nicht direkt weiterzuverarbeitendes Material wird zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

4.1.2 Lyse und Homogenisierung von Rattenhodern und -nebenhodern

Lysepuffer

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1 % (v/v)	Triton X-100
0,5 % (w/v)	Na-Deoxycholat
2 mM	PMSF
1 mM	Aprotinin
1 mM	Leupeptin

Die bei -20°C gelagerten Hoden werden im gefrorenen Zustand je nach Bedarf von den Nebenhodern getrennt und mit je 5 ml Lysepuffer versetzt. Danach werden die Proben sofort mittels Stabmixer und Ultraschallstab homogenisiert. Die Lyse erfolgt bei 4°C über 2 h auf einem Rüttler. Um unlysierte Gewebe- und Zellbestandteile von der Lösung zu trennen, werden die Proben für 1 h bei 4°C bei 11.680 × g zentrifugiert. Der Überstand ist für die Immunpräzipitation bestimmt, das Pellet wird verworfen.

4.1.3 Affinitätspräzipitation mit *Dynabeads*® *Protein A*

Die Affinitätspräzipitation dient der Isolierung bzw. Aufkonzentrierung eines Antigens aus einer heterogenen Menge an Antigenen in Lösung. Bei dem Antigen kann es sich sowohl um Proteine, als auch nur um Peptide handeln.

Dabei wird in unserer *in vitro* - Aufbereitung ein Antikörper an magnetische Metallkügelchen („Beads“) gebunden, welche an Protein A gekoppelt sind (*Dynabeads Protein A*®, Invitrogen, Carlsbad/California) (**siehe Abbildung 11**). Protein A stammt aus der Zellwand des gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* und ist in der Lage Immunglobuline zu binden.

Diente Protein A dem Bakterium als Schutz vor dem Immunsystem des Wirts, so nutzen wir seine Affinität, um die inaktivierte Endoneuraminidase N an die Beads zu koppeln. Diese interagiert stärker mit PolySia als z.B. der monoklonale α-PolySia-Antikörper 735. Der Verbund aus Beads und Enzym/ Antikörper kann daraufhin dem Gewebelysat

hinzugefügt werden und bindet dann an das entsprechende Antigen. Hierbei macht man sich den Vorteil der metallenen Beads zu Nutze, indem diese mit Hilfe eines Magneten vom Rest des Lysats separiert werden können. Der Überschuss kann daraufhin beinahe verlustfrei vom Pellet getrennt werden.

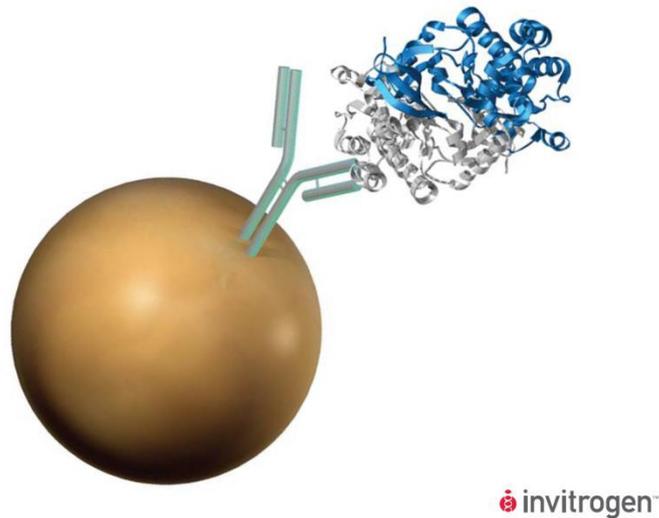


Abbildung 11. Schema eines Magnetischen Beads zur Affinitätspräzipitation: An die Metallkugel ist Protein A gebunden, welches hier mit einem Immunglobulinkomplex bindet. Protein A kann mit inaktivierter Endoneuraminidase N gekoppelt werden um Polysialinsäuren zu präzipitieren. Entnommen aus den Produktinformationen zu *Dynabeads® Protein A* der Firma *Invitrogen*.

Puffer A

0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,4

Puffer B

Puffer A

+ 3 M Ammonium-Sulphat ((NH₄)₂SO₄)

Puffer C

PBS pH 7,4

0,5 % (w/v) BSA

Puffer D

PBS pH 7,4

0,1 % (w/v) BSA

Vor der Koppelung der Dynabeads[®] mit dem Protein (in unserem Fall EndoN), müssen diese im Originalgefäß resuspendiert und gewaschen werden. Dazu werden die Beads mittels Magneten an die Gefäßwand angelagert und der Überstand verworfen. Danach erfolgt die Waschung der Beads 1 – 2 × mit 1 ml Puffer A.

Die weiteren Mengenangaben hängen von der benötigten Anzahl an Beads ab und müssen entsprechend variiert werden. Nach dem erneuten Entfernen des Überstandes werden 165 µl Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Puffer A und dem Liganden versetzt. Die Menge aus Puffer A und Ligand beträgt dabei 150 µl, wobei davon 100 µg Ligand entsprechen müssen. Nach Hinzugabe von 100 µl Puffer B wird die Lösung mittels Vortexer oder Pipettieren vermischt und für 12 – 18 h auf einem Thermorüttler bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem Verwerfen des Überstandes, wird das Bead-Ligand-Gemisch erneut für 1 h bei 37°C in 1 ml Puffer C auf dem Thermorüttler inkubiert. Danach werden die gekoppelten Beads zweimal mit 1 ml Puffer D gewaschen und zum Schluss in 240 µl Puffer D bis zur Nutzung gelagert.

Waschpuffer 1

20 mM	Tris pH 8,0
150 mM	NaCl
0,5 %	Triton-X-100

Waschpuffer 2

20 mM	Tris pH 8,0
150 mM	NaCl

Eluierpuffer

100 mM	Triethylamin
150 mM	NaCl

Vor Gebrauch der gekoppelten Beads sollten diese nach längerer Lagerung resuspendiert werden. Dazu werden die in Lösung vorliegenden Beads über einen Magneten erneut vom Puffer getrennt. Die Beads werden je zweimal in Waschpuffer 1 und 2 gewaschen, wobei sie vor der Verwendung in 100 µl Waschpuffer 2 gelöst

werden, und können danach dem zu untersuchenden Lysat hinzugefügt werden. Die Menge der benötigten Beads hängt dabei vom zu erwartenden Antigengehalt der Probe ab, sowie der Anzahl der vorhandenen Proben. Nach Inkubation der Lösung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht, werden die Beads wieder über einen Magneten vom Rest der Probe getrennt.

Nach anschließender Waschprozedur erfolgt die Elution, um die PolySia-Träger von den Beads zu lösen. Der basische Eluierpuffer ist in der Lage die reversiblen Bindungen zwischen EndoN und PolySia zu lösen. Der Überstand wird je nach Bedarf für die Lagerung oder den weiteren Enzymverdau aliquotiert (**siehe Abbildung 12**).

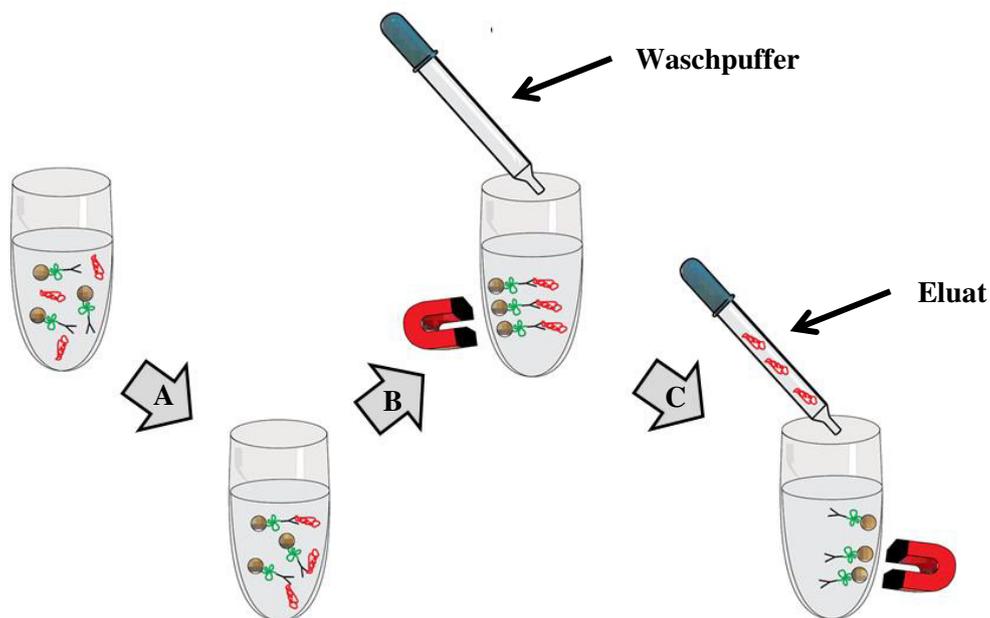


Abbildung 12. Ablauf der Affinitätspräzipitation mit Dynabeads®: (A) Die mit inaktivierter EndoN gekoppelten Dynabeads® werden mit dem Analyt für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. (B) Die nunmehr mit PolySia gebundenen Beads werden mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Probenvials angelagert und die Probe mit Waschpuffer A und B gewaschen. (C) Anschließend wird das polysialylierte Analyt eluiert und von den Dynabeads® getrennt. Angepasst aus den Produktinformationen zu *Dynabeads® Protein A* der Firma *Invitrogen*.

4.1.4 Degradierung von PolySia mittels Endoneuraminidase N

Als Negativkontrolle wird ein aliquotierter Teil des Eluats mit 30 μ l des EndoN-Verdaupuffers versetzt. Dazu wird die Endoneuraminidase N im Verhältnis (v/v) 3,33 μ g/ml mit einem 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 verdünnt.

Die Endoneuraminidase N schneidet die PolySia-Kette derart, dass der monoklonale Antikörper 735, der spezifisch α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Oligomere ab einer Kettenlänge von acht Resten erkennt, nicht mehr binden kann [Hayrinen, Bittersuermann et al. 1989].

Die Positivkontrolle wird entsprechend in 30 μ l des Na-Phosphatpuffers ohne EndoN aufgenommen. Danach werden die Proben für 3 h bei 37°C auf dem Thermorüttler inkubiert.

4.1.5 Spaltung der N-Glykane mittels PNGase F

Durch den Verdau der Proben mit N-Glycosidase F (PNGaseF) können die N-Glykane der Proteine/Peptide abgespalten werden. Dadurch ist es möglich zwischen einer an O- oder N-Glykane gebundenen Polysialinsäure durch den Antikörper 735 zu unterscheiden.

Hierzu wird die trocken gezogene Probe mit 16 μ l Glycoprotein-Denaturierungspuffer versetzt und bei 100°C für 10 min. gekocht. Nach Abkühlen der Probe für etwa 5 min. werden weitere 1,5 μ l 10%igen NP-40 Puffers, 2 μ l 0,5 M Na-Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4, sowie 5 Units des Enzyms PNGase F hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt simultan zum EndoN-Verdau.

4.1.6 SDS-Page – Gelelektrophorese

Die Elektrophorese oder SDS-Page (SDS = *Sodium Dodecyl Sulfat*) ist eine Methode zur Trennung von Molekülen verschiedener Ladung und Masse durch Aufbringen auf ein elektrisches Feld. Bei der Gelelektrophorese nutzt man die siebartige Molekularstruktur des Gels, wodurch sich die Moleküle, abhängig von ihrer Größe, unterschiedlich schnell Richtung Iode bewegen können.

Die Basis der Netzstruktur des Gels besteht dabei aus 10%igem Polyacrylamid für das Trenngel und 3%igem für das Sammelgel. Da die Proteine der Proben je nach Ladung

im elektrischen Feld entweder zur Anode oder Kathode wandern würden, wird ihnen das anionische Detergenz SDS hinzugegeben und die Probe im Wasserbad auf etwa 100°C erhitzt. Dadurch können die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Aufspalten von Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden. Zudem überdeckt SDS die Eigenladungen der Proteine, sodass sämtliche Proteine negativ geladen sind und sich im Gel Richtung Anode bewegen. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch Beigabe von β -Mercaptoethanol gespalten. Nach der Denaturierung können die Proben auf das in Pufferlösung vorliegende Gel aufgetragen werden. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine nach Anlegen der Spannung zuerst im Sammelgel aufkonzentriert, wodurch eine bessere Auftrennung im Trenngel erzielt werden kann. Dabei bewegen sich Proteine kleinerer Größe schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels als größere (siehe **Abbildung 13**). Durch verschiedene Färbungen wie z.B. Coomassie-Blau oder den immunologischen Nachweis mittels Western Blot können diese nach der Trennung sichtbar gemacht werden.

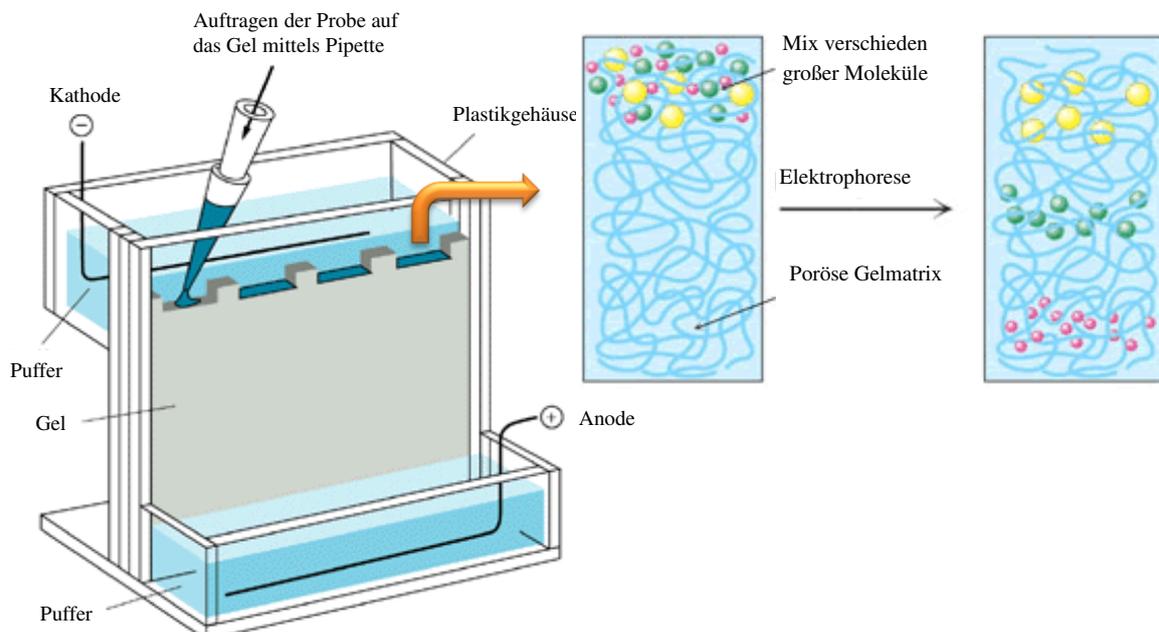


Abbildung 13. Schematischer Ablauf der Gelelektrophorese: Unter Anlegen einer Spannung werden die Moleküle des aufgetragenen Analyts durch das Gel geleitet. Aufgrund der gleichen Ladung der Moleküle erfolgt die Auftrennung der Moleküle ausschließlich über die Molekülgröße. Schema *Bioinformatics* des *Leibniz Institute for Age Research*, www.imb-jena.de.

Acrylamidlösung:	30% Acrylamid (gebrauchsfertig von Roth)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
SDS-Lösung:	10% SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
APS-Lösung:	Ammoniumpersulfat 10% in Aqua dest.
Temed:	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Elektrodenlaufpuffer:	100 mM Tris, 750 mM Glycin, 40% (v/v) SDS-Lösung

Die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des „Mini-Protean“-System von BioRad durchgeführt (**siehe Abbildung 14**).

Für zwei Trenngele einer 10%igen Acrylamidkonzentration vermischt man 3 ml Acrylamidlösung, 3 ml Trenngelpuffer, 120 µl SDS-Lösung und 5,9 ml Aqua dest. und entgast die Lösung für ca. 2 min. im Ultraschallbad. Um die radikalische Vernetzungsreaktion des Gels zu starten, wird 120 µl frisch angesetzter APS-Lösung und 12 µl Temed zur entgasten Lösung hinzugegeben und durch Pipettieren oder Vortexen ausreichend vermengt. Sofort danach wird das flüssige Gel zwischen die in der dafür vorgesehenen Apparatur eingespannten Glasplatten gegossen und mit Aqua dest. überschichtet, um eine Austrocknung des Gels während der Polymerisation zu verhindern und ein Aufsteigen der Luftblasen aus dem Gel in die Wasserschicht zu ermöglichen. Nach der Polymerisation des Trenngels kann das Wasser entfernt werden und das angesetzte Sammelgel (650 µl Acrylamidlösung, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 50 µl SDS-Lösung, 3 ml Aqua dest., 50 µl APS und 5 µl Temed) auf das Trenngel gegossen werden. In das noch flüssige Sammelgel werden anschließend Trennkämme der benötigten Kammergröße gesetzt und das Gel auspolymerisiert.

Die fertigen Gele werden in die entsprechende Apparatur eingespannt und am Ober- und Unterrand mit Elektrodenlaufpuffer bedeckt, welcher eine elektrische Leitung ermöglicht. Nach Auftragen der Proben mit Hilfe einer Pipette wird die Apparatur an

eine Spannungsquelle angeschlossen und das elektrische Feld aktiviert. Dazu werden die Proben bei einer Spannung von 50 V für 15 min. im Sammelgel aufkonzentriert und dann bei 130 V über 40-60 min. im Trenngel aufgetrennt. Zur visuellen Darstellung der Molekularmassen auf dem Gel, wird ein standardisierter Marker (Firma BioRad Laboratories, München) zusätzlich zu den Proben aufgetragen. Dieser hinterlässt, je nach Art des Markers, vorgegebene, farblich markierte Banden auf den Höhen der entsprechenden Molekularmassen, die anhand der Legende den kD-Bereichen zugeordnet werden können.

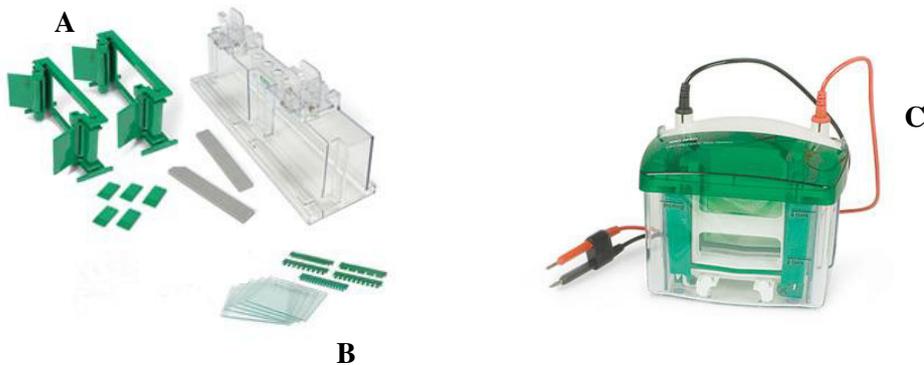


Abbildung 14. Gelelektrophoreseset: (A) Modul für den Guss der Gele; (B) Glasplatten und Gelkämme zur Formgebung des Gels. Die Glasplatten werden in die dafür vorgesehenen Module eingespannt und anschließend mit der noch flüssigen Gelmatrix aufgefüllt. Die Kämmen werden abschließend eingebracht, sie geben die Anzahl der Probenkammern vor. (C) Modul zur Anlegung der Spannung. Die Gele werden unter Spannung gesetzt, dabei bilden die Katode und Anode jeweils ein flüssiges Medium. Bild des Systems *Mini-Protean®* der Firma *BioRad*.

4.1.7. Proteinübertragung per Western Blot

Transferpuffer: 39 mM Glycin
 48 mM Tris
 20 % (v/v) Methanol

Direkt anschließend an die Gelelektrophorese werden die im Gel aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen und immobilisiert. Der Vorgang des Western Blotting kann dazu entweder eingetaucht in Puffer (Wet Blot) oder halbtrocken zwischen Filterpapieren mit Graphit- oder Platin-beschichteten Elektroden (Semi Dry) erfolgen. In dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich das Semi Dry-Verfahren verwendet und PVDF der Firma *GE Healthcare* als Trägermembran genutzt.

Graphitelektroden und PVDF Membran werden in Transferpuffer äquilibriert, wobei die Membran vorher in 100% Methanol geschwenkt wird. Die Elektroden bedecken je zwei mit Transferpuffer durchtränkte Filterpapiere (*Whatman*-Paper) und verhindern dadurch eine Austrocknung von Gel und Membran während der Übertragung der Proteine.

Um die geometrische Auftrennung der Proteine im Gel beizubehalten, erfolgt die Übertragung auf die Membran in vertikaler Richtung. Dazu werden die einzelnen Schichten horizontal zwischen den Elektroden gelagert (**siehe Abbildung 15**). Dabei sollten die Filterpapiere und die Membran entsprechend auf die Größe des Gels zugeschnitten sein und luftblasenfrei geschichtet werden. Das Blotting erfolgt bei 1 mA/cm² Blotpapier für 1,5 h.

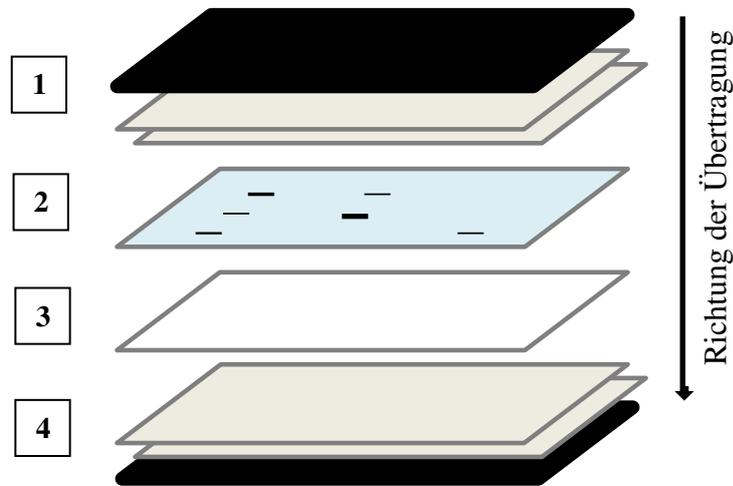


Abbildung 15. Aufbau des Semi-Dry Verfahrens: (1) Kathode bestehend aus einer Graphitplatte und 2 Schichten Whatman-Filterpapier; (2) Gel mit aufgetrenntem Analyt; (3) PVDF-Membran auf die die Moleküle übertragen werden ; (4) Anode bestehend aus zwei Lagen Whatman-Filterpapier und einer Graphitplatte.

4.1.8. Immunfärbung und Entwicklung von Western Blots

Um eine Austrocknung der PVDF Membran nach dem *Western Blotting* zu verhindern und die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran direkt nach der Proteinübertragung in Blockpuffer (Roti[®]-Block) überführt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken geblockt. Danach erfolgt eine dreimalige Wiederholung des Waschschruttes mit Roti[®]-Block für 5-10 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Membran für zwei Stunden mit dem in Roti[®]-Block gelösten Primärantikörper inkubiert (Anti-PolySia= 0,25 µg/ml ; Anti-NCAM= 3,33 µg/ml ; Anti-ST8Sia2= 2 µg/ml). Bevor der mit *horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG= 0,2 µg/ml in Blockpuffer) aufgetragen wird, erfolgt wieder eine dreifache Waschung mit Blockpuffer. Inkubiert wird für 1 Stunde bei Raumtemperatur wiederum unter leichtem Schwenken. Abschließend wird der Blot noch 3× in Roti[®]-Block und 2× in PBS-T gewaschen.

Zur Darstellung der Proteine auf der Membran wird diese mit einer chemilumineszierenden Lösung versetzt (Thermo Scientific), die frisch aus zwei Komponenten im Verhältnis 1:1 vermischt wird, und für 5 min. inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgen unter Rotlicht in einer Dunkelkammer. Direkt nach der

Inkubation wird ein *Chemiluminescence Detektion Film* der Firma Kodak aufgelegt und der Blot mit dieser zuerst für 30 s und 1 min. belichtet und anschließend entwickelt und fixiert. Die Belichtungsdauer kann dabei abhängig von der Stärke der Signale variiert und verlängert, bzw. verkürzt werden.

4.2 Massenspektrometrische Analysen

4.2.1 Vorbereitung der Probe

Zur Proteinidentifizierung wurden fünf Rattennebenhoden von den zugehörigen Hoden ab präpariert und in 50 ml Lysepuffer für zwei Stunden bei 4°C lysiert. Anschließend erfolgte die Aufkonzentrierung der polysialylierten Proteine per Affinitätszipitation mit EndoN-Beads. Das trocken gezogene Eluat wurde in 25 µl Laemmli-Probenpuffer (2fach) gelöst. Bei der Gelelektrophorese wurden 15 µl der Lösung für die anschließende Proteinidentifizierung auf eine Kammer des Fertiggels (Pearce) aufgetragen. Ein industriell gefertigtes Gel ermöglicht eine Verringerung der Kontamination des Gels durch Keratin beim Herstellungsprozess. Die restlichen 10 µl der Lösung wurde mit einigen Kammern Abstand auf das gleiche Gel aufgebracht und nach der SDS-Page per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit mAk735 inkubiert und mittels Chemolumineszenzfärbung entwickelt. Dies ermöglicht die Darstellung des kD-Bereiches auf dem Gel, in dem polysialylierte Proteine aufgetrennt sind.

Das Gelstück mit Hauptteil der Probe wird mit einer Coomassie-Lösung (Coomassie Brilliant Blue Staining Solution, Firma Bio-Rad) fixiert und blau eingefärbt, um die Proteine farblich darzustellen. Dazu wird das Gel 15 min. bei RT in der Lösung geschwenkt und für weitere 30 min. bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert.

Danach erfolgt die Entfärbung (10% Essigsäure, 50% MeOH) des Gels über Nacht bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln. Nach der Entwicklung des Western Blots kann der kD-Bereich mit den zu identifizierenden Proteinen aus dem fixierten Gel ausgeschnitten und weiter aufbereitet werden.

Nach jedem der folgenden Schritte wird der vorhandene Überstand entfernt, bevor die nächste Lösung hinzugegeben wird.

Dazu werden die ausgeschnittenen Banden in ca. 1 mm² große Stücke zerschnitten und in ein Low-Binding-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden sie mit 200 µl Aqua Dest. für 30 Sekunden auf dem Vortexer gewaschen. Danach werden die Gelstücke in 200 µl Lösung aus Methanol und 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH₄HCO₃ (1:1 v/v)) für 1 min. unter intermittierendem Vortexen entfärbt. Der Vorgang wird einmal wiederholt. Daraufhin erfolgt die Dehydrierung der Stücke über 5 min. bei intermittierendem Vortexen in 200 µl Lösung aus Acetonitril und 50 NH₄HCO₃ (1:1 v/v). Nach Entfernen des Überstandes wird nochmal 200 µl 100%iges Acetonitril hinzugefügt und für 30 Sekunden inkubiert. Anschließend werden die Gelstücke zusätzlich für 5 min. in der Speed Vac[®] trocken gezogen.

Zur Reduktion der enthaltenen Cysteine und Rehydrierung des Gels wird danach 100 µl frisch angesetztes 25 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ hinzugegeben und für 20 min. bei 56°C auf dem Schüttler inkubiert. Dadurch kommt es zur reversiblen Aufspaltung der Disulfidbrücken. Im Anschluß werden die Stücke unter Raumtemperatur und Dunkelheit für 20 min. in frisch angesetztem 55 mM Iodoacetamid in 50 mM NH₄HCO₃ inkubiert, was zu einer stabilen und irreversiblen Alkylierung der SH-Gruppen führt. Dabei ist zu beachten, dass sich die spezifische Peptidmasse für jedes vorhandene Cystein um 57,02 Da erhöht. Nach der Alkylierung werden die Gelstücke 2× mit 400 µl Aqua Dest. unter sanftem Vortexen gewaschen. Anschließend werden sie wie oben beschrieben dehydriert und in der Speed Vac[®] für 5 min. trocken gezogen, die erneute Dehydrierung soll das Eindringen des Trypsins im nächsten Schritt erleichtern.

Die Rehydrierung erfolgt in 60 µl einer Lösung mit 2 ng/µl Trypsin in 0,01 % ProteaseMAX[™] Surfactant : 50 mM NH₄HCO₃ für 10 min. Danach werden die Gelstücke mit 35 µl 0,01 % ProteaseMAX[™] Surfactant : 50 mM NH₄HCO₃ überschichtet und für einige Sekunden vorsichtig auf dem Vortexer vermischt. Abschließend werden die Proteine in der Probe für 3 Stunden bei 37°C unter sanftem Schütteln verdaut. Der Vorgang der Carbamidomethylierung mit DTT und Iodoacetamid bewirkt dabei, dass nach dem darauf folgenden In-Gel-Verdau die einzelnen verdauten Peptide nicht mehr durch die Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Nach dem Verdau wird das Kondensat im Reaktionsgefäß für 10 Sekunden bei 12.000 – 16.000 × g abzentrifugiert, für wenige Sekunden mit dem Vortexer vermischt und der Extrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da während des Verdau durch den Verdaupuffer vor allem saure Peptide aus dem Gel extrahiert werden, fügt man zu den

Gelstücken 60 µl 2,5 %ige Trifluoressigsäure (TFA) hinzu und inkubiert diese für 15 min. auf dem Schüttler, wodurch zusätzlich basische Peptide extrahiert werden können. Der extrahierte Überstand wird dem vorherigen Extrakt hinzugefügt, die Gelstücke können verworfen werden. Um mögliche Verunreinigungen wie Gelstücke und – partikel zu entfernen, wird die kombinierte Lösung für 1 h bei 12.000 – 16.000 × g abzentrifugiert und der Überstand wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Erfolgt die Analyse innerhalb der nächsten Stunden, wird die Probe auf Eis gekühlt, ansonsten wird sie schockgefroren und bei -20°C gelagert.

4.2.2 Nano-LC gekoppelte MALDI-TOF/TOF-Analyse

Zur Analyse und Identifizierung der Proteine wurde die Flüssigchromatographie mit der Flugzeitmassenspektrometrie kombiniert. Mit Hilfe der Chromatographie wird eine Auftrennung des Probengemisches erzielt. Dazu wird die Probe bei der Flüssigchromatographie auf eine stationäre Phase aufgetragen, diese kann entweder in einer Säule oder einer Ebene liegen. In diesem Versuchsaufbau wurde eine C18-Säule (PepMap100, 3µm Partikelgröße, 75 µm × 100mm, Firma Dionex) verwendet. C^x bezeichnet dabei die Anzahl der Kohlenstoffatome in einer Kette, mit der das Trägermaterial (z.B. Silikagel) der Säule substituiert ist, im Fall der C18-Säule somit Octadecylsilan. Durch die Retention des Analyten über Wechselwirkungen mit der stationären Phase kommt es zur Auftrennung des Gemisches.

Mittels einer flüssigen mobilen Phase werden die Analyten wieder von der Säule eluiert. Dabei kommt es abwechselnd zur Retention und Elution an der stationären Phase. Als Elutionsmittel (EM) wurde dabei Acetonitril in Kombination mit AquaDest. benutzt. Durch Erhöhung des Gradienten aus AquaDest und EM kann die Elution gesteigert werden. Dadurch werden Anfangs nur die Partikel von der Säule gelöst, die schwache Wechselwirkungen aufweisen, bis bei 60%igem Acetonitril sämtliche Analyten eluiert werden.

Vom Beginn der Elution bis zu Minute 30 wird ein linearer Gradient von 10% Acetonitril/ 0,1% Ameisensäure auf 60% Acetonitril/ 0,1% Ameisensäure erhöht und das Eluat in vorgegebenen Zeitabständen direkt auf ein Target (Firma *Bruker Daltonics*, Bremen) mittels Probot (Dionex) gespottet. Dabei wird der Analyt in eine Matrix gebettet in der sie auskristallisiert. Bei der Massenspektrometrie mittels MALDI (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation) absorbiert die Matrix während des

Laserbeschusses Energie, während der intakte Analyt verdampft. Dabei wurden Prespotted AnchorChip Targets und Ground Steel Targets verwendet. Auf den Ground Steel Targets lässt man die aufgetragenen Proben auf den Spots auskristallisieren und überschichtet sie anschließend mit einer DHB-Matrix (50% Acetonitril, 1% Phosphorsäure, 7,5 mg DHB/ml Matrix) (**siehe Abbildung 16**). Prespotted Targets sind bereits mit einer Matrix versehen und benötigen diese Prozedur nicht.

Im MALDI werden die tryptischen Peptide durch die Energie des Lasers aus der Matrix explosionsartig verdampft und beschleunigt. Durch die hochenergetische Ionisierung kommt es zur Dispersion der Ionen aus der DHB-Matrix. Bei einer MALDI-*time-of-flight* (TOF)-Analyse wird die Fragmentmasse mittels der Flugzeit der Ionen durch das Massenspektrometer gemessen. Die Ionen fliegen durch zwei TOF-Zonen und werden anschließend mittels eines Ionenspiegel reflektiert. Der Ionenspiegel ermöglicht es im Anschluss ein schärferes Signal zu detektieren. Der Detektor ermittelt die Intensität und Masse der Fragmente und stellt diese digital am PC als Spektrum dar. Mit Hilfe der hohen Sensitivität des LIFT-Prozesses können einzelne Peptide zusätzlich noch anhand ihrer monoisotopischen Massen identifiziert werden. Dazu werden die Ionen nach der Dispersion nochmals beschleunigt, dies ermöglicht die Differenzierung des Spektrums anhand der a-, b-, y- und i-Ionen (**siehe Abbildung 17**).

Mit Hilfe entsprechender Datenbanken (Mascot Search, Matrix Science London) und Datenbanken kann das erhaltene Massenspektrum analysiert und einem bekannten Protein zugewiesen werden.

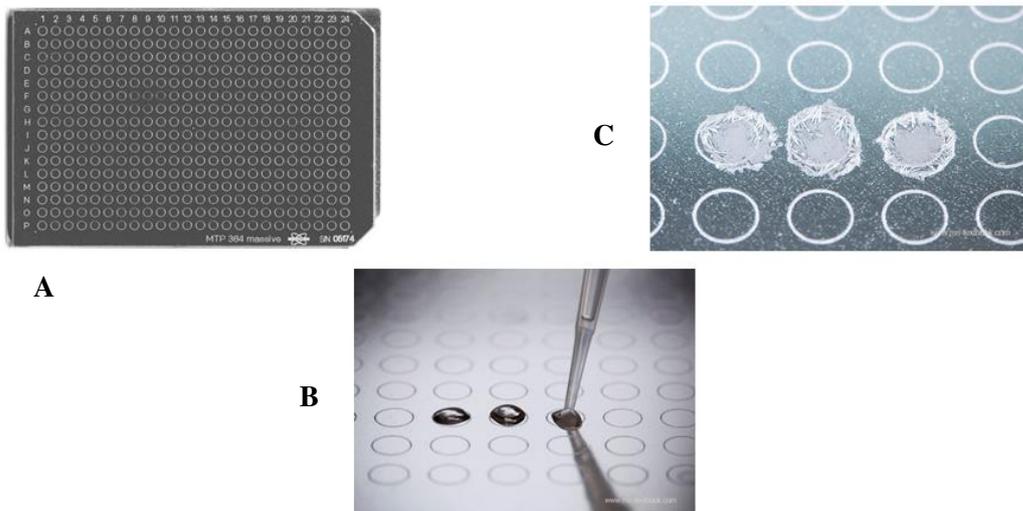


Abbildung 16. MALDI-TOF/TOF-Targets: (A) *Ground Steel Target MTP384* der Firma *Bruker Daltonics*; (B) Auftragen der DHB-Matrix nach Trennung des Analyts über nano-LC (Flüssigkeitschromatographie); (C) Kristallinisierte Matrix bereit zur Analyse mittels MALDI-TOF-MS(MS) Abb. aus *Mass Spectrometry: A Textbook* von Jürgen H. Gross [Gross 2011].

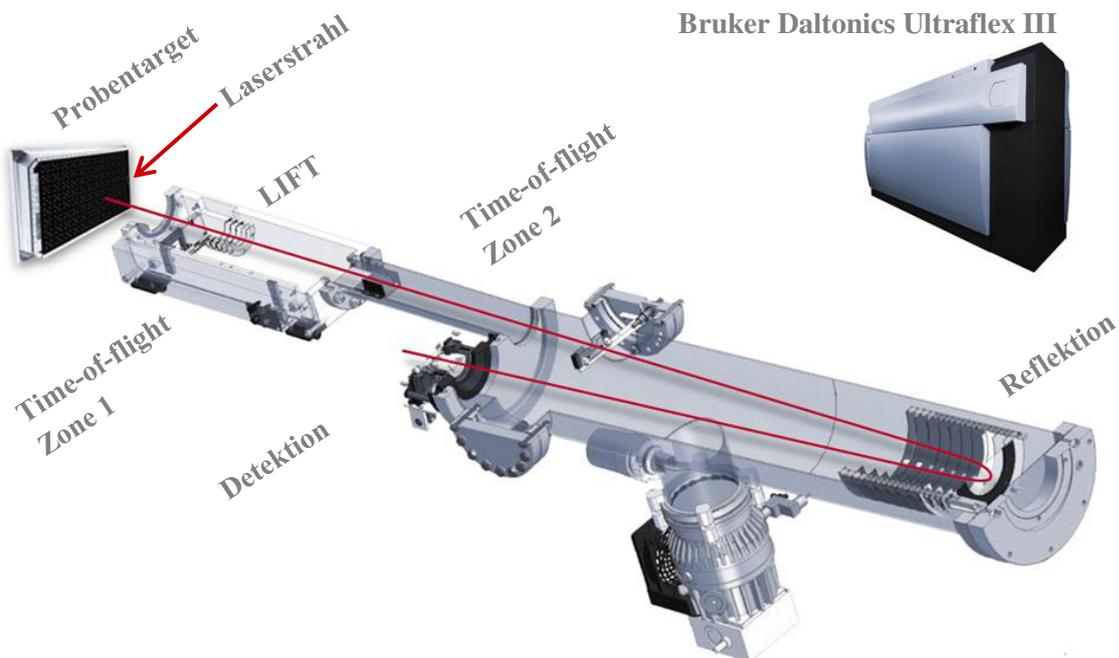


Abbildung 17. Bruker Daltonics Ultraflex III MALDI-TOF/TOF: Durch Ionisierung des Probenspots auf dem Target mittels hochenergetischen Laserstrahlen kommt es zur Dispersion des Analyts. Ohne LIFT-Analyse wird anschließend die time-of-flight gemessen, welche die Masse des Fragments widerspiegelt. Ein Ionenspiegel dient der Reflektion der beschleunigten Massen und erhöht die Schärfe der detektierbaren Ionen. Werden die Ionen nach der Dispersion zusätzlich beschleunigt, spricht man von einer LIFT-Analyse, die ein MS/MS-Spektrum ermöglicht zur Interpretation der monoisotopischen Massen (a^- , b^- , y und i -Ionen). Bilder der Ultraflex III Broschüre von Bruker Daltonics entnommen.

4.2.3 Identifizierung der polysialylierten Glykosylierungsstellen

Die zur Bestimmung der polysialylierten N-Glykane genutzten Rattenhoden werden nach der gleichen Methode wie in 4.2.1 lysiert und präzipitiert. Es folgt jedoch kein In-Gel-Verdau, sondern die Aufbereitung in Lösung. Dazu wird die trocken gezogene Probe in 50 μ l 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + 8 M Harnstoff gelöst und mit 3 μ l 100 mM DTT für 5 min. bei 90°C inkubiert. Anschließend wird 6 μ l Iodacetamid hinzugegeben und für 20 min. in einer Dunkelkammer bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nun wird 400 μ l einer Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂) hinzugegeben und die Probe über Nacht bei 37°C mit 5 μ l Trypsin verdaut.

Im Anschluss erfolgt eine Dialyse mit 2 mM PMSF in einem Reaktionsgefäß mit semipermeabler Membran (Pierce) in einem Bad mit 10 l 25 mM Ammoniumbicarbonat unter leichtem schütteln. Nach der Dialyse wird entsprechend der Probe 2 mM PMSF, 1 mM Aprotinin, 1 mM Leupeptin, 50 mM Tris/HCl pH 8 und EndoN-Beads hinzugegeben und erneut eine Affinitätspräzipitation über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Das trocken gezogene Eluat wird in 100 μ l 1 N Essigsäure gelöst und für 30 min. bei 80°C auf dem Thermoschüttler desialyliert. Anschließend werden zwei Aliquots je 50 μ l aufgeteilt und in der SpeedVac[®] trocken gezogen. Abschließend werden beide Aliquots in 27 μ l 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.5 gelöst, wobei eine Probe unbehandelt bleibt und der anderen zusätzlich 3 Units PNGaseF hinzugegeben wird. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht. Die verdauten Proben werden erneut trocken gezogen und vor der Analyse mittels Nano-LC/MALDI in je 20 μ l Laufmittel (10% Acetonitril/0,1% Ameisensäure) gelöst.

4.3 Verfahren der High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Flüssigkeitschromatographie kann als Trennmethode genutzt werden, bei der eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes über eine stationäre Phase geleitet und dabei in die einzelnen Bestandteile der Mischung aufgetrennt wird. Dazu wird die Substanzmischung, der Analyt, auf eine stationäre Phase, in diesem Fall eine DNAPac[®] PA100 Säule von Dionex, aufgetragen. Mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms, der mobilen Phase, wird der Analyt von der Säule getrennt und vermittelt damit die Wechselwirkung des Analyten mit der spezifischen Oberfläche der

stationären Phase. Dies ermöglicht nicht nur den Nachweis von Di-, Oligo- und PolySia in einer Probe, sondern auch die Länge der einzelnen Sialinsäureketten.

Für die Kettenlängebestimmung werden die Oligo- und PolySia-Ketten unter sauren Bedingungen eines Puffers vom Glykokonjugat abgespalten und die reduzierenden Enden mit DMB (1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol) markiert (**siehe Abbildung 18**). Dazu werden 1,22 mg DMB in 1 ml DMB-Puffer gelöst. Aufgrund der sauren Bedingungen kommt es gleichzeitig zu einer hydrolytischen Spaltung interner Sialyl-Verbindungen. Anschließend wird die Probe mittels Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt [Inoue, Lin et al. 2001].

DMB-Puffer

18 mM	Na-Hydrosulfit
1 M	Mercaptoethanol
40 mM	Trifluoressigsäure (TFA)

Die in 500 μ l 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) gelöste und mittels Ultraschallstab homogenisierte Probe wird mit 1.200 μ l Chloroform-Methanol (1:2 v/v) vermischt, um die vorhandenen Proteine auszufällen. Anschließend wird die Probe bei 8°C und 14.400 \times g für 10 min. zentrifugiert. Zwischen den zwei Phasen kommt es zur Ausbildung eines Proteinpellets. Die Phasen werden verworfen und das Pellet in 600 μ l gekühlter Ethanollösung aufgenommen. Nach erneuter Homogenisierung mit dem Ultraschallstab wird die Probe in der SpeedVac[®] trocken gezogen. Abschließend wird die Probe im Verhältnis 1:2 mit DMB-Puffer ((120 μ l + 120 μ l) mit Tris/HCL (50 mM)) versetzt. Die Derivatisierung erfolgt über Nacht bei 11°C. Anschließend wird sie mittels NaOH-Zugabe gestoppt. Durch den Umschlag in ein alkalisches Milieu kommt es zur Reversibilität der Laktonisierung.

Die DMB-fluoreszenzmarkierten Oligo- und PolySia-Derivate werden auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen und bei 35°C aufgetrennt. Als Laufmittel (LM-A) wird Aqua bidest und 1 M NaNO₃ (LM-B) bei einer Flussrate von 1 ml/min. genutzt. Eluiert wird mit den Gradienten:

$T_{0 \text{ min}} = 0\%$ (v/v) LM-B, $T_{5 \text{ min}} = 1\%$ (v/v) LM-B, $T_{15 \text{ min}} = 10\%$ (v/v) LM-B, $T_{60 \text{ min}} = 50\%$ (v/v) LM-B. Gewaschen wurde die DNAPac PA100-Säule (Dionex) mit 100% (v/v) LM-A. Gemessen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und einer

Emissionswellenlänge von 456 nm. Der Standard besteht aus einer 10 µg/ml Colominsäure-Standard Lösung.

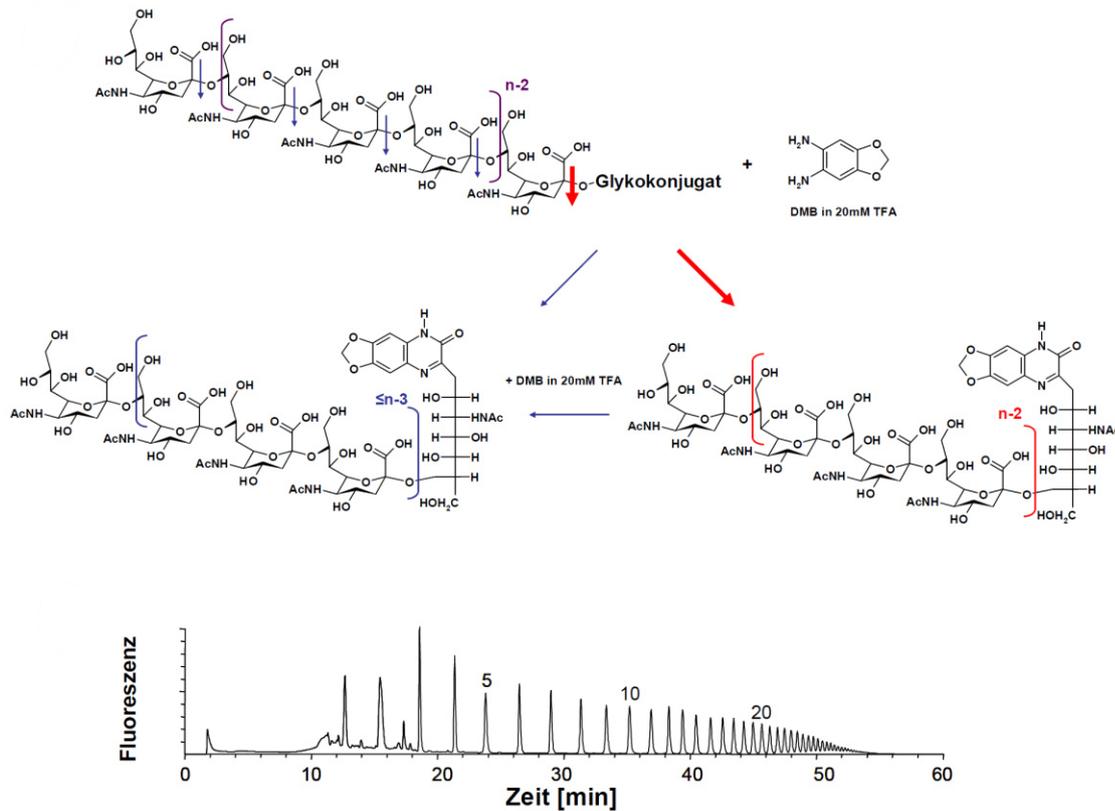


Abbildung 18. DMB-Markierung von Oligo- und Polysialinsäuren zur Kettenlängenbestimmung: (A) Markierung der Glykonjugat-gebundenen Oligo- und PolySia mit DMB. Die roten Pfeile markieren die bevorzugte chemische Reaktion auf die DMB-Markierung, die blauen Pfeile mögliche alternative Reaktionen. (B) Beispiel einer chromatographischen Trennung der fluoreszenzmarkierten Sialinsäureketten auf einer Anionenaustauschersäule anhand ihrer Länge. Schema entnommen aus Dissertation *Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV in vivo*, an der JLU Gießen 2008 von SP Galuska .

4.4 Immunhistologische Untersuchungen humaner und boviner Spermien

Zur Lokalisation der polysialylierten Proteine auf humanen und bovinen Spermien werden diese nach der beschriebenen SwimUp-Methode aufbereitet und die vitalen von den devitalen Spermien separiert. Dabei sollten die Proben möglichst frisch verarbeitet und bis zur Verwendung bei 37°C gelagert werden. Humanes Ejakulat wird vor dem

Swim Up für mindestens 1 h bei 37°C aufbewahrt, da das frische Prostatasekret ein Verkleben der Spermien bewirkt und die weitere Aufbereitung erschwert.

Nach dem Abzentrifugieren der vitalen Spermien im Anschluss an den Swim Up, werden 50 – 100 µl für die histologische Färbung abpipettiert, der Rest wird schockgefroren und bei - 20°C gelagert. Danach werden sie 2× in 37°C warmen PBS gewaschen, wonach die Probe jeweils 7 min. bei 700 × g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen wird. Anschließend werden die Spermien in 100 µl PBS resuspendiert und zur Fixierung mit 100 µl 2% Formaldehyd versetzt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Fixierung wird mit 1 ml 4°C kaltem PBS 0,1% BSA gestoppt.

Nach der Fixierung wird die Probe 3× mit 1 ml PBS 0,1% BSA bei Raumtemperatur gewaschen, wobei das Abzentrifugieren jeweils auf 3 min. verkürzt werden kann. Danach werden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 1 ml PBS 2% BSA über 2h blockiert. Abschließend wird wieder 3× mit 1 ml PBS 0,1% BSA gewaschen.

Vor dem Enzymverdau werden je 100 µl der Probe auf zentrifugierbare Filtereinheiten (Firma VMR) verteilt. Zur Negativkontrolle des Anti-PolySia-Antikörper 735 wird eine Hälfte der Aliquots mit 1 µl Endoneuraminidase N versetzt und zusammen mit den unbehandelten Proben für 4h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach werden die Spermien für 1,5 min. bei 700 × g abzentrifugiert (ebenso nach allen folgenden Waschschritten) und mit je 100 µl des Primärantikörpers (735= 5 µg/ml ; 123C3, ST8Sia2 und biotinylierte EndoN je 10 µg/ml angesetzt in PBS 0,1% BSA) versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Vor Hinzufügen des Sekundärantikörpers wird 4× mit 1 ml PBS 0,1% BSA gewaschen. Der Sekundärantikörper ist dabei mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, welcher unter Einwirkung von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und einen spezifischen Farbton emittiert (Grün = Fluoreszin (FITC) / Rot = Rhodamin). Für die Primärantikörper 735, 123C3 und Anti-ST8Sia2 wird jeweils 100 µl Anti-Maus / FITC (angesetzt 10 µg/ml in PBS 0,1% BSA) hinzugefügt. Sollen sowohl PolySia, als auch NCAM / ST8Sia2 auf einem Spermium dargestellt werden, wird für PolySia als Primärantikörper biotinyliertes EndoN verwendet. Das Biotin hat eine hohe Affinität zu Streptavidin, welches als Sekundärantikörper (100 µl angesetzt 10 µg/ml in PBS 0,1% BSA) mit Rhodamin gekoppelt werden kann. Der Antikörper 735 kann in diesem Fall nicht genommen werden, da sowohl 735, als auch 123C3 und Anti-ST8Sia2 einen Anti-Maus-Sekundärantikörper benötigen. Abschließend wird für 30 min. bei

Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und wieder 4× mit 1 ml PBS 0,1% BSA gewaschen.

Die abzentrifugierten Spermien werden in 30 µl PBS 0,1% BSA resuspendiert und je 1 µl der Lösung pro Deckgläschen aufgetragen. Die Fixierung der Schnitte erfolgt mit VectaShield® (Vector Laboratories, Peterborough UK). Dieses enthält zusätzlich 4',6-Diamidin-2-phenylindol, einen blau fluoreszierenden Farbstoff, welcher die DNA und damit die Zellkerne markiert. Da VectaShield® nicht aushärtet, wird das Deckglas mit Hilfe von klarem Nagellack mit dem Objektträger fixiert.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop können die gefärbten Proteine sichtbar gemacht werden. Dazu werden die Schnitte Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgesetzt (FITC = 520 – 530 nm; Rhodamin = 590 nm) und das emittierte Licht mit einer Kamera festgehalten. Da die Kamera nur Bilder in Graustufen ermöglicht, werden diese abschließend digital eingefärbt.

5 Ergebnisse

5.1 Optimierung der Affinitätspräzipitation

Die Fällung, oder Präzipitation, ist eine Technik, die der Aufreinigung von Proteinen einer Probe dient. Durch die Interaktion von präzipitierenden Agenzien und den in Lösung befindlichen Proteinen kommt es zu ihrer Ausfällung. Je nach Agenz kann dieser Vorgang sehr unspezifisch ablaufen und alle Proteine einer Probe ausfällen. Nutzt man jedoch spezifische Antikörper zur Ausfällung eines bestimmten Antigens, können einzelne Proteine isoliert werden. Diese Präzipitation wird daher als Affinitätspräzipitation bezeichnet. Als Bindungspartner diente uns hier jedoch kein Antikörper, sondern inaktivierte Endoneuraminidase N, welche über Protein A an magnetische Metallkügelchen (Dynabeads® Protein A, Invitrogen – Carlsbad/California) gekoppelt wurden. Nach der Inkubation mit der Probe konnte PolySia samt Glykoprotein, durch das Anlegen eines Magnetfelds, als Pellet an der Wand des Reagenzglases konzentriert werden. Nach dem Entfernen der Phase muss die Präzipitation durch die Dynabeads® eluiert werden. Die salzhaltigen Wasch- und Eluierpuffer stören die reversible Verbindung zwischen der inaktivierten Endoneuraminidase N und der PolySia wieder auf. Da die Salzkonzentration des Waschpuffers die Reinheit bestimmt, da unspezifische Bindungen gelöst werden sollen, war unser Ziel, vor Beginn weiterer Untersuchungen, das Wirkung-Nebenwirkungs-Verhältnis zu optimieren. Der Waschpuffer sollte möglichst nur die unspezifischen Bindungen auftrennen, der Eluierpuffer im Anschluss an den Waschvorgang möglichst sämtliche Bindungen von EndoN zu PolySia.

Dazu wurden als Probenmaterial Zellabstriche von PC12-Zellen (*Pheochromocytoma cells*) genommen und einer Präzipitation unterzogen. Die Ergebnisse anschließend mittels Western Blot visualisiert. Die PC12-Zellen stammen aus einem Tumor des Nebennierenmarks, dem sogenannten Phäochromozytom. Kultiviert wurde die PC12-Zelllinie 1976 aus dem Nebennierenmark einer Ratte, wobei die Zellen unter dem Einfluss des Nervenwachstumsfaktors (NGF) zur Differenzierung und Teilung angeregt werden konnten [Greene and Tischler 1976]. Diese PC12-Zellen, die endogen NCAM exprimieren, wurden mit der Sialyltransferase ST8SiaIV transfiziert, wodurch erzielt werden konnte, dass erstmals polysialylierte PC12-Zellen produziert wurden [Horstkorte, Lessner et al. 1999].

5.1.1 Lyse und Eluierung

Die PolySia-positiven PC-12 Zellproben wurden mit Lysepuffer versetzt und mittels Ultraschallstab homogenisiert. Im Anschluss an die Lyse wurden die Zellreste abzentrifugiert und verworfen. Die Inkubation der Probe mit EndoN-Beads erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Probe auf vier Reaktionsgefäße aliquotiert und gewaschen. Für den Waschpuffer 1 wurden die NaCl-Konzentrationen 150 mM, 250 mM, 350 mM und 450 mM gewählt. Dabei wurde bei jeder der vier aliquotierten Proben eine andere Konzentration angewandt. Die Salzkonzentration des Waschpuffers 2 blieb bei allen Proben unverändert. Nach jedem Waschgang mit je Waschpuffer 1 wurde der Überstand - nach Anlagern der Beads mittels Magneten an der Gefäßwand - in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei Waschgänge mit Waschpuffer 2 und die Eluierung.

5.1.2 *Western Blotting* – Semi Dry

Anschließend erfolgten die SDS-Page und die Übertragung mittels Western Blot auf eine Membran, die mit Chemolumineszenz behandelt wurde. Zusätzlich zum Eluat der Probe wurde eine Spalte des jeweiligen aufbewahrten Waschpuffers 1 (50 µl in 50 µl Laemmli-Probenpuffer [2fach]) von Waschgang 1 und 2 aufgetragen. Der Transfer fand auf eine PVDF-Membran statt und wurde anschließend mit dem PolySia-spezifischen Antikörper 735 inkubiert. Der mAk 735 wurde mit einem Polyklonalen Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper gekoppelt, welcher mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war. Mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektion erfolgte die Visualisierung der Signale (**siehe Abbildung 19**).

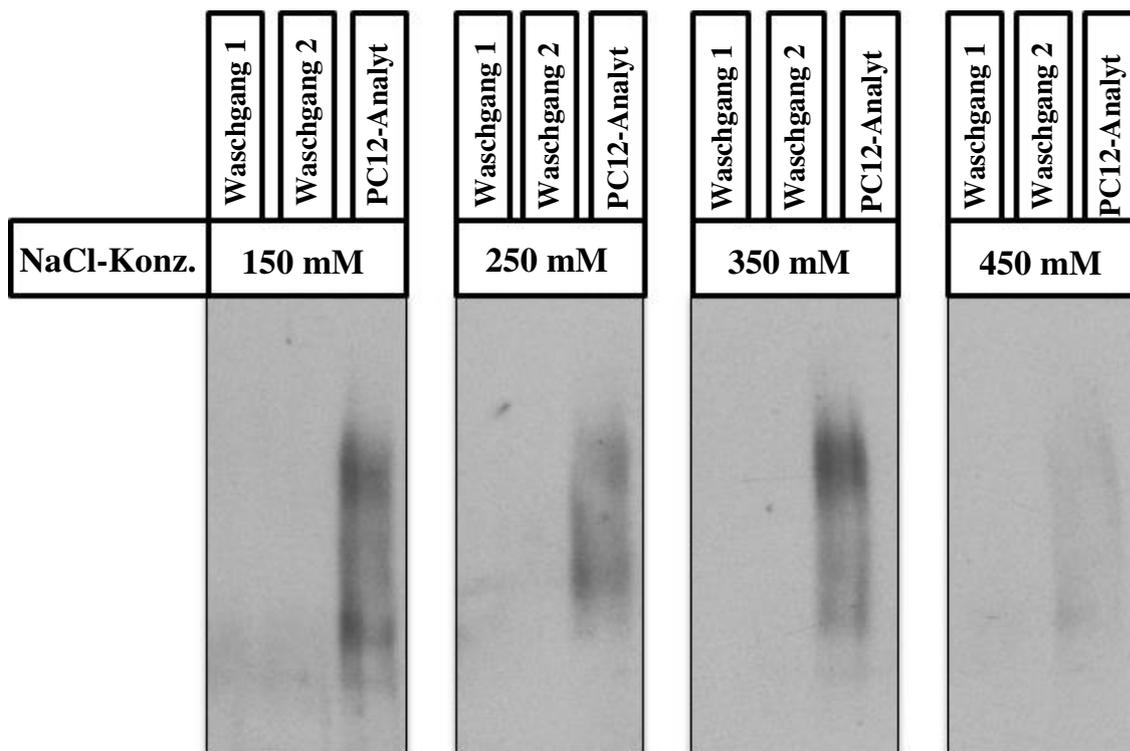


Abbildung 19. Vergleich der NaCl-Konzentration des Waschpuffer 1: PC-12-Zellysate wurde mittels verschieden konzentrierten Waschpuffer 1 nach Affinitätspräzipitation gewaschen. Anschließend wurde sowohl die Probe, als auch Aliquots des benutzten Waschpuffer 1 aus Waschgang 1 und 2 mittels *Western Blotting* und Färbung gegen PolySia (mAk 735) analysiert.

Abbildung 19 zeigt die Ausschnitte des mittels Chemolumineszenz entwickelten Films, aufgeteilt nach der Salzkonzentration des benutzten Waschpuffers 1. Die Ausschnitte wurden nur zur Übersicht getrennt dargestellt und stammen von einem einzelnen Gel bzw. einer einzelnen PVDF-Membran und dem entwickelten Film. Die gleiche Belichtungsdauer ist Voraussetzung, um einen Vergleich zwischen den Proben ziehen zu können. Dabei wurde die SDS-Page jeweils wie folgt aufgetragen: Zuerst die Spalte von Waschpuffer 1 - Waschgang 1, folgend Waschpuffer 1 - Waschgang 2, zuletzt das Eluat der Probe.

Bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM zeigten sich sowohl in Waschgang 1 wie 2 Rückstände durch Verunreinigung. Diese Probe zeigte ein starkes Signal mit dem PolySia-typischen langen Schmierfilm. Der Filmausschnitt der 250 mM NaCl-Konzentration zeigte bei den Waschgängen noch schwache Schmierstreifen und vereinzelte Verunreinigungen, die meist bei der Entwicklung und Inkubation der

Antikörper für die Chemolumineszenz-Detektion entstehen und nicht im Zusammenhang mit dem Waschpuffer stehen. Das Probensignal war schwächer als bei einer 150 mM NaCl-Konzentration, ausgehend davon, dass zunehmend die spezifische Bindung zwischen Dynabeads und PolySia angegriffen wurde. Bei 350 mM NaCl-Konzentration waren kaum bis keine Verunreinigungen mehr zu erkennen. Das PolySia-Signal gewann an Intensität, was, wenn man von einer vollständig homogenisierten Probe ausgeht, für eine bessere Inkubation des mAK 735 aufgrund geringerer Verunreinigungen spricht. Bei einer 450 mM Konzentration war kein Signal der Waschgänge 1 und 2 zu erkennen, der Hintergrund war homogen und ohne Verschmutzungen, allerdings zeigte sich das Signal von PolySia im Vergleich zu den vorherigen Konzentrationen nur sehr schwach.

Da bei einer Salzkonzentration von 350 mM die größte Ausbeute durch Elution der Präzipitate erzielt wurde, sollte im Rahmen der folgenden Versuche nur noch mit dieser Konzentration gearbeitet werden.

5.2 Nachweis von PolySia in Rattenhoden und –nebenhoden

Nachdem in unserer Forschungsgruppe durch den Doktoranden Sören Bäumner PolySia auf bovinen und humanen Spermien nachgewiesen werden konnte, Ejakulate aber aufgrund des Prostatasekrets nur bedingt für Proteomics-Ansätze nutzbar sind, war der Nachweis von PolySia in Hoden und Nebenhoden von Ratten Teil dieser Dissertation. Durch den vorangegangenen Versuch konnte die Aufreinigung der polysialylierten Proteine in unseren Proben optimiert werden und die NaCl-Konzentration unseres Waschpuffers 1 auf 350 mM festgelegt werden.

Die benötigten Präparate wurden uns von Frau Bärbel Fühler aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Klaus T. Preissner zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die Hoden und Nebenhoden als Ganzes bei -20°C bis zur Verwendung zwischengelagert.

Der Nachweis erfolgte über die Gelelektrophorese der aufgereinigten polysialylierten Proteine und anschließende Darstellung über die Anwendung eines *Western Blots* gegen den Anti-PolySia-Antikörper mAk 735.

Als Probenmaterial diente je ein Rattenhoden und -nebenhoden, welche nach dem Auftauen voneinander getrennt wurden. Im Anschluss wurden sie mit Lysepuffer versetzt, mit einem Homogenisator und Ultraschallstab homogenisiert und für zwei Stunden bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die anschließende Affinitätspräzipitation

mit EndoN-Beads erfolgte über Nacht bei 4°C wiederum auf dem Schüttler. Nach dem Durchlaufen des präzipitierten Eluats durch SDS-Page, erfolgte die Übertragung der Proteinbanden des Gels auf eine PDVF-Membran über das *Western Blot*-Verfahren. Als Primärantikörper diente der mAk735 mit einem polyklonalen Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper, welcher mit HRP konjugiert ist. Nach Chemolumineszenzfärbung und Entwicklung auf einem lichtempfindlichen Film konnten die polysialylierten Glykoproteine dargestellt werden (**siehe Abbildung 20**).

Zusätzlich zu den Probenbanden wurde bei der Gelelektrophorese eine Bande mit Größenmarker aufgetragen. Die Molekülbanden wurden bei dieser Abbildung nicht dargestellt, aber entsprechende Markierung in das Schema überführt.

Bei beiden Banden, Hoden wie Nebenhoden, zeigte sich ein starkes PolySia-positives Signal. Das Signal wies das PolySia-typische verschmierte Signal über eine weite Molekülbreite zwischen ca. 40 bis über 170 kDa auf. Sowohl das Signal vom Rattenhoden, wie auch das Signal vom Nebenhoden, zeigten eine besonders starke Bande im Bereich zwischen ca. 180 und 95 kDa. Dieser Bereich war dahingehend von Interesse, da hier die größten Mengen des gesuchten polysialylierten Proteins erwartet wurden. Da in diesem Versuch kein Vergleich der PolySia-Konzentrationen angesetzt war, wurde vor der Elektrophorese keine Äquilibrierung der Proteinmengen der beiden Proben zueinander vorgenommen. Daher konnte auch kein Vergleich zwischen dem stärker erscheinenden Signals der Hodenprobe zur Nebenhodenprobe gezogen werden.

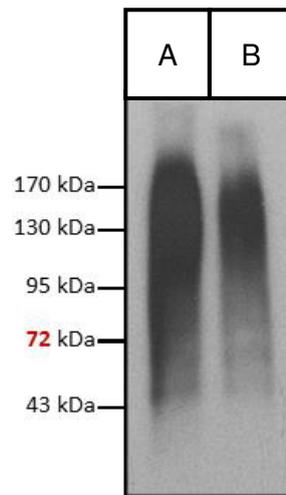


Abbildung 20. Anti-PolySia Färbung von Hoden (A) und Nebenhoden (B) einer Ratte: Antikörper-Färbung mit mAk 735 gegen PolySia von je einem lysierten und mittels Dynabead®-Affinitätspräzipitation aufgereinigten Hoden bzw. Nebenhoden mit anschließender Chemolumineszenzfärbung. Der auf dem Gel aufgetragene Marker wurde entsprechend den Massen 43 bis 170 kDa dargestellt.

5.3 Visualisierung der Sialinsäureketten in Rattenhoden und –nebenhoden mittels HPLC

Mit Hilfe der Anionenaustauscherchromatographie wurde nach der Identifizierung von PolySia im Rattenhoden und –nebenhoden eine Quantifizierung der Sialinsäureketten durchgeführt. Nach Fluoreszenzmarkierung jeweils einer Probe von Rattenhoden und Nebenhoden mit DMB (1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol) wurden diese anschließend mittels Anionenaustausch aufgetrennt.

Je ein tiefgefrorener Rattenhoden und Nebenhoden (Nicht vom selben Exemplar) wurde in 10 mL Lysepuffer mittels Stabmixer homogenisiert und für zwei Stunden bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert/lysiert. Mittels Affinitätspräzipitation durch EndoN-Beads (inaktivierte Endoneuraminidase N gekoppelt an Dynabeads®) wurden die polysialylierten Proteine in der Probe aufgereinigt. Dazu wurden die Proben über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit den EndoN-Beads inkubiert. Nach den Waschgängen mit Waschpuffer 1 und 2 wurden die polysialylierten Proteine wieder von den Beads eluiert. Dabei wurde beim Eluierpuffer auf NaCl verzichtet (nur 100 mM Triethylamin), um Störungen der Anionenaustauscherchromatographie zu umgehen (Salzgradient).

Anschließend wurden beide Proben in der Speedvac trockengezogen und der DMB-Fluoreszenzmarkierung unterzogen.

Die DMB-markierten Proben wurden auf eine Anionenaustauschersäule aufgebracht und mittels HPLC-Analyse der Kettenlänge nach getrennt (siehe **Abbildung 21**).

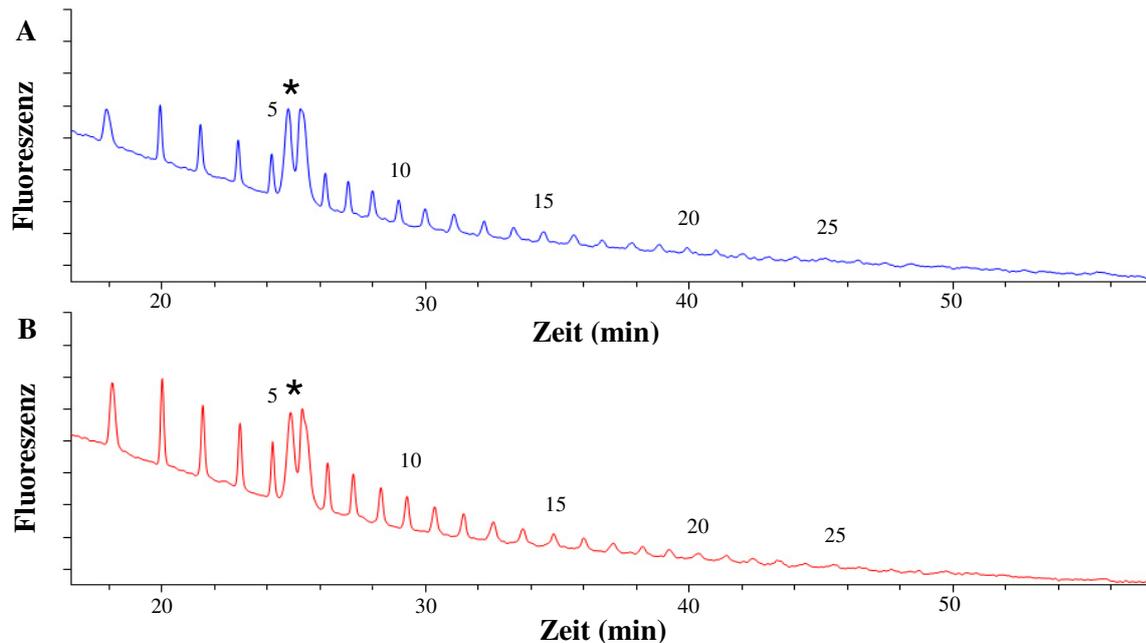


Abbildung 21. Kettenlängen der Polysialinsäuren von Rattenhoden und –nebehoden: Je ein Rattenhoden (A / blau) und Nebenhoden (B / rot) wurden lysiert, gegen PolySia aufgereinigt und durch DMB-HPLC analysiert. Hier dargestellt ist die Anzahl der Sialinsäurereste beginnend ab dem ersten Signal um Minute 18. Kettenlängen sind exemplarisch dargestellt. Signalartefakte (*) sind markiert.

Da inaktivierte EndoN erst ab einer Kettenlänge von 5 Sialinsäureresten binden kann und PolySia per Definition aus mindestens acht Sialinsäuren besteht, konnte die Affinitätspräzipitation mit EndoN-Beads gewährleisten, dass vorwiegend polysialylierte Proteine in der Probe aufgereinigt waren. Die Untersuchung mittels HPLC verifiziert dies, indem sowohl bei dem Eluat von Hoden, als auch von Nebenhoden Sialinsäureketten von mehr als 25 Resten gezeigt werden konnten. Die typischen Auftragungspeaks, die nach ein paar Minuten auftreten und das Erreichen des Probenvolumens darstellen, wurden nicht dargestellt. Die Abbildung beginnt beim ersten Sialinsäuresignal ab Minute 28. Jeder Pik steht dabei für einen zusätzlichen Sialinsäurerest. Je länger die Sialinsäurekette, umso stärker ist die Bindung an die

stationäre Phase der Säule. Daher wird eine höhere Salzkonzentration des Laufmittels benötigt, um die Probe zu eluieren. Daher kann jeder Peak mit einer zusätzlichen Sialinsäure gleichgesetzt werden. Ab dem 25. Sialinsäurerest ging das Signal im Rauschen unter. Die Signale von den Hoden- und Nebenhodenproben waren identisch, was zeigte, dass beide PolySia enthalten.

5.4 Proteinidentifizierung

Nachdem PolySia sowohl im Hoden, als auch im Nebenhoden PolySia mittels Gelelektrophorese und anschließender Inkubation mit dem Anti-PolySia mAk735 nachgewiesen und mittels HPLC-Anionenaustauscherchromatographie verifiziert werden konnte, war das folgende Ziel die Identifizierung des PolySia tragenden Glykoproteins.

Zur Proteinidentifizierung wurden fünf Rattennebenhoden lysiert. Das Eluat nach Präzipitation auf PolySia wurde aufgeteilt und anschliessend einer SDS-Page unterzogen. Der Teil des Gels, mit dem Hauptanteil der Probe wurde mittels Commassie-Brillant-Blau-Färbung fixiert, der andere Teil mit Hilfe des *Western-Blot*-Verfahrens dargestellt.

Der entwickelte Blot der Probe gab nun den benötigten Kilodalton-Bereich des Gelstücks vor, in dem die polysialylierten Glykoproteine zu erwarten sind. Anhand der mitgelaufenen Größenmarker wurden zwei Banden aus dem fixierten Gel entnommen. Das erste Stück reichte von 130 – 170 kDa und das zweite von 170 kDa bis 190 kDa (**siehe Abbildung 22**). Nach Entfärbung des Gels wurden die Proteine tryptisch verdaut und anschließend carbamidomethyliert.

Nach der vollständigen Aufbereitung der Proben wurden diese mittels nano-LC (Flüssigkeitschromatographie) getrennt und je Elutionszeit auf ein Target (Firma Bruker Daltonics) aufgetragen. Durch Massenspektrometrie mit Hilfe der *matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy* (MALDI-TOF-MS) die entstandenen Peptidfragmente detektiert.

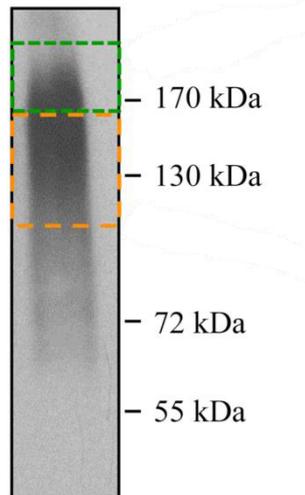


Abbildung 22. Western Blot von Rattennebenhoden gegen PolySia: Exemplarischer *Western Blot* von Rattennebenhoden nach Lyse, Affinitätspräzipitation mit EndoN-Beads und SDS-Page. Färbung mit mAk 735 gegen PolySia. Die entnommenen Bandenbereiche für die Identifizierung der polysialylierten Proteine sind markiert; 170 bis 190 kDa (Grün); um 170 bis 190 kDa (Orange).

5.4.1 Identifizierung mittels Summenspektren

Die mittels MALDI-TOF generierten Signale wurden in einem spezifischen Summenspektrum (Spektrum aus der Summe aller Fragmentensignale) zusammengefasst und konnten mittels Datenbankabgleich analysiert werden. Die entsprechende Software ordnet dabei den signifikanten Signalen ihre Molekülmassen zu. Vor der Analyse durch die Datenbank werden unspezifische Massen, welche durch den tryptischen Verdau resultieren (Trypsin und Keratin), oder aber als zum polysialylierten Protein gehörend ausgeschlossen werden können (z.B. Aktin, Myosin, usw.), aus der Datenbanksuche ausgeschlossen. Die dadurch erhöhte Spezifität des Summenspektrums ermöglicht eine gesteigerte Signifikanz des Ergebnisses der Suche.

Zur Datenbanksuche wurde die *Mascot Search* von *MatrixScience London UK* genutzt (**siehe Abbildung 23**). Dabei sind sämtliche vorgenommenen Modifizierungen wie die Carbamidomethylierung und der tryptische Verdau anzugeben. Jede Reduktion, wie z.B. von Cysteinen, führt zu einer Verschiebung der zu erwartenden Molekülmassen um mehrere Dalton.

Your name	<input type="text"/>	Email	<input type="text"/>
Search title	<input type="text"/>		
Database(s)	SwissProt NCBIInr contaminants cRAP MSDB	Enzyme	Trypsin
		Allow up to	1 missed cleavages
Taxonomy	All entries		
Fixed modifications	--- none selected --- <input type="checkbox"/> Display all modifications	> <	Acetyl (K) Acetyl (N-term) Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term) Ammonia-loss (N-term C) Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamidomethyl (C) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term)
Variable modifications	--- none selected --- <input type="checkbox"/> Display all modifications	> <	Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamidomethyl (C) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term)
Protein mass	<input type="text"/> kDa	Peptide tol. ±	1.2 Da
Mass values	<input checked="" type="radio"/> MH ⁺ <input type="radio"/> M _r <input type="radio"/> M-H ⁻	Monoisotopic	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
Data file	<input type="text"/> <input type="button" value="Durchsuchen..."/>		
Query	NB Contents of this field are ignored if a data file is specified. <input type="text"/>		
Decoy	<input type="checkbox"/>	Report top	AUTO hits
<input type="button" value="Start Search ..."/>		<input type="button" value="Reset Form"/>	

Abbildung 23. Suchmaske der Mascot Search von MatrixScience London UK: Die Online-Suche ermöglicht den Abgleich der erhaltenen Massenspektren mit umfangreichen Datenbanken. Vor dem Start der Suche muss die Suchmaske entsprechend der vorherigen Modifikationen des Analyts durch z.B. den tryptischen Verdau oder die Carbamidomethylierung justiert werden. Die Suchmaske gibt auch die vorhandenen Datenbanken an.

Die analysierten Summenspektren sind mit den bei der Datenbanksuche identifizierten Massen versehen worden. Die für das Ergebnis relevanten Massen wurden in rot eingetragen, Massen, die keinem anderen Protein zugeordnet werden konnte, aber zur Analyse hinzugezogen wurden, in schwarz.

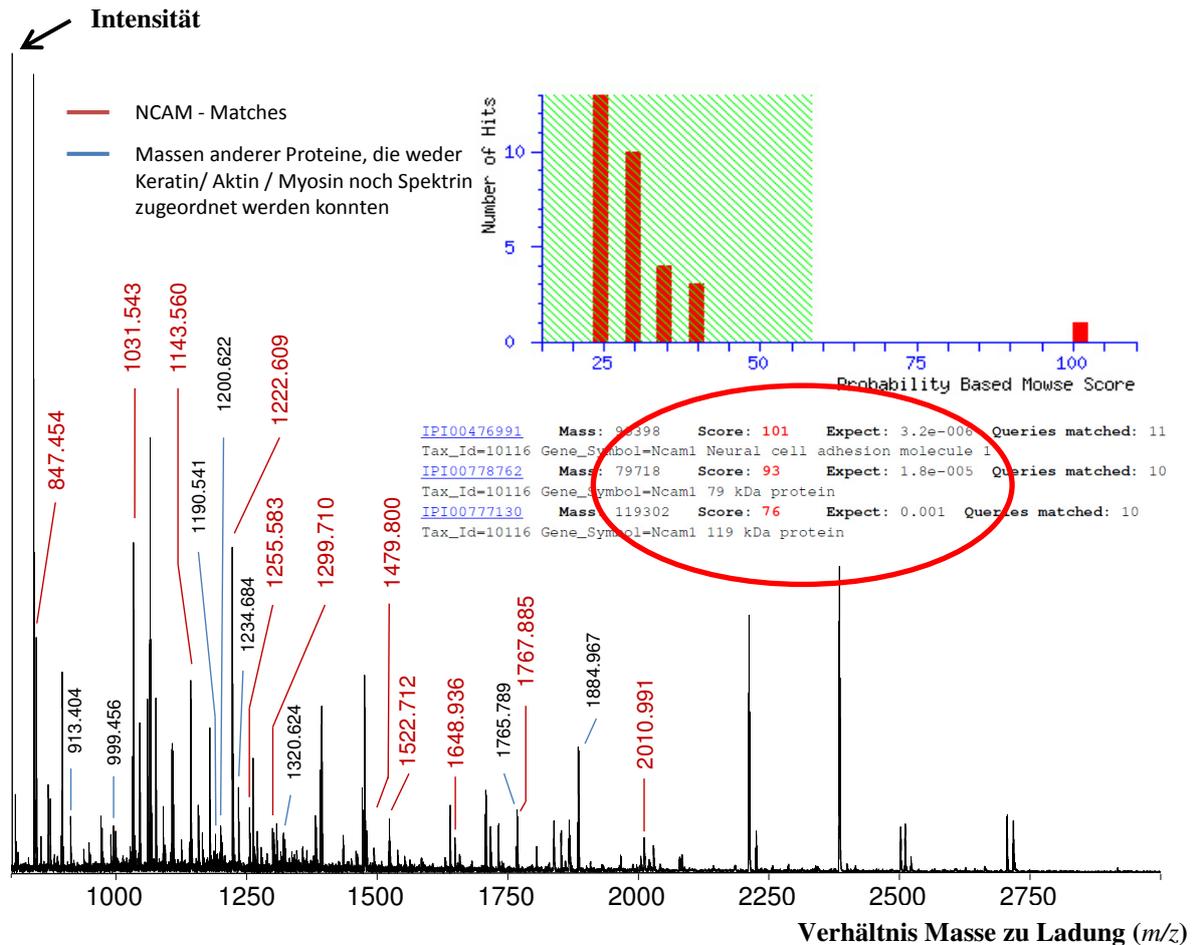


Abbildung 24. Mascot Search des Summenspektrums aus dem Probenbereich 170 bis 190 kDa

Dem Summenspektrum konnte durch die Datenbanksuche mit einem signifikanten Ergebnis das *Neural Cell Adhesion Molecule 1* zugeordnet werden (rote Elipse). Der *Probability Based Mowse Score* gibt die Signifikanz des Ergebnisses an und muss möglichst weit ausserhalb des grün schraffierten Bereiches liegen. Die rot markierten Massen geben die Peptidsignale an, die NCAM zugeordnet werden konnten. Blau markierte Massen wurden zur Suche genutzt, konnten jedoch nicht NCAM zugeordnet werden. Massen angegeben in Dalton.

Das Summenspektrum der Bande zwischen 170 und 190 kD führte zur Identifizierung des *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) als einer der Träger von PolySia im Rattennebenhoden. Der *Probability Based Mowse Score* gibt die Signifikanz des Analyseergebnisses an. Der höchste Wert (*Score*) von 101 konnte dabei gleich 11 Massen (*Queries matched*) der entsprechenden Fragmente (im Spektrum rot markiert) NCAM zugeordnet werden. Die Massen, die nicht NCAM zugeordnet werden konnten, führten zu keiner weiteren signifikanten Identifizierung (siehe **Abbildung 24**).

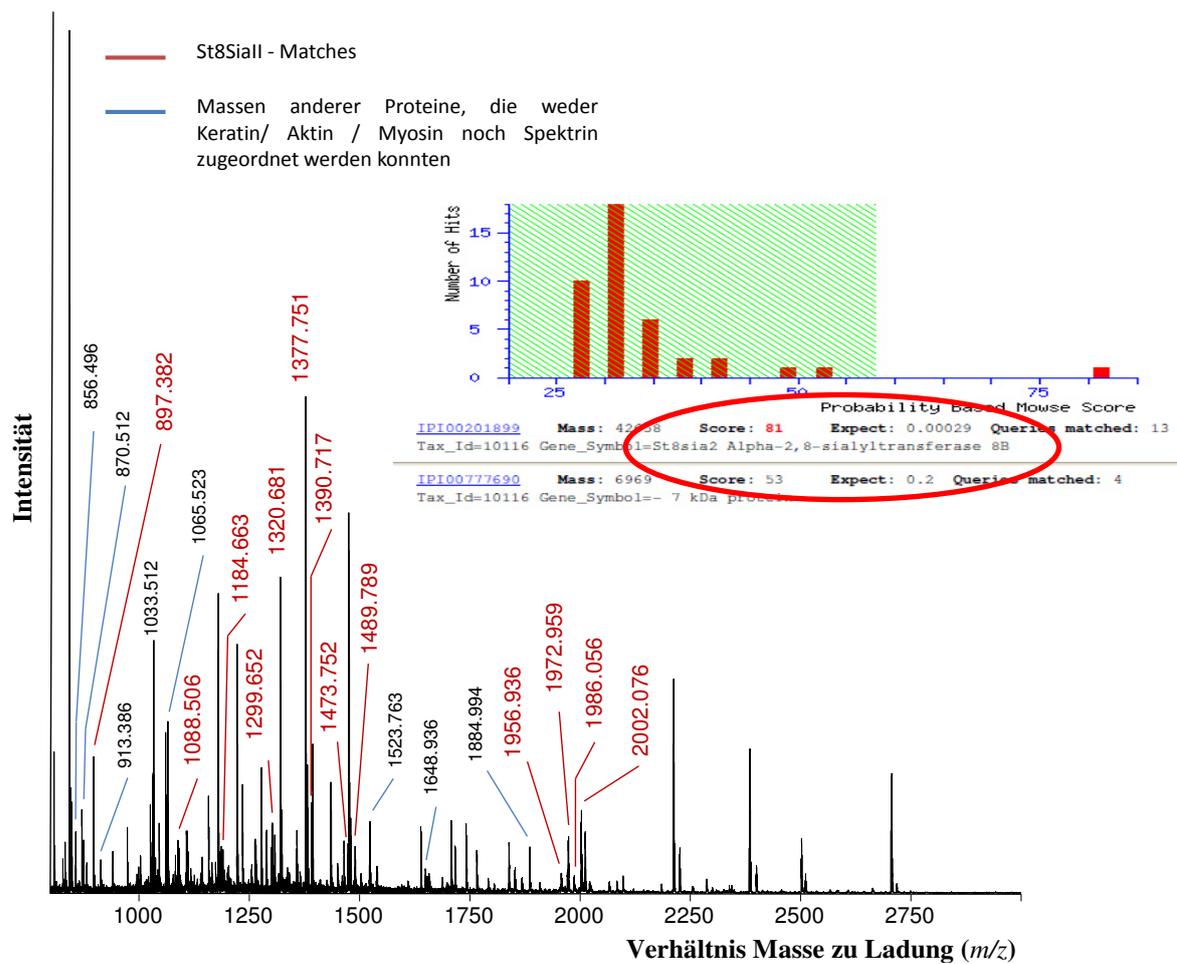


Abbildung 25. Mascot Search des Summenspektrums aus dem Probenbereich 95 bis 170 kDa
 Dem Summenspektrum konnte durch die Datenbanksuche mit einem signifikanten Ergebnis die α -2,8-Sialyltransferase zugeordnet werden (rote Elipse). Die rot markierten Massen geben die Peptidsignale an, die ST8SiaII zugeordnet werden konnten. Blau markierte Massen wurden zur Suche genutzt, konnten jedoch nicht ST8SiaII zugeordnet werden. Massen angegeben in Dalton.

Die Analyse des Massenspektrums der Bande zwischen 95 und 170 kDa führte zur Identifizierung von ST8Sia2 als zweites polysialyliertes Glykoprotein. Hierbei lag der *Score* bei 81 mit 13 zugeordneten Massen (siehe **Abbildung 25**).

5.4.2 MALDI-TOF-MS/MS-Analyse einzelner Massen

Eine Möglichkeit, das Ergebnis der Summenspektren zu verifizieren, stellt die sogenannte *LIFT*-Technik dar (Fragmentierung einzelner Peptidmassen). Ein detaillierteres Fragmentmuster der Ionen kann erzielt werden und zur Datenbankanalyse integriert werden.

Während der Fragmentierung der Peptide kommt es zur Spaltung der Amidbindungen. Die Fragmente können dabei nur detektiert werden, wenn sie geladen sind. Verbleibt die Ladung auf dem Fragment mit dem N-Terminus, wird das Ion als a, b oder c bezeichnet. Liegt es auf dem Fragment mit dem C-Terminus, als x, y oder z. Die Bezeichnung a, b oder c bzw. x, y oder z bestimmt die Position der Aufspaltung des Amids. Dabei kann jedes Peptid der gleichen Sequenz an einer anderen Stelle fragmentieren. In dieser Arbeit wurden ausschließlich das b und y Fragment beachtet, da diese statistisch am häufigsten vorkommen. Dabei ist das Spektrum umso signifikanter, je mehr der Fragmente der b bzw. y-Reihe getroffen wurden (**siehe Abbildung 26**) [Roepstorff and Fohlman 1984; Johnson, Martin et al. 1987].

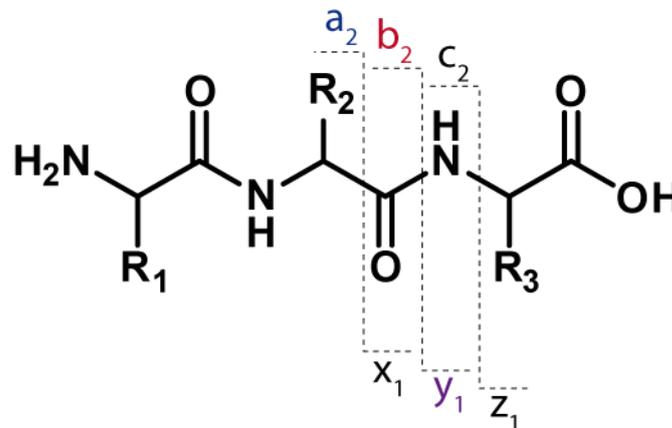


Abbildung 26. Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung: Peptidfragmente können im MALDI-TOF-MS/MS nur detektiert werden, wenn sie wenigstens eine Ladung besitzen. Sitzt diese Ladung am verbliebenen N-terminalen Fragment werden die Ionen in a, b oder c klassifiziert, liegt sie am C-terminalen Fragment entsprechend x, y oder z. Je nach Anzahl der verbliebenen Ladungen wird weiterhin in 1, 2 oder 3 unterteilt (z.B. a_2). Schema entnommen von *lamondlab.com*.

Dazu wurden einzelne Massen aus den Summenspektren, welche entweder ST8Sia2 oder NCAM zugeordnet werden konnte, „geliftet“ und deren Spektren erneut mittels *Mascot Search* analysiert.

Für ST8Sia2 wurden die Massen 1320.7 und 1377.8 „geliftet“ und gemeinsam in *Mascot Search* eingespeist. Das Ergebnis der Summenspektren konnte verifiziert und die Signifikanz der Identifizierung gesteigert werden (siehe **Abbildung 27**).

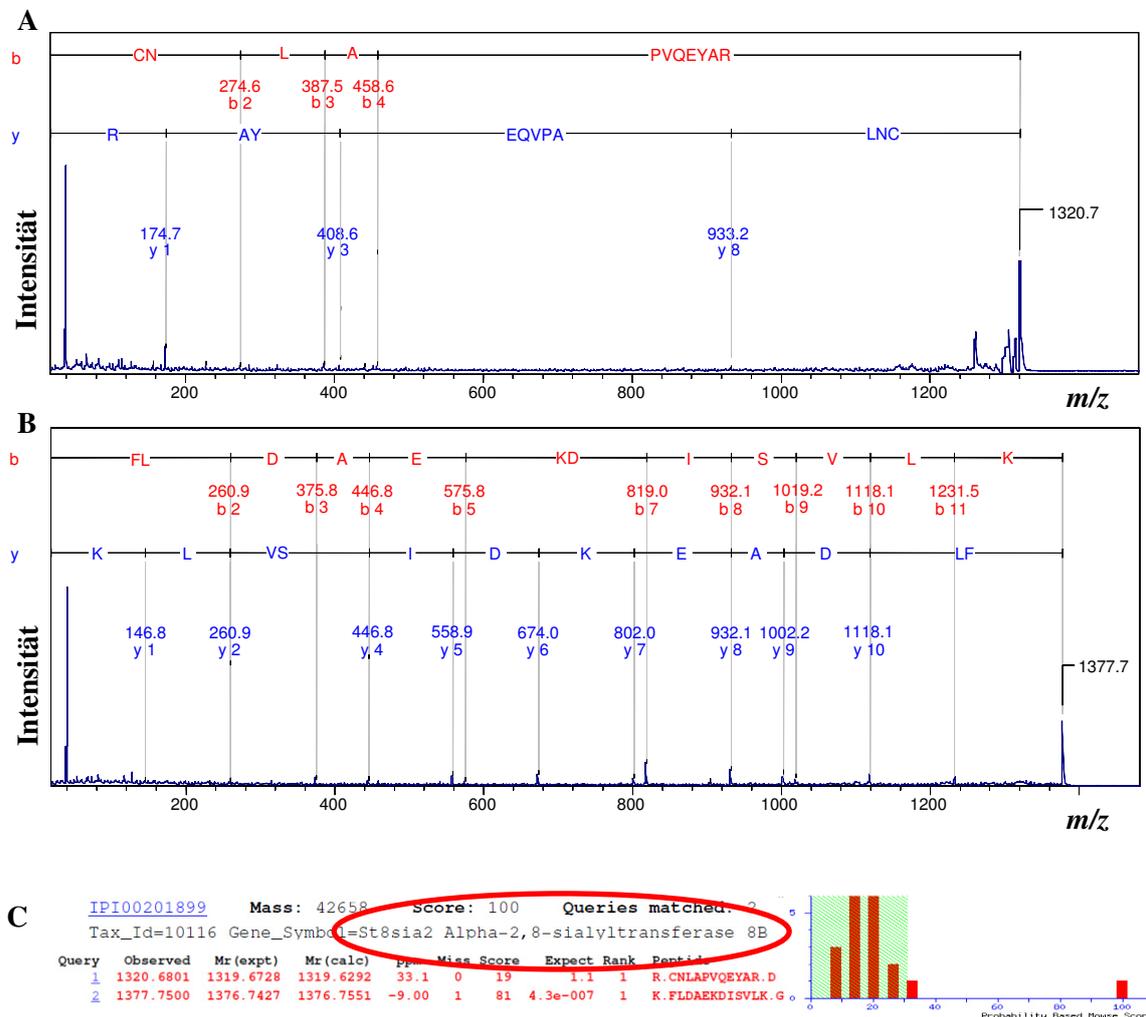


Abbildung 27. MALDI-TOF-MS/MS der Massen 1320.7 und 1377.7 Da: Die zwei der ST8SiaII zugeordneten Peptidmassen 1320.7 Da (**A**) und 1377.7 Da (**B**) wurden zusätzlich mit Hilfe der *LIFT*-Technik analysiert. Die dabei erzielten Fragmentspektren der *b*- und *y*-Ionen konnten einer weiteren Datenbanksuche (**C**) unterzogen werden und bestätigten, dass es sich um Peptide der α -2,8-sialyltransferase handelt (rote Ellipse).

Für NCAM konnten die Massen 1143.6, 1222.6, 1522,7 und 2011.0 der MALDI-TOF-MS/MS-Analyse zugeführt werden. Die Fragmentspektren der *b*- und *y*-Ionen wurden ebenso wie bei ST8SiaII in die Suchmaske der *Mascot Search* eingespeist und überprüft. Es bestätigte sich, dass auch hier alle vier Fragmente NCAM zugeordnet werden können (siehe **Abbildung 28**).

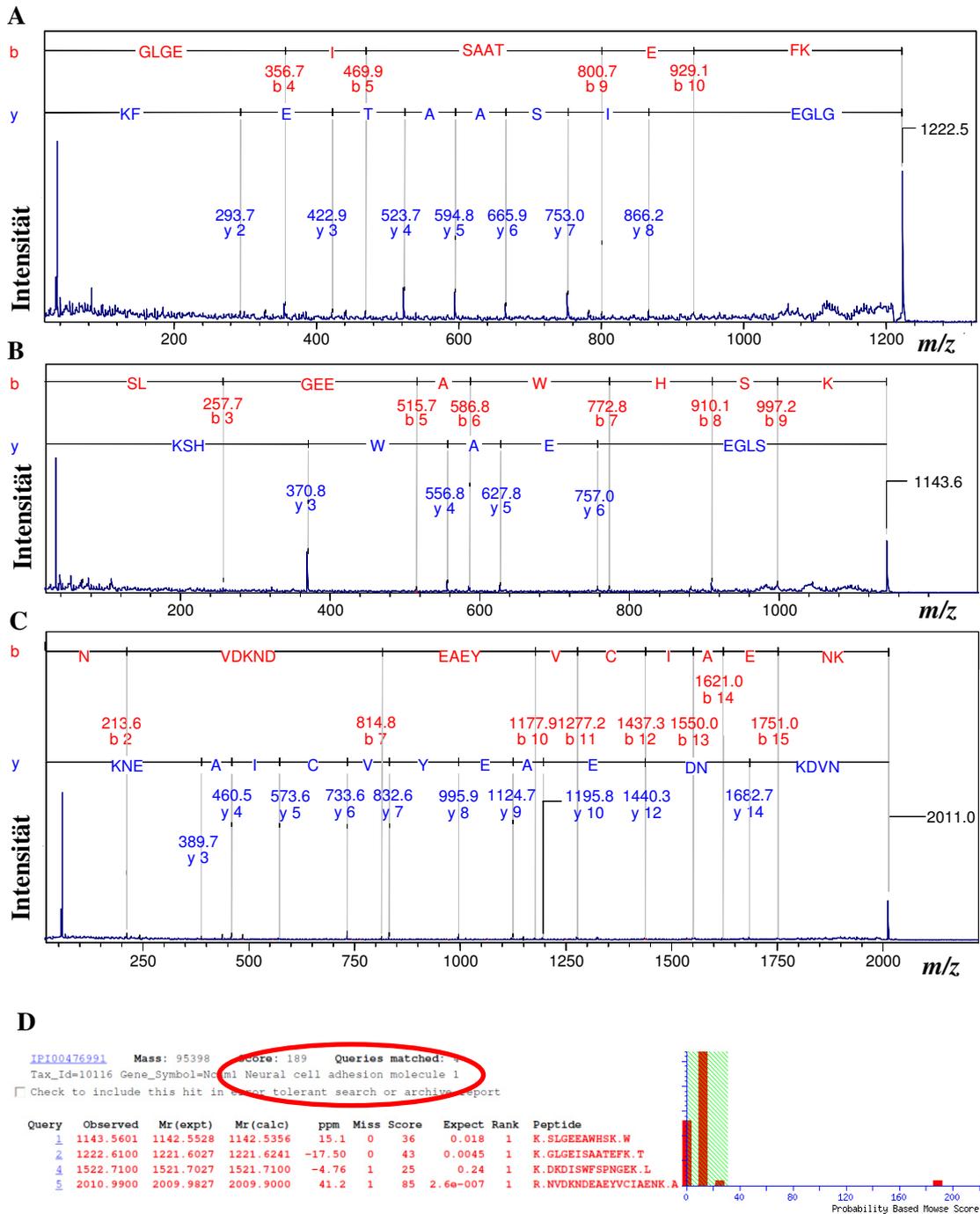


Abbildung 28. MALDI-TOF-MS/MS NCAM-zugeordneter Massen: Die vier Fragmentspektren von 1222.5 Da (A), 1143.6 Da (B), 2011.0 Da und 1522.7 Da (nicht dargestellt) wurden mit Hilfe der *LIFT*-Technik analysiert. Die Fragmentspektren der *b*- und *y*-Ionen wurden einer kombinierten Datenbanksuche unterzogen. Der *Mascot Search* (D) führte wieder zur Identifizierung von NCAM mit hoher Signifikanz (siehe rote Ellipse).

5.4.3 Identifizierung der polysialylierten Glykosylierungsstelle

Da bekannt ist, dass NCAM am N-Glykan der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle polysialyliert ist, war es das Ziel, herauszufinden wo ST8SiaII polysialyliert ist. Die Identifizierung wurde anhand der MALDI-TOF-MS/MS-Analyse von Rattennebenhodenproben durchgeführt. Durch Vorarbeit von Sören Bäumner war bereits bekannt, dass N-Glykane PolySia tragen.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die entsprechenden Rattennebenhoden nicht im Gel, sondern in Lösung carbamidomethyliert und tryptisch verdaut. Anschließend erfolgte erneut eine Affinitätspräzipitation mit EndoN-Beads über Nacht, wodurch nur die polysialylierten Peptide aufkonzentriert werden konnten. Diese wurden anschließend desialyliert und aliquotiert. Der eine Teil der Probe wurde unbehandelt analysiert, während der andere Teil vorher mit PNGaseF de-N-glykosyliert wurde. Die Peptide in der unbehandelten Probe, die ein N-Glykan aufweisen, können durch den Laserbeschuss nicht effektiver ionisiert werden und würden dementsprechend kein detektierbares Signal erzeugen. Die N-Glykosidase F ist in der Lage, sämtliche Klassen von N-Glykanen vom Proteinrückgrat zu lösen. Dazu wird das Protein zuerst denaturiert und anschließend die Bindung zwischen Asparagin und N-Acetylglucosamin gespalten. Das Asparagin wird dabei zu Asparaginsäure konvertiert [Galuska, Geyer et al. 2008]. Die anschließende massenspektrometrische Analyse zeigte ein spezifisches Signal mit der Molekülmasse von 1322.9 Da bei der mit PNGaseF behandelten Probe, die ST8SiaII zugeordnet werden kann (**siehe Abbildung 29**).

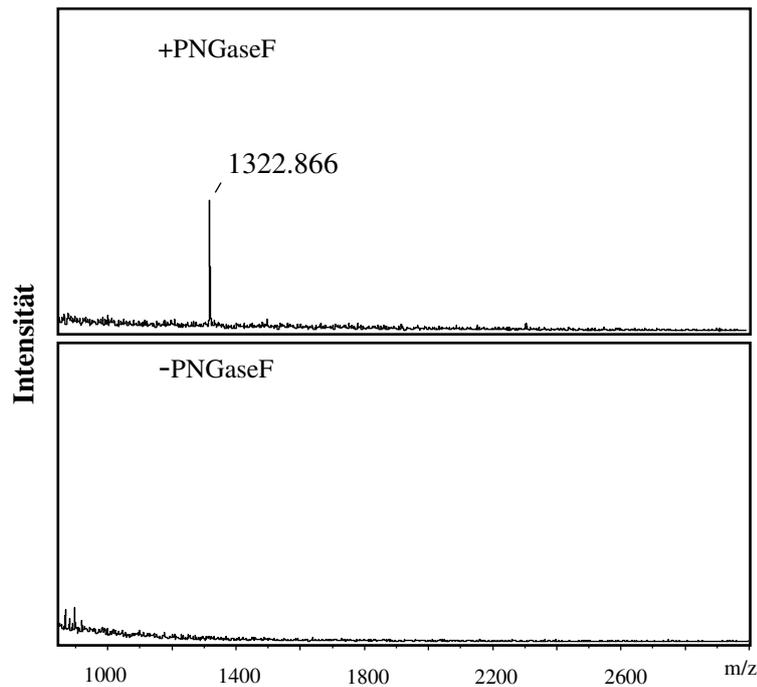


Abbildung 29. Bestimmung der polysialylierten Glykosylierungsstelle von ST8SiaII: Die polysialylierten Glykoproteine wurden tryptisch verdaut und mittels EndoN-Beads aufbereitet. Die erhaltenen Peptide wurden mit Hilfe der nanoLC aufgetrennt und durch MALDI-TOF-MS analysiert. Dabei erzielte die mit PNGaseF vorverdaute Probe (+PNGaseF) ein Signal der Masse 1322.866 Da, während die unbehandelte Probe negativ ausfiel.

Das Peptidfragment um 1322.866 Da wurde zusätzlich mittels MALDI-TOF-MS/MS überprüft (siehe **Abbildung 30A**). Die Analyse ergab, dass die Peptidsequenz von 1322.8 mit der deglykosylierten N-Glykosylierungsstelle an Asn²¹⁹ übereinstimmt. Die enzymatische Reaktion von PNGaseF hat entsprechend zur Umwandlung von Asn (D) zu Asp (N) geführt hat (Asn²¹⁹; ²¹³AFEDLVNATWR²²³). Damit konnte erwiesen werden, dass PolySia an der N-Glykosylierungsstelle des Asn²¹⁹ sitzt, welche zwischen dem *sialyltransferase motif L* und der Polysialyltransferasen-Domäne (PSTD) lokalisiert ist (siehe **Abbildung 30B**).

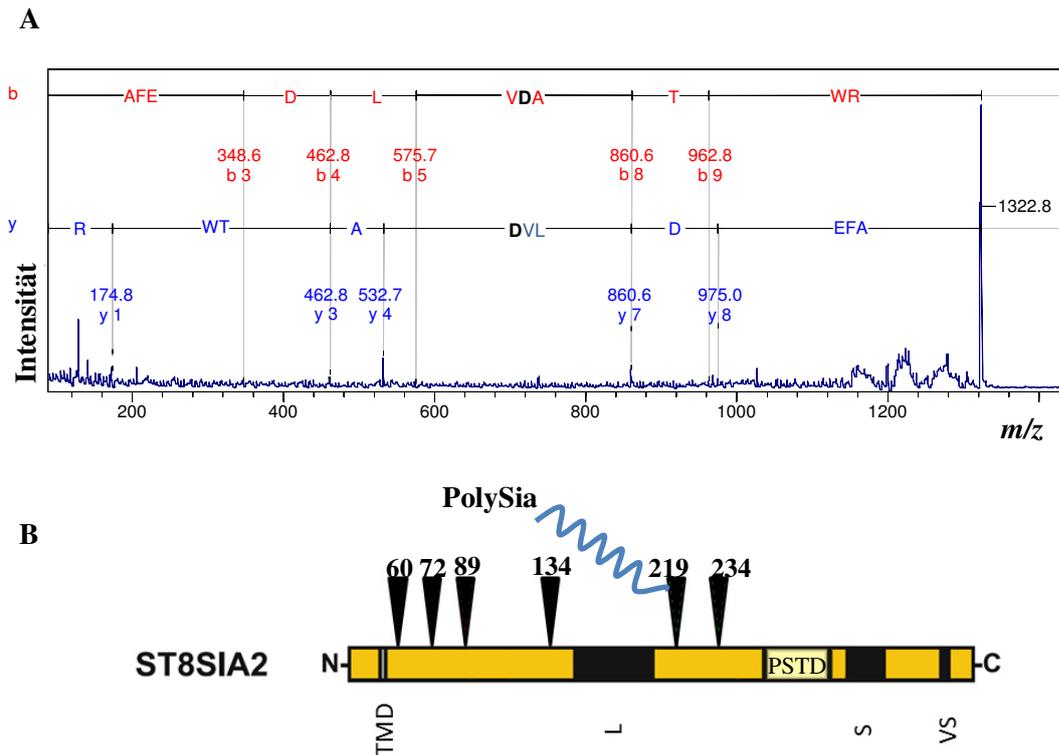


Abbildung 30. MALDI-TOF-MS/MS des Peptids um 1322.8 Da: (A) Analyse des Peptidfragments 1322.866 Da mit Hilfe der *LIFT*-Technik. Die Peptidsequenz zeigt an Stelle von Asn²¹⁹ die zu erwartende Konversion von Asn zu Asp (schwarz hervorgehoben). (B) Asn²¹⁹ liegt zwischen dem *sialyl motif L* (L) und der Polysialyltransferase-Domäne (PSTD). Adaptiert von *The polysialyltransferase ST8SiaII/STX: posttranslational processing and role of autopolsialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule* von Close B. 2001 [Close, Wilkinson et al. 2001] und *Polysialic Acid: Versatile Modification of NCAM, SynCAM and Neuropilin-2*; von Mühlenhoff M. 2013 [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013].

5.5 Western Blot gegen NCAM und ST8Sia2

Im Anschluss an die Identifizierung der Proteine NCAM und ST8SiaII sollten diese mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse dargestellt werden. Anhand von Proben von Rattennebenhoden sollte die Autopolysialylierung von ST8SiaII geprüft werden. An humanem Ejakulat sollte geklärt werden, ob NCAM und ST8SiaII vergleichbar zu den Rattenproben vorhanden sind.

Dazu wurden je 3 Rattennebenhoden und 8 Proben humanen Ejakulats homogenisiert und lysiert. Im Anschluss an die Lyse und Affinitätspräzipitation mit EndoN-Beads wurden die Proben mit EndoN bzw. PNGaseF verdaut oder unbehandelt belassen und ausschließlich in Na-Phosphatpuffer gelöst.

Die Endoneuraminidase-N degradiert dabei spezifisch α -2,8-verlinkte PolySialinsäuren von einer minimalen Kettenlänge von 7-9 Sialinsäuren, wobei Oligomere von maximal 7 Sialinsäuren in einer Kette entstehen. Da der mAk 735 gegen PolySia mindestens acht Sialinsäurereste zur Bindung benötigt, konnte der Verdau mit EndoN als Negativkontrolle für den α -PolySia-Antikörper 735 verwendet werden [Rutishauser, Watanabe et al. 1985; Hayrinen, Bitter-Suermann et al. 1989].

Nach dem Verdau wurden die Proben in Laemmli-Puffer (2fach) aufgenommen, mittels SDS-Page entsprechend ihrer Größe nach aufgetrennt und per *Western Blot* dargestellt. Die Rattennebenhodenprobe wurde gegen ST8SiaII angefärbt (**siehe Abbildung 31**).

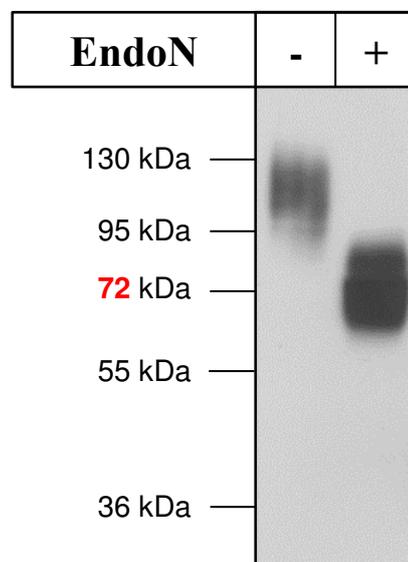


Abbildung 31. *Western Blot* von Rattennebenhoden gegen ST8SiaII: Lysierte Rattennebenhoden wurden mit EndoN-Dynabeads® aufgereinigt. Die Probe wurde aliquotiert und je ein Aliquot mit EndoN bzw. PNGaseF (nicht dargestellt) verdaut. Per *Western Blotting* und Chemolumineszenzfärbung mit dem Anti-ST8SiaII-Antikörper wurden die Proben analysiert. Der Verdau der Probe führte zu Shifts im Bereich von 20 kDa (+EndoN).

Der entwickelte *Western Blot* der Rattennebenhoden gegen ST8SiaII zeigt in jeder Bande ein entsprechendes Signal. Die komplett unverdaute Probe erzeugte ein Signal zwischen 95 und 130 kDa. Unter Zugabe von EndoN und der damit einhergehenden Abtrennung der PolySia kam es zu einem Shift des Signals um ca. 30 - 40 kDa auf einen Bereich zwischen 60 und 90 kDa. Das Signal wurde stärker, was für ein verbessertes Binden des Antikörpers ohne PolySia sprechen könnte. Der Shift der Signale zeigte deutlich, dass ST8SiaII polysialyliert. Damit konnte erstmals demonstriert werden, dass ST8SiaII *in vivo* autopolsialyliert wird.

Nach selbigem Verfahren wurde bei den humanen Proben vorgegangen. Nach Lyse und Eluierung wurden die Proben aliquotiert und eine Hälfte mit Endoneuraminidase N verdaut. Nach der SDS-Page und *Western Blotting* wurden die Proben mit 123C3 gegen NCAM und Anti-ST8SiaII gegen α -2,8-Sialyltransferase inkubiert und anschließend analysiert (siehe **Abbildung 32**).

Obwohl der Anti-NCAM Antikörper 123C3 sowohl die 180 als auch die 140 kDa Isoform des Proteins anzufärben imstande ist, konnte nur die 140 kDa angefärbt werden. Zudem erzielten depolysialylierte Proteine, gegenüber den unverdauten Glykoproteinen, deutlich stärkere Signale (Unverdaute Proben zeigen kaum sichtbare Signale). Dies betraf sowohl die NCAM als auch die ST8Sia2 – Färbung. Entsprechend der Analyse der Rattenproben zeigt sich auch hier ein deutlicher Shift zwischen polysialylierten und unpolysialylierten Proteinen von teils deutlich über 100 kDa.

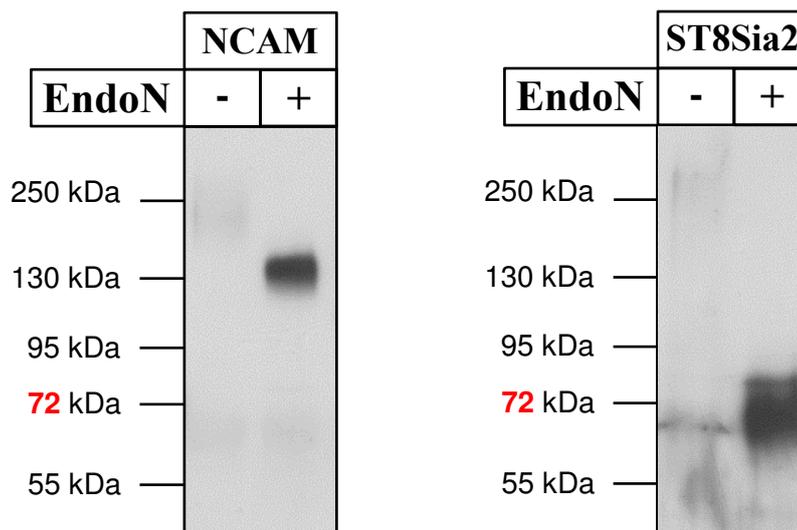


Abbildung 32. Western Blot von humanem Ejakulat gegen NCAM und ST8SiaII: Humanes Ejakulat wurde lysiert und mit EndoN-Beads aufgereinigt. Das Eluat wurde aliquotiert und eine Hälfte zusätzlich mit EndoN verdaut. Nach SDS-Page und *Western Blotting* wurde ein Teil der Probe mit 123C3 und der andere mit Anti-ST8SiaII gefärbt. Beide Proben zeigen nach dem Verdau mit EndoN ein deutlich stärkeres Signal für NCAM bzw. ST8SiaII.

5.6 Lokalisation von ST8SiaII und NCAM auf Spermien

Als abschließende Untersuchung sollte die Lokalisation der polysialylierten Proteine ST8Sia2 und NCAM anhand histologischer Fluoreszenzfärbungen von Spermien dargestellt werden. Aufgrund der Erhältlichkeit quantitativ deutlich größerer Mengen an

bovinen Spermien im Vergleich zu humanen, wurden diese als Untersuchungsmaterial vorgezogen.

Für die histologische Untersuchung wurde bovines Ejakulat von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Axel Wehrend der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Veterinärmedizin in Gießen bereitgestellt. Dieses erwies sich zudem als deutlich resistenter gegenüber der angewandten Aufbereitung im Vergleich zu humanem Ejakulat. Letzteres wies Verformungen und eine unzureichende Kernfärbung nach der Aufbereitung und Fluoreszenzfärbung auf.

Die Lokalisation der Proteine ST8Sia2 und NCAM erfolgte auf Spermien mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper, die unter Licht einer bestimmten Wellenlänge (FITC = 520 – 530 nm; Rhodamin = 590 nm) einen Farbton emittieren. Dieser konnte mittels einer Kombination aus Mikroskop und Kamera festgehalten werden. Dabei wurde ein Graustufenbild erzeugt und anschließend digital eingefärbt.

Vor der Fluoreszenzmarkierung wurden die vitalen Spermien mittels SwimUp von den devitalen Spermien getrennt. Anschließend wurde ein Teil der Probe für die histologische Untersuchung aliquotiert. Nach dem Waschen, Fixieren und Blocken der Spermien wurden die Proben entsprechend der geplanten Antikörperfärbungen aufgeteilt. Zur Negativkontrolle der PolySia-Färbung wurde eine der Proben mit EndoN behandelt, die andere Probe blieb unbehandelt.

Nach dem Verdau erfolgte die Inkubation der Primärantikörper. Durch den Einsatz von biotinylierter EndoN als PolySia bindendes Agens anstelle des mAk 735, konnten PolySia parallel mit NCAM bzw. ST8Sia2 an einem Spermium dargestellt werden. Da der mAk 735, genauso wie der Anti-NCAM (123C3) und Anti-ST8Sia2-Antikörper, in der Maus kloniert werden, war eine Kombination dieser Antikörper nicht möglich, da es zu Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper mit den Primärantikörpern gekommen wäre. Als Sekundärantikörper wurde für die biotinylierte EndoN Streptavidin verwendet, welches entweder mit FITC oder Rhodamin REDTM-X konjugiert war. Der Anti-Maus Sekundärantikörper für den Anti-ST8Sia2 bzw. 123C3 wurde entsprechend mit der gegensätzlichen konjugierten Fluoreszenzmarkierung ausgewählt (Bspw.: Streptavidin FITC-konj. + Ziege Anti-Maus Rhodamin REDTM-X konj.). Abschließend wurden die Spermien auf dem Deckglas mit VectaShield[®] fixiert und konserviert. Dieses enthält zusätzlich 4',6-Diamidin-2-phenylindol, einen blau fluoreszierenden Farbstoff, welcher die DNA und damit die Zellkerne markiert. Da der Spermienkopf fast gänzlich mit DNA durchsetzt ist, kann die DAPI-Färbung zur Darstellung eben

dieses genommen werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden dann, mit Hilfe der verschiedenen Wellenlängen, separate Fotos der Färbungen von PolySia, NCAM, ST8SiaII und der DNA der Spermien erstellt und diese später digital übereinander gelegt, um mögliche Kolokalisationen aufzuzeigen (siehe **Abbildung 33 und 34**).

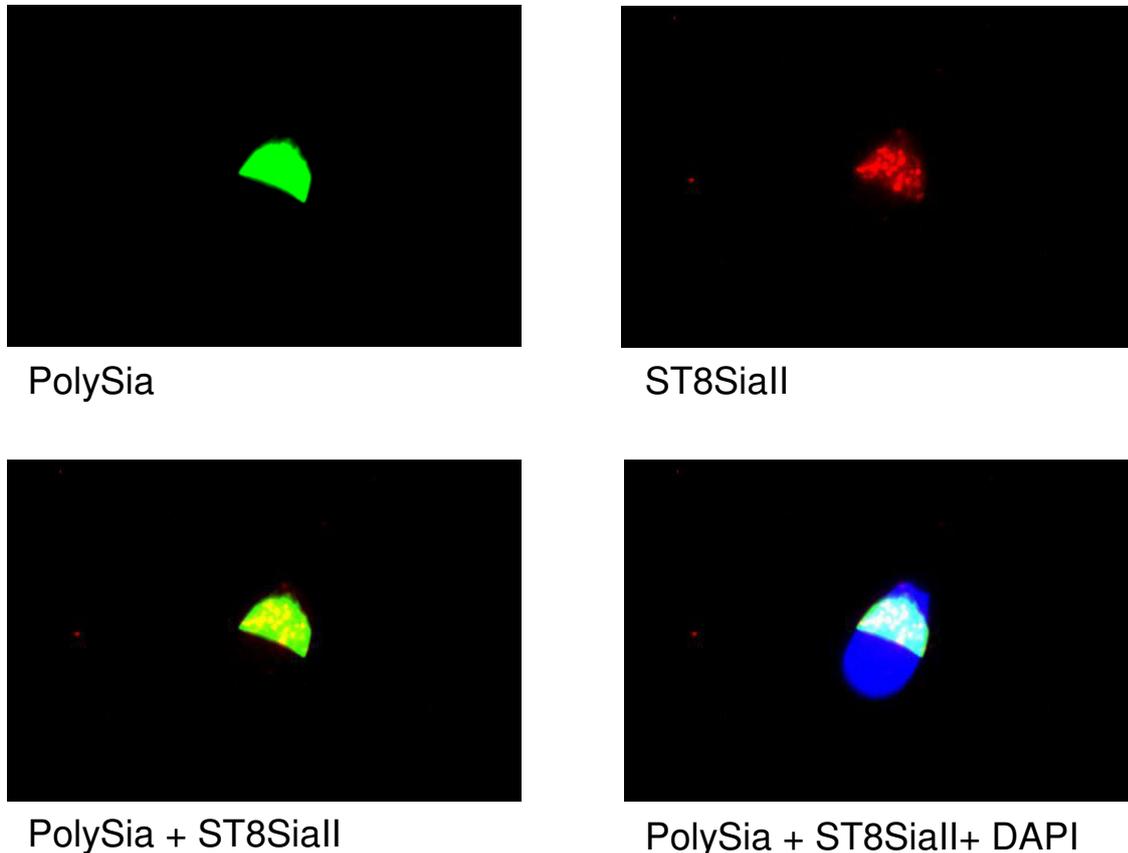


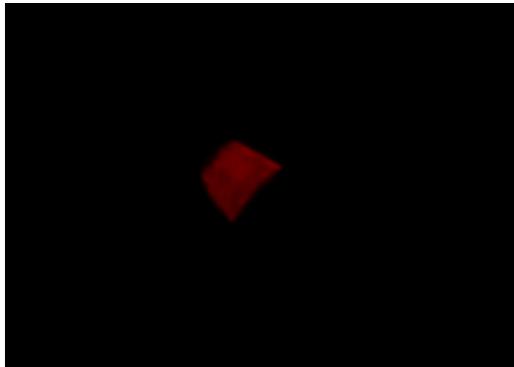
Abbildung 33. Fluoreszenzfärbung von bovinem Spermium gegen PolySia und ST8SiaII

Darstellung des Spermienkopfes nach Fluoreszenzmarkierung von PolySia (FITC = grün), ST8SiaII (Rhodamin REDTM-X = rot) und der DNA (DAPI = blau). Die Schichtung der Einzelaufnahmen von PolySia und ST8SiaII stellen die Kolokalisation zueinander dar, sowie, durch die Kombination mit der DNA-Färbung, die Lokalisation zum Spermienkopf.

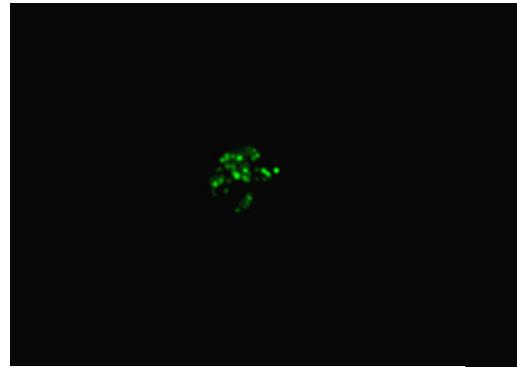
Die Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglichten uns die Kolokalisation von PolySia und ST8SiaII (**Abbildung 33**) bzw. NCAM (**Abbildung 34**) darzustellen und damit mögliche Rückschlüsse auf ihre Funktion zu ziehen. Zudem zeigte die klare Abgrenzung der PolySia zum Zellkern, dass die polysialylierten Proteine ausschließlich postakrosomal anzutreffen sind.

Hervorzuheben ist dabei, dass das Fluoreszenzsignal der PolySia-Färbung deutlich stärker war, als das Signal der beiden Proteine. Daher mussten für die Proteine weitaus längere Belichtungszeiten von bis zu 30 Sek., im Vergleich zu unter einer Sekunde für PolySia, gewählt werden. Zudem zeigte sich, dass nur ein Bruchteil der Spermien

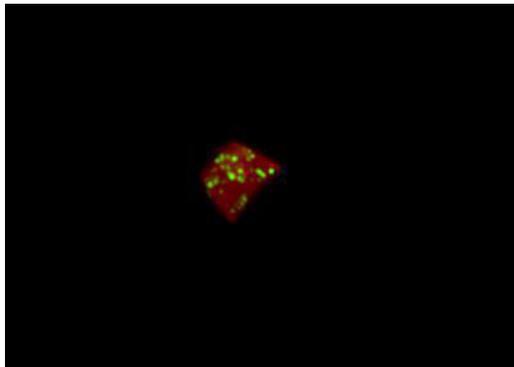
überhaupt PolySia aufwiesen. Inwiefern die polysialylierten Proteine der Spermien Einfluss auf die Funktion der Akrosomreaktion bzw. Fertilität eines Mannes nehmen, war nicht Teil dieser Arbeit und muss durch weitere Studien geklärt werden.



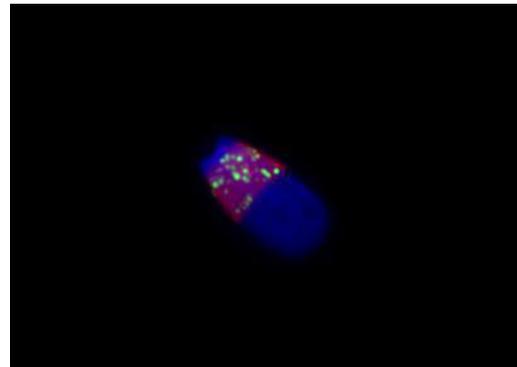
PolySia



NCAM



PolySia + NCAM



PolySia + NCAM+ DAPI

Abbildung 34. Fluoreszenzfärbung von bovinem Spermium gegen PolySia und NCAM

Darstellung des Spermienkopfes nach Fluoreszenzmarkierung von PolySia (Rhodamin REDTM-X = rot), NCAM (FITC = grün) und der DNA (DAPI = blau). Zusätzlich zu den Einzelaufnahmen wurde die Kolokalisation durch Schichtung dieser dargestellt, wodurch ersichtlich ist, dass PolySia-NCAM ausschließlich im postakrosomalen Bereich lokalisiert ist.

6 Diskussion

Alle bekannten Zelloberflächen in der Natur sind von einer Glykokalyx umgeben, einer dichten Hülle aus Oligo- und Polysaccharid tragenden Glykoproteinen und –lipiden. Schon in den 1940er Jahren wurde durch George Hirst und Frank Macfarlane Burnet das Monosaccharid Sialinsäure in Influenzaviren als ein Teil dieser Glykan-gebundenen Ketten identifiziert. Im Laufe der Jahrzehnte wurden immer mehr Variationen der Sialinsäuren entdeckt, deren größte Vertreter die N-acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) und ihr Derivat die N-glykoly-Neuraminsäure (Neu5Gc) darstellen. Mittlerweile sind über 50 Mitglieder der Sialinsäure-Familie bekannt [Varki and Schauer 2009; Ma, Wu et al. 2012].

Zu den zahlreichen, heute bekannten Funktionen von Sialinsäuren zählen die Interaktionen im Rahmen der ausgeprägten Elektronegativität in der Glykokalyx, sowie der Schutz von Molekülen und Zellen vor der Degradation durch Proteasen und Glykosidasen. Weiterhin greifen sie in die Regulation der Übertragung von Rezeptoren und transmembranen Signalen ein, maskieren Antigene in der Immunregulation und beeinflussen die Karzinogenese verschiedener bekannter Tumore, um nur einige Funktionen aufzuzeigen [Varki and Schauer 2009].

Bilden sich Polymere der Sialinsäuren aus, spricht man ab einer Kettenlänge von ≥ 8 Sialinsäuren von PolySia. Zu den bis heute identifizierten Trägern von PolySia zählen nur fünf Glykane. Neben NCAM, als am stärksten erforschten polysialylierten Glykoprotein, konnten in Säugetieren das *Synaptic Cell Adhesion Molecule 1* (SynCAM1) im Maushirn, CD36 in menschlicher Milch, Neuropilin-2 auf menschlichen Dendritischen Zellen, spannungsabhängige Natrium-Kanäle im Rattenhirn und autopolysialylierte ST8SiaIV/ST8SiaII *in vitro* und *in cellulo* in als Träger identifiziert werden [Zuber, Lackie et al. 1992; Muhlenhoff, Eckhardt et al. 1996; Close and Colley 1998; Yabe, Sato et al. 2003; Galuska, Rollenhagen et al. 2010; Rey-Gallardo, Escribano et al. 2010].

Eine japanische Forschungsgruppe um Shinji Miyata konnte im Laufe der letzten Dekade zudem α 2,8 und α 2,9-verknüpfte PolySia auf der Oberfläche von Seeigel-Spermien identifizieren, welche eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Spermium und Seeigelei während der Fertilisation spielen. Neben zwei kolokalisierten Glykoproteinen konnten erstmals auch Glykolipide als Träger der PolySia nachgewiesen werden. α 2,9-verknüpfte Sialinsäureketten waren bis dahin nur einmal in

Neuroblastoma-Zellen von Mäusen gefunden worden. Ein 40-80 kDa grosses Glykoprotein konnte als Träger von PolySia identifiziert werden und entsprechend seiner Lokalisation im Flagellum der Seeigel-Spermien als Flagelliasialin benannt. Flagelliasialin wird als Regulator des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt der Spermien angesehen, welcher direkten Einfluss auf die Motilität des Flagellums hat. Auch wenn über die Regulation von kationischen Kanälen, vergleichbar mit spannungsabhängigen Natrium- und Kalziumkanälen, spekuliert wird, so bleibt die genaue Funktionsweise von Flagelliasialin bisher ungeklärt. Das zweite, ca. 190 kDa große, polysialylierte Glykoprotein konnte anhand einer Aminosäuresequenz-Analyse noch nicht identifiziert werden [Inoue, Poongodi et al. 2003; Miyata, Sato et al. 2004; Miyata, Yamakawa et al. 2011].

Die Forschung konnte in verschiedensten Spezies den Zusammenhang zwischen einer negativ geladenen Zelloberfläche und der Entwicklung der Spermien zeigen, was mit Sialinsäuren schon 1963 vermutet wurde. Der Nachweis von Sialinsäuren auf humanen Spermien und die Identifizierung von polysialylierten Glykoproteinen auf Seeigelspermien gab den Anlass in unserer Forschungsgruppe, vergleichbare Elemente und Funktionsweisen auch auf Spermien von Säugern zu untersuchen [Schroter, Osterhoff et al. 1999; Oehninger 2001].

6.1 Vorangegangene Untersuchungen

Erste Forschungsergebnisse konnte Herr Sören Bäumner aus unserer Arbeitsgruppe liefern, welche im Rahmen seiner Dissertation über den „Nachweis von polysialylierten Glykoproteinen auf bovinen und humanen Spermien“ erzielt und in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht wurden [Simon, Baumner et al. 2013]:

Aufgrund quantitativer und qualitativer Erwägungen wurde der Nachweis von PolySia sowohl in den ersten Versuchen durch Herrn Bäumner, als auch in späteren eigenen Versuchen erst mittels bovinem Ejakulats etabliert und anschließend auf humane Spermien übertragen. Mit Hilfe der C7/C9-Methode nach Sato konnten mittels DMB-HPLC erste Sialinsäure-Moleküle in bovinem Ejakulat nachgewiesen werden. Erste Ergebnisse anhand des kompletten Ejakulates zeigten große Mengen an ketteninternen (C9-Derivaten) Sialinsäure-Resten. Im Anschluss wurde die Aufreinigung der gesuchten Glykokonjugate des bovinen Ejakulats optimiert und auf humanes Ejakulat

übertragen. Dazu wurde das *Swim-Up*-Verfahren etabliert, wobei das frische Ejakulat unter ein TALP-Medium gebracht wurde, was es den beweglichen vitalen Spermien ermöglichte, sich von den restlichen Bestandteilen und gestörten Spermien zu lösen und in das Medium zu „schwimmen“. Anschließend wurden die motilen Spermien im Idealfall komplett vom Rest des Ejakulats getrennt und mit Hilfe von Lyse und Präzipitation auf die polysialylierten Glykokonjugate aufgereinigt. Die anschließende C7/C9-Analyse der humanen Spermien konnte den eindeutigen Nachweis von internen und endständigen Sialinsäure-Resten erbringen (**siehe Abbildung 35**)[Simon, Baumner et al. 2013].

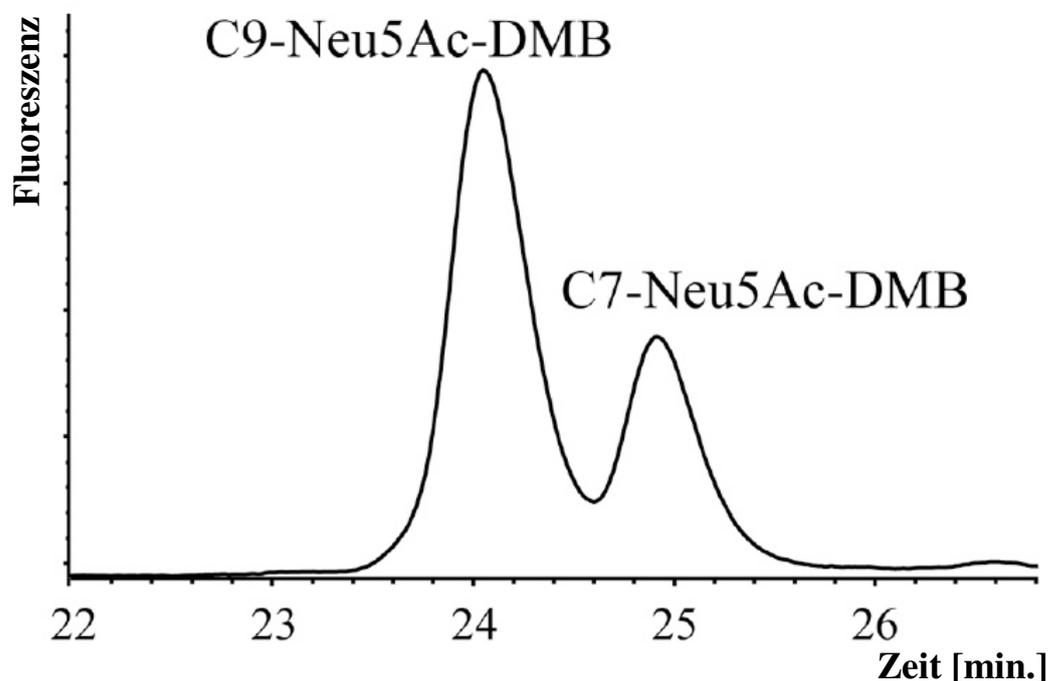


Abbildung 35. C7/C9-HPLC-Analyse von humanen Spermien: Bestimmung der ketteninternen Sialinsäure-Moleküle von humanen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels EndoN-Beads mit der C7/C9-Methode nach Sato. Siehe entsprechend auch *Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SialII*, Simon et. al 2013 [Simon, Baumner et al. 2013].

Da die Untersuchung der Sialinsäure-Komplexe keine Aussage über die Abstammung von Di-, Tri- oder OligoSia geben konnte, wurden die Sialinsäure-Ketten unter schwach sauren Bedingungen aufgespalten, fluoreszenzmarkiert und mittels Anionenaustauscher-Chromatographie nach der Anzahl ihrer Sialinsäurereste aufgetrennt.

An mittels Affinitätspräzipitation und *Swim-Up*-Verfahren aufgereinigten bovinen Proben wurde das Verfahren wieder etabliert und anschließend auf humane Proben übertragen. Bovine polysialylierte Spermien wiesen Kettenlängen von ca. 46 Sia-Molekülen. Die anschließende Analyse der humanen Proben zeigte Kettenlängen von bis zu 49 Kettenlängen (**siehe Abbildung 36**) [Simon, Baumner et al. 2013].

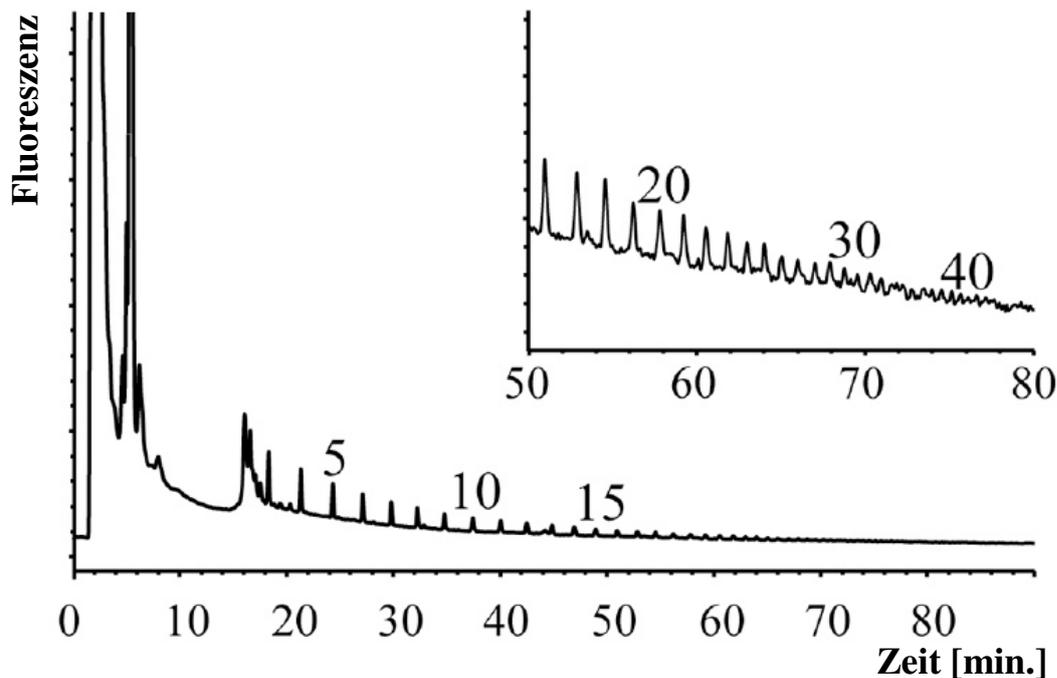


Abbildung 36. DMB-HPLC-Analyse zur Bestimmung der PolySia-Kettenlänge von humanem Samen: Die Sialinsäurepolymere wurden mittels milder DMB markiert und über Anionenaustauscherchromatographie der Kettenlänge nach aufgetrennt. Siehe entsprechend auch *Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII*, Simon et. al 2013 [Simon, Baumner et al.]

Verglichen mit den Ergebnissen von Miyata et al., liegen die Kettenlängen von PolySia auf humanen und bovinen Spermien deutlich über den Längen auf Seeigelspermien mit bis zu 25 Sialinsäure-Resten auf Flagelliasialin, ca. 15 beim unidentifizierten 190 kDa-großen Glykoprotein oder den ≥ 16 Sialinsäure-Reste langen Ketten der gefundenen Glykolipide [Miyata, Sato et al. 2004; Miyata, Sato et al. 2006; Miyata, Yamakawa et al. 2011].

Bei ersten Versuchen zur Identifikation des polysialylierten Proteins, wurde humanes Ejakulat mit Hilfe des *Swim-Up* und der Affinitätspräzipitation auf PolySia-Strukturen

aufgereinigt und anschließend mittels *Western-Blot*-Verfahrens analysiert. Ein Teil der Probe wurde mit EndoN inkubiert, welches PolySia dahingehend verdaut, dass ausschließlich Kettenlängen von ≤ 7 Sialinsäure-Resten verbleiben [Hayrinen, Bittersuermann et al. 1989]. Da der verwandte Antikörper gegen PolySia eine Kettenlänge von mindestens acht Sialinsäuren zur Bindung benötigt, konnte die verdaute Probe als Negativ-Kontrolle genutzt werden.

Die *Western-Blot*-Analyse zeigte nach der Belichtung ein positives Signal der unverdauten Probe zwischen 95 und 150 kDa, während die verdaute Probe negativ ausfiel. Nach einem zusätzlichen Verdau der Proben mit PNGaseF gegen N-glykosidische Verbindungen konnte somit erstmals gezeigt werden, dass PolySia auf bovinen und humanen Spermien vorkommt und an N-Glykane gebunden ist.

Die Darstellung des polysialylierten Glykoproteins auf den Spermien erfolgte mittels Formalin-Fixierung und Fluoreszenzeinfärbung mit anschließender flüssiger Versiegelung (Vectashield[®]) auf Objektträgern zur Mikroskopie-Analyse. PolySia wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC dargestellt, die Kernfärbung DAPI war im *mounting medium* Vectashield[®] bereits enthalten.

Die DNA füllt den Kopf eines Spermiums fast vollständig aus, wodurch die Kernfärbung DAPI diesen nahezu komplett einfärbt. Legt man nun die Schichtaufnahmen der DAPI- und der FITC-Färbung übereinander, so ermöglicht dies die Lokalisation der polysialylierten Glykoproteine im postakrosomalen Anteil des Spermienkopfes, sowohl im humanen (**siehe Abbildung 37A**) als auch im bovinen Ejakulat (**siehe Abbildung 37B**). Nur ein geringer Teil der Spermien war dabei PolySia-positiv, die entsprechende Negativkontrolle durch EndoN-Vorverdau zeigte keine PolySia-Signale (Abbildung nicht gezeigt).

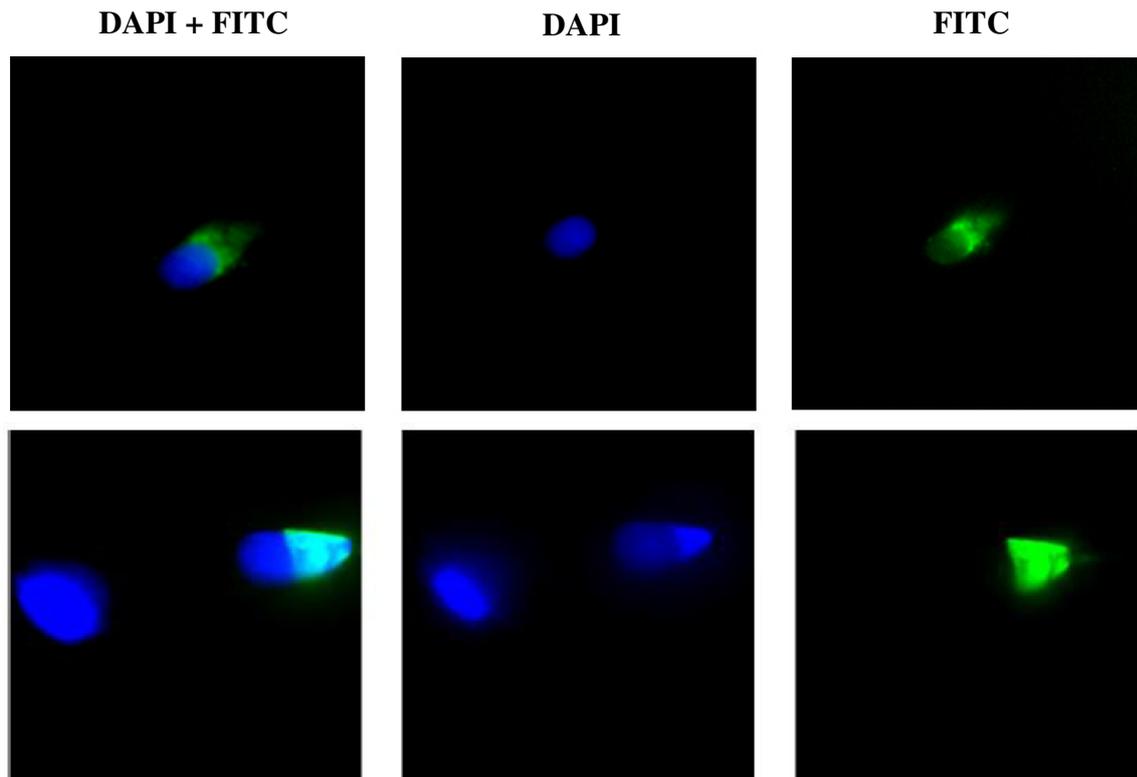


Abbildung 37. Immunfluoreszenz-Färbung von humanem und bovinem Ejakulat gegen PolySia: Aufnahmen von humanem (A) und bovinem (B) Ejakulat nach *swim-up* und Fluoreszenzfärbung in 40x Vergrößerung; Kernfärbung mit DAPI (Blau); PolySia-Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün). Entnommen aus der Dissertation von Sören Bäumner: *Nachweis von polysialylierten Glykoproteinen auf bovinen und humanen Spermien.*

6.2 Neue Ergebnisse

Das menschliche Spermium ist eine hoch spezialisierte Keimzelle, deren einzige Aufgabe es ist die männliche haploide DNA zur Oozyte zu transportieren, diese zu penetrieren und zu befruchten. Die männliche Keimzelle muss dafür über mehrere Wochen im Nebenhoden überleben, dem Milieu des weiblichen Geschlechtstrakts widerstehen und gleichzeitig den langen Weg zur Eizelle und ihre Befruchtung bewerkstelligen können. Um all dies bewältigen zu können, besitzen Spermatozoen eine hoch differenzierte Zelloberfläche aus wenigstens 300 verschiedenen Proteinen, deren glykosylierter Anteil die Glykokalyx formt. Seit dem Jahr 1963 wurde durch mehrere Studien nachgewiesen, dass die negative Oberfläche der Glykokalyx im Laufe der Maturation im Nebenhoden ansteigt und dies durch die Bindung von Sialinsäuren mitbestimmt wird [Bedford 1963; Holt 1980; Naaby-Hansen, Flickinger et al. 1997; Schroter, Osterhoff et al. 1999].

Der Nachweis von polysialylierten Glykoproteinen auf humanen und bovinen Spermien und das Verständnis der Modifikation der Spermatozoen mit Sialinsäuren während ihres Durchlaufs und der Lagerung im Nebenhoden führte uns zu der Frage, ob PolySia auch im Hoden und Nebenhoden präsent sind und welche Glykoproteine diese tragen.

Als Probenmaterial wurden Rattenhoden wie –nebenhoden verwendet, welche von Frau Bärbel Fühler aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Klaus T. Preissner des Biochemischen Instituts Gießen in ausreichender Quantität zur Verfügung gestellt werden konnten. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des *Western-Blot*-Verfahrens. Um das Ergebnis zu optimieren, wurden die lysierten Proben mittels Affinitätspräzipitation gegen PolySia aufgereinigt. Die Präzipitation mit Hilfe inaktiver Endoneuraminidase N-gekoppelter DynaBeads[®] wurde vor der Anwendung an Rattenproben mittels PC12-Zellproben optimiert. Diese PC12-Zelllinie aus dem Nebennierenmark einer Ratte, wurde 1976 mit ST8SiaIV transfiziert, wodurch die Zellen große Mengen an PolySia produzieren [Greene and Tischler 1976].

Um eine möglichst komplett aufgereinigte Probe mit ausschließlich PolySia-Konjugaten zu erreichen, müssen die nach der Lyse eingesetzten EndoN-Beads wieder von den PolySia-Konjugaten gelöst werden. Um unspezifisch gebundene Bestandteile der Proben von den EndoN-Beads „abzuwaschen“, wurden die Beads vor der Eluierung zwei Waschgängen mit NaCl-Waschpuffern ausgesetzt. Zur Optimierung der Waschpufferkonzentration wurden für den Waschgang 1 die NaCl-Konzentrationen 150 mM, 250 mM, 350 mM und 450 mM des Waschpuffers 1 getestet. Das Ergebnis der *Western-Blot*-Analyse führte zur Verwendung der 350 mM NaCl-Konzentration für die Folgeversuche, da ein starkes Probensignal bei gleichzeitig schwachen Artefakten im Hintergrund des Blots erzielt werden konnten (**siehe Abbildung 19**).

Im Folgenden wurde die *Western-Blot*-Analyse auf Rattenhoden und –nebenhoden übertragen. Die Rattenproben wurden bis zur Nutzung bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt und erst direkt vor der Homogenisierung mittels Ultraschallstab voneinander getrennt. Nach der optimierten Affinitätspräzipitation mit Hilfe der EndoN-Beads wurde Hoden-, wie Nebenhodenprobe auf das gleiche Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese per *Western-Blot* entwickelt. Der genutzte anti-PolySia-Antikörper mAk735 erzeugte ein starkes Chemolumineszenzsignal mit einer großen Breite von ca. 40 bis 190 kDa (**siehe Abbildung 20**). Beide Proben wiesen eine Konzentrierung des Signals im Bereich zwischen 95 bis 180 kDa. Der lange PolySia-

„Schmier“ entsteht aufgrund der unterschiedlichen Längen der PolySia-Ketten nach der Präzipitation und der entsprechend unterschiedlich langen Penetration der Poren im Verlauf der Gelelektrophorese, obwohl die Ladung durch den Einfluss von SDS analog zu den verschiedenen Molekülgrößen ist. Da in dem Versuchsaufbau kein Vergleich zwischen der Konzentration von PolySia in Hoden und Nebenhoden angestrebt war, erfolgte keine Äquilibration der Proben. Deshalb ist die unterschiedliche Signalstärke der beiden Proben von keinerlei Relevanz für eine Aussage zur Konzentration von PolySia im Hoden im Vergleich zum Nebenhoden. Das konzentrierte Probensignal gab den Bereich vor, welcher der größten Menge an zu charakterisierendem Glykoproteins entsprechen sollte.

Nachdem wir den Nachweis von PolySia sowohl im Rattenhoden, als auch im Nebenhoden erbringen konnten, galt es die Länge der Sialinsäureketten zu bestimmen, um einen Vergleich zu den Vorversuchen mit humanen und bovinen Spermienproben ziehen zu können. Als Probenmaterial diente wieder je ein Rattenhoden und –nebenhoden, die vor dem Beginn des Versuchs voneinander getrennt und homogenisiert wurden. Mit Hilfe der Affinitätspräzipitation gegen PolySia wurden die polysialylierten Glykokonjugate aus den Proben gelöst und aufgereinigt. Anschließend erfolgte unter sauren Bedingungen die Aufspaltung der Oligo- und PolySia-Ketten, die anschließend mit DMB (1,2-Diamino-4,5-Methyldioxybenzol) fluoreszenzmarkiert wurden. Mittels Anionenaustauscher-Chromatographie wurden die Sialinsäurefragmente ihrer Kettenlänge nach aufgetrennt und detektiert (**siehe Abbildung 21**).

Die Läufe des Eluats von Rattenhoden waren nahezu identisch zum Nebenhoden. Dargestellt wurde ab dem ersten Sialinsäure-Signal ab etwa Minute 18. Zwischen Minute 18 und 24 sind 5 eindeutige Signale ersichtlich, worauf ein ungeklärtes Doppelsignal um Minute 25 auftritt, welches ein durch das Verfahren ausgelöstes Artefakt darstellt. Bei beiden Proben können ab Minute 26 weitere etwa 17 Sialinsäure-*peaks* bis Minute 46 verzeichnet werden, bevor die Signalstärke im Rauschen untergeht. Insgesamt konnten somit im Hoden und Nebenhoden Kettenlängen von wenigstens 23 Sialinsäuren nachgewiesen werden, die zudem zu den gleichen regelmäßigen Signal-*peaks* führten. Einzig die Signalstärke variierte in den beiden Läufen. Da allerdings keine Äquilibration der PolySia-Menge in den einzelnen Proben erfolgte, kann kein Rückschluss auf die Konzentration von polysialylierten Glykoproteinen des Rattenhodens bzw. –nebenhodens getroffen werden. Allerdings konnte so das Vorliegen

von PolySia verifiziert werden, deren Ketten im Vergleich zu den PolySia-Kettenlängen von NCAM aus Maushirnen mit bis zu 62 Sialinsäure-Molekülen eher kurz ausfallen. Damit liegen die Kettenlängen im Bereich der in Seeigelspermien entdeckten Glykoproteinen. Die o-glykosidisch gebundene α 2,9-verknüpfte PolySia am Flagelliasialin erreicht Längen von 2 bis über 25 Resten, das noch unidentifizierte 190 kDa große Glykoprotein auf bis zu 13 Sialinsäurereste. Da jedoch die maximal detektierbare Kettenlänge stark von der eingesetzten Menge abhängt, ist das Vorhandensein von längeren PolySia-Ketten sehr wahrscheinlich [Miyata, Sato et al. 2006; Galuska, Geyer et al. 2008; Galuska, Rollenhagen et al. 2010; Miyata, Yamakawa et al. 2011].

Nachdem unsere Arbeitsgruppe PolySia auf Spermien von humanem und bovinem Ejakulat nachweisen und lokalisieren konnte, gelang somit während der Versuche dieser Dissertation die Verifizierung, dass PolySia auch im männlichen Reproduktionstrakt von Ratten vorkommt. Daraufhin wurde angestrebt die polysialylierten Glykoproteine zu identifizieren. Dazu wurden fünf Rattennebenhoden lysiert und mittels Affinitätspräzipitation gegen PolySia aufgereinigt. Nach SDS-Page und *Western-Blot*-Analyse konnte ein deutliches PolySia-Signal von 130 bis 190 kD nachgewiesen werden (**siehe Abbildung 22**). Daher wurde das andere Proben-Gelstück in den Bereichen von 95 - 170 kD und 170 - 190 kD ausgeschnitten. Die in diesen Signalbereichen zu erwartenden polysialylierten Glykoproteine wurden anschließend für die MALDI-TOF-MS-Analyse vorbereitet und dazu über eine nano-LC eluiert und auf einem Target in einer DHB-Matrix fixiert (**siehe Abbildung 16**).

Die Analyse der einzelnen Spots auf den Targets generierte eine Vielzahl an registrierten tryptischen Peptiden. Die Spots mit den deutlichsten Signalen wurden anschließend erneut hochenergetisch beschossen und sämtliche Signale in einem Summenspektrum erfasst. Die *Mascot Search* von *MatrixScience London UK* ermöglicht den Abgleich detektierter Massen mit entsprechenden Datenbanken. Dabei musste die Suchmaschine entsprechend der vorgenommenen Veränderungen des Analyts konfiguriert werden. Entsprechend wurde die Reduktion der Cysteine zur Trennung der Disulfidbrücken vor dem Durchlauf vermerkt, da dies zu einer Verschiebung der Peptidmassen um 57,02 Da führt.

Die *Mascot Search* der Probe von 95 bis 170 kD führte zur Identifizierung der Polysialyltransferase ST8Sia2 als polysialyliertes Glykoprotein im Rattennebenhoden

(siehe **Abbildung 25**). Damit konnte das erste Mal überhaupt die Autopolysialylierung *in vivo* nachgewiesen werden. Bis dato war es nur gelungen eine Autopolysialylierung *in vitro* und *in cellulo* zu erzielen [Muhlenhoff, Eckhardt et al. 1996; Close and Colley 1998].

Das Analyt aus dem Gelstück von 170 bis 190 kD führte zu dem Erweis von NCAM als zweites polysialyliertes Glykoprotein (siehe **Abbildung 24**). Fragmentierungsanalysen einzelner Massen, die zur Identifikation von ST8Sia2 und NCAM geführt hatten, verifizierte das vorangegangene Ergebnis (siehe **Abbildung 27**).

Bekanntermaßen sind die N-Glykane von NCAM an der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle polysialyliert [Muhlenhoff, Rollenhagen et al. 2013]. Zur Identifizierung der N-Glykosylierungsstelle der im Nebenhoden gefundenen Glykoproteine wurden Rattennebenhoden verwendet. Die polysialylierten tryptischen Glykoproteine wurden mittels Präzipitation über EndoN Beads aufgereinigt. Nach einer Desialylierung des Analyts wurde die Probe aliquotiert. Ein Aliquot wurde unbehandelt analysiert, das andere wurde vorher mit PNGaseF de-N-glykosidiert. Die massenspektrometrische Analyse durch MALDI-TOF-MS führte zu einem Signal mit der Masse von 1322,8 kD in der mit PNGaseF behandelten Fraktion, welche in der unbehandelten Probe nicht auftrat. Die Peptidsequenz wurde zusätzlich mittels MALDI-TOF-MS/MS überprüft. Die Analyse ergab, dass das Signal von 1322.8 mit der erwarteten deglykosylierten N-Glykosylierungsstelle an Asn²¹⁹ übereinstimmt, nachdem die enzymatische Reaktion von PNGaseF zur Umwandlung von Asn zu Asp geführt hat (Asn²¹⁹; ²¹³AFEDLVNATWR²²³; N entspricht dem Einbuchstabencode für Asparagin). Damit konnte erwiesen werden, dass PolySia an der N-Glykosylierungsstelle des Asn²¹⁹ sitzt, welche zwischen dem *sialyltransferase motif L* und der Polysialyltransferasendomäne lokalisiert ist (siehe **Abbildungen 29+30**).

Zusätzlich zu der Identifikation der zwei polysialylierten Glykoproteine im Nebenhoden der Ratte mittels Analyse durch MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-MS/MS, konnten diese Ergebnisse mit Hilfe der SDS-Page und anschließendem *Western Blotting* von Lysaten von Rattennebenhoden und humanem Ejakulat verifiziert werden (siehe **Abbildung 31+32**). Nach Verdau der Proben mit EndoN zeigten sich deutliche Shifts innerhalb der Signale des Blots, was darauf zurückzuführen ist, dass durch das Abspalten der Polysialinsäuren der Durchlauf durch die Poren des Gels erleichtert wird. Zudem scheint PolySia das Binden der Antikörper gegen NCAM und ST8Sia2 zu

behindern. Ohne den vorherigen Verdau der Proben mit EndoneuraminidaseN war die Signalstärke der Lumineszenzfärbung im Rattennebenhoden deutlich schwächer, als nach Verdau mit EndoN.

Nachdem die Voruntersuchungen von PolySia auf humanen und bovinen Spermien zur Lokalisierung in der postakrosomalen Region des Spermienkopfes führte, wurde untersucht, ob die identifizierten polysialylierten Glykoproteine NCAM und ST8Sia entsprechend kolokalisiert zur PolySia auf Spermien sind. Dazu wurde aus Gründen der Qualität und der Quantität auf bovines Ejakulat zurückgegriffen. Für den Nachweis von NCAM wurde der Antikörper 123C3 verwendet. Dieser wurde mit einem Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper inkubiert, welcher entweder mit Rhodamin REDTM-X oder FITC konjugiert war. Rhodamin REDTM-X emittiert ein rötliches Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop, FITC entsprechend ein grünliches. Die Kernfärbung DAPI visualisiert den nahezu kompletten Spermienkopf in blau. Als PolySia-Antikörper wurde biotinylierte EndoN verwendet, da dieser im Gegensatz zum verlässlichen mAk 735 keine Kreuzverbindungen mit den Sekundärantikörpern für NCAM bzw. ST8Sia2 eingeht. Als Sekundärantikörper diente hier Streptavidin, welches wiederum gegenläufig zum Glykoprotein-Sekundärantikörper konjugiert war. Die angefertigten Fluoreszenzaufnahmen mit Hilfe des Mikroskops konnten anschließend digital übereinander gelegt werden. Dies zeigte sowohl für ST8Sia2, als auch für NCAM eine eindeutige Kolokalisation von PolySia zu den beiden Glykoproteinen im postakrosomalen Bereich der Spermienköpfe (**siehe Abbildung 33+34**). Deutlich wird, dass sowohl ST8Sia2 als auch NCAM nur partikulär darzustellen ist und dazu waren auch deutlich längere Belichtungszeiten nötig. Ein möglicher Grund wäre hier wieder die schlechtere Bindung der Antikörper von ST8Sia2 und NCAM, wenn die Polysialinsäuren vorher nicht mittels EndoN abgespalten werden, da diese aufgrund des großen Volumens die Bindungsstellen überlagern. Alternativ ist eine mehrfache Bindung des mAk735 aufgrund der über 20 Sialinsäurereste langen PolySia-Ketten denkbar. Zudem bleibt unklar, ob sämtliche Glykoproteine auch polysialyliert sind oder nur partiell.

Eine Glykokalyx reich an Sialinsäuren bedeckt die Oberfläche von Spermien. Im Laufe der Kapazitation kommt es zu Modulationen und Modifikationen dieser Glykokalyx der Spermatozoen aus dem Nebenhoden, wodurch die Motilität der ausgereiften Spermien

aktiviert und eine Akrosomreaktion ermöglicht wird. Im Laufe dieses Reifungsprozesses kommt es auch zum Verlust eines Teils der Sialinsäuren durch die zwei Sialidasen Neuraminidase Neu1 und Neu3 auf der Oberfläche der kapazitierten Spermien. Eine Inhibition dieser Sialidasen führt zu einer eingeschränkten Bindung der Spermien an die Zona Pellucida der Oozyte [Lassalle and Testart 1994; Ma, Wu et al. 2012].

Neben der Reifung der Spermatozoen beim Durchqueren des weiblichen Genitaltrakts kommt es auch während der Speicherung und des Durchlaufs des männlichen Reproduktionstrakts im Nebenhoden zur Differenzierung der Spermienoberfläche. Dabei sekretiert das Epithel des Nebenhodens Proteine in das Lumen. Diese in Vesikel eingeschlossenen Proteine sind in der Lage mit der Glykokalyx der Spermien zu interagieren und wurden entsprechend Epididymosomen genannt. Nachfolgende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass ausschließlich Epithelzellen im Kopf des Nebenhodens von Mäusen PolySia exprimieren. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei Ratten und Rehböcken erzielt werden. Daher nehmen wir an, dass PolySia und seine Glykoproteine über Epididymosomen während der epididymalen Maturation zur Integration an die Spermienoberfläche transportiert werden [Sullivan, Frenette et al. 2007; Simon, Baumner et al. 2013; Sullivan and Saez 2013].

Sialinsäuren scheinen einen protektiven Einfluss auf die ejakulierten Spermien zu haben, da ihre Abwesenheit zur Phagozytose der Spermien während der Durchquerung des weiblichen Geschlechtstrakts führt [Holt 1980].

Da während des Sexualaktes bei Säugetieren eine Kontamination des weiblichen Geschlechtstraktes nicht vermeidbar ist, benötigt das weibliche Immunsystem entsprechende Maßnahmen um eine Infektion zu bekämpfen. Neutrophile Granulozyten sind die dominierenden Zellen der Immunabwehr. Sie sind in der Lage ihre DNA in das extrazelluläre Milieu zu extrudieren und sogenannte *neutrophil extracellular traps* (NETs) auszubilden. Die ausgebildeten extrazellulären Fäden aus Histon-beladener DNA sind in der Lage grampositive und –negative Bakterien und Pathogene zu binden und zu zerstören [Brinkmann, Reichard et al. 2004; Hahn, Giaglis et al. 2012]. Allerdings konnte an Untersuchungen mit Samen von Hengsten nachgewiesen werden, dass es durch den Einfluss von Spermatozoen auf Neutrophile Granulozyten ebenfalls zur Ausbildung von NETs kommt. Durch die Einwirkung der NETs werden die Spermatozoen gebunden, was zu einer Behinderung der Motilität und schlussendlich

auch zu einer eingeschränkten Fertilität führen kann. Gleichzeitig hatten DNAsen aus dem Ejakulat einen inhibitorischen Effekt auf die Wirkung der NETs [Alghamdi and Foster 2005].

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Preissner des Biochemischen Instituts an der JLU Giessen ergaben, dass den größten zytotoxischen Effekt im NET die enthaltenen Histone besitzen. Zudem konnte bewiesen werden, dass PolySia als direkter Interaktionspartner von Histon H1 in der Lage ist, den zytotoxischen Effekt zu hemmen. Dies konnte sowohl anhand von α 2,8-verknüpften Neu5Ac-Polymeren in *Escherichia coli* K1 (Äquivalent von PolySia in Säugetieren) als auch mittels löslichem PolySia-NCAM-110 erreicht werden. Eine vorherige Inkubation mit EndoneuraminidaseN negierte diesen Effekt. Damit konnte gezeigt werden, dass PolySia ein entscheidender Inhibitor ist [Mishra, von der Ohe et al. 2010; Saffarzadeh, Juenemann et al. 2012; Ulm, Saffarzadeh et al. 2013].

Dies führte uns zu der Annahme, dass PolySia als Teil der Glykoproteine NCAM und ST8SiaII der Glykokalyx von Säugetierspermien eine protektive Funktion vor dem weiblichen Immunsystem darstellen. Die Inhibition und Bindung der Histone im DNA-Fasergeflecht der NETs würde der Zytotoxizität entgegenwirken (**siehe Abbildung 38**).

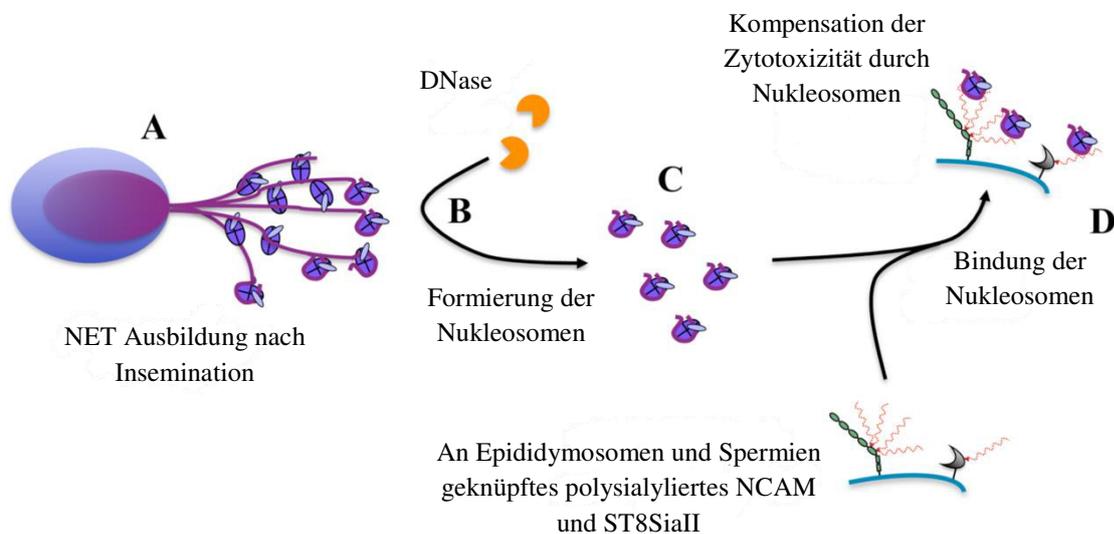


Abbildung 38. Modellvorschlag für eine vermeintliche zytoprotektive Funktion von PolySia gebunden an ST8SiaII und NCAM. (A) Nach der Insemination kommt es zur Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten und der Ausbildung von NET (neutrophil extracellular traps); (B) DNAsen aus dem Plasma der Samen degradieren DNA; (C) Zytotoxische Nucleosomen entstehen; (D) Die Polysialinsäuren von NCAM und ST8SiaII auf Epididymosomen und Spermien binden die Nucleosomen und wirken der Zytotoxizität entgegen; modifiziert nach *Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII*, Simon et. al 2013 [Simon, Baumner et al. 2013].

Sollte dieses Konzeptmodell den Tatsachen entsprechen, bleibt die Frage offen, warum nur ein Bruchteil der Gesamtanzahl an Spermien sowohl beim bovinen, als auch beim humanen Ejakulat polysialyliert sind. Ist ein direkter Rückschluss auf die Fertilität zu ziehen, oder spiegelt dies nur das bekannte Konzept wieder, das nur ein Spermium aus Millionen in der Lage ist die Oozyte zu penetrieren.

Des Weiteren müssen andere Einwirkungen von PolySia untersucht werden. Die in diesen Studien untersuchten Ejakulate unterlagen nicht dem Vorgang der Kapazitation und weitere Modifikationen im Bereich der polysialylierten Glykoproteine im postakrosomalen Bereich der Spermien bleiben denkbar. So ist bekannt, dass es im Laufe der Kapazitation zur Verringerung an Sialinsäuren auf der Spermienoberfläche kommt. Die aktive Einwirkung der Sialidasen Neu1 und Neu3 bei der Degradation im Verlauf der Kapazitation ist bekannt [Ma, Wu et al. 2012]. Neuere Untersuchungen zeigten zudem, dass die Sialidase Neu4 in der Lage ist Polysialinsäuren zu hydrolysieren, was bei Neu4-defizitären Mäusen zu pathologischen Veränderungen führte. Allerdings sind diese Untersuchungen auf den zerebralen Bereich beschränkt gewesen.

Daher werden erst zukünftige Untersuchungen zeigen, ob eine Sialidase einen direkten Einfluss auf PolySia der Spermien hat und welchen Veränderungen die Spermien nach dieser Degradation unterliegen [Takahashi, Mitoma et al. 2012].

7 Zusammenfassung

PolySia ist ein Homopolymer aus α -2,8-verknüpften Sialinsäuren, den Derivaten der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), welches erstmals 1982 im Gehirn von Ratten identifiziert wurde. Aufgrund seiner negativen Ladung erhöht PolySia als posttranslationale Modifikation von Glykoproteinen dessen hydrodynamischen Radius, was wiederum den interzellulären Spalt um die Trägerproteine erhöht und Zell-Zell-Kontakte lösen kann. Dieser Effekt wurde erstmals beim *Neural Cell Adhesion Molecule* nachgewiesen, wodurch die Zellmigration, Zelladhäsion, die Neurogenese und die synaptische Plastizität während der Entwicklung des vertebralen Nervensystems beeinflusst wird. Zu den polysialylierten Glykoproteinen bei Säugetieren zählen zudem die lösliche Form von CD36, die in humaner Milch und der von Mäusen nachgewiesen wurde, die α -Untereinheit der Natriumkanäle im Rattenhirn, eine Subfraktion von SynCAM 1 im Mäusehirn, sowie eine polysialylierte Form von NRP-2 auf humanen dendritischen Zellen. Die Synthese von PolySia aus Sialinsäuren erfolgt durch die beiden Sialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV.

Vorangegangene Versuche durch Herrn Sören Bäumner führten zur Identifikation von PolySia auf bovinen und humanen Spermien. Da zwar die Lokalisation der PolySia auf den Spermien im postakrosomalen Bereich bestimmt werden konnte, das polysialylierte Glykoproteine jedoch unbekannt blieb, war das Ziel dieser Dissertation, diese zunächst auf Rattennebenhoden zu identifizieren und anschliessend mittels humanem Ejakulat zu verifizieren.

Die Analyse präzipitierter PolySia aus Rattennebenhoden nach tryptischem Verdau mittels MALDI-TOF-MS(MS) führte zur Identifikation von NCAM und ST8SiaII als polysialylierte Glykoproteine. Damit konnte sowohl erstmals, NCAM im Nebenhoden eines Säugetieres nachgewiesen, als auch Autopolysialylierung von ST8SiaII *in vivo* beobachtet werden. Massenspektrometrische Untersuchungen der Proben nach PNGaseF-Verdau zeigten, dass PolySia bei der Autopolysialylierung von ST8SiaII an der N-Glykosylierungsstelle von Asn²¹⁹ sitzt, welche sich zwischen dem sialyltransferase motif L und der Polysialyltransferasen-Domäne (PSTD) befindet.

Durch Fluoreszenzfärbungen konnte eine Kolo-kalisation von PolySia+NCAM und PolySia+ST8SiaII gezeigt werden. Dabei wurde deutlich, dass das Signal von PolySia

dem der Glykoproteine überwog. Auch war nur ein Bruchteil aller Spermien PolySia-positiv. Welche Rolle die polysialylierten Glykoproteine im Ejakulat haben, bedarf jedoch weiterer Studien.

8 Summary

Polysialic acid (polySia) is a homopolymer of α -2,8-linked sialic acids, the derivatives of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), which was firstly found in rat brain in 1982. This post-translational modification of glycoproteins increases the hydrodynamic radius due to its negative charge, increasing the intercellular gap to the carrier proteins and release cell-cell contacts. This effect was initially described for the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule and affects cell migration, cell adhesion, neurogenesis and synaptic plasticity during the development of the vertebral nervous system. The polysialylated glycoproteins in mammals include the soluble form of CD36, which has been observed in human milk and in milk of mice, the α -subunit of sodium channels in rat brains, a subfraction of SynCAM 1 in the mouse brain as well as a polysialylated form of NRP-2 on human dendritic cells. PolySia can be generated by two sialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV.

Previous studies by Sören Baeumner led to the identification of polySia on bovine and human sperm. Even though the localization of polySia could be visualized on the postacrosomale area of sperm, the polysialylated glycoproteins, however, still remain unknown. Thus, the aim of this dissertation is to identify those glycoproteins in rat epididymis and to verify this findings using human ejaculate.

The analysis of precipitated polySia from rat epididymis after tryptic digestion by MALDI-TOF-MS(MS) led to the identification of NCAM and ST8SiaII as polySia carriers. It was the first time that NCAM could be detected in the epididymis of mammals and that ST8SiaII can be autopolysialylated *in vivo*. Mass spectrometric analysis of the samples after PNGaseF- digestion demonstrated that polySia is bound to the N-glycosylation site Asn219 during autopolysialylation of ST8SiaII, which is located between the *sialyltransferase motif L* and *polysialyltransferasedomain (PSTD)*.

By fluorescence staining a colocalisation of polySia + NCAM and polySia + ST8SiaII could be shown. It became apparent that the signal of polySia is more intense than the signal of the glycoproteins, furthermore just a fraction of the analysed sperm was polySia-positive. The biological functions of the polysialylated glycoproteins in ejaculates is, however, unknown and it has to be investigated in further studies.

9 Abkürzungsverzeichnis:

HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
FBS:	fetale bovine serum
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
IP:	Immunpräzipitation
EndoN:	Endoneuraminidase N
PNGaseF:	N-Glycosidase F
PBS:	Phosphat buffered saline
BSA:	Bovine serum albumine
SDS:	Natriumdodecylsulfat
PVDF:	Polyvinylidenfluorid
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ST8Sia2:	Alpha-2,8-sialyltransferase 8B
NCAM:	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
FITC:	Fluorescein
DHB:	2,5-Dihydroxybenzoesäure
APS:	Ammoniumpersulfat
DTT:	Dithiothreitol
TFA:	Trifluoressigsäure
DMB:	1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol
PC12:	Phäochromazytoma Zellen
HRP:	Meerrettich-Peroxidase
MALDI:	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
IP:	Immunpräzipitation

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren.....	2
Abbildung 2. Effekt des hydrodynamischen Radius von PolySia auf den interzellulären Spalt.....	3
Abbildung 3. Schematische Darstellung von polysialyliertem NCAM.....	4
Abbildung 4. (A) Schematische Darstellung von ST8SiaII und ST8SiaIV (B) Struktur und Interaktion von NCAM, SynCAM 1 und NRP2 mit ihren PolySTen.....	8
Abbildung 5. Polysialinsäure.....	12
Abbildung 6. Glykosylierungsstellen für die Autopolysialylierung von ST8SiaII und ST8SiaIV.....	13
Abbildung 7. Anatomie des menschlichen Hodens.....	14
Abbildung 8. Schema des Keimepithel des Hodens.....	17
Abbildung 9. Schema der Spermatogenese.....	20
Abbildung 10. Schematischer mikroskopischer Aufbau eines reifen Spermiums.....	21
Abbildung 11. Schema eines Magnetischen Beads zur Affinitätspräzipitation.....	33
Abbildung 12. Ablauf der Affinitätspräzipitation mit Dynabeads®.....	35
Abbildung 13. Schematischer Ablauf der Gelelektrophorese.....	37
Abbildung 14. Gelelektrophoreseset.....	39
Abbildung 15. Aufbau des Semi-Dry Verfahrens.....	41
Abbildung 16. MALDI-TOF/TOF-Targets.....	46
Abbildung 17. Bruker Daltonics Ultraflex III MALDI-TOF/TOF.....	46
Abbildung 18. DMB-Markierung von Oligo- und Polysialinsäuren zur Kettenlängen-Bestimmung.....	49
Abbildung 19. Vergleich der NaCl-Konzentration des Waschpuffer 1.....	54
Abbildung 20. Anti-PolySia Färbung von Hoden (A) und Nebenhoden (B) einer Ratte.....	57
Abbildung 21. Kettenlängen der Polysialinsäuren von Rattenhoden und –nebehoden.....	58
Abbildung 22. <i>Western Blot</i> von Rattennebenhoden gegen PolySia.....	60
Abbildung 23. Suchmaske der <i>Mascot Search</i> von <i>MatrixScience London UK</i>	61
Abbildung 24. <i>Mascot Search</i> des Summenspektrums aus dem Probenbereich 170 bis 190 kDa.....	62
Abbildung 25. <i>Mascot Search</i> des Summenspektrums aus dem Probenbereich 95 bis 170 kDa.....	63
Abbildung 26. Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung.....	64
Abbildung 27. MALDI-TOF-MS/MS der Massen 1320.7 und 1377.7 Da.....	65
Abbildung 28. MALDI-TOF-MS/MS NCAM-zugeordneter Massen.....	66
Abbildung 29. Bestimmung der polysialylierten Glykosylierungsstelle von ST8SiaII.....	68
Abbildung 30. MALDI-TOF-MS/MS des Peptids um 1322.8 Da.....	69
Abbildung 31. <i>Western Blot</i> von Rattennebenhoden gegen ST8SiaII.....	70
Abbildung 32. <i>Western Blot</i> von humanem Ejakulat gegen NCAM und ST8SiaII.....	71
Abbildung 33. Fluoreszenzfärbung von bovinem Spermium gegen PolySia und ST8SiaII.....	73
Abbildung 34. Fluoreszenzfärbung von bovinem Spermium gegen PolySia und NCAM.....	74
Abbildung 35. C7/C9-HPLC-Analyse von humanen Spermien.....	77

Abbildung 36. DMB-HPLC-Analyse zur Bestimmung der PolySia-Kettenlänge von humanem Samen.....	78
Abbildung 37. Immunfluoreszenz-Färbung von humanem und bovinem Ejakulat gegen PolySia.....	80
Abbildung 38. Modellvorschlag für eine vermeintliche zytoprotektive Funktion von PolySia gebunden an ST8SiaII und NCAM.....	87

11 Literaturverzeichnis

- Alghamdi, A. S. and D. N. Foster (2005). "Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps." *Biol Reprod* **73**(6): 1174-1181.
- Bax, M., S. J. van Vliet, et al. (2009). "Interaction of polysialic acid with CCL21 regulates the migratory capacity of human dendritic cells." *PLoS One* **4**(9): e6987.
- Bedford, J. M. (1963). "Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis." *J Reprod Fertil* **5**: 169-177.
- Biederer, T. (2006). "Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules." *Genomics* **87**(1): 139-150.
- Biederer, T., Y. Sara, et al. (2002). "SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly." *Science* **297**(5586): 1525-1531.
- Blix, F. G., A. Gottschalk, et al. (1957). "Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids." *Nature* **179**(4569): 1088.
- Bonfanti, L. (2006). "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis." *Prog Neurobiol* **80**(3): 129-164.
- Brinkmann, V., U. Reichard, et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." *Science* **303**(5663): 1532-1535.
- Calvo, D., D. Gomez-Coronado, et al. (1998). "Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL." *J Lipid Res* **39**(4): 777-788.
- Close, B. E. and K. J. Colley (1998). "In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX." *J Biol Chem* **273**(51): 34586-34593.
- Close, B. E., K. Tao, et al. (2000). "Polysialyltransferase-1 autopolysialylation is not requisite for polysialylation of neural cell adhesion molecule." *J Biol Chem* **275**(6): 4484-4491.
- Close, B. E., J. M. Wilkinson, et al. (2001). "The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule." *Glycobiology* **11**(11): 997-1008.
- Curreli, S., Z. Arany, et al. (2007). "Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions." *J Biol Chem* **282**(42): 30346-30356.
- Derre, I., M. Pypaert, et al. (2007). "RNAi screen in Drosophila cells reveals the involvement of the Tom complex in Chlamydia infection." *PLoS Pathog* **3**(10): 1446-1458.
- Finne, J. (1982). "Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain." *J Biol Chem* **257**(20): 11966-11970.
- Foley, D. A., K. G. Swartzentruber, et al. (2009). "Identification of sequences in the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV that are required for the protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule, NCAM." *J Biol Chem* **284**(23): 15505-15516.
- Galuska, S. P., R. Geyer, et al. (2008). "Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo." *J Biol Chem* **283**(1): 17-28.
- Galuska, S. P., I. Oltmann-Norden, et al. (2006). "Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV." *J Biol Chem* **281**(42): 31605-31615.
- Galuska, S. P., M. Rollenhagen, et al. (2010). "Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(22): 10250-10255.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2424-2428.
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hahn, S., S. Giaglis, et al. (2012). "Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss." *Front Immunol* **3**: 362.
- Hayrinen, J., D. Bitter-Suermann, et al. (1989). "Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding." *Mol Immunol* **26**(6): 523-529.
- Hess, R. A. and L. Renato de Franca (2008). "Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium." *Adv Exp Med Biol* **636**: 1-15.
- Hildebrandt, H., M. Muhlenhoff, et al. (2007). "Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development." *J Neurochem* **103 Suppl 1**: 56-64.

- Holstein, A. F. (2008). Männliche Geschlechtsorgane. Benninghoff Anatomie Band 1. D. Drenckhahn. Hackerbrücke 6, 80335 München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag. **17**: 799-836.
- Holt, W. V. (1980). "Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing." Biol Reprod **23**(4): 847-857.
- Horstkorte, R., N. Lessner, et al. (1999). "Expression of the polysialyltransferase ST8SiaIV: polysialylation interferes with adhesion of PC12 cells in vitro." Exp Cell Res **246**(1): 122-128.
- Inoue, S., S. L. Lin, et al. (2001). "An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis." Glycobiology **11**(9): 759-767.
- Inoue, S., G. L. Poongodi, et al. (2003). "Discovery of an alpha 2,9-PolyNeu5Ac glycoprotein in C-1300 murine neuroblastoma (clone NB41A3)." J Biol Chem **278**(10): 8541-8546.
- James, W. M. and W. S. Agnew (1987). "Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from electrophorus electricus: evidence for alpha-2,8-linked polysialic acid." Biochem Biophys Res Commun **148**(2): 817-826.
- Johnson, C. P., I. Fujimoto, et al. (2005). "Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion." J Biol Chem **280**(1): 137-145.
- Johnson, R. S., S. A. Martin, et al. (1987). "Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine." Anal Chem **59**(21): 2621-2625.
- Lassalle, B. and J. Testart (1994). "Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface." J Reprod Fertil **101**(3): 703-711.
- Ma, F., D. Wu, et al. (2012). "Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation." J Biol Chem **287**(45): 38073-38079.
- Manzi, A. E., A. Dell, et al. (1990). "Studies of naturally occurring modifications of sialic acids by fast-atom bombardment-mass spectrometry. Analysis of positional isomers by periodate cleavage." J Biol Chem **265**(14): 8094-8107.
- Mishra, B., M. von der Ohe, et al. (2010). "Functional role of the interaction between polysialic acid and extracellular histone H1." J Neurosci **30**(37): 12400-12413.
- Miyata, S., C. Sato, et al. (2004). "A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an alpha2,9-linked poly-N-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue." Glycobiology **14**(9): 827-840.
- Miyata, S., C. Sato, et al. (2006). "Flagelliasialin: a novel sulfated alpha2,9-linked polysialic acid glycoprotein of sea urchin sperm flagella." Glycobiology **16**(12): 1229-1241.
- Miyata, S., N. Yamakawa, et al. (2011). "Co-expression of two distinct polysialic acids, alpha2,8- and alpha2,9-linked polymers of N-acetylneuraminic acid, in distinct glycoproteins and glycolipids in sea urchin sperm." Glycobiology **21**(12): 1596-1605.
- Moore, H. D. and M. A. Akhondi (1996). "In vitro maturation of mammalian spermatozoa." Rev Reprod **1**(1): 54-60.
- Muhlenhoff, M., M. Eckhardt, et al. (1996). "Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1." EMBO J **15**(24): 6943-6950.
- Muhlenhoff, M., M. Eckhardt, et al. (1998). "Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function." Curr Opin Struct Biol **8**(5): 558-564.
- Muhlenhoff, M., I. Oltmann-Norden, et al. (2009). "Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions." Biol Chem **390**(7): 567-574.
- Muhlenhoff, M., M. Rollenhagen, et al. (2013). "Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2." Neurochem Res **38**(6): 1134-1143.
- Naaby-Hansen, S. (2012). "Functional and immunological analysis of the human sperm proteome." Dan Med J **59**(4): B4414.
- Naaby-Hansen, S., C. J. Flickinger, et al. (1997). "Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa." Biol Reprod **56**(3): 771-787.
- Nakata, D., L. Zhang, et al. (2006). "Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation." Glycoconj J **23**(5-6): 423-436.
- Nakayama, J., K. Angata, et al. (1998). "Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function." Pathol Int **48**(9): 665-677.
- Nelson, R. W., P. A. Bates, et al. (1995). "Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule." J Biol Chem **270**(29): 17171-17179.

- Ockenhouse, C. F., F. W. Klotz, et al. (1991). "Sequestrin, a CD36 recognition protein on Plasmodium falciparum malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3175-3179.
- Oehninger, S. (2001). "Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction." Cells Tissues Organs **168**(1-2): 58-64.
- Oltmann-Norden, I., S. P. Galuska, et al. (2008). "Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development." J Biol Chem **283**(3): 1463-1471.
- Parker, M. W., H. F. Guo, et al. (2012). "Function of members of the neuropilin family as essential pleiotropic cell surface receptors." Biochemistry **51**(47): 9437-9446.
- Pellet-Many, C., P. Frankel, et al. (2008). "Neuropilins: structure, function and role in disease." Biochem J **411**(2): 211-226.
- Podrez, E. A., E. Poliakov, et al. (2002). "Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36." J Biol Chem **277**(41): 38503-38516.
- Rey-Gallardo, A., C. Delgado-Martin, et al. (2011). "Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo." Glycobiology **21**(5): 655-662.
- Rey-Gallardo, A., C. Escribano, et al. (2010). "Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21." Glycobiology **20**(9): 1139-1146.
- Robaire, B. (2006). The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. J. D. Neill, Elsevier: 1076-1092.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." Biomed Mass Spectrom **11**(11): 601.
- Rollenhagen, M., S. Kuckuck, et al. (2012). "Polysialylation of the synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM 1) depends exclusively on the polysialyltransferase ST8SiaII in vivo." J Biol Chem **287**(42): 35170-35180.
- Rutishauser, U. (1996). "Polysialic acid and the regulation of cell interactions." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 679-684.
- Rutishauser, U. (2008). "Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system." Nat Rev Neurosci **9**(1): 26-35.
- Rutishauser, U. and L. Landmesser (1996). "Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions." Trends Neurosci **19**(10): 422-427.
- Rutishauser, U., M. Watanabe, et al. (1985). "Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase." J Cell Biol **101**(5 Pt 1): 1842-1849.
- Saffarzadeh, M., C. Juenemann, et al. (2012). "Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones." PLoS One **7**(2): e32366.
- Sato, C. (2004). "Chain Length Diversity of Sialic Acids and Its Biological Significance." Trends Glycosci. Glycotechnol. **16**: 331-334.
- Schroter, S., C. Osterhoff, et al. (1999). "The glycocalyx of the sperm surface." Hum Reprod Update **5**(4): 302-313.
- Seidenfaden, R., R. Gerardy-Schahn, et al. (2000). "Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV." Eur J Cell Biol **79**(10): 680-688.
- Silverstein, R. L., M. Baird, et al. (1992). "Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor." J Biol Chem **267**(23): 16607-16612.
- Simon, P., S. Baumner, et al. (2013). "Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII." J Biol Chem **288**(26): 18825-18833.
- Sullivan, R., G. Frenette, et al. (2007). "Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit." Asian J Androl **9**(4): 483-491.
- Sullivan, R. and F. Saez (2013). "Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology." Reproduction **146**(1): R21-35.
- Takahashi, K., J. Mitoma, et al. (2012). "Sialidase NEU4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons." J Biol Chem **287**(18): 14816-14826.
- Tandon, N. N., U. Kralisz, et al. (1989). "Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion." J Biol Chem **264**(13): 7576-7583.
- Tulsiani, D. R., M. D. Skudlarek, et al. (1993). "Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation." Biol Reprod **48**(2): 417-428.

- Ulm, C., M. Saffarzadeh, et al. (2013). "Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung." Cell Mol Life Sci **70**(19): 3695-3708.
- Varki, A. and R. Schauer (2009). Sialic Acids. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- von Der Ohe, M., S. F. Wheeler, et al. (2002). "Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM." Glycobiology **12**(1): 47-63.
- Welsch, U. (2010). Männliche Geschlechtsorgane. Lehrbuch Histologie. U. Welsch and T. Deller. Hackerbrücke 6, 80335 München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag. **3**: 406-421.
- Yabe, U., C. Sato, et al. (2003). "Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein." J Biol Chem **278**(16): 13875-13880.
- Zapater, J. L. and K. J. Colley (2012). "Sequences prior to conserved catalytic motifs of polysialyltransferase ST8Sia IV are required for substrate recognition." J Biol Chem **287**(9): 6441-6453.
- Zuber, C., P. M. Lackie, et al. (1992). "Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain." J Biol Chem **267**(14): 9965-9971.

12 Publikation

Publikation:

Simon, P., Bäumner, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., Wehrend, A., Müller, K., Gerardy-Schahn, R., Mühlenhoff, M., Geyer, H., Geyer, R., Middendorff, R., Galuska, SP.

Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII.

Journal of Biological Chemistry, 28. Juni 2013; 288(26): 18825-18833.

doi: 10.1074/jbc.M113.451112. Epub 13. Mai 2013.

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten, sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift (Oliver Hendrik Busch)

14 Danksagung

Mein Dank gilt dem Leiter meiner Arbeitsgruppe des Biochemischen Instituts Prof. Dr. Rudolf Geyer, der zahlreichen medizinischen Studenten eine Dissertation in seinem Fachbereich ermöglichte. Unter seiner Leitung sind Forschungen durchgeführt worden, die zu völlig neuen, bis dahin unbekanntem Erkenntnissen geführt haben.

Nicht genug danken kann ich meinem Betreuer Dr. Sebastian Galuska (mittlerweile PD, Gratulation!), dem es nie an Geduld und Motivation gemangelt hat, einem unwissenden Zahnmediziner die Grundlagen solch komplexer biochemischer Themen näherzubringen. Ohne seine Weisungen und Anleitungen wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Weitere Unterstützung wurde mir durch die Arbeitsgruppe von Prof. Preissner und speziell Frau Bärbel Fühler, sowie durch Dr. Peter Richterich aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere zuteil, die mich mit frischem und präpariertem Probenmaterial versorgten.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Geyer möchte ich meinen Dank aussprechen, da sie jederzeit für Fragen und Antworten bereit standen und mir die Grundlagen der Laborversuche näher bringen konnten, damit überhaupt erst ein eigenständiger Versuchsablauf möglich war. Darunter speziell Dr. Sandra Frank, Dr. Dennis Blank und Dr. Christina „Tina“ Ulm. Ebenso danken möchte ich Peter Käse und Siegfried Kühnhardt, die mir bei den HPLC-Versuchen eine große Hilfe waren.

Danke an meinen Vorgänger Dr. Rik Sören Bäumner für seine vorangegangenen Untersuchungen und meinen Nachfolger Peter Simon, der meine Forschungen fortführt und die Thematik vertiefen wird.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums und meines beruflichen Werdegangs unterstützt und immer wieder motivierend auf mich eingewirkt haben. Ohne Euch wären die Promotion und mein Studium nicht möglich gewesen.