

# **Nachweis von polysialylierten Glykoproteinen auf bovinen und humanen Spermien**

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

vorgelegt von  
Rik Sören Bäumner  
aus Herdecke

Gießen 2013



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

Leiter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Geyer

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Steger

Tag der Disputation: 26.05.2014



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Mono-, Oligo- und Polysialinsäure.....	3
1.1.1	Struktur von Oligo- und PolySia.....	4
1.1.2	Vorkommen und Funktion von Oligo- und PolySia.....	6
1.1.3	Synthese von PolySia.....	9
1.2	Anatomie und Physiologie des Hoden.....	9
1.2.1	Histologischer Aufbau des Keimepithels.....	10
1.2.2	Spermatogenese.....	10
1.2.3	Entwicklung zum elongierten Spermium.....	12
1.2.4	Spermienreifung im Nebenhoden.....	13
1.2.5	Veränderungen der Zellmembran während der Passage des Nebenhodens.....	14
1.3	Anatomie und Physiologie der Spermien,.....	15
1.3.1	Histologischer Aufbau.....	15
1.3.2	Spermien-Glykokalix.....	17
1.3.3	Interaktion von Spermium und Eizelle.....	18
2	Zielsetzung.....	21
3	Material.....	22
3.1	Probenmaterial.....	22
3.2	Antikörper.....	22
3.2.1	Primärantikörper.....	22
3.2.2	Sekundärantikörper.....	22
3.3	Enzyme.....	22
3.4	Geräte.....	23
3.5	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.6	Chemikalien.....	24
4	Methoden.....	27
4.1	Probenaufbereitung des frischen Ejakulates.....	27
4.1.1	Proteinfällung mit Aceton.....	27
4.1.2	<i>Swim-up</i> .....	27
4.1.3	Lyse.....	28
4.1.4	Aufreinigung von polysialylierten Glykoproteinen.....	29
4.2	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) als Trennmethode.....	32

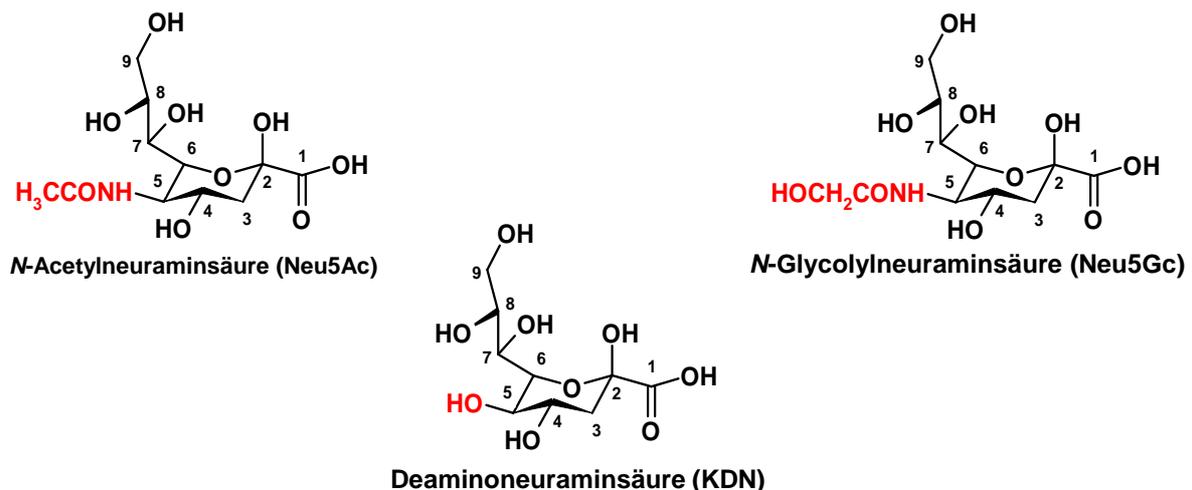
4.2.1	C7/C9-Methode nach Sato .....	32
4.2.2	Trennung von PolySia-Ketten nach der Anzahl der enthaltenen Sialinsäureresten.....	35
4.3	Proteinanalytische Methoden.....	37
4.3.1	Enzymverdau.....	37
4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
4.3.3	<i>Western Blot</i> .....	39
4.3.4	Immunfärbung und Entwicklung von <i>Western Blots</i> .....	40
4.4	Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbung von Spermien .....	40
5	Ergebnisse .....	43
5.1	Nachweis interner Sialinsäurereste mit der C7/C9-Methode .....	43
5.1.1	C7/C9-Analyse von bovinen Spermien.....	43
5.1.2	C7/C9-Analyse von humanen Spermien .....	47
5.2	Bestimmung der Kettenlängen .....	49
5.2.1	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien .....	50
5.2.2	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien .....	53
5.3	Detektion der polysialylierten Proteine mittels <i>Western Blot</i> .....	59
5.3.1	<i>Western Blot</i> Nachweis von PolySia auf bovinen Spermien .....	59
5.3.2	<i>Western Blot</i> Nachweis von PolySia auf humanen Spermien.....	62
5.4	Lokalisation von PolySia auf Spermien.....	63
5.4.1	Immunfluoreszenz-Färbung boviner Spermien .....	64
5.4.2	Immunfluoreszenz-Färbung humaner Spermien .....	66
6	Diskussion.....	68
7	Zusammenfassung .....	78
8	Summary .....	80
9	Abkürzungsverzeichnis.....	81
10	Abbildungsverzeichnis.....	83
11	Literaturverzeichnis .....	85
12	Publikation und Posterbeitrag .....	93
13	Eidesstattliche Erklärung .....	94

# 1 Einleitung

## 1.1 Mono-, Oligo- und Polysialinsäure

Sialinsäuren (Sia) sind eine mehr als 50 verschiedene Derivate umfassende Familie von sauren Monosacchariden, die bei einer Vielzahl von höher entwickelten Wirbeltieren, aber auch bei einigen Wirbellosen und Mikroorganismen vorkommen [Angata *et al.*; 2002; Schauer; 2009]. Sie befinden sich bei Glykolipiden und Glykoproteinen meistens als Monosialylreste am terminalen Ende von Glykanen [Sato; 2004]. Sialinsäuren sind z.B. beteiligt bei Zelladhäsionsprozessen [Green *et al.*; 1995], Zell-Zell-Interaktionen [Kelm *et al.*; 1997] und Signalübertragungen [Crocker *et al.*; 2007]. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne das Schlüsselenzym zur Sia-Synthese, die bifunktionale UDP-*N*-Acetylglukosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase, bereits im Embryonalstadium sterben, was deren essentielle Bedeutung für die physiologischen Prozesse von Säugetieren zeigt [Schwarzkopf *et al.*; 2002].

Entdeckt wurden die ersten Sia-Reste bereits in den 1930er Jahren von Ernst Klenk und Gunnar Blix, die unabhängig voneinander in Köln und Uppsala forschten. Klenk isolierte ein Neuraminsäure-Derivat aus Glykolipiden des menschlichen Gehirnes, während Blix in submaxillären Mucoproteinen vom Rind Sialinsäuren fand [Faillard; 1989].



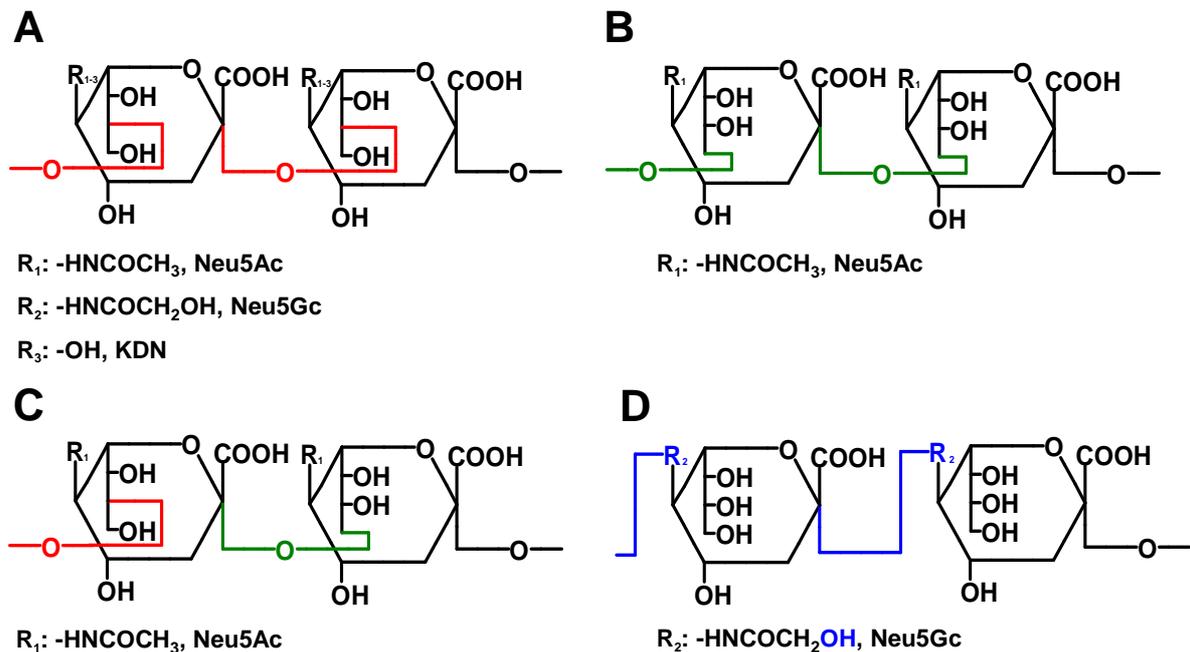
**Abbildung 1.1 Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren**

Entnommen aus der Kumulativdissertation: *Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SiaII und St8SiaIV in vivo* von Galuska, S.P., Gießen 2008

Sialinsäuren sind  $\alpha$ -Ketosäuren mit einem C9-Grundgerüst. In C1-Position befindet sich eine Carboxylgruppe in Nachbarschaft zu einer Ketogruppe an C2. Die am häufigsten vorkommenden Formen sind *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure (KDN) (Abbildung 1.1). Die große Diversität von Sialinsäuren beruht vor allem auf Substitution der Hydroxylgruppen mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- oder Phosphonylresten in C4-, C7-, C8- oder C9-Position sowie auf Substitution bzw. Fehlen der Aminogruppe [Angata und Varki; 2002; Schauer; 2004].

### 1.1.1 Struktur von Oligo- und PolySia

Während Sialinsäuren hauptsächlich als endständige MonoSia-Reste auf Glykokonjugaten vorkommen, kann auch eine Di- (2 Sialinsäuren), Oligo- (3-7 Sialinsäuren) oder Polysialylierung ( $\geq 8$  Sialinsäuren = PolySia) von Glykokonjugaten erfolgen [Sato; 2004] (Abbildung 1.2).

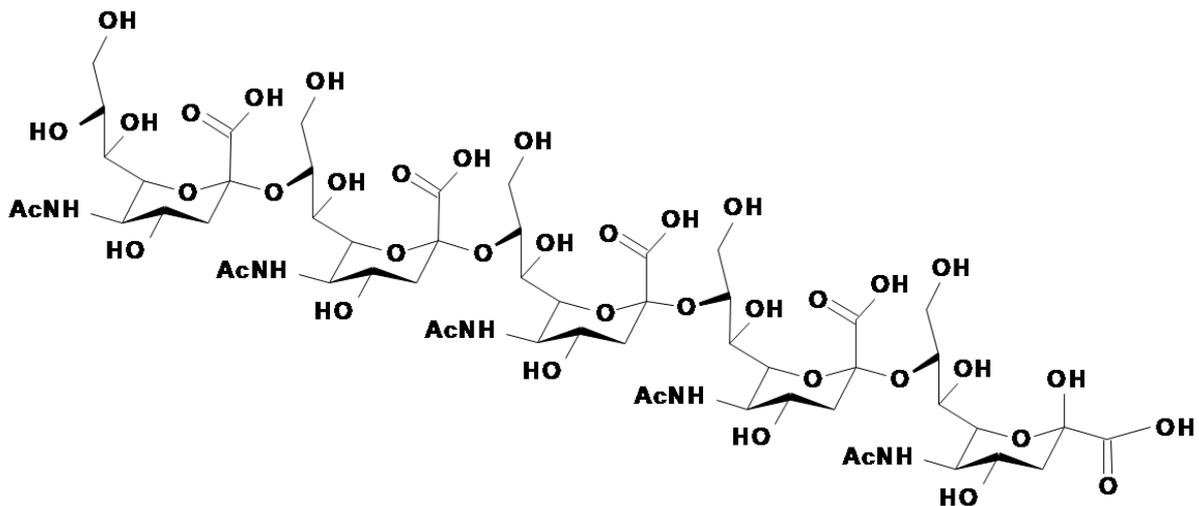


**Abbildung 1.2 Darstellung der bisher bekannten Oligo/PolySia-Verknüpfungen**

(A)  $\alpha$ 2,8-Verknüpfung; (B)  $\alpha$ 2,9-Verknüpfung; (C) alternierende  $\alpha$ 2,8/ $\alpha$ 2,9-Verknüpfung; (D)  $\alpha$ 2,5-O-Glykolylverknüpfung. Entnommen aus der Kumulativdissertation: *Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in vivo* von Galuska, S.P., Gießen 2008

Solche Polymere unterscheiden sich sowohl in der Länge der Kette, als auch in der Art der enthaltenen Sia-Moleküle sowie der Art der Verknüpfung der einzelnen Bausteine [Galuska *et al.*; 2007]. Beschrieben wurden bisher  $\alpha$ 2,8- [Inoue *et al.*; 1980],  $\alpha$ 2,9- [Bhattacharjee *et al.*; 1975], alternierende  $\alpha$ 2,8-/ $\alpha$ 2,9- [Chao *et al.*; 1999] und  $\alpha$ 2,5-O-Glykolyilverknüpfungen [Kitazume *et al.*; 1996].

Entdeckt wurde PolySia im Jahr 1957 von Guy Barry und Walther Goebel, die eine weiße Substanz aus *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien isolierten, die sie Colominsäure nannten und die sich später als  $\alpha$ 2,8-verknüpftes Neu5Ac-Polymer erweisen sollte [Barry *et al.*; 1957; McGuire *et al.*; 1964] (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3** Darstellung eines  $\alpha$ 2,8-verknüpften Neu5Ac-Polymers

Wie bei MonoSia können auch Oligo- und PolySia an verschiedenen Stellen modifiziert werden, was ihre strukturelle Vielfalt noch erhöht. Dabei spielen vor allem die Positionen C7 bis C9 eine Rolle, die sulfatiert [Ijuin *et al.*; 1996], O-acetyliert [Sato *et al.*; 1993] oder laktonisiert werden können [Kielczynski *et al.*; 1994]. Durch die Laktonisierung kommt es beispielsweise zu einer Verbindung der Carboxylgruppe mit einer benachbarten Hydroxylgruppe und es entsteht ein sechsgliedriger Ring. Effekt der Laktonisierung ist eine schnelle Herunterregulation von funktionellen Carboxylgruppen, ohne dass die Kettenlänge verändert wird. Die dadurch entstehende Ladungsveränderung kann die physiochemischen Eigenschaften von PolySia beeinflussen und scheint von

biologischer Bedeutung zu sein [Zhang *et al.*; 1999]. Die Laktonisierung erfolgt vor allem unter sauren Bedingungen. Die Geschwindigkeit differiert nach Art der Verknüpfung. So läuft sie bei  $\alpha$ 2,9-verknüpfter PolySia langsamer als bei  $\alpha$ 2,8-verknüpfter PolySia ab. Unklar bleibt, ob die Laktonisierung allein pH-abhängig ist oder ob sie Enzym-vermittelt abläuft [Cheng *et al.*; 2004].

### 1.1.2 Vorkommen und Funktion von Oligo- und PolySia

PolySia-Ketten mit  $\alpha$ 2,8-Verknüpfungen kommen auf der Glykokalix von den neuroinvasiven Bakterien *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis* Typ B vor. Da  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia physiologisch auch im Nervengewebe von Säugetieren vorkommt, erkennt deren Immunsystem die Bakterien nicht als „fremd“ [Vimr *et al.*; 2002]. In *Neisseria meningitidis* des Typs C findet man dagegen  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia [Bhattacharjee *et al.*; 1976]. Im Gegensatz zum Typ C kann man gegen Typ B Meningokokken bisher nicht impfen, was mit der andersartigen Verknüpfung der PolySia-Ketten zu tun haben könnte [Swartley *et al.*; 1997].

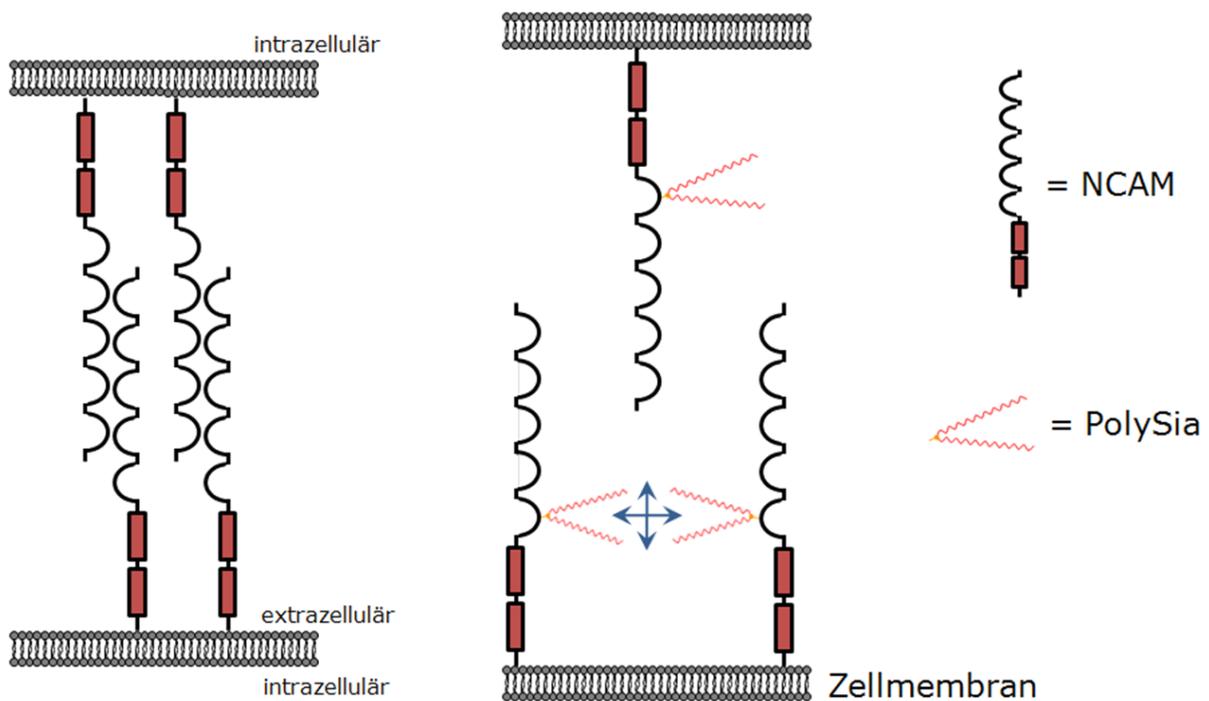
Eines der am besten erforschten Beispiele für Neu5Ac-polysialylierte Proteine in Säugetieren ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, einem zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie gehörendem Adhäsionsmolekül, welches über N-Glykane polysialyliert wird [Galuska *et al.*; 2006]. Durch die Polysialylierung kommt es zu Interferenz bis hin zur kompletten Inhibition der homophilen NCAM-NCAM-Bindung, was zu vermehrter Axonbildung führt und so einen essentiellen Faktor der Neurogenese im Säugerhirn darstellt [Bonfanti; 2006] (Abbildung 1.4).

Nach neuen Untersuchungen zeigt an NCAM gebundene Neu5Ac-PolySia eine Bindungsfähigkeit von Dopamin *in vitro*. Diese Bindungsfähigkeit geht verloren, wenn die PolySia-Kette von einer an einer Stelle punktmutierten Form der Sialyltransferase ST8SiaII synthetisiert wird. Diese mutierte Form der Sialyltransferase weist eine deutlich verminderte Aktivität auf, was in kürzeren Ketten resultiert, und kann vor allem in Schizophrenie-Patienten nachgewiesen werden [Isomura *et al.*; 2011].

Neu5Ac-PolySia ist außerdem in der Lage Wachstumsfaktoren zu binden. Dies konnte unter anderem für *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin 3 und *nerve growth factor* (NGF) gezeigt werden. Im Fall von BDNF

erfolgt die Bindung ab einer Kettenlänge von mindestens 12 Neu5Ac-Resten; ein Beleg, dass die Kettenlänge für biologische Funktionen relevant ist [Kanato *et al.*; 2008].

Der Nachweis von PolySia in NCAM-*knock-out*-Mäusen führte in unserem Labor zur Identifikation eines weiteren polysialylierten Proteins im sich entwickelnden Mausgehirn, dem synaptischen Zelladhäsionsmolekül SynCAM 1, wobei die biologische Funktion noch unklar ist. Die Polysialylierung könnte die Interaktion von Neuronen und Gliazellen auf Synapsen-Ebene regulieren [Galuska *et al.*; 2010].



**Abbildung 1.4 Wirkung von PolySia auf NCAM**

Mögliche Regulation der NCAM-NCAM-Interaktion durch PolySia und die daraus resultierende Inhibition der Zelladhäsion. Modifiziert nach [Rutishauser *et al.*; 1996; Bruses *et al.*; 2001]

Neben NCAM und SynCAM 1, wo N-Glykane die PolySia-Ketten aufweisen, sind in Säugern zwei weitere PolySia-Träger bekannt, deren O-Glykane Ziel dieser posttranslationalen Modifikation sind: CD 36 (Cluster of Differentiation), ein ursprünglich in Thrombozyten nachgewiesenes Glykoprotein in der Muttermilch, weist PolySia-Ketten von bis zu 18 Neu5Ac-Resten auf [Yabe *et al.*; 2003]. Des Weiteren findet man polysialylierte O-Glykane an humanem Neuropilin-2 auf gereiften Dendritischen Zellen [Curreli *et al.*; 2007]. Bei einem

spannungsabhängigen Natriumkanal im Rattenhirn [Zuber *et al.*; 1992] konnten zwar PolySia-Ketten nachgewiesen werden, aber bisher ist noch nicht bekannt, ob hier die PolySia-Ketten an O- oder N-Glykanen zu finden sind.

Vor einigen Jahren entdeckte ein japanisches Forscherteam um Shinji Miyata mehrere polysialylierte Glykokonjugate auf Seeigel-Spermien [Miyata *et al.*; 2007]. Das mit  $\alpha$ 2,9-verknüpfte und bis zu 20 Neu5Ac-Resten langen Ketten glykosylierte Protein Flagelliasialin befindet sich am Flagellum und ist an der intrazellulären Calcium-Regulation beteiligt. Die Inkubation von Seeigel-Spermien mit einem gegen  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolyNeu5Ac gerichteten Antikörper bewirkt einen intrazellulären Calcium-Anstieg, was eine Abnahme der Motilität und der Fertilisationsrate zur Folge hat [Miyata *et al.*; 2004; Miyata *et al.*; 2006]. Ein noch nicht näher identifiziertes polysialyliertes Glykoprotein von 190 kDa Größe in Kopf und Flagellum weist dagegen 2 bis 15  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Reste auf. Im Gegensatz zum gegen  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia gerichteten Antikörper beeinträchtigte ein gegen  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolyNeu5Ac gerichteter Antikörper die Fertilisation nicht, so dass für die beiden PolySia-Typen verschiedene biologische Funktionen angenommen werden können. Ebenfalls  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia mit bis zu 16 Neu5Ac-Resten konnten an Polysialogangliosiden im Seeigelsperma nachgewiesen werden. Dies ist der erste Nachweis von  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia in Glykolipiden von Eukaryonten [Miyata *et al.*; 2007; Miyata *et al.*; 2011]. In Spermien von Wirbel- und Säugetieren wurde bisher keine PolySia nachgewiesen bzw. beschrieben.

Die chemischen und immunogenen Eigenschaften, die sich einzelne Bakterien wie oben beschrieben zunutze machen, um sich zu maskieren, machen PolySia als Modifikation von Medikamenten auf Protein-Basis interessant. Diese weisen oft nachteilige Eigenschaften wie ein hohes Molekulargewicht, geringe Halbwertszeiten und eine starke Immunogenität auf. Vor allem Halbwertszeit, Löslichkeit und Immunogenität könnten durch Hyperglykosylierung verbessert werden. PolySia scheint dafür ein geeigneter Kandidat zu sein [Pisal *et al.*; 2010].

### 1.1.3 Synthese von PolySia

In Säugetieren wird PolySia von den beiden Golgi-ständigen  $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV synthetisiert [Kean; 1991; Münster *et al.*; 1998]. ST8SiaII und ST8SiaIV gehören zur mehr als 20 Mitglieder umfassenden Familie der Sialyltransferasen [Harduin-Lepers *et al.*; 2001].

Die individuellen und synergistischen Polysialylierungs-Eigenschaften der beiden Polysialyltransferasen *in vivo* wurden am NCAM-Mausmodell eingehend charakterisiert. Je nach Expressionsniveau von ST8SiaII und ST8SiaIV unterscheiden sich sowohl die synthetisierte Gesamtmenge von PolySia als auch die synthetisierten Kettenlängen. Außerdem zeigte sich, dass NCAM je nach Genotyp in unterschiedlichem Ausmaß polysialyliert wird. So wird bei ST8SiaII-defizienten Mäusen 55 % von NCAM polysialyliert, während ST8SiaII bei einem intakten Allel allein in der Lage war 90 % aller NCAM-Moleküle zu polysialylieren [Galuska *et al.*; 2006; Galuska *et al.*; 2008; Oltmann-Norden *et al.*; 2008].

Der Synergismus der beiden Polysialyltransferasen bewirkt ein fein reguliertes Expressionsmuster von PolySia-NCAM. So wird ein fehlreguliertes PolySia-NCAM-Muster mit dem Morbus Alzheimer [Mikkonen *et al.*; 2001] und ein erniedrigter PolySia-NCAM-Gehalt mit Schizophrenie-Erkrankungen [Barbeau *et al.*; 1995; Isomura *et al.*; 2011] in Verbindung gebracht. Die komplette Inaktivierung von ST8SiaII und ST8SiaIV im Mausmodell führt zu einem letalen Phänotyp mit fortschreitendem Hydrocephalus, Bildungsdefekten von neuronalen Zellverbindungen und postnataler Wachstumsverzögerung [Weinhold *et al.*; 2005].

Über die Synthese von  $\alpha$ 2,8-verknüpfter PolySia in Seeigeln ist bislang wenig bekannt. Die Gene der beiden  $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen von Säugetieren können in Seeigeln nicht nachgewiesen werden [Harduin-Lepers *et al.*; 2008].

Zur besseren Verständlichkeit und Übersichtlichkeit werden im weiteren Verlauf der Arbeit die Begriffe Sialinsäure (Sia) und Neu5Ac bzw. PolySia und  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Polymere synonym verwendet.

## 1.2 Anatomie und Physiologie des Hoden

Die paarig angelegten Hoden erfüllen zwei Aufgaben: die Bildung von Samenzellen, die sog. Spermatozoen oder Spermien, und die Synthese von

männlichen Geschlechtshormonen wie z.B. Testosteron [Holstein; 1994]. Der grundlegende Aufbau des Hodens ist bei den verschiedenen Säugetierspezies vergleichbar [Holstein; 1994; Sinowatz; 2001].

### 1.2.1 Histologischer Aufbau des Keimepithels

Das menschliche Hodengewebe besteht aus Hodenläppchen, die gekammert von bindegewebigen Septen zum Rete testis (lat. rete = Netz) verlaufen. Das Rete testis ist das Verbindungsstück vom Hoden zum Nebenhoden [Holstein; 1994]. In den Hodenläppchen laufen in morphologisch und funktionell voneinander getrennten Kompartimenten sowohl die Samenzellreifung als auch die Hormonproduktion ab. Die Samenzellreifung (Spermatogenese) findet im tubulären Kompartiment, den sog. Tubuli seminiferi, statt, während die Hormonsynthese (Steroidogenese) im Interstitium abläuft [Weinbauer *et al.*; 2009].

Häufigster Zelltyp neben den in allen Stadien vorkommenden Keimzellen innerhalb der Tubuli sind die Sertoli-Zellen, die mit ihren Zellausläufern das zur Spermatogenese nötige Stützgerüst und Wachstumsmilieu des Keimepithels erzeugen und die Blut-Hoden-Schranke bilden [Mruk *et al.*; 2004]. Im Laufe der Spermatogenese passieren die Keimzellen im Spermatozyten-Stadium die Blut-Hoden-Schranke [Lui *et al.*; 2003; Rabionet *et al.*; 2008] und sind damit ab diesem Stadium vor dem eigenen Immunsystem verborgen [Weinbauer *et al.*; 2009].

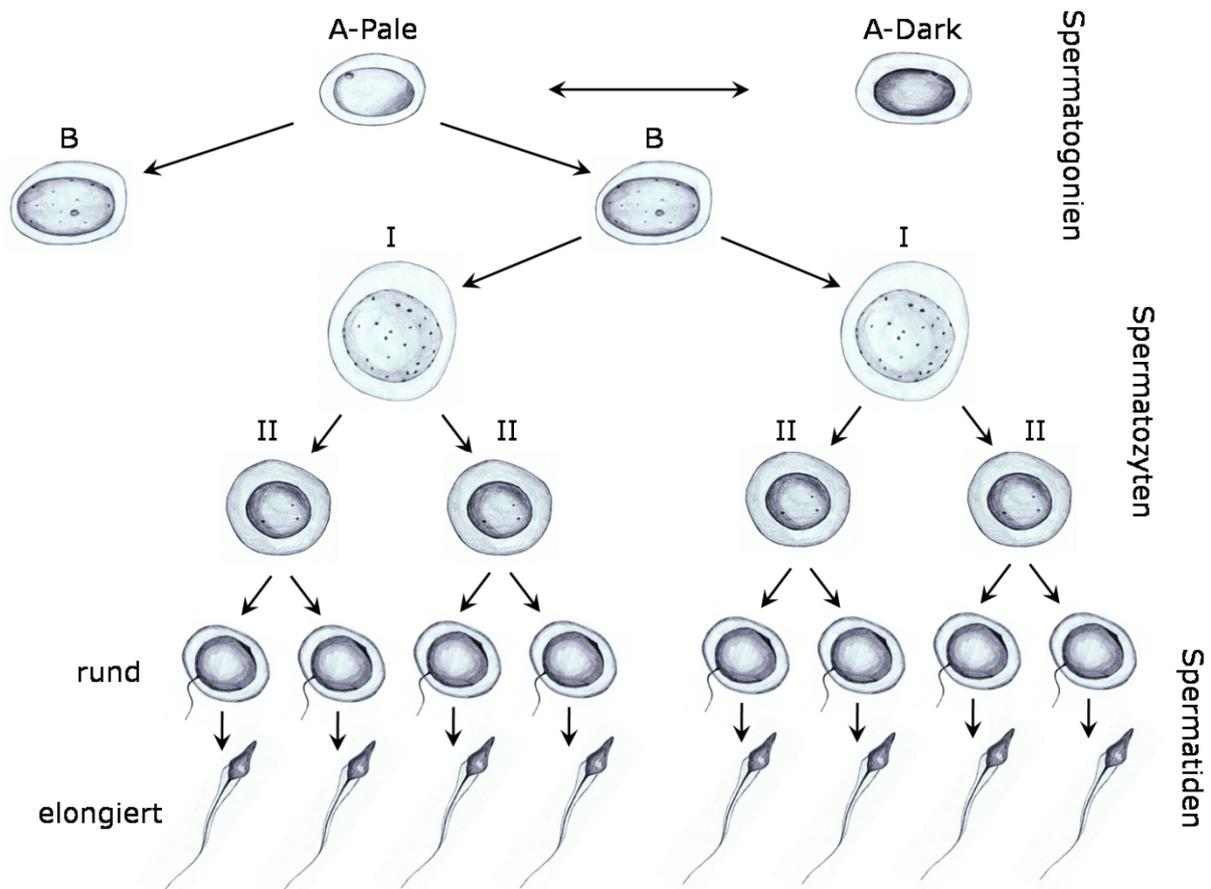
### 1.2.2 Spermatogenese

Die Spermatogenese umfasst mehrere Stadien, an deren Ende die aus der Meiose hervorgehenden haploiden Spermien stehen (Abbildung 1.5).

Die Spermatogonien liegen basal im Keimepithel. Sie können in Typ A und B unterteilt werden, wobei die Spermatogonien Typ B ein weiter entwickeltes Keimzellstadium darstellen und nur noch losen Kontakt mit der Basalmembran haben. Die A-Spermatogonien können ebenfalls in zwei verschiedene Typen unterteilt werden, nämlich in A pale (Ap) und A dark (Ad), was von ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit herrührt [Clermont; 1963; Holstein; 1994]. Die Ad-Spermatogonien weisen im adulten Hoden nur eine sehr geringe

Proliferationsaktivität auf und werden als testikuläre Stammzellen angesehen [Ehmcke *et al.*; 2006b]. Ap-Spermatogonien weisen eine kontinuierliche Teilungsaktivität auf [Ehmcke und Schlatt; 2006a]. Aus einer Ap-Spermatogonie gehen beim Menschen rein rechnerisch 16 elongierte Spermatisden hervor [Amann; 2008].

Durch mitotische Teilung entstehen aus B-Spermatogonien primäre Spermatozyten. Kennzeichnend für die Entwicklung der Spermatozyten ist die Überwindung der Blut-Hoden-Schranke und die Bildung von haploiden Keimzellen durch meiotische Reifeteilungen [de Kretser *et al.*; 1998]. Die Blut-Hoden-Schranke bleibt zu jedem Zeitpunkt dieses Prozesses intakt [Russell; 1977].



**Abbildung 1.5 Spermatogenese**

Schematische Darstellung der Spermatogenese sowie Darstellung einzelner Keimzelltypen des Mannes. Aus einer A-Pale-Spermatogonie gehen rein rechnerisch 16 reife Spermien hervor [Amann; 2008]. Die Interaktion zwischen A-Pale und A-Dark-Spermatogonien ist bisher unbekannt. Ab dem Stadium der B-Spermatogonie ist nur der halbe Stammbaum dargestellt. A-Pale = A-Pale-Spermatogonie; A-Dark = A-Dark-Spermatogonie; B = B-Spermatogonie; I = Spermatozyt Typ I; II = Spermatozyt Typ II. Modifizierte Darstellung nach [Weinbauer *et al.*; 2009]

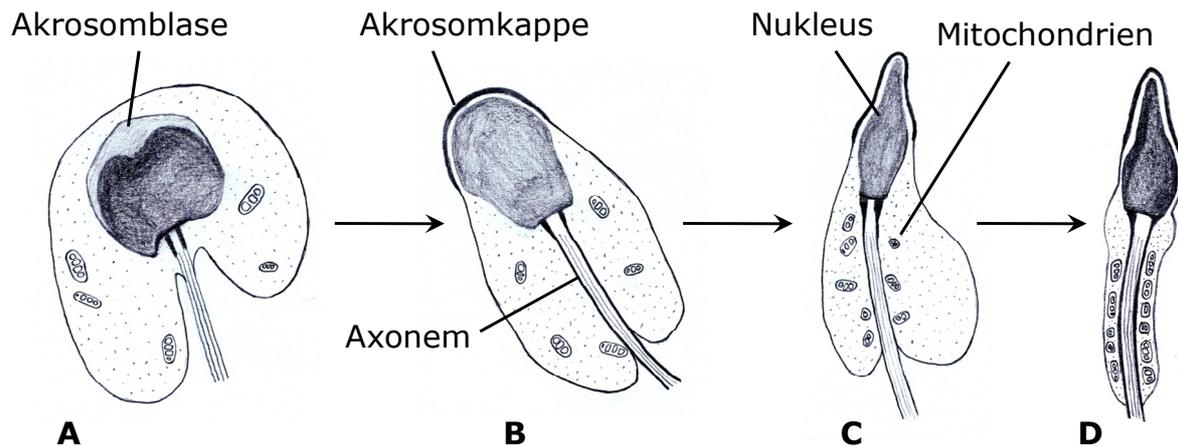
Bereits während des Transportes durch die Blut-Hoden-Schranke treten die Spermatozyten in die Meiose ein. Die erste meiotische Phase, die Prophase I, dauert beim Menschen etwa 24 Tage. In dieser Phase findet auch der *crossing-over* genannte Austausch genetischen Materials zwischen den homologen Chromosomen statt [Holstein; 1994]. Nach Ablauf der Prophase I wird die erste meiotische Teilung schnell abgeschlossen und endet pro Spermatozyt I in der Bildung von zwei haploiden Spermatozyten II, jedoch mit doppeltem Chromatidensatz. Die DNA wird nun nicht redupliziert und nach nur ca. 6 Stunden teilen sich die Spermatozyten II in haploide Spermatiden mit einfachem Chromatidensatz [de Kretser *et al.*; 1998; Sinowatz; 2001]. Der zweite Teil der Meiose läuft dabei wie eine normale Mitose ab. Aus einem Spermatozyt II entstehen zwei Spermatiden [Bergmann; 1998].

### 1.2.3 Entwicklung zum elongierten Spermium

Die Entwicklung der Spermatide zum reifen elongierten Spermium (Spermatozoon) umfasst vor allem morphologische Veränderungen, die mit einer Polarisierung der Zelle einhergehen (Abbildung 1.6).

Mit der Wanderung des Zellkerns in die Peripherie findet eine starke Verdichtung der DNA statt. Zwischen Zellmembran und exzentrischem Zellkern formiert sich das Akrosom, welches aus granulären Vakuolen des Golgi-Apparates entsteht und sich kappenartig über zwei Drittel des Kerns legt. Auf der Gegenseite entsteht der Spermischwanz, das Flagellum, welches über zwei T-förmig angeordnete Zentriolen an der Kernmembran verankert ist. Dieser Prozess wird auch als Elongation bezeichnet. Mit der Reduktion des Organellenapparates auf ein Minimum findet am Schluss der Spermiogenese die Abstoßung des entstehenden Residualkörpers und damit der Verlust großer Zytoplasma-Anteile statt [Holstein; 1994; de Kretser *et al.*; 1998; Weinbauer *et al.*; 2009].

Zeitgleich mit den morphologischen Veränderungen werden die elongierenden Spermatiden lumenwärts transportiert [Guttman *et al.*; 2000]. Die Lösung des reifen Spermiums vom Keimepithel wird als Spermiation bezeichnet [Mruk und Cheng; 2004]. Kontraktile Elemente, die die Tubuli seminiferi umhüllen, sorgen für den Transport der noch unbeweglichen Spermien ins Rete testis und von dort weiter in den Nebenhoden [Middendorff *et al.*; 2002].



**Abbildung 1.6 Differenzierung der Spermatide zu Spermatozoen**

(A) Die Akrosomblase bildet sich über dem Kern, das Axonem entsteht am entgegengesetzten Kernpol. (B) Der Nukleus wird oval, das Akrosom verdichtet sich. (C) Der Nukleus verdichtet sich, die Mitochondrien gruppieren sich um das Axonem. (D) Reifes Spermium nach Abstoßung großer Zytosplasmaanteile, die Mitochondrien sind helikal um das Mittelstück angeordnet. Vereinfachte Darstellung nach [Holstein; 1994]

#### 1.2.4 Spermienreifung im Nebenhoden

Die treibende Kraft für den Transport der noch unbeweglichen Spermien in den Nebenhoden ist ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom, in dem die Spermien passiv mitgespült werden [Holstein; 1994; Cooper *et al.*; 2009]. Dort verweilen sie beim Menschen abhängig von der testikulären Produktionsrate zwischen 2 und 7 Tage, während sie weiter reifen. Umso niedriger die testikuläre Produktionsrate, desto länger dauert der Transit der Spermien durch den Nebenhoden [Johnson *et al.*; 1988].

Der Nebenhoden gliedert sich in Kopf, Körper und Schwanz und wird in dieser Reihenfolge von den Spermien durchquert [Seitz; 1998]. Er erfüllt vor allem drei Aufgaben [Bedford; 1994]:

- Transport der Spermien zum Nebenhoden-Schwanz, von dem aus sie ejakuliert werden können
- Schaffung eines Mikromilieus, um die weitere Reifung zu überlebens- und befruchtungsfähigen Spermien zu fördern
- Speicherung von reifen und befruchtungsfähigen Spermien.

Mikroskopische Studien belegen, dass sich während der Passage des Nebenhodens unter anderem Größe und Konfiguration von Akrosom und Nukleus verändern, sowie strukturelle Veränderungen an anderen Organellen stattfinden [Cornwall; 2009].

Bei früheren *in vivo* und *in vitro* Versuchen wurde beobachtet, dass die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Spermium eine Eizelle befruchtet, ansteigt, bzw. die Befruchtung schneller eintritt, je weiter distal die Spermien aus dem Nebenhoden entnommen wurden. Direkt aus dem Hoden entnommene Spermien sind dazu weder nach Insemination noch nach *in-vitro*-Fertilisation (IVF) in der Lage, was auf weitere Entwicklungsschritte schließen lässt [Cooper; 2007].

In distaler Richtung scheint die Anzahl morphologisch missgebildeter Spermien abzunehmen, was bei näherer Betrachtung auf die Reduktion von Artefakten in der Präparation zurückzuführen ist [Yeung *et al.*; 1997]. Bekannt ist, dass die epididymale Flüssigkeit hohe Konzentrationen an wasserlöslichen niedermolekularen Komponenten wie Myoinositol, Taurin, L-Carnitin oder Glutamat aufweist und gegenüber Serum hyperosmolar ist [Cornwall; 2009]. Die Hypothese ist, dass Spermien auf ihrem Weg durch den Nebenhoden diese Moleküle aufnehmen und nach Ejakulation auf diese Weise besser vor osmotischem Stress geschützt sind [Cooper *et al.*; 2003].

Ein zentraler Entwicklungsschritt der Spermien ist die Ausbildung der Beweglichkeit. Obwohl die morphologischen Voraussetzungen bereits bei Lösung vom Keimepithel vorhanden sind, entwickelt sich eine koordinierte und progressive Geißelbewegung erst in den distalen Bereichen des Nebenhoden-Körpers bzw. im Schwanz [Soler *et al.*; 1994]. Dabei scheint vor allem eine bessere Koordination des Bewegungsmusters, neben der Erhöhung der Schlagkraft, die Vorwärtsbeweglichkeit zu erhöhen [Cooper und Yeung; 2009]. Obwohl die Spermien im Nebenhoden die Fähigkeit zur Vorwärtsbewegung erlernen, sind sie während der Speicherung im Schwanz weitgehend unbeweglich, um die Energiereserven zu schonen [Yeung *et al.*; 1993].

### 1.2.5 Veränderungen der Zellmembran während der Passage des Nebenhodens

Bei dem auf ein Minimum reduzierten Organellenapparat der Spermien kommt der Zellmembran sozusagen als Sitz der Kommunikationsmoleküle eine Schlüsselrolle in der Interaktion mit dem männlichen bzw. weiblichen Genitaltrakt im Allgemeinen und der Interaktion mit der Eizelle im Besonderen zu. Darum ist es für die erfolgreiche Befruchtung von großer Wichtigkeit, dass dieser Zellapparat mit den nötigen Proteinen ausgestattet wird, da Spermien,

wenn sie einmal vom Keimepithel abgestoßen sind, diese nicht mehr selbst herstellen können [Sullivan *et al.*; 2005].

Während man zunächst annahm, dass die meisten Membran-Proteine auf Spermien im Nebenhoden durch elektrostatische, nicht-kovalente Bindungen aufgelagert werden und somit mit Detergenzien „abwaschbar“ sind [Robitaille *et al.*; 1991], verdichten sich die Hinweise, dass viele fest in die Membran integriert sind, z.B. mittels Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) [Légaré *et al.*; 1999; Frenette *et al.*; 2001; Yeung *et al.*; 2001; Zhang *et al.*; 2003].

Der epididymale Reifungsprozess lässt sich außerdem an einer Zunahme negativer Oberflächen-Ladungen beobachten. Dies konnte bereits in mehreren Spezies gezeigt werden [Yanagimachi *et al.*; 1972; Eddy *et al.*; 1985]. Diese Ladungszunahme hängt unter anderem mit dem Anstieg von Sialinsäure-Resten zusammen [Holt; 1980].

Die Oberflächen-Glykosylierung von epididymalen Zellen kann mittels Lektinen nachgewiesen werden [Arya *et al.*; 1986]. Die Bindungsraten der entsprechenden Lektine im Nebenhoden nehmen nach distal hin zu mit Maximalwerten im Schwanz, während im Lumen des Samenleiters nur noch Bindung von *wheat germ agglutinin* (WGA) nachweisbar ist, einem Lektin das relativ spezifisch an *N*-Acetylglukosamin und Sialinsäuren bindet [Arenas *et al.*; 1996].

### 1.3 Anatomie und Physiologie der Spermien,

Aufgabe der Spermien ist es, das Erbgut des Mannes zum Erbgut der Frau zu transportieren und dort durch Verschmelzung der beiden Gameten je nach Spezies einen bzw. mehrere Embryonen zu bilden, aus denen sich das neue Leben weiterentwickeln kann. Nach einer Reihe von Entwicklungsschritten in Hoden und Nebenhoden, wird das Spermium als reife und terminal ausdifferenzierte Zelle bei der Ejakulation im weiblichen Genitaltrakt deponiert.

#### 1.3.1 Histologischer Aufbau

Die Spermiengröße variiert bei den verschiedenen Spezies. Beim Menschen erreicht sie eine Länge von 50 – 60 µm, während sie beim Rind bis zu 90 µm betragen kann [Schnorr; 2006].

Morphologisch lassen sich drei verschiedene Kompartimente unterteilen: Kopf, Hals und Schwanz (Abbildung 1.7). Der Kopf beherbergt den Kern mit haploidem Chromosomensatz und das Akrosom, welches sich kappenartig über den Kern stülpt [Holstein; 1994]. Es entsteht während der Spermatogenese aus dem Golgi-Apparat und beherbergt hydrolytische Enzyme wie Akrosin oder Hyaluronidase, die im Rahmen der Akrosomenreaktion ausgeschüttet werden und die Zona pellucida der Eizelle verdauen [Tulsiani *et al.*; 1998]. Der nicht vom Akrosom bedeckte Teil des Kopfes wird postakrosomale Region genannt [Pedersen; 1972]. Diese wird durch das äquatoriale Segment, welches noch zum Akrosom gehört, von der Akrosomen-Region getrennt. Es ist nur in Höheren Säugetieren (Eutheria) nachweisbar [Bedford *et al.*; 1979]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Fusion von Spermium und Eizelle von dieser Struktur ausgeht [Fujihara *et al.*; 2010].

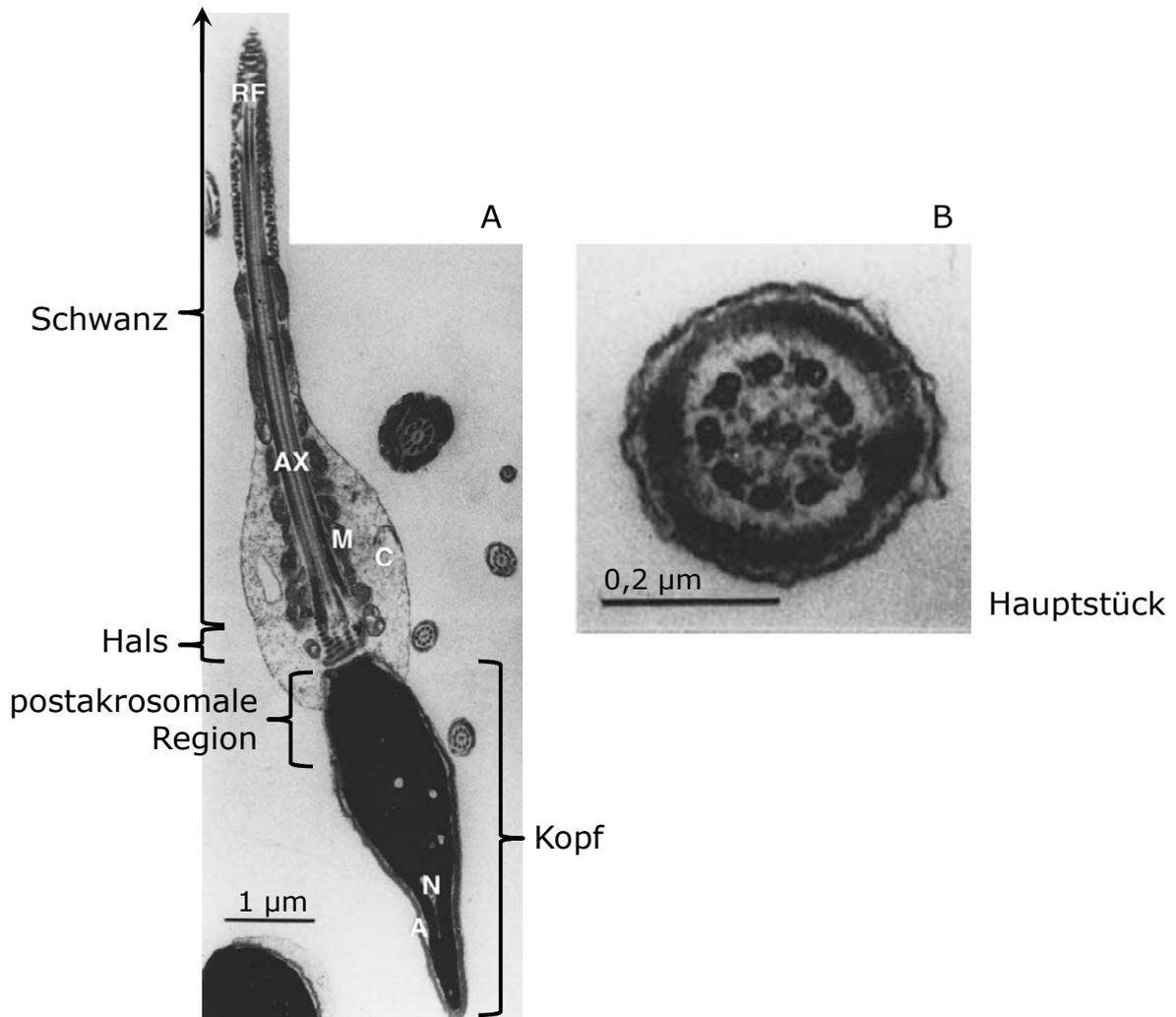
Der menschliche Spermien-Kopf hat eine Tennisschläger-artige Form. Bei der seitlichen Ansicht ist er zur Spitze hin abgeplattet [Holstein; 1994]. Rinderspermien haben eine ovale bis birnenförmige Form und sind in der Seitenansicht ebenfalls abgeplattet [Sinowitz; 2001].

Der Spermienhals ist ein kurzes Verbindungsstück zwischen Kopf und Schwanz. Er besteht im reifen Spermium nur noch aus einem Zentriol. Aus dem zweiten Zentriol, welches T-förmig zum ersten angeordnet war, entsteht im Laufe der Spermatischen-Differenzierung das Tubulusbündel des Schwanzes [Pesch *et al.*; 2006]. Einige Autoren sprechen von zwei Kompartimenten und zählen den Hals zum Schwanz hinzu [Fawcett; 1975].

Der dreiteilige Schwanz dient als Fortbewegungsorgan, um den weiten Weg durch den Uterus und die Eileiter zurücklegen zu können. Er lässt sich in Mittelstück, Hauptstück und Endstück unterteilen. Zentrales Element ist das aus Mikrotubuli in 9x2+2-Konfiguration gebildete Tubulusbündel. Es erstreckt sich über den gesamten Schwanz, verliert aber im Endstück die charakteristische Anordnung [Afzelius *et al.*; 1995].

Unterscheidungsmerkmal von Mittelstück und Hauptstück sind die in ersterem Teil liegenden Energie-liefernden Mitochondrien [Si *et al.*; 1993]. Um die Beweglichkeit des Schwanzes nicht zu beeinträchtigen, sind sie helikal um das Tubulusbündel angeordnet. Ein enger mit der Zellmembran verbundener Ring

verhindert ein Abrutschen der Mitochondrien nach distal [Pesch und Bergmann; 2006].



**Abbildung 1.7 Aufbau eines Spermiums**

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines menschlichen Spermiums. (A) Längsschnitt. Dargestellt sind der Kopf, der Hals und der Schwanz mit Mittelstück und teilweise dem Hauptstück. A = Akrosom; N = Nukleus; C = Zytoplasma; M = Mitochondrien; Ax = Axonem; Rf = Ringfasern. (B) Querschnitt durch das Hauptstück. Zu sehen ist die typische 9x2+2 Anordnung der Mikrotubuli mit den umgebenden Ringfasern. Abbildung nach [Neugebauer *et al.*; 1990], entnommen aus [Cooper und Yeung; 2009]

### 1.3.2 Spermien-Glykokalix

Im Ejakulat erscheinende menschliche Spermien tragen schätzungsweise mindestens 300 verschiedene Proteine auf ihrer Oberfläche, detektierbar durch vektorielle Markierung mit  $^{125}\text{I}$ , einem Jod-Radioisotop, oder Biotin [Naaby-Hansen *et al.*; 1997]. Bei somatischen Zellen wird geschätzt, dass über 90 % der Oberflächen-Proteine glykosyliert sind [Gahmberg *et al.*; 1996], und auch

Spermien-Proteine sind häufig glykosyliert [Benoff; 1997]. Die elektronenmikroskopisch messbare Größendifferenz zwischen (relativ gesehen dünnerer) Erythrozyten- und (dickerer) Spermien-Glykokalix mit einem Unterschied zwischen 10 und 50 nm [Rademacher *et al.*; 1988; Bearer *et al.*; 1990] lässt die Bedeutung der Glykosylierung im Rahmen der Fertilisation erahnen.

Die Charakterisierung von Spermien-Glykoproteinen in verschiedenen Spezies zeigt starke Spezies-spezifische Unterschiede in den Glykosylierungsmustern. Dies könnte zur Verhinderung von Spezies-übergreifender Fertilisation beitragen [Schroeter *et al.*; 1999].

Die Verteilung der Glykoproteine auf der Oberfläche folgt einem genauen Plan, anhand dessen man sowohl eine terminologische Einteilung als auch eine funktionelle Zuordnung der einzelnen Kompartimente vornehmen kann [Koehler; 1981]. Mittels Klonierung testikulärer und epididymaler Gene konnte eine Reihe von Glykoproteinen der Spermien-Glykokalix identifiziert werden [Schroeter *et al.*; 1999]. Dies ist insofern von Bedeutung, als Glykoproteinen eine wichtige Rolle im Rahmen der Fertilisation zugeschrieben wird. Zum einen gibt es Hinweise, dass Oligosaccharid-Reste immunsuppressive Wirkung haben [Halttunen *et al.*; 2000; Pang *et al.*; 2007; Koyama *et al.*; 2009]. Zum anderen sind Glykoproteine von großer Relevanz für die Interaktion von Spermien mit weiblichem Gewebe [Ivell; 1999] oder die Implantation des Embryos [Whyte *et al.*; 1985]. Spermien binden im weiblichen Genitaltrakt an das Epithel des Eileiters und verbleiben dort in einem energiesparenden Zustand bis zur Ovulation, um die Oozyte zum optimalen Zeitpunkt erreichen zu können [Dobrinski *et al.*; 1997; Orihuela *et al.*; 1999; Croxatto; 2002]. Dieser Vorgang wird über Proteine vermittelt, die stark glykosyliert sind [Suarez; 2002]. Dabei gibt es Spezies-spezifische Unterschiede zwischen den Kohlenhydrat-Molekülen. So wird vermutlich die Spermien-Ovidukt-Adhäsion beim Rind durch Fucose [Lefebvre *et al.*; 1997], bei der Ratte und beim Hamster durch Sialinsäure-Reste vermittelt [DeMott *et al.*; 1995; Cortes *et al.*; 2004].

### 1.3.3 Interaktion von Spermium und Eizelle

Bevor Spermien die weibliche Eizelle befruchten können, müssen sie noch einige Entwicklungsschritte im weiblichen Genitaltrakt vollziehen. Diese umfassen die

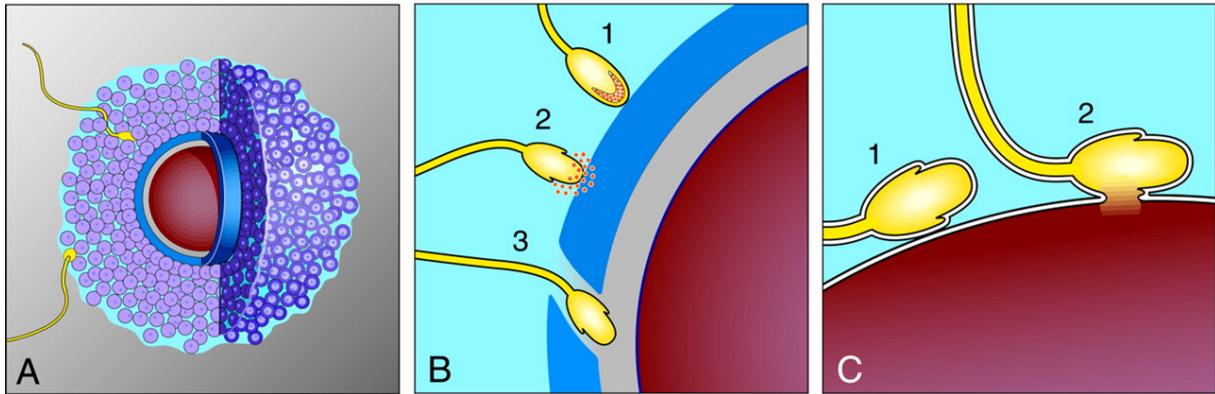
sog. Kapazitation, ein Prozess, bei dem unter anderem Membran-Proteine abgespalten oder modifiziert werden [Abou-haila *et al.*; 2009], und die Hyperaktivierung, die durch eine größer werdende asymmetrische Bewegungsamplitude des Flagellums gekennzeichnet ist [Katz *et al.*; 1980; Marquez *et al.*; 2004].

Um zur Eizelle vordringen zu können, müssen Spermien zunächst den aus ca. 5000 Zellen bestehenden Cumulus oophorus durchdringen (Abbildung 1.8). Als Werkzeug nutzen sie die GPI-verankerte Oberflächen-Hyaluronidase PH-20, die für die hyperaktivierten Spermien einen Weg durch die Zellschicht bahnt. Das Akrosom ist noch intakt [Lin *et al.*; 1994; Primakoff *et al.*; 2002].

Der erste direkte Kontakt zwischen Spermium und Zona pellucida der Eizelle löst die Akrosomen-Reaktion aus [Oehninger; 2001]. Die Zona pellucida ist eine zwischen Cumulus oophorus und Eizelle liegende glykoproteinreiche extrazelluläre Matrix, welche die komplette Eizelle umhüllt [Lefièvre *et al.*; 2004]. Die das Akrosom überdeckende Spermien-Membran löst sich auf, das Akrosom wird eröffnet und die darin enthaltenen Proteasen und Glycosidasen werden freigesetzt. Lektinartige Proteine auf der inneren Akrosomen-Membran binden an Oligosaccharide der Eizelle, während die freigesetzten Proteasen und Glycosidasen einen Weg durch die Zona pellucida bahnen [Dell *et al.*; 1999].

Ein Großteil der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen der noch nicht penetrierten Zona pellucida enthalten beim Rind Sialinsäure-Reste [Katsumata *et al.*; 1996]. Ihr Gehalt sinkt nach erfolgter Akrosomen-Reaktion des Spermiums stark ab. Das führte zu der Hypothese, dass aus dem Akrosom freigesetzte Neuraminidasen die Zusammensetzung der Zona pellucida verändern und so die Eizelle vor Polyspermie, also der gleichzeitigen Befruchtung durch mehrere Spermien, schützen [Velasquez *et al.*; 2007].

Spermien, die die Zona pellucida passiert haben, fusionieren mit der Zellmembran der Eizelle. Der erste Kontakt findet zwischen Oolemma und Spermien spitze statt [Talbot *et al.*; 2003]. Anschließend bindet das entsprechende Spermium seitlich mit der Äquatorial-Region an die Eizelle [Stein *et al.*; 2004]. Eine Voraussetzung scheint die erfolgreich abgelaufene Akrosomen-Reaktion zu sein [Ikawa *et al.*; 2010].



**Abbildung 1.8 Interaktion von Spermium und Eizelle**

Schematische Darstellung der Interaktion von Spermium und Eizelle. (A) Penetration des Cumulus oophorus (Lila). (B) Darstellung der Eizelle ohne Cumulus-Zellen. Spermium 1 bindet an die Zona pellucida (Blau); Spermium 2 vollzieht die Akrosomenreaktion mit Exozytose des akrosomalen Inhalts; Spermium 3 durchquert die Zona pellucida. (C) Spermium 1 bindet seitlich mit der Äquatorial-Region an die Zellmembran der Eizelle; Spermium 2 fusioniert mit der Eizelle. Abbildung nach [Primakoff und Myles; 2002]

Es existiert eine Reihe von Proteinen, von denen man weiß, dass sie Penetration und/oder Fusion von Spermium und Eizelle unterstützen. Viele der *in vitro* identifizierten Proteine erwiesen sich im Mausmodell als wichtig, aber nicht essentiell für die Fertilisation. Das Fehlen bestimmter Faktoren scheint *in vivo* kompensiert werden zu können [Talbot *et al.*; 2003; Ikawa *et al.*; 2010].

## 2 Zielsetzung

Es gibt zahlreiche Beispiele, dass sich physiologische Prinzipien, die einen evolutionären Vorteil haben, unabhängig von einander in unterschiedlichen Spezies entwickelt haben (z.B. Auge bei Tintenfisch und Wirbeltier). Da PolySia entscheidend an der Funktionalität von Seeigelspermien beteiligt ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob PolySia auch auf Spermatozoen von Säugetieren präsent ist.

Dabei waren folgende Fragestellungen von besonderem Interesse:

- Sind Sialinsäurepolymere auf Glykoproteinen von Spermien vorhanden?
- Wie lang sind die synthetisierten PolySia-Ketten?
- Liegen die PolySia-Ketten an N- oder O-Glykanen des polysialylierten Glykoproteins vor?
- Wo ist das bzw. sind die sialylierten oder polysialylierten Proteine auf dem Spermium lokalisiert?

### 3 Material

#### 3.1 Probenmaterial

Zur Etablierung der Methoden wurde zunächst natives, bovines Ejakulat verwendet. Verwendet wurden nur Proben mit einer guten Massenbewegung und einer Vorwärtsbewegung, die bei mindestens 70 % lag [Weitze; 2001].

Zur Gewinnung der bovinen Ejakulate wurden wechselweise drei gesunde Bullen der Rasse Holstein-Friesian aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Veterinärmedizin Gießen mit Hilfe eines Unterstell-Bullen [Leiding; 2007] abgesamt. Die Tiere waren zwischen 2 und 3 Jahren alt.

Die humanen Ejakulate stammten von drei an der Studie beteiligten Wissenschaftlern im Alter zwischen 26 und 34 Jahren, so dass es sich um eine Eigenspende handelte und kein Ethikvotum erforderlich war (siehe [Simon *et al.*; 2013]).

#### 3.2 Antikörper

##### 3.2.1 Primärantikörper

Anti-PolySia (735)	monoklonaler Antikörper, erkennt $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von 8 Sialinsäureresten [Frosch <i>et al.</i> ; 1985]
Anti-SynCAM	Sigma

##### 3.2.2 Sekundärantikörper

Polyklonale Ziegen Anti-Maus-Ig Immunglobuline/HRP-konjugiert	Dako
Polyklonale Schwein Anti-Kaninchen-Ig Immunglobuline/HRP-konjugiert	Dako
Polyklonale Ziegen Anti-Maus IgG, FITC-konjugiert	Dianova
Polyklonale Ziegen Anti-Maus IgG, Rhodamin Red <sup>TM</sup> -X-konjugiert	Dianova

#### 3.3 Enzyme

EndoN	Endoneuraminidase N aus einem <i>E. coli</i> K1 Phagen [Kwiatkowski
-------	---

	<i>et al.; 1982]</i>
<i>N</i> Glycosidase F (PNGaseF)	Roche, NEB
<i>N</i> -Acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminsäure	Sigma
Enzympuffer:	
• Glycoprotein-Denaturierungspuffer	Bio-Labs
• 10 % NP-40	Bio-Labs

### 3.4 Geräte

Analysenwaagen	Mettler Toledo
Auto-Sampler Midas	Spark
Blockthermostate	HLC, ThermoDUAL
Blotkammer	Kreutz Labortechnik
Brutschrank	WTC Binder
Drucker	Brother, Samsung
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern	Bio-Rad
Fluoreszenz-Detektoren	Jasco, Merck Hitachi
Gefrierschränke	Bosch, Liebherr
HPLC-Anlagen	Knauer, Merck Hitachi
Kühlschrank	Bosch
Magnetrührer	Hartenstein
Microplate Reader	Bio-Tek
Mikroskope	
• Fluoreszenz-Mikroskop	Leica
• Lichtmikroskop	Olympus
Mikroskop-Kamera RT Slider	Diagnostic Instruments
Mikrotom	Leica
pH-Meter	Knick
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore
Dokumenten-Scanner	Brother
Schüttler	Stovall, Ika
Spannungsquelle EPS 600	Pharmacia
Speedvac RC 10.22	Jouan

Ultraschallbad	Bandelin Sonorex
Ultraschallstab Sonifier	Branson
Vortexer	Ika
Thermomixer	Eppendorf
Thermo-Wasserbad	Eppendorf
Wärmeschrank	Memmert
Zentrifugen:	
• Kühlzentrifuge „Universal“	Hettich
• Galaxy 14D	VWR
• Labofuge	Heraeus

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Roth, Knittel
Filme	Kodak Biomax XAR Film
Filterpapier Whatman-Paper	Schleicher & Schell
Kanülen Spinocan	Braun
Mikrotiterplatten	Greiner, Roth
Objektträger	Langenbrinck, Roth
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Polypropylenröhrchen	Greiner, Sarstedt
PVDF-Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Spritzen (2 ml, 5 ml)	Braun, Henke-Sass Wolf
Zentrifugier-Filter-Gefäße	Millipore

### 3.6 Chemikalien

$\alpha$ 2,9 verknüpfte Neu5Ac	Dade Behring
Aceton	Merck
Acrylamid Rotiphorese®	Roth
AEC Staining Kit	Sigma
Aprotinin	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma

---

## Material

---

BCA Assay Kit	Pierce
Blockpuffer Roti®-Block	Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Chemilumineszenz SuperSignal	Thermo
Colominsäure	Sigma, Ey
2-Mercaptoethanol	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol	Bio-Labs
Dynabeads® Tosylactivated	Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethanol	Merck
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma
Glycin	Roth
Hämalaun	Roth
Hepes	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Laemmlis	Bio-Rad
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Merck
Mounting Medium (Glycergel)	Dako, Roth
Natriumcarbonat	Seromed
Natriumchlorid	Roth
Natrium-Deoxycholat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-Laktat	Sigma
Natrium-Pyruvat	Sigma
Pageruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Precision Plus All Blue Protein Standard	Bio-Rad
Roticlear®	Roth

---

## Material

---

Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
Temed ( <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethan-1,2-diamin)	Roth
Triethylamin	Merck
Trifluoressigsäure (TFA)	Pierce
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Vectashield inkl. Diamidinphenylindol	Vector
Zytochem AP Staining Kit	Zytomed
1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB)	Dojindo

## 4 Methoden

### 4.1 Probenaufbereitung des frischen Ejakulates

#### 4.1.1 Proteinfällung mit Aceton

Die Acetonfällung ist eine Methode, um Proteine aus Lösungen auszufällen und aufzureinigen. Aceton dient dabei aufgrund seiner sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Eigenschaften als Lösungsmittel. Es hat gegenüber Alkoholen wie Ethanol oder Butanol den Vorteil, dass die Proteine weniger denaturiert werden. Bei besonders hydrophoben Proteinen wirkt es dagegen eher schlechter als Alkohole.

Die zur Acetonfällung vorgesehenen Spermien werden zunächst mit Aqua bidest lysiert und mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Anschließend wird die Probe im Verhältnis 1:5 mit Aceton von -20°C Temperatur gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Das ausgefallene Sediment wird bei 10.000 g und 8°C für 5 Minuten zentrifugiert und nach Tiefkühlung mit flüssigem Stickstoff im Lyophilisator getrocknet. Anders als bei der Lyse, die der Affinitätspräzipitation vorausgeht, wird bei der Acetonfällung kein spezieller Lysepuffer verwendet.

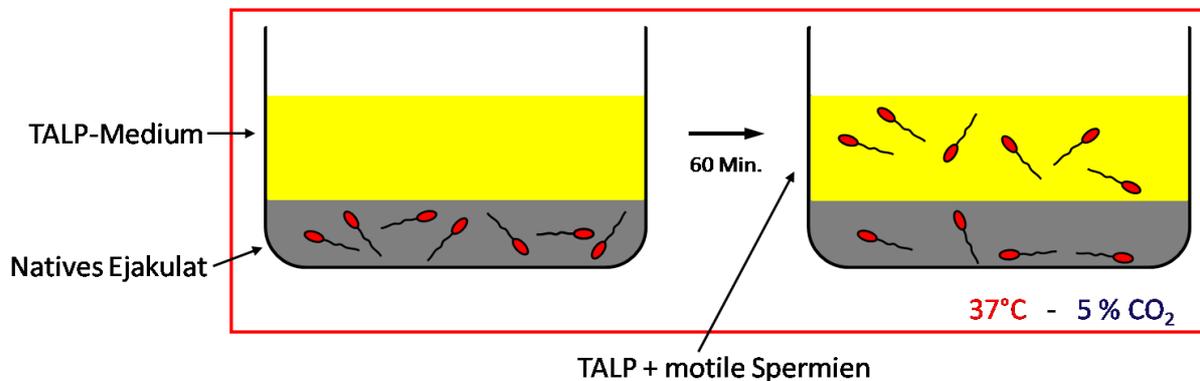
#### 4.1.2 *Swim-up*

##### Modifiziertes Tyrode-Medium (TALP)

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

Ziel der *swim-up*-Behandlung ist die Trennung der Spermien von übrigen Ejakulatbestandteilen, wie z.B. Leukozyten oder Sekreten von Prostata oder Bläschendrüse (Abbildung 4.1). Dafür wird das native unbehandelte Ejakulat vorsichtig unter angewärmtes TALP-Medium in einer PCR-*well-plate* geschichtet. Bei bovinem Sperma 1 mL unter 5 mL TALP, bei humanem Sperma aufgrund der niedrigeren Zellzahl im Ejakulat 1 mL unter 4 mL TALP-Medium. Nach 60 Minuten

Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem Ziel, dass die beweglichen Spermien sich aus der vorgelegten Ejakulatmasse lösen und in das TALP-Medium schwimmen, werden 3 mL Überstand aus jeder Vertiefung (*well*) abgenommen und bei 700 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Nach Zentrifugation wird erneut der Überstand abgenommen und verworfen. Als Sediment bleiben die während der *swim-up*-Prozedur aufgrund ihrer Beweglichkeit ins Medium eingewanderten Spermien zurück, welche zur weiteren Analytik verwendet werden können. Nachteil der *swim-up*-Technik ist ein hoher Zellverlust, da selbst bei kontinuierlicher Wärmezufuhr und schneller Weiterverarbeitung nach der Samengewinnung viele Spermien ihre Vorwärtsbeweglichkeit verlieren.



**Abbildung 4.1** *Swim-up*

Schematische Darstellung des *swim-up*. Das native Ejakulat wird vorsichtig unter TALP-Medium geschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wird der Überstand bestehend aus beweglichen Spermien und Medium abgenommen

### 4.1.3 Lyse

#### Lysepuffer

5 mM EDTA  
 150 mM NaCl  
 50 mM Tris/HCl, pH 8  
 1 % (w/v) Triton X-100  
 0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat  
 kurz vor Lyse hinzufügen:  
 1 mM PMSF  
 1 mM 1000 U Aprotinin  
 1 mM Leupeptin

Bei Anwendung der unten beschriebenen Affinitätspräzipitation wird die Lyse der Spermien zusätzlich zur Homogenisierung mit dem Ultraschallstab durch

Inkubation mit Lysepuffer durchgeführt. Die Spermien werden vor der Lyse teilweise per Swim-up vom Rest-Ejakulat separiert.

Wenn kein Swim-up vorgeschaltet wird, wird das native Ejakulat mit Lysepuffer versetzt und auf Eis mechanisch homogenisiert („gepottert“). Die mittels Swim-up gewonnenen und vom TALP-Medium getrennten Spermien werden ebenfalls mit Lysepuffer versetzt. In beiden Fällen erfolgt anschließend die Homogenisierung mit dem Ultraschallstab.

Als Mengenrichtwert gilt: pro 1 mL Nativ-Ejakulat 1 mL Lysepuffer bzw. pro nach Swim-up eines kompletten Ejakulates abzentrifugiertem Spermienpellets 2 mL Lysepuffer. Die homogenisierten, mit Lysepuffer versetzten Spermien werden 2 Stunden unter Bewegung inkubiert und anschließend 1 Stunde bei 20.160 g zentrifugiert, um unlösliche Zell- und Gewebsbestandteile abzutrennen. Beide Prozeduren erfolgen bei 4°C. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt.

Wenn die lysierten Spermien zur HPLC-Analytik verwendet werden, wird das ionische Detergens Natrium-Deoxycholat weggelassen, um die HPLC-Säulen nicht zu beschädigen.

#### 4.1.4 Aufreinigung von polysialylierten Glykoproteinen

##### Waschpuffer 1

20 mM Tris/HCl, pH 8  
150 mM NaCl  
0,5 % (w/v) Triton X-100

##### Waschpuffer 2

20 mM Tris/HCl, pH 8  
150 mM NaCl

##### Elutionspuffer

100 mM Triethylamin  
150 mM NaCl

##### Puffer B

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

##### Puffer C

3 M Ammoniumsulfat  
0,1 M Na-Phosphat, pH 7,4

Puffer D

0,5 % BSA in PBS

Puffer E

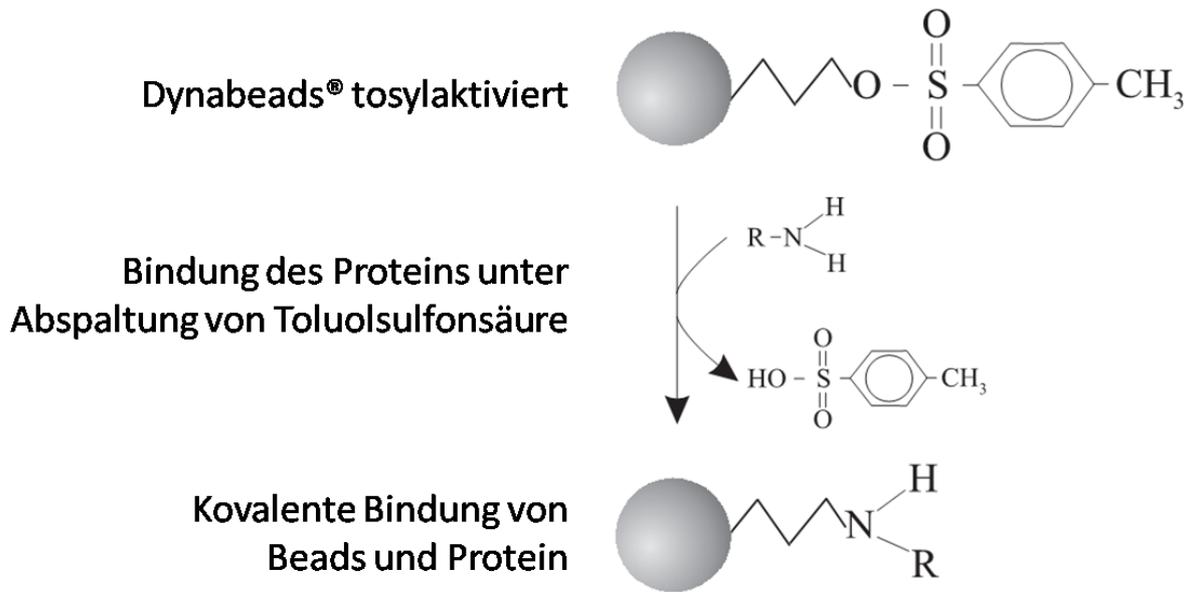
0,1 % BSA in PBS

Um Proteine aufzureinigen, kann man beispielsweise eine Immunpräzipitation oder Affinitätspräzipitation durchführen. Die Affinitätspräzipitation ist eine molekularbiologische Methode, um ein bestimmtes Antigen, z.B. ein Protein, aus einer großen Zahl von Antigenen einer Lösung *in vitro* zu isolieren. Dabei ist ein Antikörper an ein festes Substrat gekoppelt. Der jeweilige Antikörper bindet spezifisch über seine Affinität das entsprechende Antigen.

In dieser Arbeit werden für die Aufreinigung von polysialylierten Proteinen tosylaktivierte magnetische *beads* (Kügelchen) verwendet. Diese besitzen an ihrer Oberfläche Tosylgruppen, die eine kovalente Bindung eines Proteins über eine primäre Amino- oder Sulfhydrylgruppe unter Abspaltung von Toluolsulfonsäure ermöglichen (Abbildung 4.2). Statt eines Antikörpers wurde in dieser Arbeit inaktivierte EndoN verwendet. Diese besitzt neben dem inaktivierten aktiven Zentrum zur Spaltung von  $\alpha$ 2,8-verknüpfter PolySia hoch spezifische Bindungsdomänen.

Die magnetischen Eigenschaften der *beads* macht man sich zunutze, indem man mittels eines Magneten die sich in einer Lösung befindlichen *beads* von dieser trennt. Die im Folgenden genannten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Probe.

Die *beads* werden im Originalgefäß resuspendiert und 335  $\mu$ L (10 mg) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Anlagerung des Magneten kann der Überstand entnommen werden. Die *beads* werden zwei Mal in Puffer B gewaschen (jeweils 1 mL). Für die Ligand-Lösung werden 200  $\mu$ g inaktivierte EndoN mit Puffer B gemischt, sodass es insgesamt 150  $\mu$ L Lösung ergibt. Diese wird zusammen mit 100  $\mu$ L Puffer C zu den *beads* gegeben, sofort resuspendiert und für 12 Stunden bei 37°C unter Bewegung inkubiert.



**Abbildung 4.2 Schema zur Kopplung von Proteinen an tosylaktivierte magnetische *beads***

Entnommen aus Dynabeads® Produktbeschreibung der Firma Invitrogen™

Nach Inkubation werden die *beads* erneut an den Magneten gehalten und nach Abnahme des Überstandes eine weitere Stunde bei 37°C unter Bewegung mit 0,5 % BSA in PBS (Puffer D) inkubiert, um freie EndoN-Moleküle, die unspezifisch reagieren könnten, zu verdrängen. Die inaktivierte EndoN ist nun kovalent an die *beads* gebunden. Abschließend wird noch zweimal mit PBS 0,1 % BSA (Puffer E) gewaschen. EndoN-konjugierte *beads* können mehrfach verwendet und zwischen den Versuchen in Puffer E tiefgefroren werden.

Vor der eigentlichen Affinitätspräzipitation werden die *beads* je zwei Mal in Waschpuffer 1 und 2 gewaschen (jeweils 1 mL). Die folgenden Arbeitsschritte werden unter kontinuierlicher Kühlung im Kühlraum durchgeführt.

Die *beads* werden nun zum entsprechend aufbereiteten Spermienlysat gegeben und über Nacht unter Bewegung (mindestens für 8 Stunden) inkubiert. Nach den jeweils zwei Waschschritten mit den Waschpuffern 1 und 2 erfolgt die Elution, bei der Substrat und inaktivierter EndoN wieder voneinander getrennt werden. Der Elutionspuffer hat dabei einen basischen pH-Wert, wodurch die Bindung von Substrat und inaktivierter EndoN gelöst wird. Die EndoN bleibt jedoch aufgrund der kovalenten Verknüpfung weiter an die *beads* gebunden.

Das gewonnene Eluat wird in ein neues Gefäß überführt, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der SpeedVac trocken gezogen.

## 4.2 *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) als Trennmethode

Die Flüssigkeitschromatographie oder *high-performance liquid chromatography* ist ein analytisches Verfahren der Chemie und Biochemie, mit dessen Hilfe man gelöste Substanzen trennen und anhand von definierten Standards auch identifizieren und quantifizieren kann.

### 4.2.1 C7/C9-Methode nach Sato

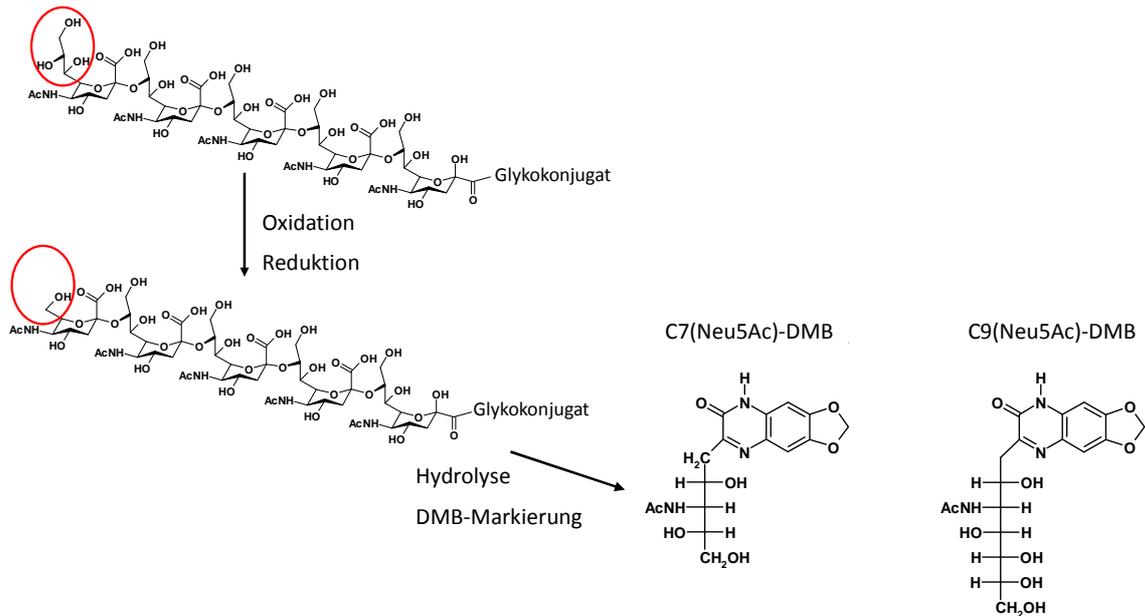
#### DMB-Puffer

18 mM Na-Hydrogensulfit  
1 M Mercaptoethanol  
40 mM TFA

Eine hoch sensitive Methode zur Detektion interner  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Sialinsäurereste ist die C7/C9-Methode nach Sato [Sato *et al.*; 1998]. Weil Sialinsäuren nach heutigem Wissen *in vivo* immer endständig vorkommen, lässt sich so ein Nachweis über Di-, Oligo- und PolySia führen.

Die C7/C9-Methode beinhaltet sowohl eine Oxidation mit Perjodat, eine Reduktion mit Natrium-Borhydrid als auch eine Fluoreszenz-Markierung mit 1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol (DMB), welches spezifisch ans reduzierende Ende von  $\alpha$ -Ketosäuren bindet (Abbildung 4.3).

Unterzieht man Polysialinsäure-Proben einer Perjodat-Oxidation, so führt dies zur Bildung von C7-Körpern am nicht-reduzierenden bzw. terminalen Ende der Kohlenhydratkette, während die internen Sialinsäure-Moleküle C9-Körper bleiben. Anschließend kann das Verhältnis von C7 zu C9 bestimmt werden.



### Abbildung 4.3 C7/C9-Methode nach Sato I

Prinzip der C7/C9-Methode nach Sato: das polysialylierte Glykokonjugat wird oxidiert und reduziert. Dadurch entsteht am nicht-reduzierenden Ende C7-Neu5Ac, während die ketteninternen Neu5Ac-Moleküle weiter ein C9-Gerüst besitzen. Nach Hydrolyse und Fluoreszenz-Markierung können sie mittels HPLC (*high-performance liquid chromatography*) getrennt bestimmt werden. DMB = 1,2-Diamino-4,5-Methylen-Dioxybenzol. Entnommen vom Posterbeitrag: *Detection of Polysialylated Proteins in Mammalian Sperm* von Galuska, S.P. et al., 2010

Die aufbereitete und getrocknete Probe wird in 50  $\mu\text{L}$  40 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 5,5) gelöst, mit 4  $\mu\text{L}$  frisch angesetzter 250 mM Natrium-Metaperjodat-Lösung versetzt und 3 Stunden bei 0°C inkubiert. Die Oxidation wird mit 10  $\mu\text{L}$  Ethylenglycol (3 %) gestoppt. Anschließend wird die Probe mit 64  $\mu\text{L}$  200 mM Natrium-Borhydrid, gelöst in 200 mM Natrium-Boratpuffer (pH 8), versetzt. Die Reduktion erfolgt über Nacht bei 0°C. Am nächsten Tag wird die Probe in der SpeedVac trocken gezogen.

Die getrocknete Probe wird in 200 mL 0,2 N TFA gelöst, 4 Stunden lang bei 80°C hydrolysiert und erneut in der SpeedVac trocken gezogen. Die Fluoreszenz-Markierung erfolgt mit DMB-Reagenz, welches 1:1 mit Aqua bidest verdünnt wird, für 2 Stunden bei 55°C. Die Derivatisierung wird mit 20  $\mu\text{L}$  0,2 M NaOH gestoppt.

Zur Auftrennung wird eine LiChroCART® 250-2 Superspher® 100 *reversed-phase*-Säule von Merck verwendet, die auf 40°C erwärmt wird.

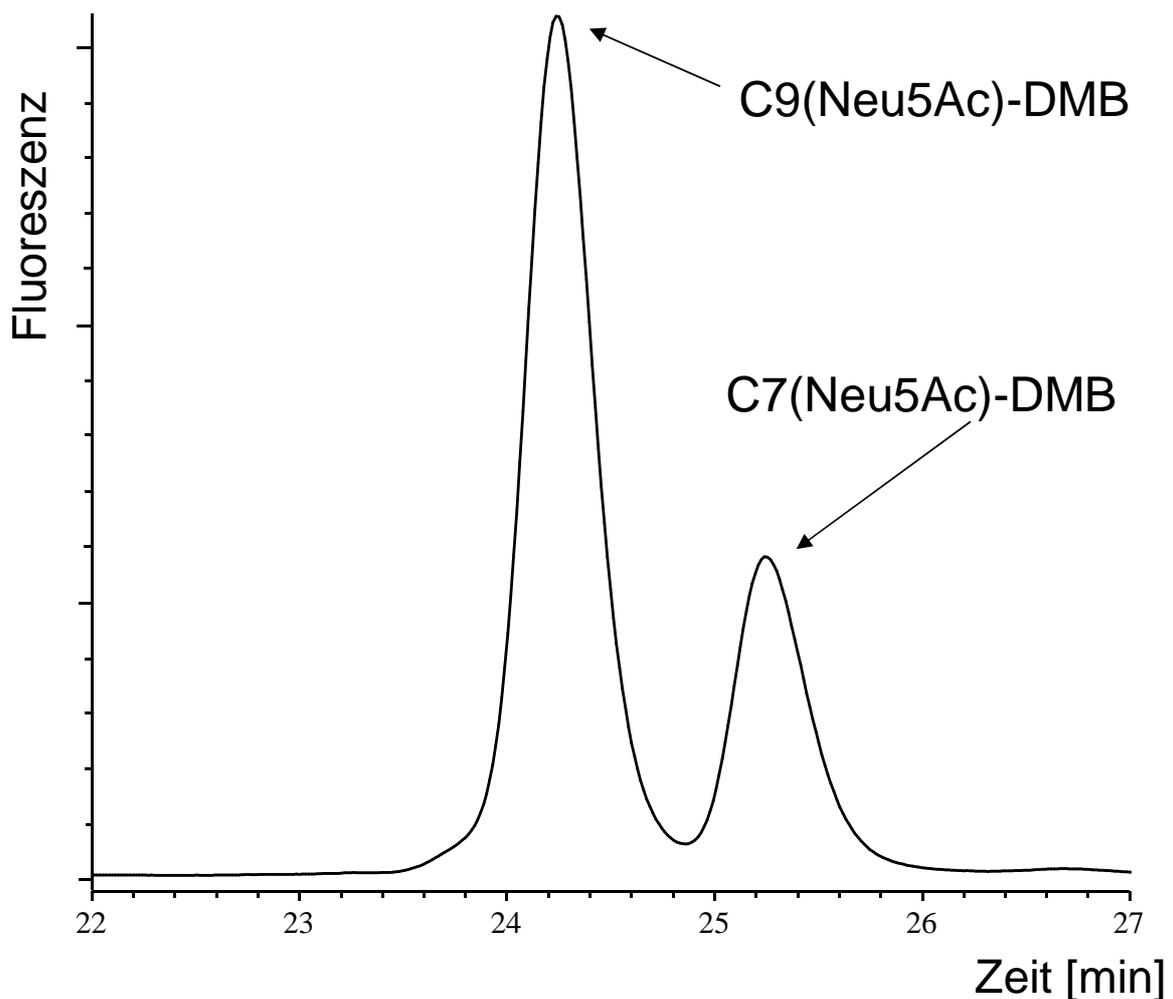
Gemessen wird bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Als Laufmittel (LM) werden verwendet:

LM A: 4 % Acetonitril : 4 % Methanol : 92 % H<sub>2</sub>O und 0,1 % (v/v) TFA

LM B: 45 % Acetonitril : 45 % Methanol : 10 % H<sub>2</sub>O und 0,1 % (v/v) TFA

Die Flussgeschwindigkeit liegt bei 0,25 mL/min. Eluiert wird mit folgendem Gradienten:

T<sub>0 min</sub> = 0 % (v/v) LM B, T<sub>30 min</sub> = 15 % (v/v) LM B. Gewaschen wird die Säule 5 Minuten mit 100 % (v/v) LM B und anschließend 15 Minuten mit 100 % (v/v) LM A.



**Abbildung 4.4 C7/C9-Methode nach Sato II**

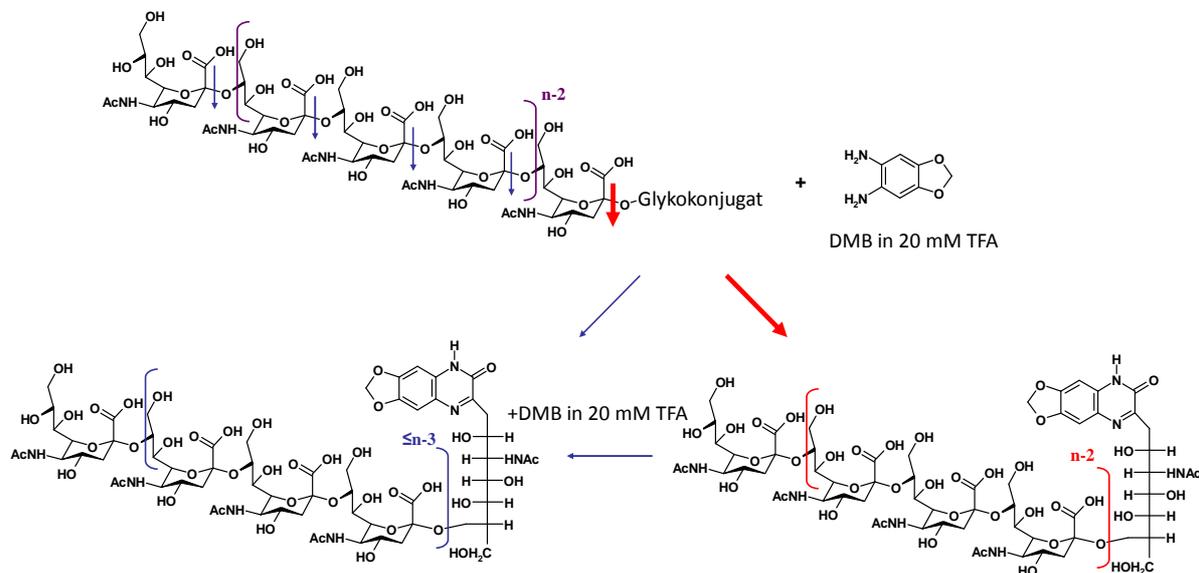
Typische Konfiguration von Oligo- bzw. PolySia bei Bestimmung nach der C7/C9-Methode nach Sato. C9(Neu5Ac)-DMB = ketteninterne Sia-Moleküle; C7(Neu5Ac)-DMB = endständige Sia-Moleküle; DMB = 1,2-Diamino-4,5-Methylen-Dioxybenzol

Im Chromatogramm erscheinen C7-Neu5Ac und C9-Neu5Ac aufgrund der verschiedenen Laufzeiten als zwei direkt aufeinander folgende Signale, wie in Abbildung 4.4 dargestellt.

## 4.2.2 Trennung von PolySia-Ketten nach der Anzahl der enthaltenen Sialinsäureresten

Des Weiteren kann mittels HPLC die Kettenlänge bestimmt werden [Inoue *et al.*; 2001].

Hierbei werden in einer Ein-Topfreaktion die Oligo- und PolySia-Ketten unter sauren Bedingungen vom Glykokonjugat abgespalten und die reduzierenden Enden mit DMB markiert (Abbildung 4.5). Die resultierende DMB-markierte Oligo- und PolySia wird anschließend nach Anzahl der Sialinsäuren mittels Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt, womit nicht nur die Anwesenheit von Oligo- und PolySia nachgewiesen, sondern auch eine Aussage über die Länge der Ketten getroffen werden kann. Unvermeidlich ist bei dieser Methode jedoch die hydrolytische Spaltung interner Sialyl-Verbindungen, die aufgrund der sauren Bedingungen auftritt. Es werden 1,22 mg DMB in 1 mL DMB-Puffer gelöst. PolySia-spezifische Signale erscheinen in regelmäßigem Abstand und spiegeln jeweils die Anzahl an Sialinsäure-Monomeren innerhalb der Kette wieder (Abbildung 4.6).



### Abbildung 4.5 Bestimmung der Kettenlänge I

Prinzip der Kettenlängenbestimmung: Nach Abspaltung vom Glykokonjugat unter sauren Bedingungen wird die PolySia mit DMB markiert. DMB = 1,2-Diamino-4,5-Methylen-Dioxybenzol; TFA = Trifluoressigsäure. Entnommen vom Posterbeitrag: *Detection of Polysialylated Proteins in Mammalian Sperm* von Galuska, S.P. *et al.*, 2010

Die aufbereitete und getrocknete Probe wird im Verhältnis 1:1:1 mit DMB-Reagenz (DMB und DMB-Puffer) und H<sub>2</sub>O versetzt. Die Derivatisierung läuft über

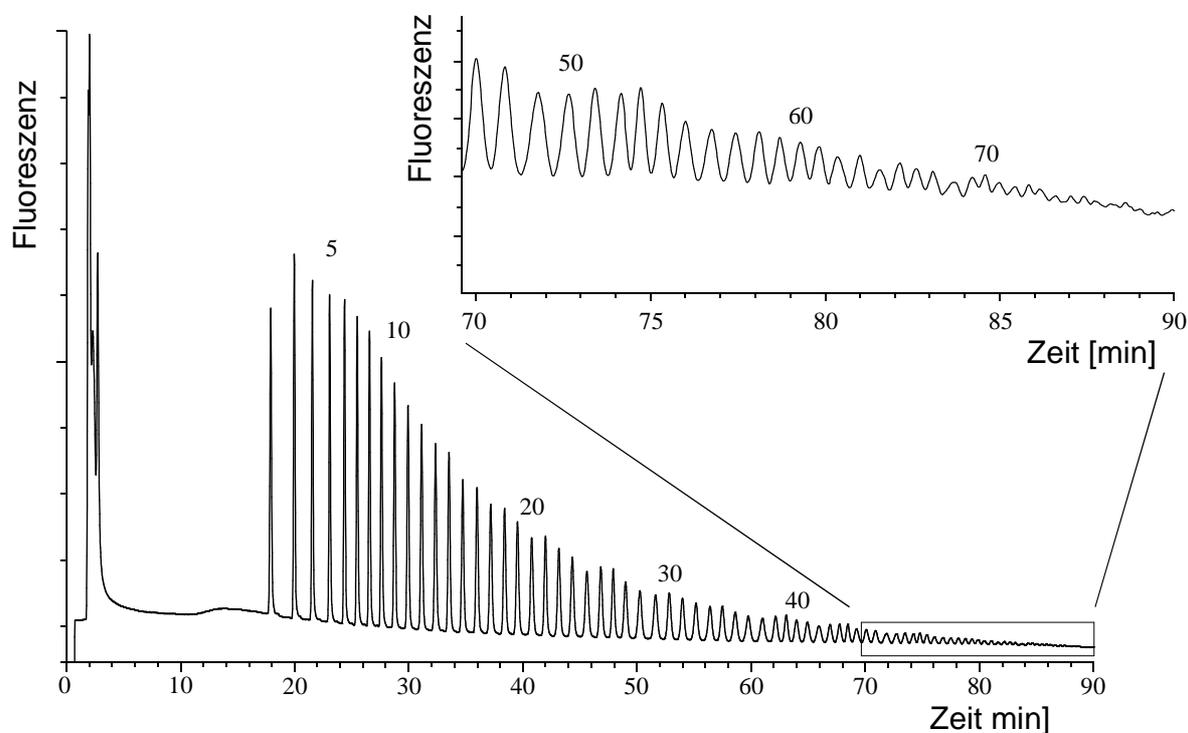
Nacht bei 11°C und wird durch NaOH-Zugabe gestoppt. Durch das alkalische Milieu wird die Laktonisierung gestoppt und rückgängig gemacht.

Die resultierenden Oligo- bzw. PolySia-Derivate werden über eine DNAPac® PA100 Säule von Dionex bei einer Temperatur von 35°C aufgetrennt und bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm detektiert. Als Laufmittel (LM) werden Aqua bidest (LM A) und 4 N Ammoniumacetat-Puffer (LM B) verwendet. Die Flussgeschwindigkeit liegt bei 1 mL/min. Eluiert wird mit folgendem Gradienten:

$T_{0 \text{ min}} = 0 \%$  (v/v) LM B,  $T_{15 \text{ min}} = 8 \%$  (v/v) LM B,  $T_{35 \text{ min}} = 14 \%$  (v/v) LM B,  $T_{115 \text{ min}} = 28 \%$  (v/v) LM B. Gewaschen wird die Säule 10 Minuten mit 100 % (v/v) LM B und anschließend 15 Minuten mit 100 % (v/v) LM A.

Der Standard wird aus einer 10 µg/mL Colominsäure-Standard-Lösung 1:400 (v/v) in verdünntem DMB-Reagenz hergestellt.

Im Chromatogramm erscheinen die PolySia-Ketten, wie in Abbildung 4.6 dargestellt, als eine gleichmäßige Wiederholung von Signalen, wobei das erste Signal gleichzeitig das Auftrags- und MonoSia-Signal ist. Jedes weitere Signal steht für ein weiteres Sia-Molekül der Kette.



**Abbildung 4.6 Bestimmung der Kettenlänge II**

Typische Konfiguration von PolySia bei der Kettenlängenbestimmung: Nach DMB-Markierung erscheinen im HPLC-Chromatogramm nach dem Auftragungssignal bzw. MonoSia-Signal bei etwa 2 Minuten die PolySia-spezifischen Signale in regelmäßigen

Abständen ab Minute 18. Die Anzahl jeweils vorhandener Sialinsäure-Einheiten ist exemplarisch angegeben

## 4.3 Proteinanalytische Methoden

### 4.3.1 Enzymverdau

Der Enzymverdau für die nachfolgend beschriebenen Positiv- und Negativ-Kontrollen läuft über Nacht bei 37°C. Die Vorbehandlung ist im Folgenden jeweils einzeln beschrieben.

#### 4.3.1.1 PolySia-Abbau mit EndoN

Als Negativkontrolle versetzt man die Eluate mit dem Enzym EndoN. Dieses schneidet die PolySia-Kette in maximal Heptamere, so dass der Anti-PolySia-Antikörper 735, der mindestens 8 aufeinanderfolgende *N*-Acetylneuraminsäuren als Erkennungsmotiv benötigt, nicht mehr binden kann. Pro Probe werden 3,2 ng EndoN in 50 µL 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,3 aufgenommen.

#### 4.3.1.2 Abspaltung von *N*-Glykanen mit PNGaseF

Um *N*-Glykane freizusetzen, werden die Proben mit dem Enzym PNGaseF behandelt. Dafür werden die in der SpeedVac getrockneten Proben mit 40 µL Dithiothreitol (DTT) 10 Minuten im Wasserbad bei 100°C aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Anschließend werden 5 µL NP-40-Denaturierungspuffer, 5 µL 0,5 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,3 und 750 U PNGaseF zugegeben.

#### 4.3.1.3 Positiv-Kontrolle

Die Positiv-Kontrolle wird wie die PNGaseF-Kontrolle behandelt mit dem Unterschied, dass kein Enzym zugegeben wird.

### 4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### Sammelgel 3 %

650 µL Acrylamid 40 %  
1,25 mL Tris/HCl, pH 6,8  
50 µL SDS 10 % (w/v)  
3,05 mL H<sub>2</sub>O  
50 µL APS 10 % (w/w)  
5 µL Temed

Angaben für 2 Gele (2 x 8 cm)

### Trenngel 7 %

2,9 mL Acrylamid 40 %

3 mL Tris/HCl, pH 8,8

120 µL SDS 10 %

6 mL Aqua bidest

120 µL APS 10 % (w/w)

12 µL Temed

Angaben für 2 Gele (5 x 8 cm)

### Elektrodenlaufpuffer

50 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS-Lösung

Das Grundprinzip aller elektrophoretischen Trennmethoden beruht auf der Wanderung geladener Moleküle, z.B. Proteine, in einem elektrischen Gleichstromfeld. Die durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten der Moleküle zustande kommende Auftrennung in einzelne Fraktionen erfolgt aufgrund verschiedener Massen- und Ladungseigenschaften [Westermeier; 1990].

Als Trägermaterial für die Elektrophorese wird Polyacrylamid in den Konzentrationen 7 % für das Trenngel und 3 % für das Sammelgel verwendet. Durch den Zusatz des negativ geladenen Detergenzes SDS erhalten alle Proteine proportional zu ihrer Masse die gleiche Ladung: pro 1 g Protein werden 1,4 g SDS gebunden.

Nach Zufügen von APS und Temed zu der vorher wenige Minuten im Ultraschallbad entgasten Trenngel-Lösung wird diese unmittelbar zwischen die eingespannten Glasplatten (7 x 8 cm) gegossen und mit Aqua bidest überschichtet. Nach Polymerisation wird das überschichtende Wasser entfernt, das Sammelgel, welches ebenfalls kurz entgast wurde, sofort nach Zugabe von APS und Temed eingegossen und die Trennkämme eingesetzt.

Die Enzym-behandelten Proben werden 1:1 mit 2fach SDS-Probenpuffer (Laemmli mit 5 % Di-Mercaptoethanol) gemischt, 10 Minuten im Wasserbad bei 100°C aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Pro Spur werden 10 µL Probe aufgegeben.

Nach einer 15-minütigen Focussierungsphase bei niedriger Spannung (50 V) erfolgt die Auftrennung über 60 Minuten bei 130 V.

### 4.3.3 *Western Blot*

#### Transferpuffer

39 mM Glycin  
48 mM Tris  
20 % (v/v) Ethanol  
0,02 % (w/v) SDS-Lösung

#### Phosphat Buffered Saline mit Tween-20 (PBS-T)

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,05 % (v/v) Tween-20

Unmittelbar nach Durchführung der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Protein-bindende Membran. Bei der Auswahl des Membranmaterials haben sich unter anderem Nitrocellulose und Polyvinylidendifluorid (PVDF) bewährt. PVDF-Membranen zeichnen sich durch eine sehr hohe Proteinbindungskapazität, eine hohe Reißfestigkeit und ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis bei Verwendung von Chemilumineszenz-Detektionssystemen aus. Der Transfer erfolgt senkrecht zur Trennrichtung der Gelelektrophorese, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran genau dem Trennmuster des Gels entspricht. Durch Anlegen einer Spannung werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran überführt.

In Rahmen dieser Arbeit wird zum elektrophoretischen Transfer ausschließlich das *semi dry* Verfahren angewendet, welches gleichberechtigt neben dem *wet* – oder *tank blot* existiert. Die Proteine werden auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Blotapparatur, bestehend aus zwei horizontal, parallel liegenden Kohlenstoffelektroden, wird vor dem Transfer mit Transferpuffer äquilibriert. Die verwendeten PVDF-Membranen werden vor dem Transfer in 100 % Methanol und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Die Reihenfolge der verschiedenen übereinander geschichteten Bestandteile von der Anode zur Kathode lautet wie folgt: *Whatman*-Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, *Whatman*-Filterpapier. Die einzelnen Lagen werden auf die gleiche Größe zugeschnitten, in Transferpuffer geschwenkt und luftblasenfrei übereinander geschichtet. Geblottet wird bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> Blotpapier über 90 Minuten.

#### 4.3.4 Immunfärbung und Entwicklung von *Western Blots*

Direkt im Anschluss an den *western blot* wird die Membran in Blockpuffer (Roti®-Block) überführt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Geblockt wird 2 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C. Anschließend folgt eine dreimalige Waschung (jeweils 10 Minuten) mit Roti®-Block und die Inkubation mit dem in Roti®-Block verdünnten Primärantikörper (Anti-PolySia 1:2000) über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Membran erneut dreimal mit Roti®-Block (jeweils 10 Minuten) gewaschen. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Ziege/Anti-Maus) wird 1:5000 in Roti®-Block verdünnt und auf die Membran gegeben. Inkubationszeit der Membran mit dem Sekundärantikörper ist 60 Minuten bei Raumtemperatur. Danach erfolgen drei Waschungen mit Roti®-Block und zwei mit PBS-T (jeweils 10 Minuten). Alle bis hierhin in diesem Abschnitt geschilderten Arbeitsschritte werden unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgen unter Rotlicht im Fotolabor:

Die Chemilumineszenz Lösung wird frisch aus den beiden Teillösungen im Verhältnis 1:1 hergestellt und 5 Minuten auf die Membran gegeben. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase kommt es zu einer chemischen Reaktion mit dem Chemilumineszenz, bei der Energie in Form von Licht frei wird. Die Membran wird sofort auf einen Chemilumineszenz-Detektions-Film gelegt, je nach Ergebnis unterschiedlich lang belichtet und entwickelt.

#### 4.4 Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbung von Spermien

##### Phosphat Buffered Saline (PBS) mit BSA

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,1 % / 2 % (w/v) BSA

##### Phosphat Buffered Saline (PBS) mit Formaldehyd

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2 % (v/v) Formaldehyd

Als effektivste Methode zur Visualisierung der PolySia-Lokalisation am Spermium hat sich im Laufe der Arbeit die Immunfluoreszenz-Färbung in Lösung erwiesen. Das frische native Sperma wird zwei Mal in PBS gewaschen, d.h. es wird jeweils in 1 mL PBS aufgenommen, mit der Pipette vorsichtig suspendiert und 5 Minuten bei 700 g abzentrifugiert. Anschließend wird das gewaschene Sperma in 100  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Zur Fixierung werden 100  $\mu\text{L}$  2 % Formaldehyd in PBS ohne BSA zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Um die Morphologie der Spermien möglichst gut zu erhalten, werden die oben beschriebenen Fixierungsschritte bei 37°C durchgeführt.

Die Fixierung wird durch Zugabe von 1 mL 4°C kaltem PBS 0,1 % BSA gestoppt. Es folgen 3 Waschschrte mit PBS 0,1 % BSA bei Raumtemperatur nach dem bereits beschriebenen Verfahren. Geblockt wird 2 Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur mit PBS 2 % BSA, worauf erneut 3 Waschungen mit PBS 0,1 % BSA folgen.

Alle weiteren Schritte werden in Zentrifugier-Filter-Gefäßen (Amicon®) mit hydrophilen Durapore® PVDF 0,1  $\mu\text{m}$  Filtern durchgeführt. Dazu wird die Probe in mehrere Amicon®-Gefäße aufgeteilt. Durch Zentrifugation der Zentrifugier-Filter-Gefäße mit 700 g werden Flüssigkeit und kleine Moleküle durch die Membran gedrückt und die größeren Bestandteile, in diesem Fall ab einem Mindestdurchmesser von 0,1  $\mu\text{m}$ , bleiben zurück.

Als Negativ-Kontrolle wird eine Probe mit EndoN 1:100 in PBS 0,1 % BSA 4 Stunden bei 37°C verdaut. Die Positiv-Kontrolle wird 4 Stunden in PBS 0,1 % BSA bei 37°C inkubiert. Als Zwischenschritt werden alle Proben einmal mit PBS 0,1 % BSA gewaschen. Der in PBS 0,1 % BSA verdünnte Primärantikörper (Anti-PolySia 1:200) wird auf Positiv- und Negativ-Kontrollen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben werden dreimal in PBS 0,1 % BSA gewaschen und anschließend 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus, FITC-konjugiert 1:200) in PBS 0,1 % BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wird erneut dreimal gewaschen (PBS 0,1 % BSA) und in 100  $\mu\text{L}$  pro Aliquot resuspendiert.

Pro Objektträger werden 10 µL Spermienlösung aufgegeben. Eingedeckelt wird ebenfalls mit Vectashield® *mounting medium* inklusive DAPI und die Deckgläschen werden mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

DAPI wird bei einer Lichtwellenlänge von 360 nm zum Fluoreszieren angeregt und bei 460 nm gemessen. Die Anregungswellenlänge von FITC liegt bei 492 nm, die Emission bei 520 nm. Bei Rhodamin Red<sup>TM</sup>-X erfolgt die Anregung bei 570 nm und die Emission 590 nm.

Ausgewertet werden die immungefärbten Spermien-Bilder an einem Leica DMR Fluoreszenz-Mikroskop. Die Bilder werden als Graustufen-Bilder mit einer RT Slide Kamera von Diagnostic Instruments aufgezeichnet und mit MetaMorph® 7.0 von Universal Imaging gefärbt und nachbearbeitet.

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und wenn ja wo PolySia auf Spermatozoen von Säugetieren präsent ist. Die grundsätzliche Vorgehensweise bestand zunächst in der Etablierung und Optimierung der jeweiligen analytischen Techniken unter Verwendung von bovinem Sperma, da hier im Vergleich zu menschlichem Probenmaterial größere Mengen zur Verfügung standen. Anschließend wurden die etablierten Verfahren auf menschliches Sperma angewandt und so die bereits erzielten Ergebnisse überprüft und komplettiert.

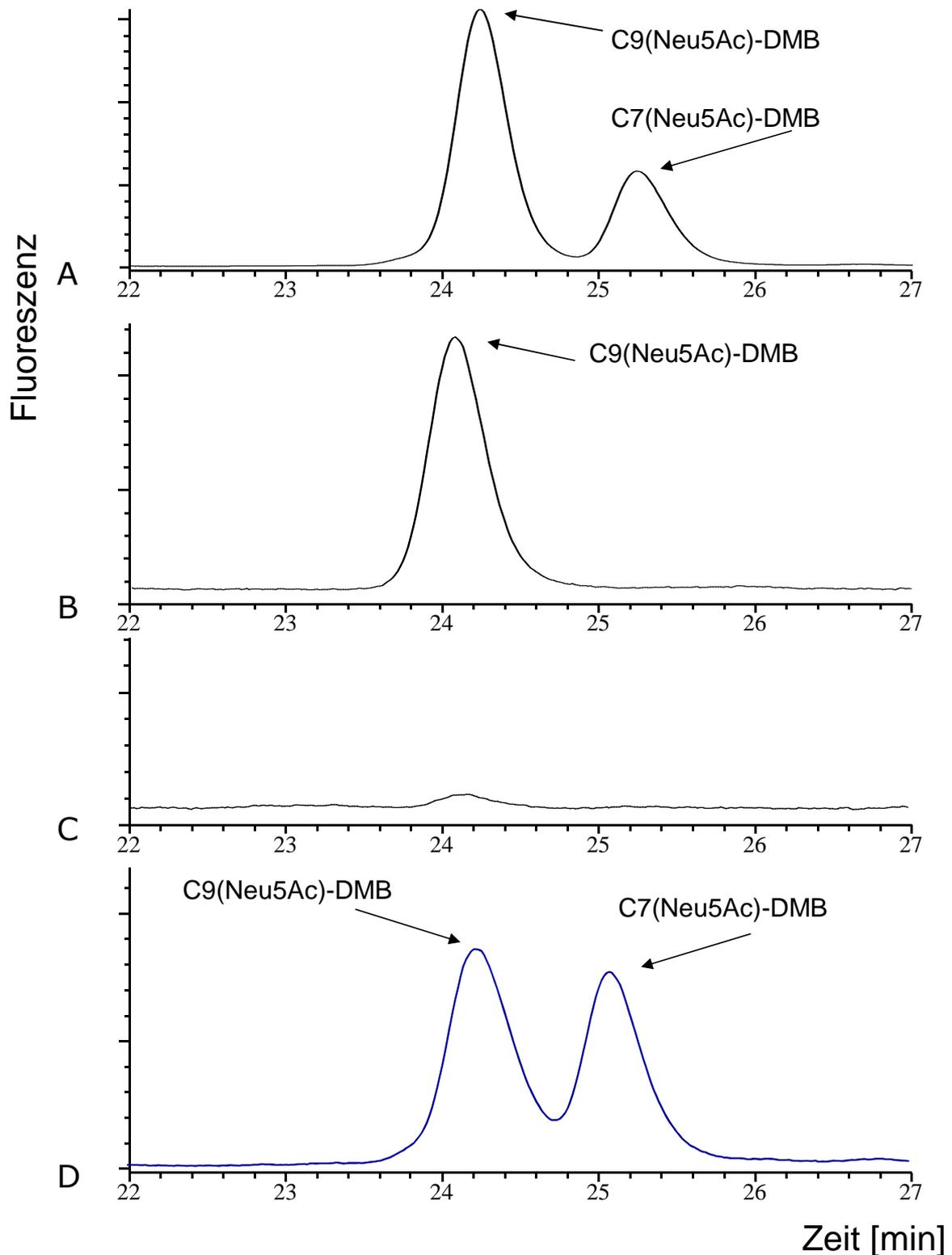
### 5.1 Nachweis interner Sialinsäurereste mit der C7/C9-Methode

Mit der C7/C9-Methode nach Sato lässt sich ein Nachweis über interne Sialinsäurereste führen [Sato *et al.*; 1998]. Diese Methode gibt erste Hinweise auf das Vorliegen von Oligo- oder PolySia, jedoch würden auch Di- und Trimere ein positives Ergebnis erbringen. Über die mögliche Länge der Sialinsäurepolymere lässt sich mit dieser Methode also keine Aussage treffen. Durch Oxidation und Reduktion werden die terminalen Sialinsäure-Moleküle in einen C7-Körper überführt, während die internen Sialinsäurereste durch die  $\alpha$ 2,8-Verknüpfung nicht oxidiert werden und so weiterhin als C9-Körper vorliegen. Hierfür ist es notwendig, dass zwei direkt benachbarte Hydroxylgruppen vorhanden sind. Nach Hydrolyse werden die Sialinsäurereste mit DMB fluoreszenzmarkiert. Nun kann man mittels HPLC über eine *reversed-phase*-Säule das Verhältnis von C7- zu C9-Derivate bestimmen.

Zur besseren Unterscheidbarkeit sind die generierten Chromatogramme im Folgenden farblich unterschieden: bovine Proben sind blau, humane Proben orange und alle Standards schwarz dargestellt.

#### 5.1.1 C7/C9-Analyse von bovinen Spermien

Zunächst war von Interesse, ob überhaupt interne Sialinsäurereste im Ejakulat vorkommen. Dazu wurde das Ejakulat zunächst in Wasser verdünnt und mit dem Ultraschallstab homogenisiert.



**Abbildung 5.1 C7/C9-HPLC-Analyse von bovinen Spermien I**

Bestimmung ketteninterner Sia-Moleküle nach der C7/C9-Methode. Zur Bestimmung der Retentionszeiten von C7- und C9(Neu5Ac)-DMB wurde OligoSia verwendet (A). Darüber hinaus wurde Neu5Ac vor (B) sowie nach (C) vorhergehender Oxidierung und Reduktion mit DMB markiert. Bestimmung ketteninterner Sia-Moleküle von bovinem Gesamtejakulat nach Lyse und Aceton-Fällung (D).

Anschließend wurden die Proteine aus dem Flüssigkeitsgemisch mit Hilfe von Aceton ausgefällt und im Lyophilisator getrocknet. Nach Oxidation und Reduktion sowie Hydrolyse der Kette, wurden die Sialinsäuren mit DMB fluoreszenzmarkiert und per *reversed-phase*-HPLC aufgetrennt.

Als Standard wurde unter anderem OligoSia verwendet. In Abbildung 5.1A ist das aufgenommene Chromatogramm der resultierenden Reaktionsprodukte nach Oxidation, Reduzierung, Hydrolyse sowie abschließender Fluoreszenzmarkierung zu sehen. Wie erwartet waren zwei Signale (C9(Neu5Ac)-DMB und C7(Neu5Ac)-DMB) visualisierbar. Da mehr interne als terminale Neu5Ac-Reste in einem Oligomer vorhanden sind, war die Signalintensität von C9(Neu5Ac)-DMB höher als die von C7(Neu5Ac) (Abbildung 5.1A). Abbildung 5.1B zeigt das zu DMB-Neu5Ac gehörige Chromatogramm. DMB-Neu5Ac diente zur Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung und zudem zur Bestimmung der Retentionszeit von DMB-Neu5Ac (entsprechend C9(Neu5Ac)-DMB). Neu5Ac wurde außerdem als Reduktionskontrolle genutzt. Hierfür wurde diese parallel zur Probe mit oxidiert und reduziert. Durch die Reduktion wird die Ketogruppe in eine Hydroxylgruppe überführt. Da für die DMB-Derivatisierung sowohl die Carboxylgruppe als auch die Ketogruppe nötig sind, war, wie in Abbildung 5.1C dargestellt, nahezu kein zugehöriges Fluoreszenzsignal detektierbar. Das nach zusätzlicher Vergrößerung schwache Signal ist darauf zurückzuführen, dass die Reduktion und Oxidation nicht vollständig abgelaufen sind. Dies zeigt, dass es wichtig ist, immer solch eine Kontrolle parallel zur Probe laufen zu lassen, um den Anteil an Hintergrund vom tatsächlichen Signal unterscheiden zu können.

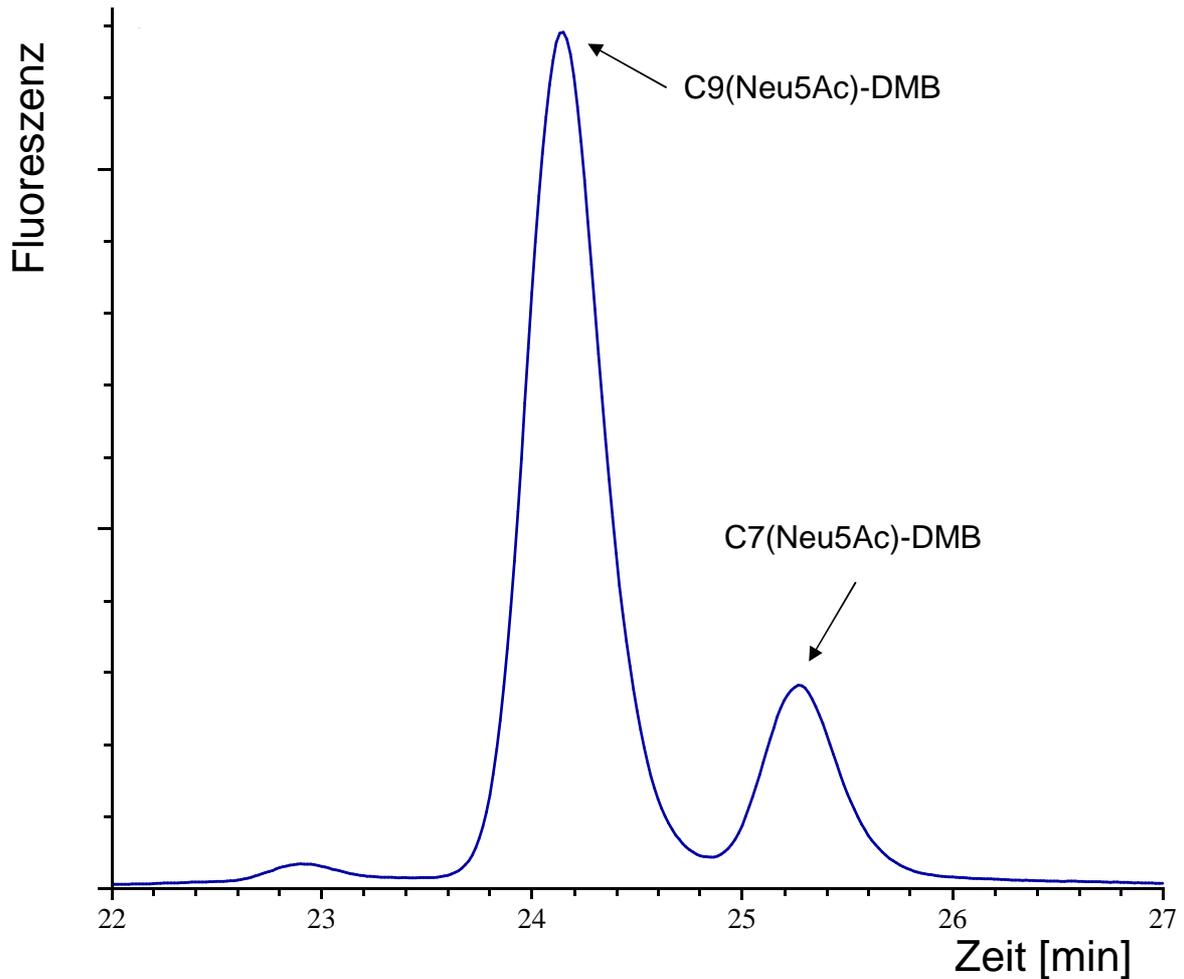
Die Anwendung der C7/C9-Methode führte bei den bovinen Ejakulatproben sowohl zu C9(Neu5Ac)-DMB als auch C7(Neu5Ac)-DMB (Abbildung 5.1D). Beide Signale hatten etwa vergleichbare Signalintensitäten. Somit kommen an Glykoproteinen im Ejakulat von Bullen nachweislich interne Sialinsäuren vor.

Als Nächstes war es von Interesse, ob die detektierten internen Sialinsäuren auf Glykoproteinen von Spermien vorkommen oder von Glykoproteinen im löslichen Teil des Ejakulates stammen. Um die Spermien von den restlichen Bestandteilen des Ejakulates zu trennen, wurde die *swim-up*-Prozedur angewendet, bei der das frische unbehandelte Sperma vorsichtig unter warmes TALP-Medium geschichtet wird. Die beweglichen Spermien schwimmen daraufhin ins TALP-Medium ein und

können dort als Überstand abgenommen werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die internen Neu5Ac-Reste unter anderem Bestandteil von Oligo/PolySia sind. Aus diesem Grund sollten nur oligo/polysialylierte Glykoproteine isoliert werden. Dafür wurden die mittels *swim-up* gewonnenen Spermien zunächst in Lysepuffer lysiert und mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Auf eine Acetonfällung wurde bei diesem Versuchsansatz verzichtet. Zur Aufreinigung wurden mittels Affinitätspräzipitation, bei der inaktivierte EndoN an magnetische *beads* (Kügelchen) gebunden ist, oligo/polysialylierte Glykoproteine isoliert. Inaktivierte EndoN ist noch in der Lage Oligo/PolySia (Kettenlänge  $\geq 5$  Sialinsäurereste) zu binden, kann diese aber nicht mehr aufspalten. Nach mehreren Waschschritten wurde die Bindung von PolySia und inaktivierter EndoN im basischen Milieu gelöst, während die inaktivierte EndoN durch kovalente Kopplung an die *beads* gebunden blieb.

Die Bestandteile des auf diese Weise gewonnenen Eluats wurden wie bereits beschrieben oxidiert und reduziert und einer sauren Hydrolyse unterzogen. Anschließend wurden die Sialinsäuren mit DMB fluoreszenzmarkiert und per *reversed-phase*-HPLC aufgetrennt.

Auch hier war der Nachweis, dass im Ejakulat interne Sialinsäurereste vorkommen, eindeutig positiv, da sowohl das C7(Neu5Ac)- als auch der C9(Neu5Ac)-Signal vorhanden waren (Abbildung 5.2). Durch die vorangegangene Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation konnte zudem indirekt nachgewiesen werden, dass die internen Sialinsäuren von einem  $\alpha 2,8$ -verknüpften Sialinsäurepolymer mit mindestens 5 Sialinsäureresten stammen, da – wie bereits erwähnt – EndoN eine Kettenlänge von mindestens 5 Sialinsäureresten für eine Bindung benötigt [Haselhorst *et al.*; 2006].



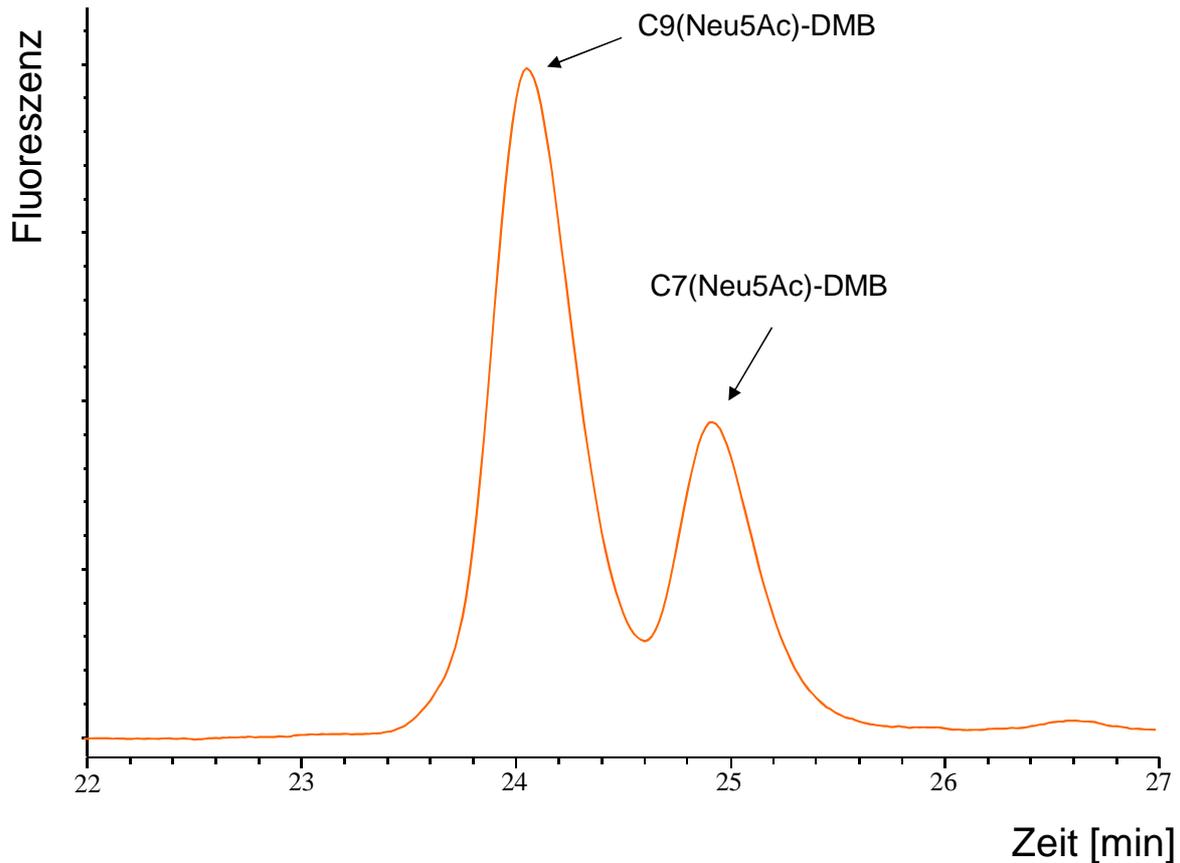
**Abbildung 5.2 C7/C9-HPLC-Analyse von bovinen Spermien II**

Bestimmung ketteninterner Sia-Moleküle nach der C7/C9-Methode von bovinen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation (inaktivierte EndoN gebunden an magnetische *beads*)

5.1.2 C7/C9-Analyse von humanen Spermien

Nach Etablierung der Methodik mit Hilfe boviner Spermien war es von Interesse, ob es bei humanem Sperma ebenfalls Hinweise auf das Vorliegen von Oligo- oder PolySia gibt.

Zunächst wurde das gesamte Ejakulat lysiert. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe von Aceton ausgefällt und das Präzipitat nach Lyophilisation mit DMB fluoreszenzmarkiert.



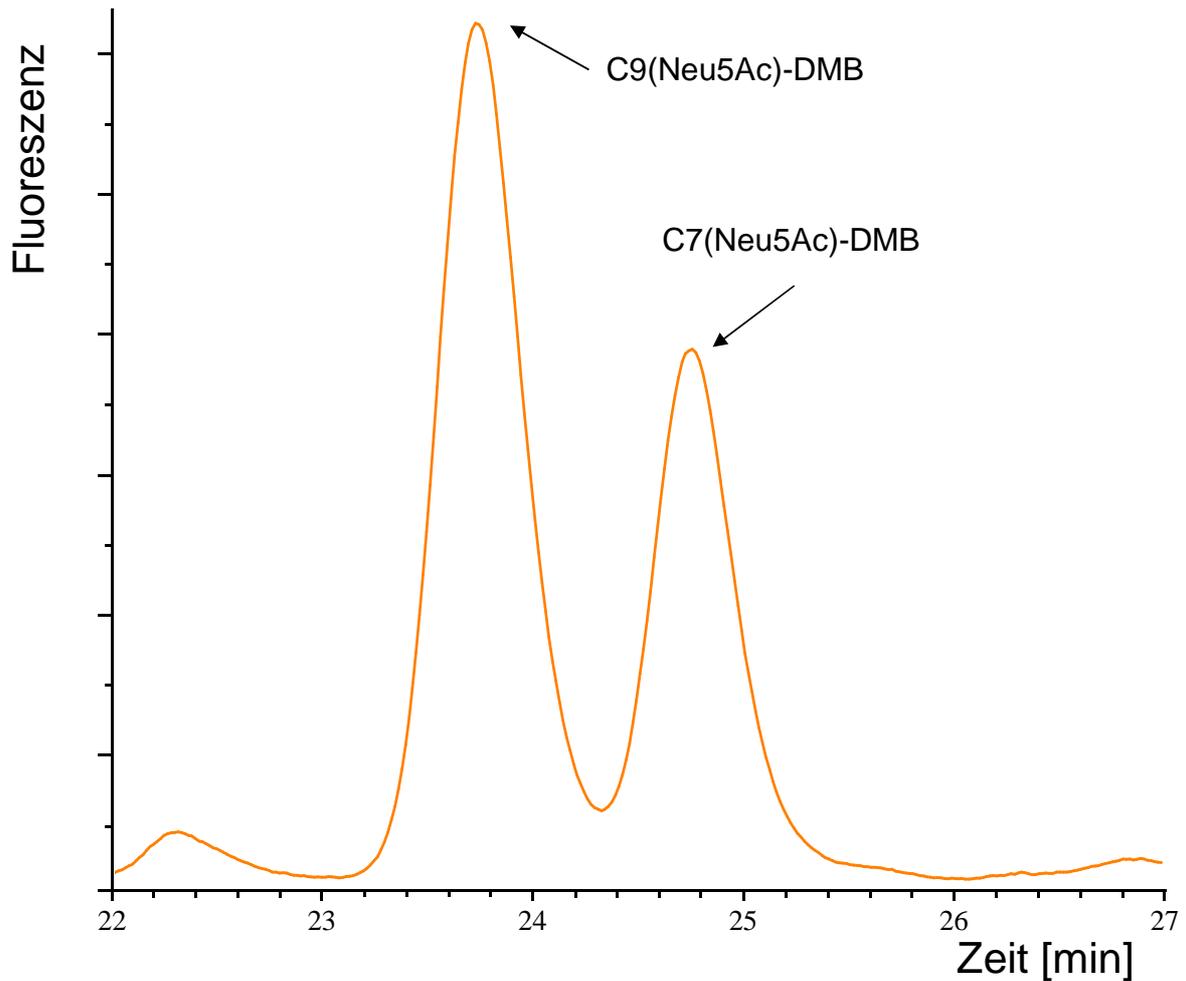
**Abbildung 5.3 C7/C9-HPLC-Analyse von humanen Spermien I**

Bestimmung ketteninterner Sia-Moleküle nach der C7/C9-Methode von humanem Gesamtejakulat nach Lyse und Aceton-Fällung (vgl. Figure 1A in [Simon *et al.*; 2013])

Analog zu den Ergebnissen der C7/C9-Analyse von bovinen Ejakulatproben waren auch in menschlichem Sperma Sialinsäurereste, die innerhalb eines Di-, Oligo- oder Polymers aus Neu5Ac-Resten liegen, nachweisbar (Abbildung 5.3). Im direkten Vergleich mit dem C7/C9-Lauf aus Abbildung 5.1D fällt auf, dass der Unterschied von C9(Neu5Ac) zu C7(Neu5Ac) größer ist.

Um auch hier zu überprüfen, ob die internen Sialinsäuren zumindest anteilsweise aus Neu5Ac-Polymeren von Spermien stammen, wurde der Versuchsablauf auch hier um *swim-up*, Lyse mit Lysepuffer und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation erweitert. Anschließend wurde das Eluat für die C7/C9-Analyse verwendet (Abbildung 5.4).

Wie bei allen vorangegangenen Versuchen, sind auch hier deutlich C7(Neu5Ac)- und C9(Neu5Ac)-Signal zu erkennen.



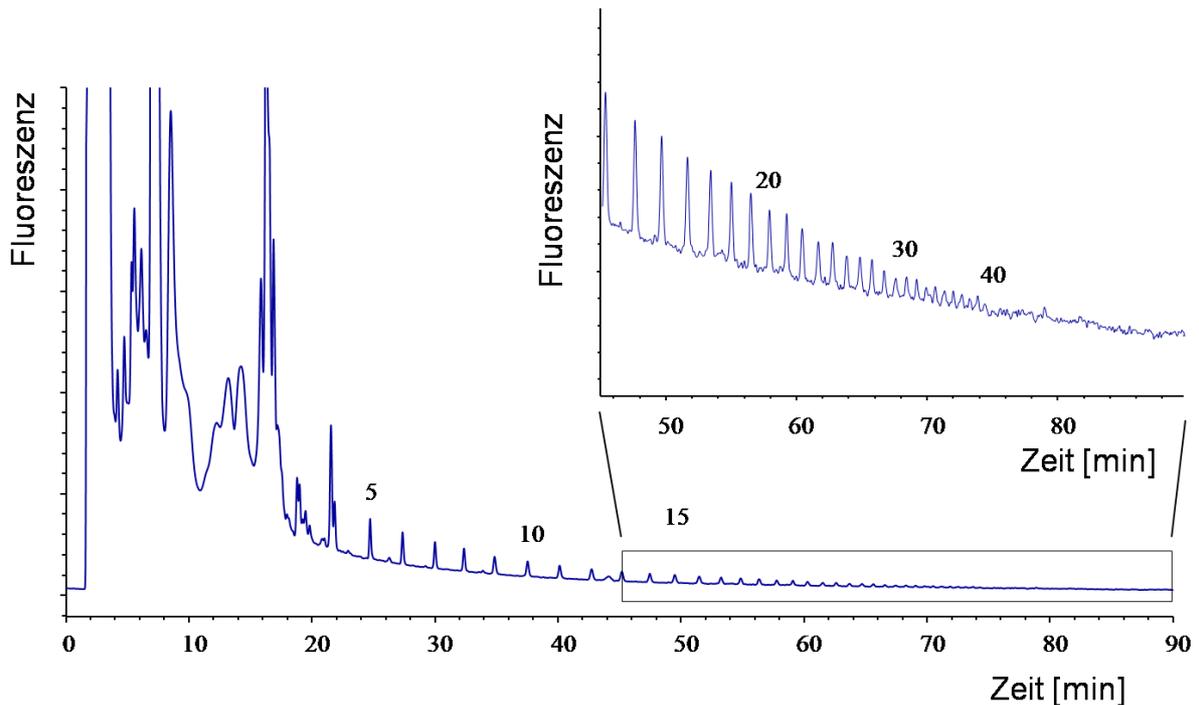
**Abbildung 5.4 C7/C9-HPLC-Analyse von humanen Spermien II**  
Bestimmung ketteninterner Sia-Moleküle nach der C7/C9-Methode von humanen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation

## 5.2 Bestimmung der Kettenlängen

Nach dem erfolgreichen Nachweis von internen Sialinsäureresten vorhandener Neu5Ac-Polymere mit der C7/C9-Methode sollte darüber hinaus - ebenfalls mittels HPLC - die Länge der PolySia-Ketten ermittelt werden. Hierzu wurden die PolySia-Ketten unter schwach sauren Bedingungen abgespalten und am reduzierenden Ende in einer Ein-Topf-Reaktion mit DMB fluoreszenzmarkiert. Die DMB-markierten Sialinsäureketten wurden auf einer Anionenaustauscher-Säule getrennt.

### 5.2.1 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien

Zunächst wurde die „Kettenlängen-Bestimmung“ aus nativem bovinem Sperma durchgeführt, welches erst in Wasser lysiert und mit dem Ultraschallstab homogenisiert wurde, um die Zellen aufzubrechen. Anschließend wurde eine Acetonfällung durchgeführt, um die Proteine zu präzipitieren. Die Fluoreszenz-Markierung erfolgte mit DMB.



**Abbildung 5.5 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien I**

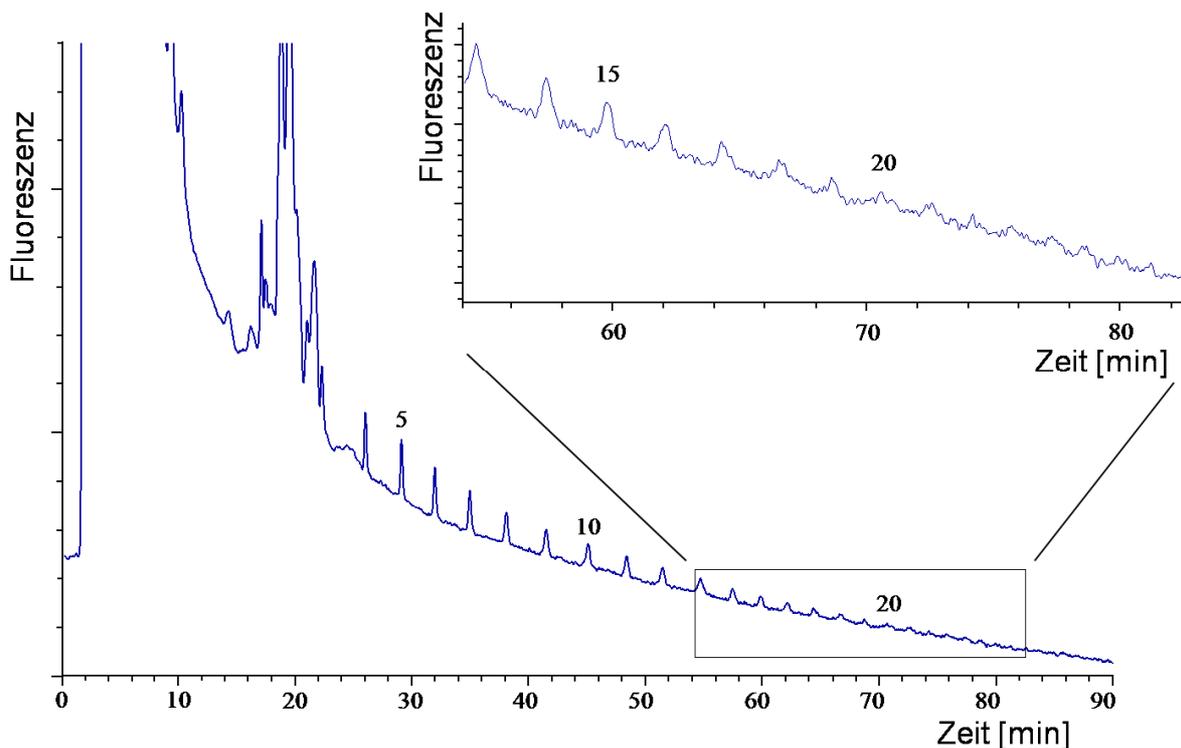
Natives bovines Sperma wurde mit Ultraschall homogenisiert. Polysialylierte Bestandteile wurden mit Aceton gefällt und der DMB-HPLC-Analyse zugeführt. Die Anzahl vorhandener Sialinsäure-Einheiten ist exemplarisch angegeben

Das erste Signal nach zwei Minuten ist das sogenannte Auftragungssignal, welches auch DMB-Sia-Monomere enthält. Darauf folgt ein auf Verunreinigungen zurückzuführendes Rauschen mit unspezifischen Signalen. Aufgrund der im Vergleich zu den PolySia-Signalen deutlich größeren Amplituden der unspezifischen Signale sind letztere der Übersichtlichkeit halber nicht vollständig dargestellt.

Eindeutige PolySia-spezifische Signale treten ab einer Elutionszeit von ca. Minute 24 in regelmäßigen periodischen Abständen mit abnehmender Amplitude auf. Dabei steht jedes nachfolgende Signal für die Verlängerung um einen weiteren Sialinsäurerest in der PolySia-Kette. Mit jedem Sialinsäurerest steigt die

Bindungsfähigkeit von PolySia an die Säule, so dass es einer immer größeren Menge an Natriumacetat bedarf, die PolySia-Kette von der Säule zu eluieren. PolySia enthält *per definitionem* mindestens 8 Sialinsäuremoleküle. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand von Colominsäure, die als Standard fungierte. Nach durchgeführter DMB-Derivatisierung und anschließender HPLC-Trennung konnten bei entsprechender Vergrößerung Sialinsäurepolymere mit mehr als 40 enthaltenen Resten nachgewiesen werden (Abbildung 5.5).

Beim im Folgenden gezeigten Lauf wurde die Acetonfällung durch eine Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation ersetzt (Abbildung 5.6). Die Lyse wurde entsprechend mit Lysepuffer durchgeführt. Auf eine *swim-up*-Aufarbeitung wurde zunächst verzichtet.



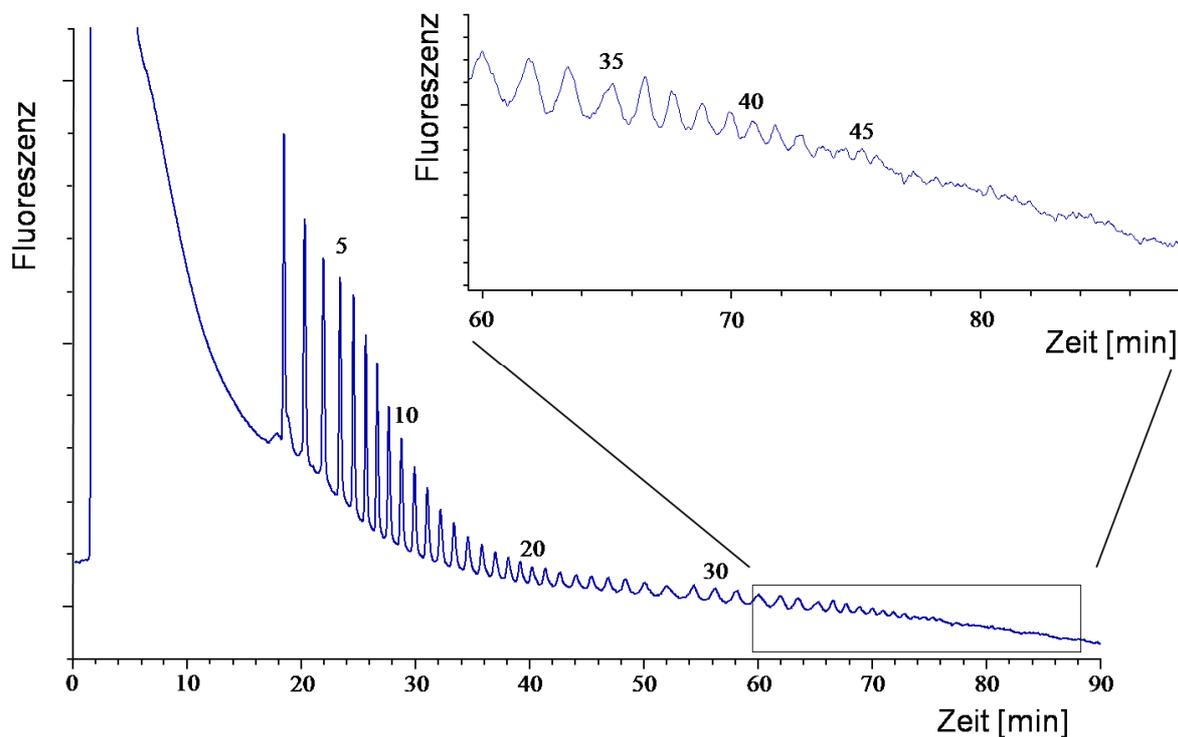
**Abbildung 5.6 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien II**

Natives bovines Sperma wurde nach Inkubation mit Lysepuffer und Anreicherung polysialylierter Bestandteile mittels Affinitätspräzipitation einer DMB-HPLC-Analyse zugeführt. Die Anzahl jeweils vorhandener Sialinsäure-Einheiten ist exemplarisch angegeben

Auch hier sind MonoSia-Signal und unspezifische auf Verunreinigung beruhende Signale nicht vollständig abgebildet. Eindeutige Signale für Oligo/PolySia-Derivate waren erst ab Minute 26 (Neu5Ac-Tetramer) erkennbar. Die weiteren

Signale folgten in der typischen periodischen Reihenfolge. Die hier bestimmbaren Kettenlängen umfassen etwa 27 Neu5Ac-Einheiten.

Um auch bei der Bestimmung der Kettenlängen die Herkunft der PolySia besser eingrenzen zu können, wurden die Spermien vor der Lyse mittels *swim-up* von den übrigen Bestandteilen getrennt. Es folgten Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation und DMB-Markierung. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.7 zu sehen.



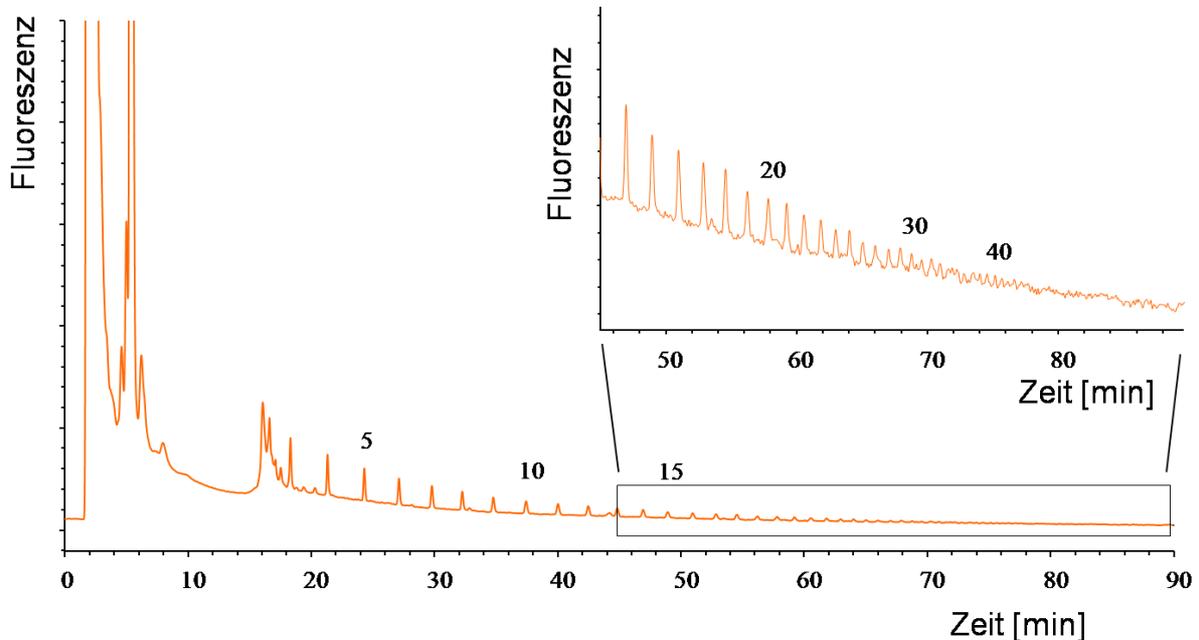
**Abbildung 5.7 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien III**

Die Analyse mittels HPLC des bovinen Probenmaterials erfolgte nach *swim-up*-Prozedur, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation. Die jeweiligen Sialinsäure-Einheiten sind exemplarisch angegeben

Im in Abbildung 5.7 gezeigten Lauf sind keine Artefakte nach dem Signal von DMB-Neu5Ac zu sehen. MonoSia-Signal und Auftragungssignal sind nicht komplett abgebildet. Ab Minute 18 waren wiederum die in regelmäßiger Reihenfolge erscheinenden PolySia-Signale sichtbar. Die auf die Säule aufgebene Probenmenge erlaubte hier den Nachweis von Polymeren mit mindestens 45 Sialinsäure-Resten. Damit wurde eindeutig nachgewiesen, dass PolySia auf bovinen Spermien vorkommt.

### 5.2.2 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien

Um die Methode auch für humane Spermien zu etablieren, wurde menschliches Ejakulat zunächst mit Wasser verdünnt und lysiert. Enthaltene Proteine wurden mit Aceton ausgefällt und einer DMB-HPLC-Analyse zugeführt (Abbildung 5.8).

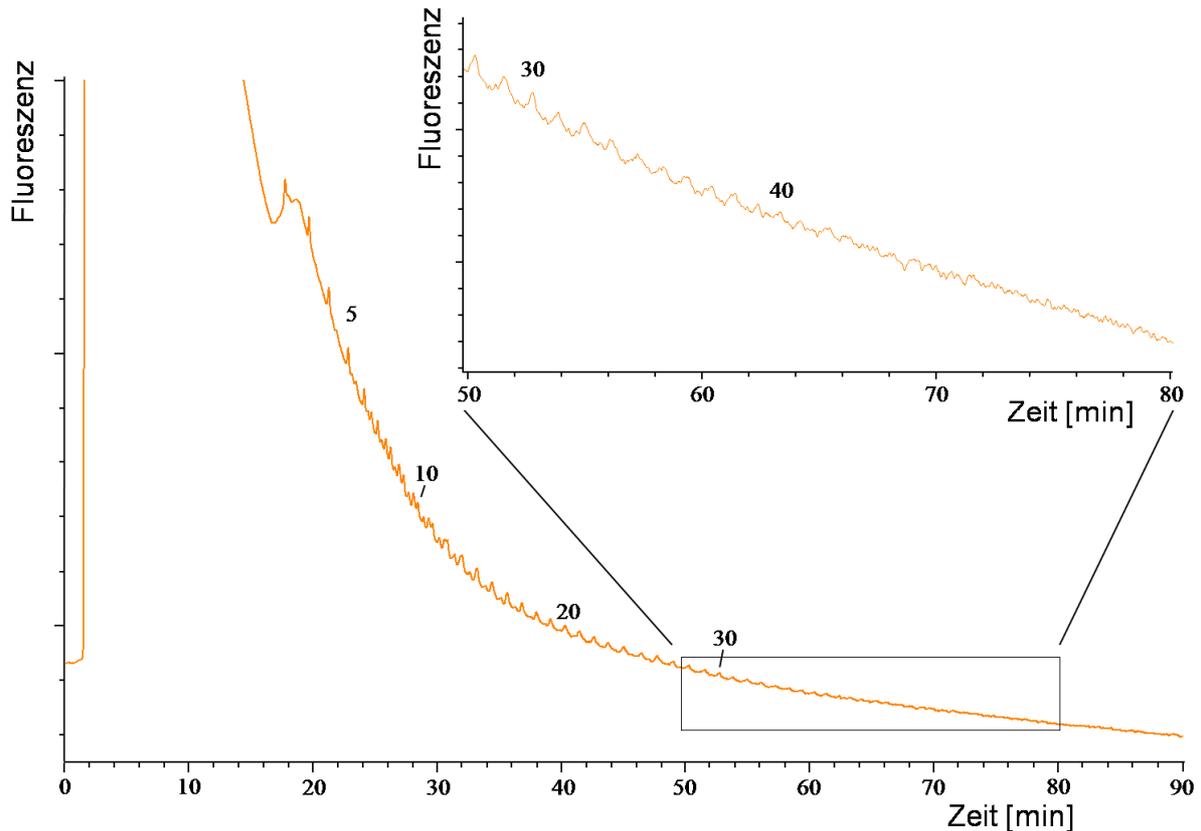


**Abbildung 5.8 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien I**

Die Proteinanteile menschlichen Spermas wurden nach Lyse mittels Aceton präzipitiert und anschließend einer DMB-HPLC-Analyse unterzogen. Die Anzahl jeweils vorhandener Sialinsäure-Einheiten ist exemplarisch angegeben (vgl. Figure 1B in [Simon *et al.*; 2013])

Nach Auftrennung ließen sich, vergleichbar mit bovinen Spermien, Sia-Polymere mit über 40 Resten nachweisen. Verunreinigungsbedingte Artefakte waren hier im Vergleich zur bovinen Probe, die mittels Acetonfällung aufgearbeitet wurde, geringer. Erste Signale von Sia-Polymeren waren nach 16 Minuten sichtbar.

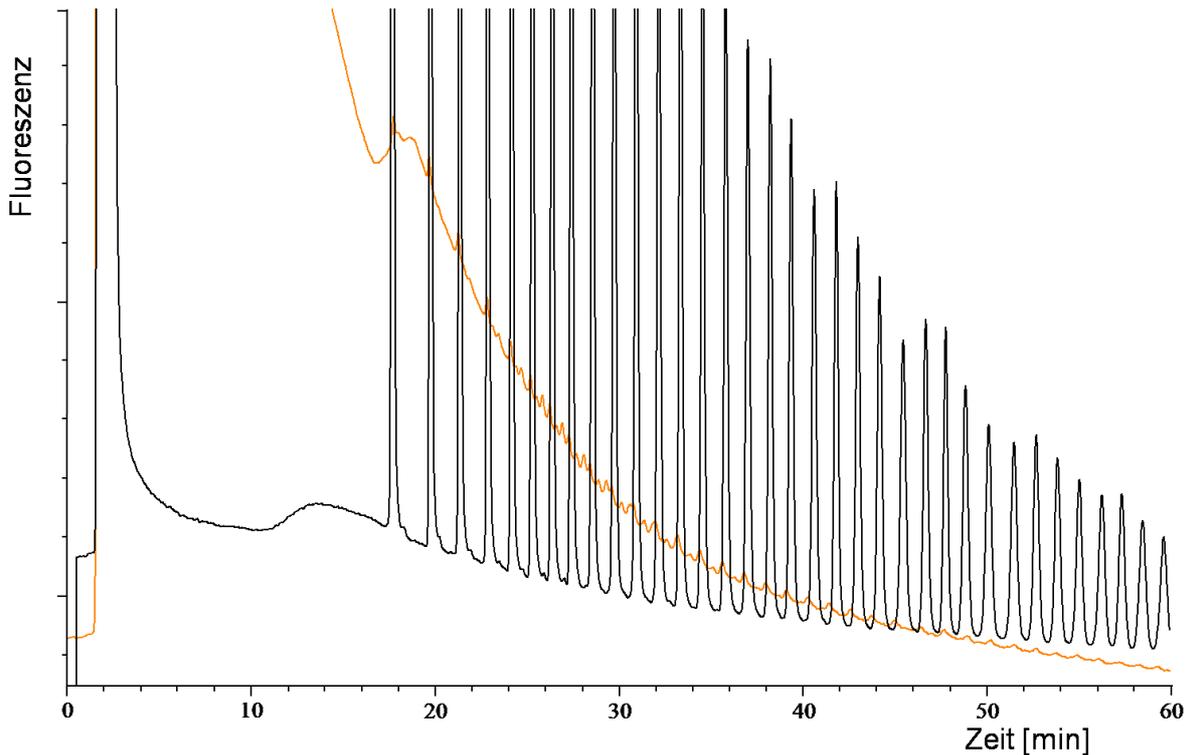
Für genauere Aussagen hinsichtlich des Ursprungs von PolySia wurden die beweglichen menschlichen Spermien ebenfalls per *swim-up* von den übrigen Ejakulatbestandteilen getrennt. Anschließend erfolgten die Lyse im Lysepuffer, die Aufreinigung mittels inaktiver EndoN an magnetischen *beads* und die DMB-Fluoreszenzmarkierung.



**Abbildung 5.9 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien II**  
 Die Analyse mittels HPLC des humanen Probenmaterials erfolgte nach *swim-up*-Prozedur, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation. Die jeweiligen Sialinsäure-Einheiten sind exemplarisch angegeben

Auffällig war hier, dass die Signalstärke deutlich niedriger als in den vorangehenden Läufen war. Artefakte in den Anfangsminuten waren nicht sichtbar. Signale von Sia-Polymeren konnten ab Minute 18 zugeordnet werden. Im weiteren Verlauf, zwischen Minute 25 und Minute 35, waren die PolySia-spezifischen Signale nicht eindeutig abgrenzbar.

Zur genauen Identifikation der spezifisch für  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia stehenden Signale konnte aufgrund der verminderten Signalstärke und einer Signalüberlagerung eine genaue Zuordnung anhand des parallel gemessenen Colominsäure-Standards vorgenommen werden (Abbildung 5.10). Die Colominsäure-Derivate sind in schwarz dargestellt. Die Laufzeiten von Probe und Standard sind identisch.



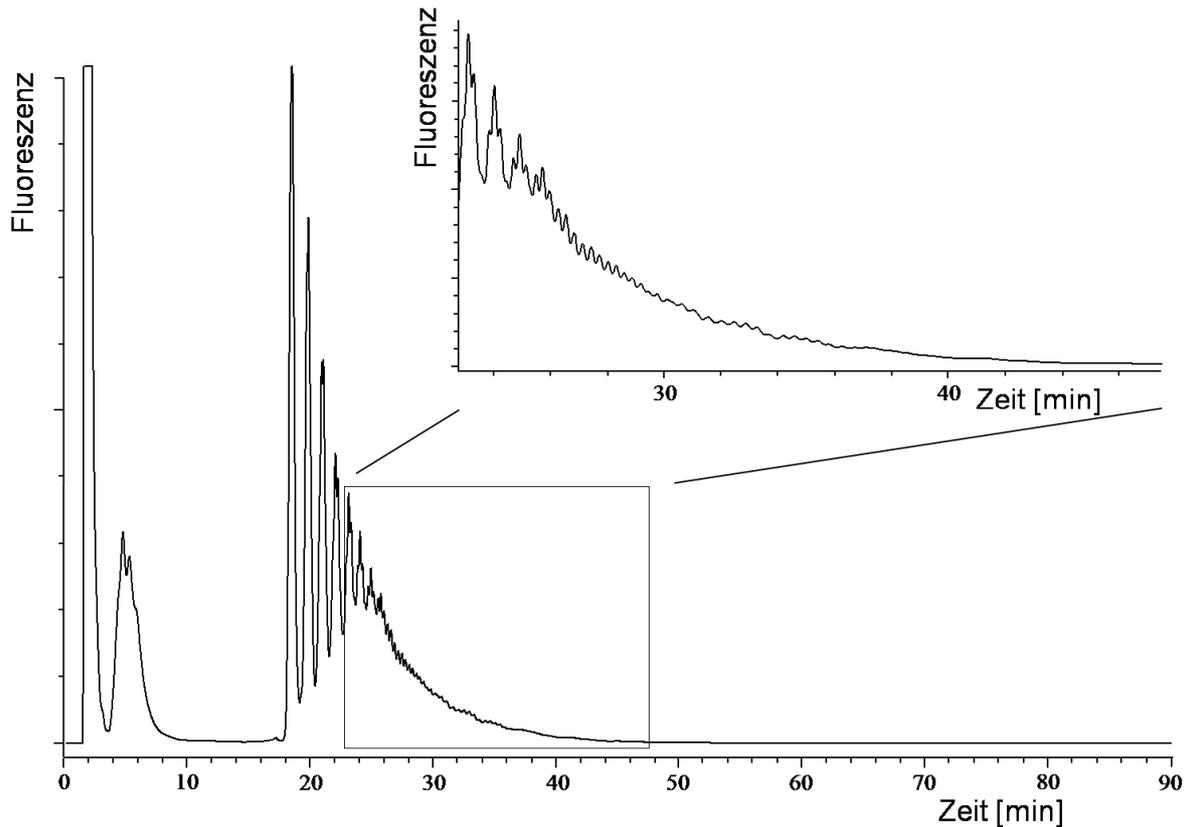
**Abbildung 5.10 Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien III**

Vergleich der PolySia-Kettenlängen von humanem Probenmaterial (Orange) nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation mit Colominsäure-Standard (Schwarz) als Kontrolle

Dadurch ließen sich auch bei menschlichen Spermien PolySia-Ketten mit einer Länge von über 40 Sialinsäureresten, bei entsprechender Vergrößerung, nachweisen. Zu beachten ist, dass die Signale des Colominsäure-Standards aufgrund ihrer größeren Amplitude nicht vollständig abgebildet sind.

Die Überlagerung von humaner Probe und Colominsäure-Standard zeigte, dass die zwischen den PolySia-*peaks* liegenden Signale ebenfalls eine periodische Regelmäßigkeit aufwiesen. Dies ließ den Verdacht aufkommen, dass es sich um PolySia handeln könnte, die nicht  $\alpha$ 2,8-verknüpft ist. Um diesem Verdacht nachzugehen, untersuchten wir  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia hinsichtlich der Frage, ob sich die Laufzeiten der Oligomere bei unterschiedlicher Verknüpfung verändern.

Die  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia wurde dazu nach dem gleichen Protokoll wie  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia DMB-markiert und per HPLC aufgetrennt.

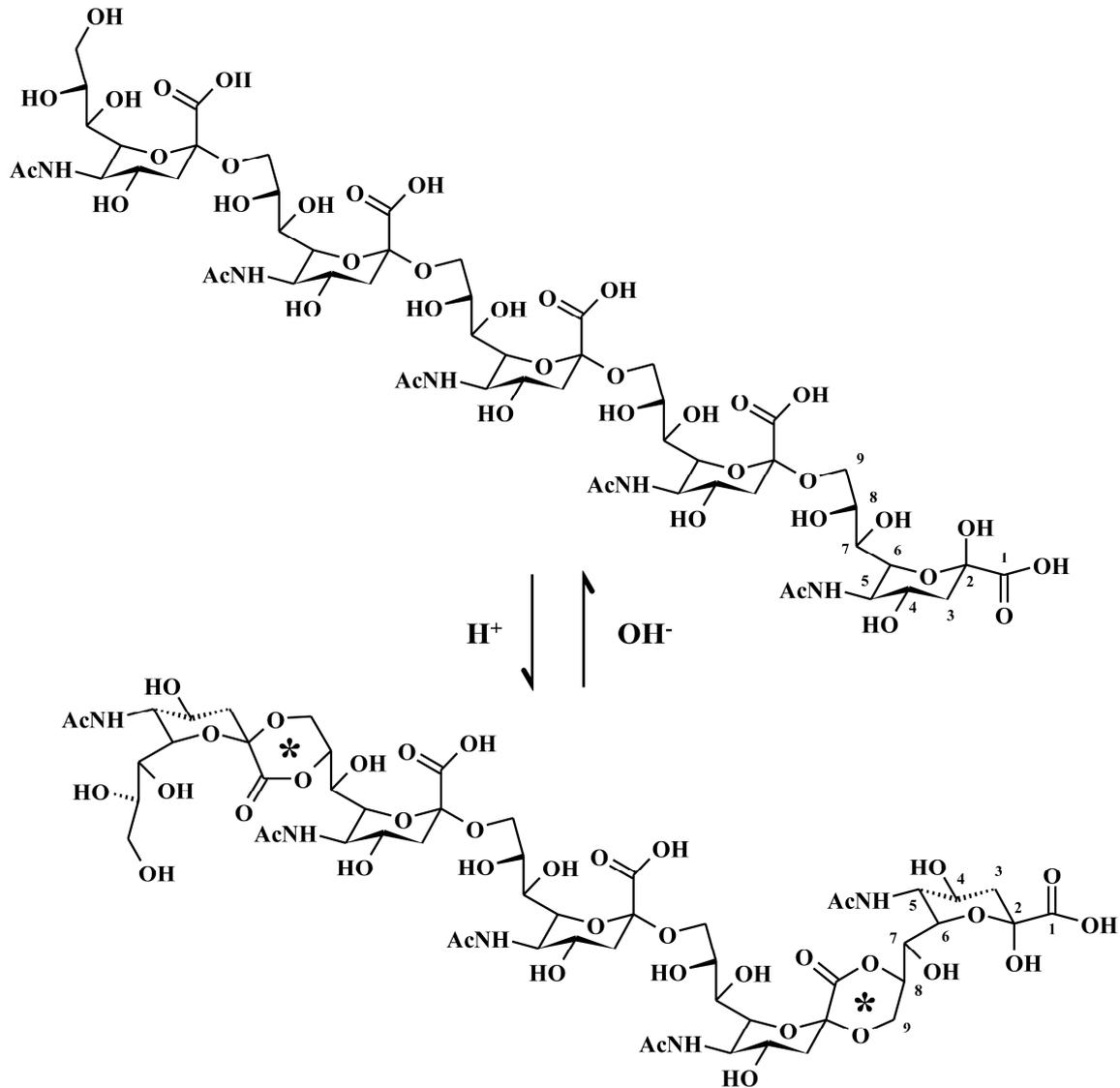


**Abbildung 5.11 Bestimmung von Kettenlängen  $\alpha$ 2,9-verknüpfter PolySia I**

Die DMB-HPLC-Analyse der eingesetzten  $\alpha$ 2,9-verknüpften PolySia erfolgte hier nach 1 Stunde Delaktonisierungszeit

In Abbildung 5.11 ist die Auftrennung der  $\alpha$ 2,9-verknüpften PolySia abgebildet. Hier wurde mit den gleichen Inkubationszeiten gearbeitet wie bei der  $\alpha$ 2,8-verknüpften Colominsäure und den bovinen und humanen Spermien. Auch hier traten bis Minute 10 zunächst das MonoSia-Signal neben weiteren, unidentifizierten Signalen auf. Die regelmäßigen PolySia-Signale erschienen ab Minute 18. Auffällig war dabei, dass die Grundlinie durch Überlagerung dreiecksförmig nach oben verschoben wurde. In der Vergrößerung wirken die Signale zerklüftet und ungleichmäßig.

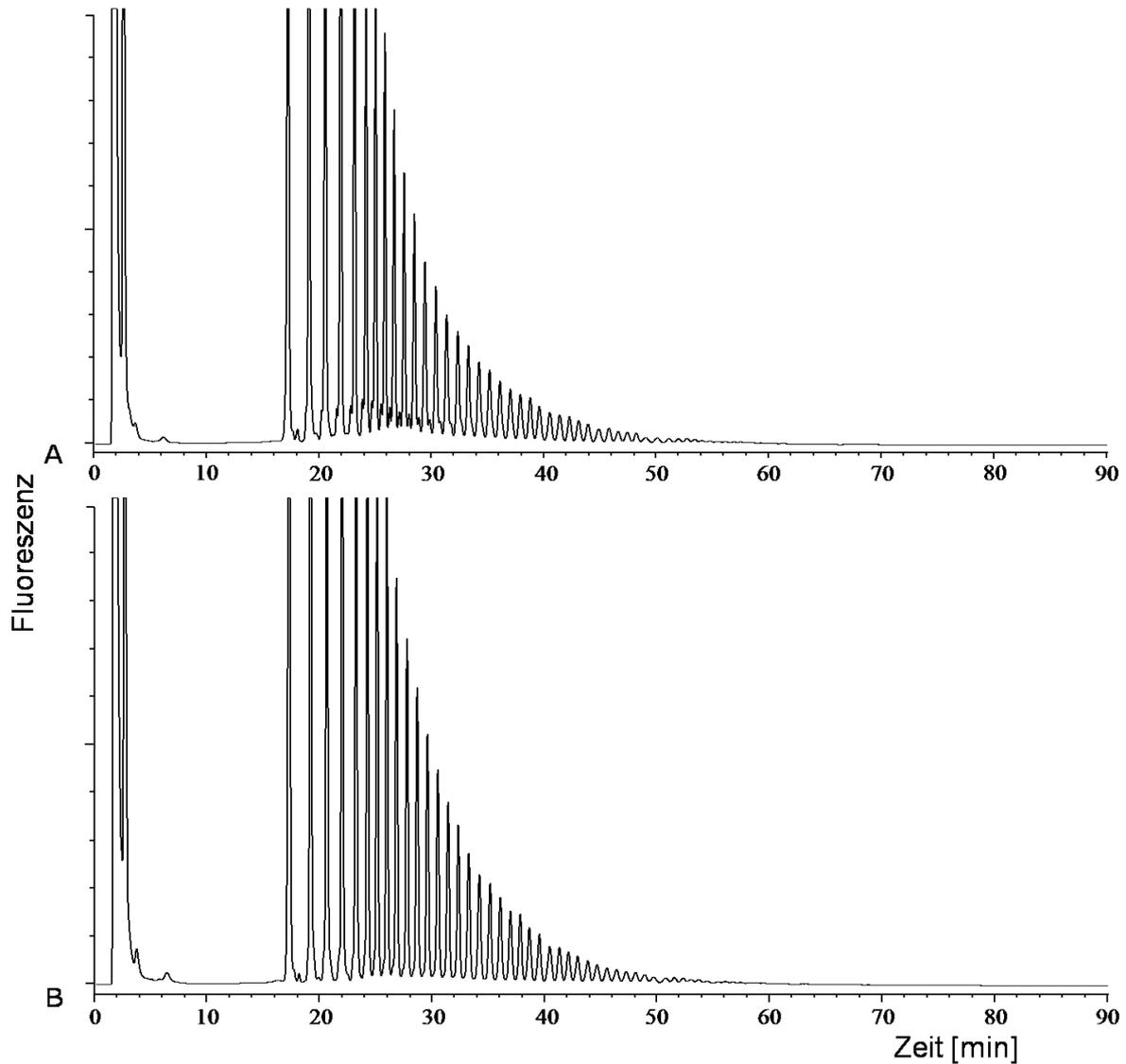
In Abbildung 5.12 ist laktonisierte  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia abgebildet.



**Abbildung 5.12 Darstellung  $\alpha$ 2,9-verknüpfter, partiell laktonisierter PolySia**

Gebildete Lakton-Ringe sind mit Sternchen markiert, Kohlenstoffatome am reduzierenden Ende sind nummeriert, Darstellung nach [Galuska *et al.*; 2007]

Um zu überprüfen, ob  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia langsamer delaktonisiert als  $\alpha$ 2,8-PolySia, verlängerten wir die Zeit zur Delaktonisierung nach NaOH-Zugabe. Zum Vergleich: bei  $\alpha$ 2,8-PolySia wurde immer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der folgenden Abbildung 5.13 ist die Bestimmung der Kettenlänge der  $\alpha$ 2,9-PolySia nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation mit NaOH dargestellt.



**Abbildung 5.13 Bestimmung von Kettenlängen  $\alpha$ 2,9-verknüpfter PolySia II**  
DMB-HPLC-Analyse  $\alpha$ 2,9-verknüpfter PolySia nach (A) 24 Stunden und (B) 48 Stunden  
Delaktonisierungszeit

Nach Inkubation mit NaOH für 24 Stunden ist die Auftrennung deutlicher. Die Grundlinie weist eine geringere Überlagerung als in Abbildung 5.11 nach normaler einstündiger Delaktonisierungszeit auf (Abbildung 5.13A). Diese ist in Abbildung 5.13B, nach einer Delaktonisierungszeit von 48 Stunden nicht mehr erkennbar. Regelmäßige PolySia-Signale sind in beiden Abbildungen länger abgrenzbar. Die Retentionszeiten von  $\alpha$ 2,9- und  $\alpha$ 2,8-verknüpfter PolySia waren nach vollständiger Delaktonisierung identisch.

### 5.3 Detektion der polysialylierten Proteine mittels *Western Blot*

Proteine unterscheiden sich untereinander, abgesehen von Aminosäuresequenz und 3D-Struktur, durch ihre Größe und ihre elektrische Ladung. Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sie sich in einem elektrischen Feld nach Ladung und in einem entsprechend durchlässigen Medium nach Größe auftrennen, was man sich bei der Gel-Elektrophorese zu Nutze macht. Bei der sogenannten SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine ausschließlich nach deren Größe getrennt. Die aufgetrennten Proteine können anschließend im Western Blot auf eine Membran transferiert und mit Hilfe von Antikörpern und Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden.

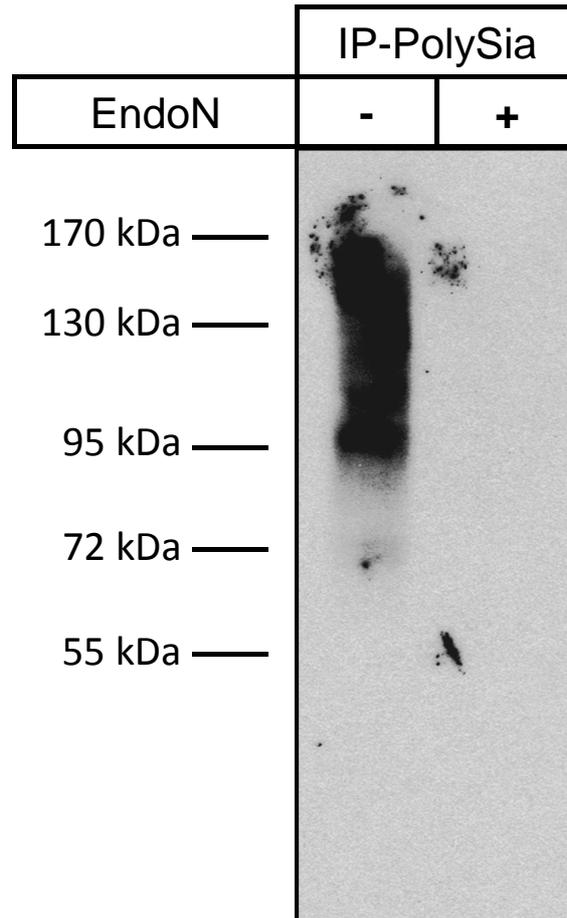
Der als Primär-Antikörper verwendete mAK 735 bindet an PolySia ab einer Größe von 8 Sialinsäureresten. Da EndoN die PolySia-Kette in maximal heptamere Einheiten spaltet, kann der mit EndoN enzymatisch verdaute Ansatz als Negativ-Kontrolle gelten [Frosch *et al.*; 1985].

Als Sekundär-Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Ziege/Anti-Maus-Ig Antikörper verwendet. Die Peroxidase wandelt das aufgegebene Substrat in einer chemischen Reaktion um. Dabei wird Energie in Form von Licht frei, welches einen aufgelegten lichtempfindlichen Film schwärzt.

Anhand parallel aufgetrennter Größenmarker kann die Molekülgröße des Proteins im polysialyliertem Zustand bestimmt werden.

#### 5.3.1 *Western Blot* Nachweis von PolySia auf bovinen Spermien

Für die *western blot* Analysen wurde das bovine Sperma der *swim-up*-Prozedur unterzogen. Die erhaltenen Spermien wurden anschließend lysiert, mittels Affinitätspräzipitation aufgereinigt und die gewonnenen polysialylierten Bestandteile in einem 7%igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 5.14). Weil die Aufreinigung mit inaktivierter EndoN durchgeführt wurde, welche auch nach der Elution aufgrund ihrer kovalenten Bindung an die *beads* gebunden bleibt, sollten ausschließlich polysialylierte Proteine im Eluat vorhanden sein.



**Abbildung 5.14 Western Blot Analyse von bovinen Spermien I**

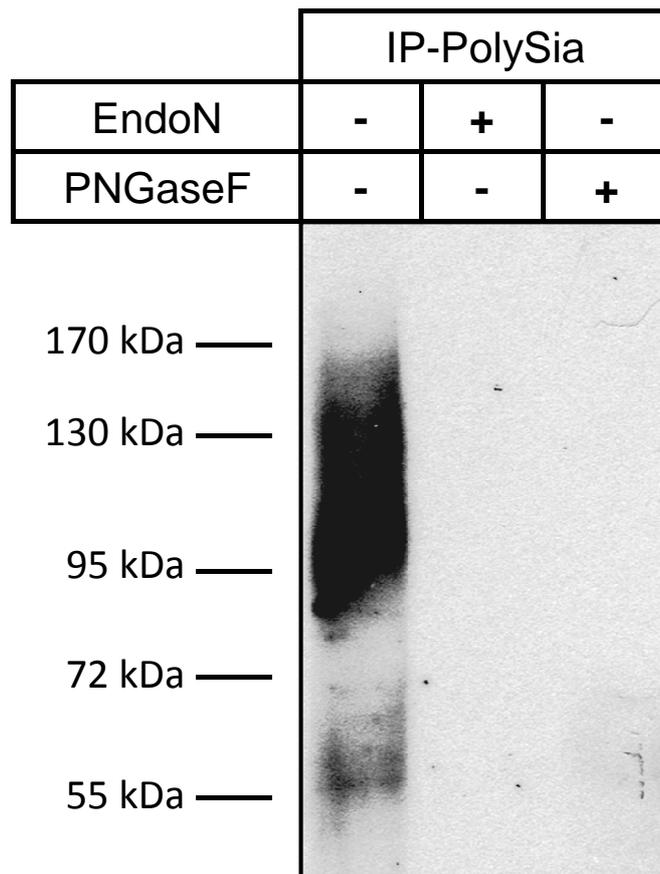
Western-Blot von bovinen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation; elektrophoretische Auftrennung in einem 7%igen Polyacrylamid-Gel; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper; linke Spur: unbehandelte Probe; rechte Spur: Probe nach Inkubation mit aktiver EndoN

In der linken Spur wurde das nicht enzymatisch verdaute Eluat aufgetragen. Deutlich zu sehen ist ein PolySia-Signal mit einem apparenten Molekulargewicht zwischen 95 und 170 kDa. Die Bande wies einen langen schmierartigen Charakter auf, der typisch für polysialylierte Proteine ist [Hoffman *et al.*; 1982]. Grund dafür ist die Heterogenität der PolySia-Ketten: einerseits werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Kettenlängen die größeren Moleküle zurückgehalten; andererseits steigt mit der Größe des Moleküls wiederum die elektrische Ladung, was ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld erhöht. Im Ergebnis kommt die Gesamtheit der polysialylierten Glykoproteine in einem weiteren Bereich zu liegen, als dies z.B. bei einer bestimmten Isoform eines Proteins mit einer einheitlichen Molekülgröße der Fall wäre.

In der rechten Spur wurde die mit aktiver EndoN inkubierte Negativ-Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich keine Schwärzung des Films, so dass von einer PolySia-spezifischen Reaktion auszugehen ist. Da kein quantitativer Vergleich der PolySia-Menge zwischen einzelnen Individuen gezogen werden sollte, wurde auf eine densitometrische Auswertung der Signale verzichtet.

PolySia-Ketten können sowohl an N- als auch an O-Glykanen der polysialylierten Glykoproteine vorliegen. Um zu überprüfen, welche dieser beiden Glykan-Typen Träger der PolySia-Kette ist, wurden die polysialylierten Glykoproteine der Spermien mit PNGaseF inkubiert. Falls PolySia an N-Glykane gebunden ist, würde durch Inkubation mit PNGaseF die PolySia-Kette samt N-Glykan vom Glykoprotein abgespalten werden.

Bei Kenntnis der Art der glykosidischen Bindung lässt sich PolySia gegebenenfalls einem funktionellen Bereich des Proteins zuordnen, wenn das Protein und seine Primärstruktur bekannt sind.



**Abbildung 5.15 Western Blot Analyse von bovinen Spermien II**

Western-Blot von bovinen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation; elektrophoretische Auftrennung in einem 7%igen Polyacrylamid-

Gel; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper; linke Spur: unbehandelte Probe; mittlere Spur: Probe nach Inkubation mit aktiver EndoN; rechte Spur: Probe nach Inkubation mit PNGaseF

Wie Abbildung 5.15 zeigt, erstreckte sich die PolySia-Bande in der linken Spur wiederum von etwa 90 kDa bis 170 kDa. Zusätzlich zeigte sich ein schwaches Signal auf Höhe von etwa 60 kDa. Die EndoN-inkubierte Negativ-Kontrolle in der mittleren Spur wies keine Bande auf. Nach Verdau mit PNGaseF war ebenfalls kein Signal detektierbar (rechte Spur). Somit kann angenommen werden, dass PolySia über N-Glykane an das Glykoprotein gebunden ist. N-Glykane sind immer mit Asparagin eines bestimmten Tripeptid-Motivs verknüpft, was die Anzahl der möglichen Lokalisationen auf dem Protein einschränkt. Mögliche Motive sind Asparagin-X-Serin oder Asparagin-X-Threonin, wobei X für jede beliebige Aminosäure außer Prolin stehen kann [Kasturi *et al.*; 1995].

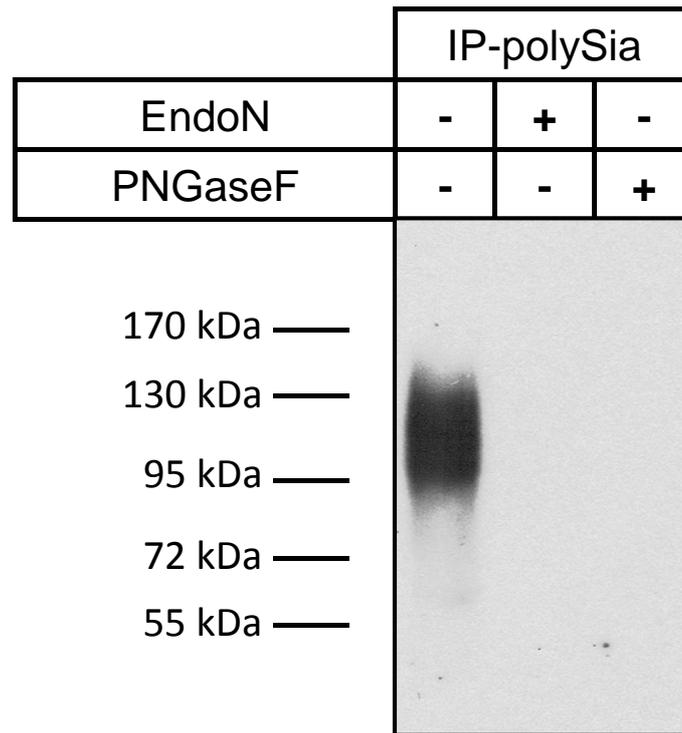
### 5.3.2 Western Blot Nachweis von PolySia auf humanen Spermien

Nach Etablierung der Methode zur Detektion von polysialylierten Glykoproteinen aus Rinder-Sperma wurde das gleiche Protokoll auch zur Analyse von humanem Sperma verwandt.

Das ebenfalls mittels *swim-up* und Affinitätspräzipitation aufgereinigte humane Spermienlysat wurde - einmal unverdaut, sowie jeweils einmal mit aktiver EndoN und einmal mit PNGaseF versetzt - elektrophoretisch in einem 7%igem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet.

Nach Belichtung des Films zeigte sich in der linken Spur ein Signal zwischen 95 und 130 kDa, welches, ähnlich wie beim *western blot* von bovinen Spermien, einen schmierartigen Charakter aufwies (Abbildung 5.16). Die Länge des „Schmiers“ war jedoch kürzer als beim bovinen Material.

Sowohl die in der mittleren Spur aufgetragene, mit aktiver EndoN behandelte Negativ-Kontrolle als auch die in der rechten Spur aufgetragene, mit PNGaseF-inkubierte Probe zeigten keine Signale. Wir können somit auch bei menschlichen Spermien von an N-Glykane gebundener PolySia ausgehen.



**Abbildung 5.16 Western Blot Analyse von humanen Spermien**

Western-Blot von humanen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation; elektrophoretische Auftrennung in einem 7%igen Polyacrylamid-Gel; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper; linke Spur: unbehandelte Probe; mittlere Spur: Probe nach Inkubation mit EndoN; rechte Spur: Probe nach Inkubation mit PNGaseF

## 5.4 Lokalisation von PolySia auf Spermien

Zur weiteren Charakterisierung der polysialylierten Strukturen war es von Interesse, diese auf den Spermien zu lokalisieren. Dazu wurde ein Immunfluoreszenz-Ansatz gewählt.

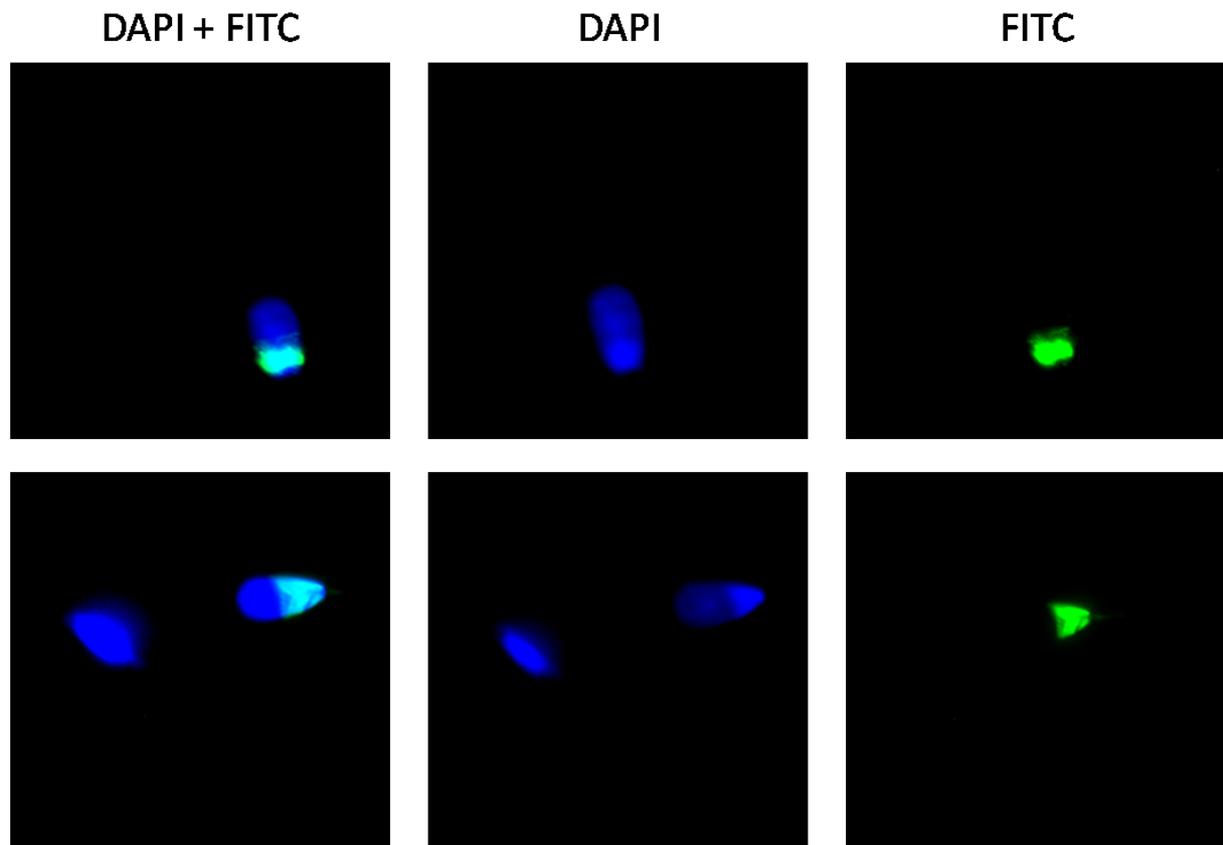
Die Spermien wurden für die Immunfluoreszenz-Färbung direkt aus dem frischen Ejakulat entnommen, zweimal in PBS gewaschen und in Formalin-Lösung fixiert. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte in Lösung unter leichtem Schütteln. Die Kernfärbung fand während des Eindeckelns mit Vectashield® *mounting medium* statt, welches bereits DAPI enthielt. Aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen von FITC und DAPI wurden die Bilder jeweils einzeln aufgenommen und anschließend übereinander gelegt. Zur besseren Übersicht sollen hier sowohl die jeweils übereinandergelegten als auch die einzelnen Bilder gezeigt werden.

Bei Spermien ist der Zellapparat auf ein Minimum reduziert. Der Spermienkopf besteht beinahe ausschließlich aus dem Nukleus mit dem haploiden

Chromosomensatz und der Akrosomenkappe (vgl. Abbildung 1.6 und Abbildung 1.7). Die Kernfärbung mit DAPI stellt daher nahezu den kompletten Kopf dar.

#### 5.4.1 Immunfluoreszenz-Färbung boviner Spermien

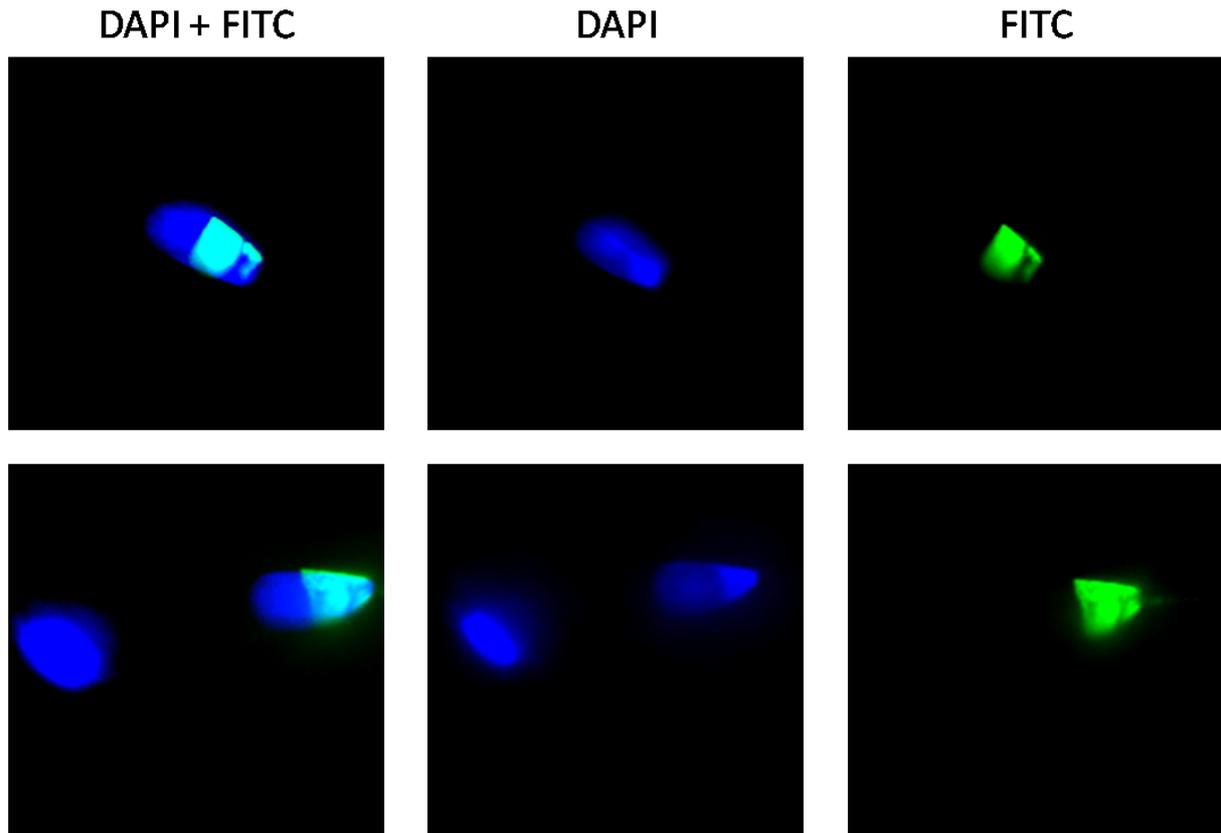
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen sind reine Oberflächen-Färbungen der Spermienmembran ohne Permeabilisierung. Zur Etablierung der Methodik wurden zunächst nur bovine Spermien verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.17 und Abbildung 5.18 zu sehen.



**Abbildung 5.17 Immunfluoreszenz boviner Spermien I**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von bovinen Spermien in 40facher Vergrößerung; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün); Kernfärbung mit DAPI (Blau)

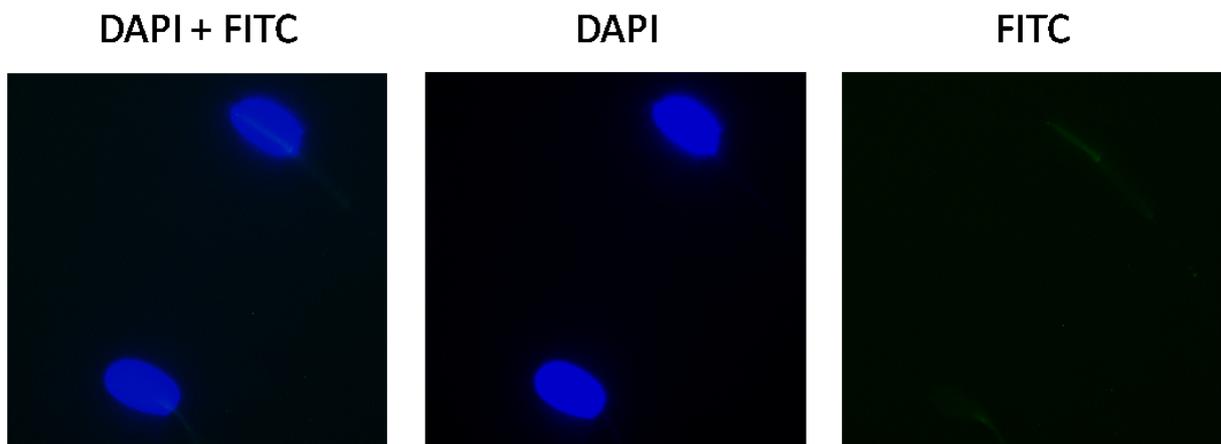
Die Überlagerung der Bilder zeigte, dass bei bovinen Spermien die polysialylierten Glykoproteine in der post-akrosomalen Region des Kopfes liegen. Es ist deutlich zu sehen, dass sich DNA (DAPI = blau) und PolySia (FITC = grün) in diesem Bereich überlagern. Der Schwanz wurde in der Fluoreszenz-Färbung nicht angefärbt und schließt sich offensichtlich an die polysialylierte Region an.



**Abbildung 5.18 Immunfluoreszenz boviner Spermien II**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von bovinen Spermien in 63facher Vergrößerung; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün); Kernfärbung mit DAPI (Blau)

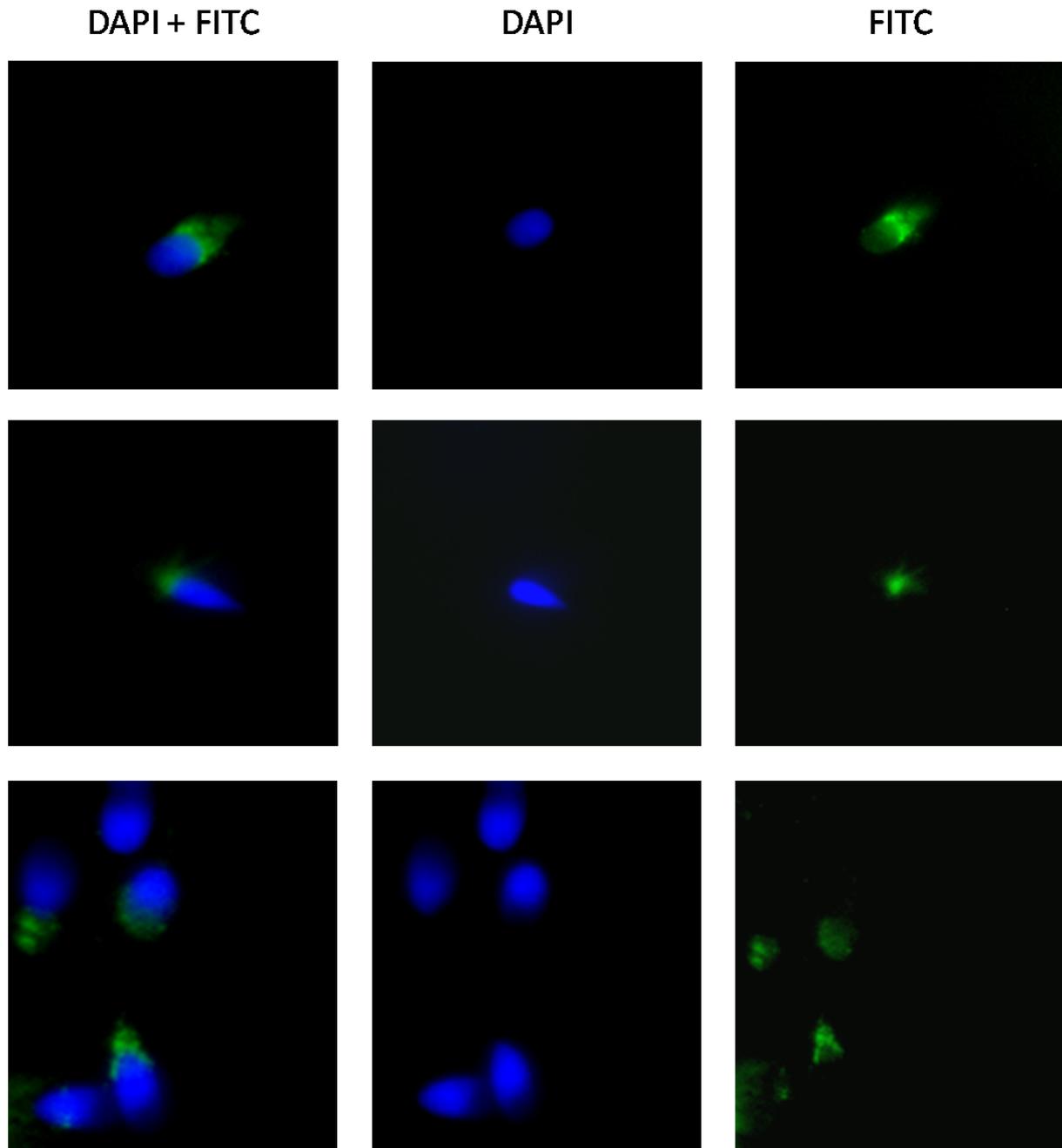
Zur Überprüfung der Spezifität der Immunfärbung wurden die Spermien mit aktiver EndoN behandelt. Die vorher mit EndoN verdaute Negativ-Kontrolle wies keinerlei PolySia-Färbung auf (Abbildung 5.19).



**Abbildung 5.19 Immunfluoreszenz boviner Spermien - Negativ-Kontrolle**

Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von bovinen Spermien in 40facher Vergrößerung nach Inkubation mit EndoN als Negativ-Kontrolle; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün); Kernfärbung mit DAPI (Blau)

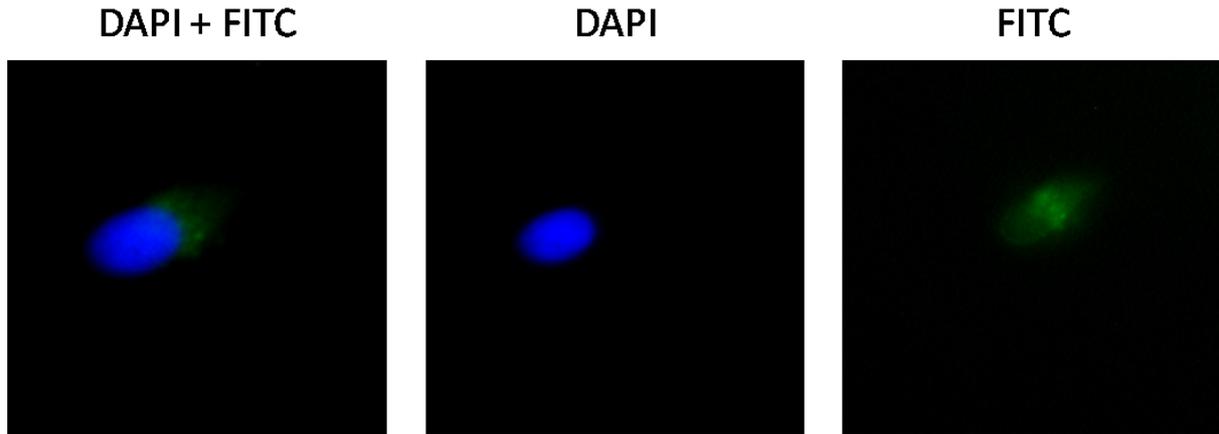
### 5.4.2 Immunfluoreszenz-Färbung humaner Spermien



**Abbildung 5.20 Immunfluoreszenz humaner Spermien I**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Spermien in 40facher Vergrößerung; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün); Kernfärbung mit DAPI (Blau)

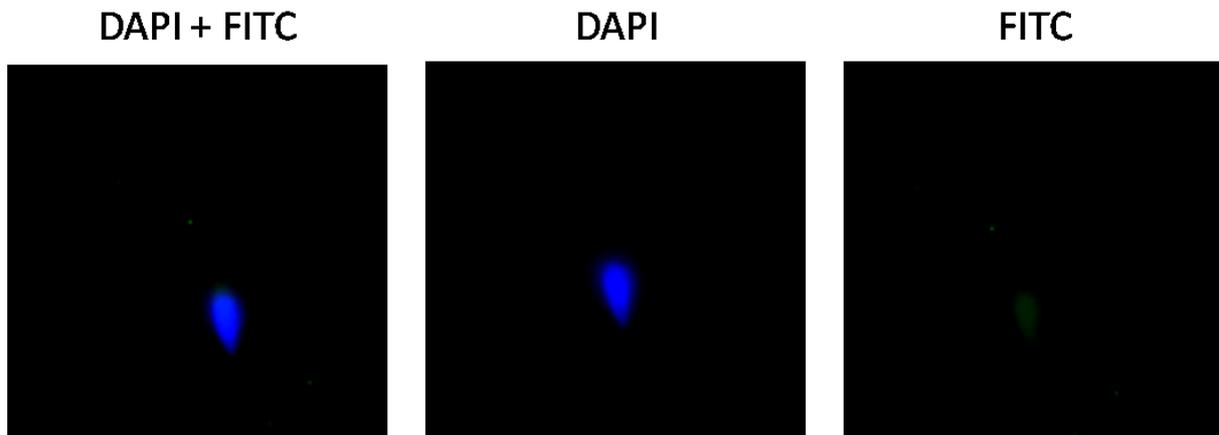
Die Immunfluoreszenz-Färbung von humanem Spermienmaterial erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei den bovinen Spermien. Eine Permeabilisierung der Membran wurde auch hier nicht durchgeführt.



**Abbildung 5.21 Immunfluoreszenz humaner Spermien II**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Spermien in 63facher Vergrößerung; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün); Kernfärbung mit DAPI (Blau)

Die Überlagerung von PolySia- und DNA-Färbung erschien bei den humanen Spermien auf den ersten Blick weniger ausgeprägt als bei den bovinen (Abbildung 5.20 und Abbildung 5.21). Die Einzelaufnahmen zeigten jedoch, dass die PolySia sich auch hier auf die postakrosomale Region erstreckte. Sie projiziert sich zusätzlich auf die Halsregion und scheint so eine zangenförmige, das Hinterteil des Spermienkopfes umgreifende Konfiguration zu haben. Die Negativkontrolle wies wiederum keine PolySia-Färbung auf (Abbildung 5.22).



**Abbildung 5.22 Immunfluoreszenz humaner Spermien - Negativ-Kontrolle**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Spermien in 40facher Vergrößerung nach Inkubation mit EndoN als Negativ-Kontrolle; Färbung mit Anti-PolySia-Antikörper und FITC (Grün); Kernfärbung mit DAPI (Blau)

## 6 Diskussion

Glykane finden sich als posttranslationale Modifikation auf einer Vielzahl von extrazellulären Proteinen. Die Glykokonjugate können dabei auch Sialinsäurepolymere (PolySia) aufweisen. Mittlerweile sind bei Säugetieren 5 Proteine bekannt, deren Glykane polysialyliert sein können: NCAM, SynCAM 1, CD36, Neuropilin-2 und ein spannungsabhängiger Natriumkanal.

In den letzten Jahren wurden parallel drei polysialylierte Glykokonjugate in Seeigel-Spermien entdeckt: neben polysialylierten Gangliosiden und Flagelliasialin ein noch nicht näher charakterisiertes Glykoprotein von 190 kDa Größe. Das Flagelliasialin wird durch seinen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration als (Mit-)Regulator der Motilität angesehen. Seeigel haben in der Fertilisations- und Reproduktionsforschung eine lange Geschichte, da ihre Gameten in großer Zahl gewonnen werden können und relativ unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen sind [Miyata *et al.*; 2004; Miyata *et al.*; 2007].

Auch wenn die evolutionäre Entwicklung von Seeigeln und Säugetieren seit langer Zeit unabhängig voneinander stattfindet, gibt es in der Natur Beispiele, dass sich erfolgreiche Anpassungsstrategien in verschiedenen Zweigen des phylogenetischen Stammbaums unabhängig voneinander entwickeln können. Als Beispiel seien das Linsenauge von Wirbeltieren und Kopffüßlern wie Tintenfischen oder Kraken bzw. die strömungsgünstige Körperform von Haien, Delphinen und Pinguinen genannt [Lehmann; 1996].

Schon länger gibt es Hinweise, dass bei Säugetieren negativ geladene Glykokonjugate essentiell für einzelne Schritte der Fertilisation sind [Oehninger; 2001], so dass der Verdacht aufkam, dass auch bei Säugetieren PolySia - neben MonoSia-Einheiten - in irgendeiner Form an der Reproduktion beteiligt sein könnten. Diese Überlegung lag der hier beschriebenen Arbeit zugrunde.

Aufgrund der einfacheren Gewinnung und der höheren Spermiedichte pro Ejakulat wurde jede Methode zunächst mit bovinem Sperma etabliert und anschließend auf humane Spermien angewendet. Bei Interpretation der Ergebnisse sollte immer berücksichtigt werden, dass menschliches und bovines Sperma einige Unterschiede aufweist. Diese Unterschiede sind zum einen quantitativer, z.B. in Bezug auf die absolute Anzahl von Spermien pro Ejakulat, und zum anderen qualitativ, was Morphologie, Beweglichkeit und Fehlbildungsrate betrifft. Da es im Rahmen dieser Arbeit nur um den qualitativen

Nachweis von PolySia sowie die Lokalisierung des Trägermoleküls ging, wurde auf eine exakte Quantifizierung verzichtet.

Zunächst war das Ziel, erste Hinweise zu sammeln, die das Vorkommen von PolySia wahrscheinlich machen. Mit Hilfe der C7/C9-Methode nach Sato können mittels DMB-HPLC durch Bildung eines C7-Derivats am nicht-reduzierenden Ende und anschließender Hydrolyse des Glykan-Polymers Sialinsäure-Moleküle nachgewiesen werden, die nicht als endständige Monosialyl-Reste auf Glykanen vorkommen. Dabei wurde zunächst frisches unbehandeltes Bullen-Sperma analysiert, ohne die einzelnen Fraktionen des Ejakulates vorher zu trennen. Hier konnte gezeigt werden, dass ketteninterne (C9-Derivate) Sialinsäure-Reste im Ejakulat nicht nur nachweisbar sind, sondern dass diese auch in größerer Anzahl als die endständigen C7-Derivate anfielen (Abbildung 5.1).

Um die Aussagekraft dieses Ergebnisses zu erhöhen, wurde in einem nächsten Schritt die Ausfällung der Proteine mittels Aceton durch Aufreinigung mittels magnetischer *beads* (Affinitätspräzipitation) ersetzt. Als Sialinsäurepolymer-bindendes Protein wurde enzymatisch inaktivierte EndoN genutzt.

Weil Spermien nicht die einzigen Zelltypen im Säuger-Ejakulat darstellen und darüber hinaus noch eine Vielzahl gelöster Proteine und Glykokonjugate vorkommt, wurde der *swim-up* in den Versuchsablauf integriert, bei dem sich die beweglichen Spermien aus dem vorsichtig unter das Medium geschichteten Ejakulat lösen und „hoch schwimmen“ sollen. Alle weiteren Analyseschritte (Lyse, Affinitätspräzipitation, HPLC etc.) wurden aus dem abgenommenen Überstand, der im Idealfall nur Medium und motile Spermien enthält, durchgeführt. So konnte eine Separation von den übrigen Bestandteilen des Ejakulates erreicht werden. Wie zuvor bereits nachgewiesen überstieg auch hier die Menge der internen die der endständigen Sialinsäure-Reste (Abbildung 5.2).

Analog zur C7/C9-Analytik boviner Spermien, wurde der Versuchsablauf auf humane Spermien übertragen, zunächst ausgehend von unbehandeltem Probenmaterial (Abbildung 5.3), dann nach Affinitätspräzipitation und *swim-up* (Abbildung 5.4). In jedem Lauf konnten interne Sialinsäure-Reste nachgewiesen werden, deren Menge in jedem Lauf die der endständigen Reste überstieg. Durch die spezifisch gegen Sialinsäurepolymere gerichtete Aufreinigungsprozedur war somit ein indirekter Nachweis erfolgreich geführt. Über die Kettenlängen der

Polymere ließ sich mit dieser Methode keine Aussage treffen, da die C9-Derivate auch von Di-, Tri- oder OligoSia stammen konnten.

Um sich ein Bild von den jeweiligen Kettenlängen der identifizierten Sia-Oligo/Polymere zu verschaffen, wurden die PolySia-Ketten unter schwach sauren Bedingungen abgespalten, fluoreszenzmarkiert und mittels Anionenaustauscher-Chromatographie nach Anzahl der Sialinsäurereste aufgetrennt. Zur Etablierung des Versuchsablaufs wurde wie bei der C7/C9-Methode vorgegangen: zunächst Analyse von bovinem unbehandeltem Sperma, dann Aufreinigung polysialylierter Produkte mittels Affinitätspräzipitation und anschließend Gewinnung motiler Spermien mittels *swim-up*. In erstem und letztem erwähnten Lauf ließen sich Kettenlängen von ca. 40 (Abbildung 5.5) bzw. 46 Sia-Molekülen (Abbildung 5.6) nachweisen. Der Lauf mit vorangegangener Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation ohne *swim-up* ergab Kettenlängen von bis zu 28 Sia-Molekülen (Abbildung 5.7). Zu berücksichtigen ist, dass bei kleineren Probenmengen die Signalintensität geringer ausfällt und PolySia-spezifische Signale im der Methode geschuldeten Grundrauschen des Detektors überdeckt werden können. Außerdem kann es aufgrund der schwach sauren Bedingungen zu spontanen Kettenbrüchen kommen, was eine Vermehrung kürzerer Ketten zur Folge hat.

Die bei humanen Spermien bestimmten Kettenlängen waren mit 44 Neu5Ac-Einheiten beim unbehandeltem Ejakulat (Abbildung 5.8) und 49 Sia-Einheiten, nach *swim-up* der Spermien und Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation (Abbildung 5.9), geringfügig größer als die Kettenlängen boviner Spermien. Somit ist die Existenz von PolySia sowohl im bovinen als auch im humanen Ejakulat bzw. auf den enthaltenen Spermien bewiesen.

Auffällig im in Abbildung 5.9 dargestellten HPLC-Lauf war, dass die in regelmäßigen Abständen auftretenden PolySia-spezifischen Signale zwischen Signal 6 und 9 von weiteren regelmäßig auftretenden Signalen überlagert wurden. Eine eindeutige Zuordnung konnte anhand des stets mitanalysierten Colominsäure-Standards getroffen werden (Abbildung 5.10). Möglicherweise handelt es sich um eine Form der PolySia, die nicht  $\alpha$ 2,8-verknüpft ist. Beschrieben sind  $\alpha$ 2,9- [Bhattacharjee *et al.*; 1975], alternierende  $\alpha$ 2,8-/ $\alpha$ 2,9- [Chao *et al.*; 1999] sowie  $\alpha$ 2,5-O-Glycolylverknüpfungen [Kitazume *et al.*;

1996]. Um dieser Frage nachzugehen, untersuchten wir, ob sich  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia bezüglich ihrer Laufzeiten unterscheiden. Es zeigte sich jedoch, dass die Elutionszeiten beider PolySia-Formen identisch sind. Allerdings unterschieden sich die Delaktonisierungszeiten deutlich. Nach dem für  $\alpha$ 2,8-PolySia benutzten Protokoll ist eine Inkubationszeit mit NaOH von einer Stunde vorgesehen. Unter diesen Bedingungen zeigte sich jedoch bei der  $\alpha$ 2,9-verknüpften Form eine deutliche Signalüberlagerung mit Verlagerung der Grundlinie (Abbildung 5.11). Erst nach deutlich längerer Delaktonisierung über 24 bzw. 48 Stunden erschien ein vergleichbares Bild mit regelmäßigen Signalen ohne Überlagerung (Abbildung 5.13). Bei dem in Abbildung 5.9 dargestellten HPLC-Lauf könnte es aufgrund einer inkompletten Delaktonisierung zu den Zwischensignalen gekommen, da bei weiteren Analysen von humanen Proben dieses Ergebnis nicht reproduzierbar war bzw. vergleichbare Resultate wie in Abbildung 5.8 gewonnen wurden. Ob neben  $\alpha$ 2,8-verknüpften auch  $\alpha$ 2,9-verknüpfte PolySia vorkommt, konnte mit der angewendeten Methode nicht abschließend geklärt werden.

Verglichen mit den Kettenlängen der im Seeigelsperma gefundenen polysialylierten Glykoproteine von 20 Sia-Molekülen beim Flagelliasialin und 15 beim 190 kDA-Protein [Miyata *et al.*; 2007] sind die PolySia-Ketten bei Rind und Mensch also deutlich länger. Sie liegen etwa in der Größenordnung der PolySia-Ketten von NCAM und SynCAM 1, deren N-Glykane PolySia-Kettenlängen von mehr als 62 bzw. 44 Sia-Molekülen aufweisen können, wenn diese mittels der beschriebenen Methode analysiert werden [Galuska *et al.*; 2006; Galuska *et al.*; 2010]. Um die analysierten Kettenlängen jedoch gezielt mit denen von Glykanen an NCAM und SynCAM 1 vergleichen zu können, müsste parallel und mit gleicher Sialinsäure-Gesamtmenge die beschriebene Prozedur durchgeführt werden, da die Bestimmung der maximal detektierbaren Kettenlänge von der PolySia-Menge abhängt. Gleiches gilt natürlich auch für PolySia auf Seeigelspermien.

Um das polysialylierte Protein eingehender zu charakterisieren, wurde versucht, PolySia nach gelelektrophoretischer Auftrennung im *western blot* sichtbar zu machen. Dazu wurde bovines Sperma der *swim-up*-Prozedur unterzogen und polysialylierte Glykoproteine der gewonnenen Spermien nach deren Lyse mittels Affinitätspräzipitation aufgereinigt. Vor Beladung des Gels wurde ein Aliquot der

Probe mit EndoN verdaut, während das andere unverdaut aufgegeben wurde. Der als Primärantikörper benutzte Anti-PolySia-Antikörper benötigt eine Mindestanzahl von 8 Sia-Resten um zu binden, während EndoN die PolySia in heptamere Einheiten und kürzer schneidet. Somit kann das EndoN-verdaute Aliquot als Negativ-Kontrolle angesehen werden.

Obwohl die elektrischen Ladungen der Moleküle durch SDS proportional zu ihrer Größe sind, verteilen sich die Moleküle in einem weiten Bereich. Dies kommt dadurch zustande, dass die aus den unterschiedlichen PolySia-Kettenlängen resultierenden Molekülgrößen im elektrischen Feld ein komplexes Wechselspiel mit den Poren des Polyacrylamid-Gels bewirken, die einen Widerstand im Laufweg der Moleküle darstellen. Polysialylierte Proteine werden dadurch als lange schmierartige Bande auf dem geschwärzten Röntgenfilm sichtbar [Hoffman *et al.*; 1982].

Nach Belichtung zeigte sich im Fall von bovinen Spermien nach *swim-up*, Lyse und Affinitätspräzipitation in der unverdauten Spur ein deutliches breites Signal zwischen 95 und 170 kDa, welches den für PolySia typischen Schmier aufwies (Abbildung 5.14).

Um Hinweise darüber zu bekommen, ob PolySia an N- oder O-Glykane der Glykoproteine gebunden ist, wurde neben unverdauten und EndoN behandelten Proben auch ein Probenaliquot mit PNGaseF behandelt. Dieses Enzym spaltet spezifisch N-glykosidische Bindungen, wie sie z.B. bei NCAM und SynCAM 1 nachgewiesen wurden [Liedtke *et al.*; 2001; Galuska *et al.*; 2010]. Die unverdaute Probe zeigte im *western blot* ein breites, starkes Signal zwischen 90 und 170 kDa (Abbildung 5.15). EndoN-verdautes und PNGaseF-verdautes Aliquot wiesen dagegen keine PolySia-spezifischen Signale auf. PolySia wurde offenbar mit den N-Glykanen vom Proteinerückgrat abgespalten. Außerdem zeigte sich schmalbandig ein Signal mit niedriger Signalintensität auf Höhe von 60 kDa. Nach Abschluss der hier beschriebenen Untersuchungen zeigten weiter durchgeführte Versuche an bovinen Gesamtejakulaten, dass nach Erhöhung der Konzentration an käuflichen Protease-Inhibitoren in den Ejakulaten das zusätzliche Signal nicht mehr detektierbar war, während die PolySia-Bande reproduzierbar zwischen 95 und 200 kDa dargestellt werden konnte. Somit könnte es sich bei dem kleineren Signal in Höhe von 60 kDa um Degradierungsprodukte handeln.

Schließlich wurde das etablierte Aufarbeitungsprotokoll auch auf humane Spermien angewandt. Der *western blot* zeigte nach Belichtung in der Spur des unverdauten Aliquots ein deutliches Signal zwischen 95 und 150 kDa (Abbildung 5.16), jedoch keine akzessorische Bande wie in Abbildung 5.15. EndoN- und PNGaseF-Verdau führten wie bei den bovinen *western blots* zum Verschwinden der PolySia-spezifischen Signale. Somit sind die PolySia-Ketten auch bei humanen Spermien mit N-Glykanen verknüpft.

Anhand der Wanderungstrecken im SDS-Gel sind sich die polysialylierten Proteine von bovinen und humanen Spermien ähnlich, auch wenn die Signalbanden beim Rind einen größeren Molekulargewichtsbereich umfassen. Dies könnte auf minimalen Unterschieden im Polysialylierungsgrad beruhen [Simon *et al.*; 2013].

In späteren Untersuchungen wurden in unserer Arbeitsgruppe mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und vorangegangenem tryptischen In-Gel-Verdau zwei polysialylierte Proteine identifiziert. Dabei handelte es sich zum einen um NCAM und zum anderen um die Polysialyltransferase ST8SiaII. Damit gelang erstmals der Nachweis, dass ST8SiaII auch *in vivo* polysialyliert vorkommt [Simon *et al.*; 2013]. Polysialylierung und Autopolysialylierung von ST8SiaII konnten bisher nur *in vitro* oder *in cellulo* in Abwesenheit von NCAM beobachtet werden, so dass man bisher von einem, den artifiziellen Bedingungen geschuldeten Phänomen ausging.

Für die Interpretation der Aufgaben eines polysialylierten Proteins auf der Spermienoberfläche ist die Kenntnis der Lokalisation von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurde versucht, PolySia mit Hilfe von Immunfluoreszenz zu lokalisieren. Als effektivste Methode erwies sich dabei die Fixierung und Färbung in Lösung mit anschließender Einbettung in ein nicht aushärtendes Medium (Vectashield®). Bei Fixierung auf einem Objektträger mit anschließender Färbung war die Eigenfluoreszenz des Fixationsmediums zu stark, um aussagekräftige Fotos machen zu können (Daten nicht gezeigt). Die Färbemethode wurde zunächst an bovinen Spermien etabliert und später mit humanen wiederholt. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde FITC verwendet, die Kernfärbung wurde mit DAPI durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein

Aliquot mit EndoN verdaut. Da das Spermienköpfchen fast ausschließlich aus dem Nukleus besteht, kann die DAPI-Färbung als Darstellung desselbigen betrachtet werden. Mit dieser Prämisse projizierte sich die Lokalisation der polysialylierten Proteine bei bovinen Spermien auf den hinteren Teil des Köpfchens bis zum Übergang in den Halsteil, auch als postakrosomale Region bezeichnet (Abbildung 5.17 und Abbildung 5.18). Der Schwanz wurde in den Fluoreszenz-Färbungen nicht mit angefärbt. Die EndoN-verdauten Spermien wiesen keine derart charakteristische Färbung auf (Abbildung 5.19). Festzuhalten ist, dass sich FITC-PolySia und DNA-DAPI in der postakrosomalen Region nahezu komplett überlagerten.

Die humanen Spermien wurden im selben Verfahren wie die bovinen aufbereitet und gefärbt. In den mikroskopischen Aufnahmen wurde deutlich, dass sich DAPI- und PolySia-Signal in der Oberflächenfärbung nicht in der Art überlagerten, wie es bei bovinen Spermien der Fall war. Die PolySia-positive Region stellte sich in einer den postakrosomalen Teil von hinten umgreifenden Konfiguration neben bzw. hinter dem Nukleus dar (Abbildung 5.20 und Abbildung 5.21). Die Signalintensität war geringer, als bei den bovinen Spermien. Der Schwanz war ebenfalls nicht angefärbt. Das Fehlen von PolySia-Signal in der EndoN-verdauten Negativkontrolle zeigte erneut, dass die Färbung spezifisch war.

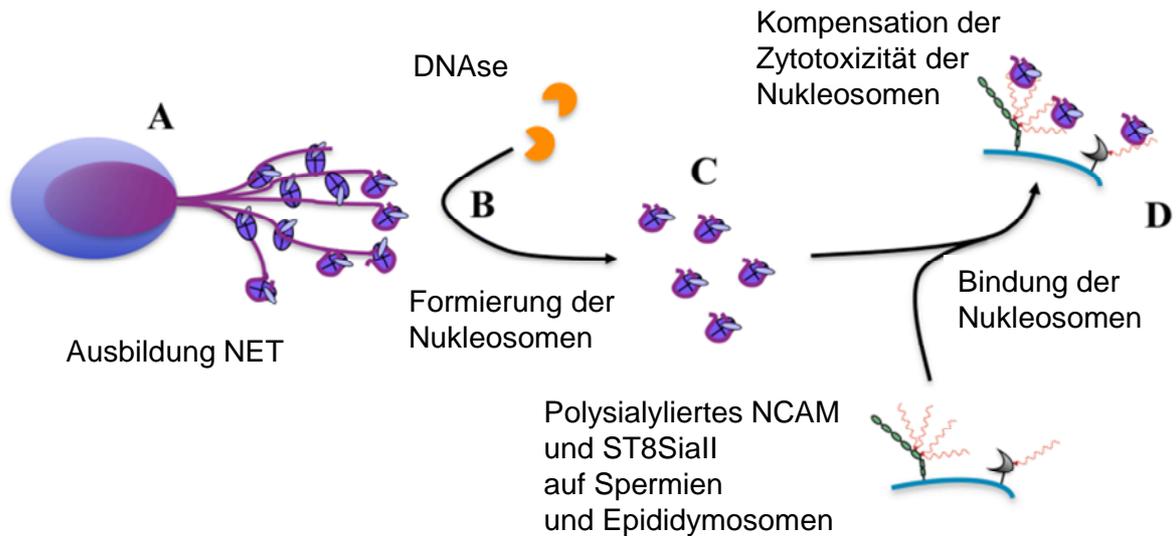
Die Lokalisation der polysialylierten Proteine in bovinen und humanen Spermien war ähnlich. Die in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurden ausschließlich von ejakulierten Spermien gemacht, die kurz nach Ejakulation mittels Formaldehyd fixiert wurden. Das bedeutet, dass die nach Ejakulation einsetzenden physiologischen Reifungsprozesse, wie z.B. die Kapazitation, zum Zeitpunkt von Fixierung und Färbung noch nicht bzw. in sehr anfänglichen Stadien eingetreten waren.

Insgesamt war der Anteil an PolySia-positiven Spermien im Vergleich zur Gesamtmenge aller untersuchten Spermien gering. Eine genaue Quantifizierung wurde nicht durchgeführt, da es, wie oben bereits erwähnt, im Rahmen dieser Arbeit um einen qualitativen Nachweis von PolySia ging.

In weiteren Untersuchungen konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass PolySia von Epithelzellen im Kopf des Nebenhodens exprimiert wird, während PolySia im Hoden weder in Epithelzellen noch an Keimzellen nachweisbar ist [Simon *et al.*; 2013]. Die Passage des Nebenhodens ist für die Reifung von

Spermien essentiell, da hier viele wichtige Reifungsschritte stattfinden. So werden Glykoproteine von Epithelzellen synthetisiert und mittels sogenannter Epididymosomen zu den Spermien transportiert und in die Spermien-Membran integriert [Marengo; 2008]. Vermutlich wird PolySia-NCAM bzw. polysialylierte ST8SiaII ebenfalls durch diesen Mechanismus in die Spermien-Membran eingebaut.

Reife, ejakulierte Spermien sind im weiblichen Genitaltrakt einer Vielzahl von Abwehrmechanismen des weiblichen Immunsystems ausgesetzt, die vor allem von Neutrophilen Granulozyten vermittelt werden. Dabei bildet sich unter anderem ein Netzwerk bestehend aus Histonen und DNA, in dem Spermien hängenbleiben und absterben können. Dieses Netzwerk wird auch als *neutrophil extracellular trap* (NET) bezeichnet [Brinkmann *et al.*; 2007]. Aufgrund einer im Ejakulat vorhandenen DNase kann zwar die DNA degradiert werden, damit sich die Spermien wieder fortbewegen können, jedoch sind die resultierenden Nukleosomen aufgrund der extrazellulären Histone weiterhin zytotoxisch. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Preissner (Biochemisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen) nachweisen, dass PolySia von Bakterien oder Menschen die Zytotoxizität von extrazellulären Histonen und Nukleosomen abschwächen bzw. komplett aufheben kann [Saffarzadeh *et al.*; 2012; Saffarzadeh *et al.*; 2013; Ulm *et al.*; 2013]. Somit könnte PolySia - gebunden an NCAM und ST8SiaII - als Schutzmechanismus vor dem weiblichen Immunsystem dienen und so die Überlebensrate der Spermien im fremden Milieu erhöhen (Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1 Mögliches Modell einer zytoprotektiven Funktion von polysialyliertem NCAM und ST8SiaII im Ejakulat**

(A) Aktivierung von Neutrophilen und Ausbildung von NET (*neutrophil extracellular traps*); (B) DNase aus dem Ejakulat degradiert DNA der Neutrophilen und (C) zytotoxische Nucleosomen entstehen; (D) PolySia-NCAM und -ST8SiaII auf Spermien und Epididymosomen binden Nucleosomen und inhibieren deren Zytotoxizität, modifiziert nach [Simon *et al.*; 2013]

Andere Funktionen sind ebenfalls denkbar. Es ist bekannt, dass der weibliche Genitaltrakt, den die Spermien auf ihrem Weg zur Eizelle durchwandern müssen, in vielfacher Weise mit den Spermien interagiert. Dazu gehört die Bereitstellung eines Milieus, in dem weitere Reifungsprozesse ablaufen können. Mittlerweile verdichten sich die Hinweise, dass vor allem im Eileiter Vorgänge stattfinden, die Spermien auf ihre Befähigung zur erfolgreichen Befruchtung überprüfen und bei Mängeln aussortieren können, wenngleich die entsprechenden Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind [Holt *et al.*; 2010].

Die Lokalisation von PolySia im postakrosomalen Bereich der Spermien wirft zudem die Frage auf, ob sie bei der Verschmelzung von Spermium- und Eizellen-Membran eine Rolle spielen könnten, denn die Bindung des Spermiums an die Eizelle findet im Bereich der postakrosomalen Region statt [Stein *et al.*; 2004].

Da PolySia wegen seiner hohen Elektronegativität bisher nur als Inhibitor von Zell-Zell-Kontakten charakterisiert wurde, ist dies auch bei der Spermien-Eizellen-Interaktion denkbar, etwa als Schutz der Eizelle vor Polyspermie. Die regulatorischen Mechanismen dieser Hypothese bleiben unklar, da bei der Akrosomen-Reaktion Neuraminidasen freigesetzt werden, die nachweislich Sialinsäuren von Glykokonjugaten abspalten.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit verschiedene chemische und immunologische Verfahren auf Ejakulatsproben angewendet werden (*swim-up*, C7/C9-HPLC-Analysen, HPLC-basierte Kettenlängenbestimmung von PolySia, Affinitätspräzipitation und Immunfluoreszenztechniken). Auf diese Weise konnte erstmalig gezeigt werden, dass polysialylierte Proteine als Teil der extrazellulären Glykokalix im postakrosomalen Bereich von bovinen und humanen Spermien präsent sind und dass die an N-Glykanen gebundenen PolySia-Ketten dabei einen Polysialylierungsgrad mit mehr als 40 Sialinsäureresten aufweisen können.

## 7 Zusammenfassung

Polysialinsäure (PolySia), ein Homopolymer aus  $\alpha$ 2,8-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren, ist bisher vor allem als essentieller Regulator von Adhäsionsprozessen im sich entwickelnden Säugerhirn bekannt. Dabei wurde PolySia als posttranslationale Modifikation zweier Proteine identifiziert: dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM und dem synaptischen Zelladhäsionsmolekül SynCAM 1. Da in Seeigel-Sperma bereits PolySia nachgewiesen werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob PolySia auch auf Spermien von Säugetieren vorkommt.

Erste Hinweise auf das Vorliegen von Oligo- und/oder PolySia lieferte der Nachweis interner Sialinsäuren (Sia) mit der C7/C9-Methode [Sato *et al.*; 1998]. Mittels „milder“ DMB-Derivatisierung konnte verifiziert werden, dass die internen Sia-Reste Bestandteil von Sialinsäurpolymeren sind. Dabei wurden PolySia-Kettenlängen mit bis zu 46 Sia-Resten beim Rind und bis zu 49 beim Menschen bestimmt, was die Existenz von PolySia im bovinen und humanen Sperma beweist. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen, dass die polysialylierten Glykoproteine sowohl bei bovinen als auch bei humanen Spermien auf der Oberfläche vorkommen und dass die  $\alpha$ 2,8-verknüpften PolySia-Ketten an N-Glykane der polysialylierten Glykoproteine gebunden sind.

Durch Fluoreszenz-Mikroskopie konnten darüber hinaus die polysialylierten Glykokonjugate bei bovinen Spermien innerhalb der postakrosomalen Region lokalisiert werden. Bei humanen Spermien war PolySia ebenfalls in der postakrosomalen Region darstellbar, jedoch im Vergleich zu bovinen Spermien mehr in Richtung Hals verlagert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass polysialylierte Glykoproteine auf Spermien von Säugetieren vorhanden sind. Somit wurde die Basis für weiterführende Studien hinsichtlich der Identifizierung der PolySia-Trägerproteine sowie deren PolySia-abhängige Funktionen auf Spermien geschaffen, die nachfolgend zur Identifizierung von NCAM und der Polysialyltransferase ST8SiaII als polysialylierte Proteine führte [Simon *et al.*; 2013]. Es ist nachgewiesen, dass PolySia sowohl Histon-vermittelte Zytotoxizität als auch einen als *neutrophil extracellular trap* (NET) bezeichneten Mechanismus, der ebenfalls zytotoxisch wirkt, abschwächen und sogar aufheben kann. Da diese Mechanismen nach der Insemination eine wichtige Rolle spielen, lässt sich somit

eine wichtige immunmodulatorische Funktion von PolySia im weiblichen Genitaltrakt vermuten.

## 8 Summary

Polysialic acid (polySia), a homopolymer consisting of  $\alpha$ 2,8-linked *N*-acetylneuraminic acids, is known as an essential regulator of adhesion processes in the developing mammalian brain. Here, polySia has been identified as a posttranslational modification of the *neural cell adhesion molecule* NCAM and the *synaptic cell adhesion molecule* SynCAM 1. Since polySia has also been detected in sea urchin sperm and is involved during fertilization processes, we wanted to investigate if polysialylated proteins are also localized at the surface of mammalian sperms.

The first evidence for the presence of oligo- and/or polySia in mammalian semen was provided by the detection of internal sialic acid residues using the C7/C9-method [Sato *et al.*; 1998]. Subsequent "mild" DMB-derivatization showed that internal sialic acid residues are part of sialic acid polymers, of which the degree of polymerization ranged from  $\sim$  46 sia residues in bovine up to  $\sim$  49 sia residues in human semen. Thus, the existence of polySia in bovine and human semen was confirmed. Additional Western blot based experiments demonstrated that polysialylated glycoproteins were associated to bovine and human sperm and that  $\alpha$ 2,8-linked polySia chains were attached to N-glycans of these polysialylated glycoproteins.

Furthermore, polysialylated glycoconjugates could be localized in the postacrosomal region of bovine and human sperms using fluorescence microscopy. In human sperm, however, the polySia positive area appeared to be more closely associated with the neck.

In summary the results of this thesis demonstrated for the first time that polysialylated glycoproteins are present in the postacrosomal region of mammalian sperm. Based on these findings, further investigations allowed the identification of two polySia carriers, NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII, which are modified by the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV [Simon *et al.*; 2013]. Since polySia is known to counteract histone- as well as *neutrophil extracellular trap* (NET)-mediated cytotoxicity against host cells, which plays a role after insemination, we propose an immunomodulatoric function of polySia in the female reproduction tract.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Ap	A-Pale (hell) Spermato gonien
Ad	A-Dark (dunkel) Spermato gonien
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	Vom Hirn abstammender neurotropher Factor ( <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Oberflächenantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EndoN	Endoneuraminidase N
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluorescein
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
Ig	Immunglobulin
IVF	<i>in-vitro</i> -Fertilisation
KDN	Deaminoneuraminsäure
LM	Laufmittel
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Analyse ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight</i> )
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül ( <i>neural cell adhesion molecule</i> )
NET	Neutrophile extrazelluläre Fallen ( <i>neutrophil extracellular traps</i> )
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor ( <i>nerve growth factor</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PNGaseF	<i>N</i> -Glykosidase F
PolySia	Polysialinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
Sia	Sialinsäure
ST8SiaII	Polysialyltransferase II
ST8SiaIV	Polysialyltransferase IV
SynCAM	Synaptisches Zelladhäsionsmolekül ( <i>synaptic cell adhesion molecule</i> )
TALP	Tyrode-Medium mit Albumin, Laktat und Pyruvat
TFA	Tri-Fluor-Essigsäure
UDP	Uridin-Di-Phosphat
WGA	Weizenkeim-Agglutinin ( <i>wheat germ agglutinin</i> )

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren .....	3
Abbildung 1.2	Darstellung der bisher bekannten Oligo/PolySia-Verknüpfungen.	4
Abbildung 1.3	Darstellung eines $\alpha$ 2,8-verknüpften Neu5Ac-Polymers .....	5
Abbildung 1.4	Wirkung von PolySia auf NCAM .....	7
Abbildung 1.5	Spermatogenese .....	11
Abbildung 1.6	Differenzierung der Spermatide zu Spermatozoen .....	13
Abbildung 1.7	Aufbau eines Spermiums.....	17
Abbildung 1.8	Interaktion von Spermium und Eizelle .....	20
Abbildung 4.1	<i>Swim-up</i> .....	28
Abbildung 4.2	Schema zur Kopplung von Proteinen an tosylaktivierte magnetische <i>beads</i> .....	31
Abbildung 4.3	C7/C9-Methode nach Sato I .....	33
Abbildung 4.4	C7/C9-Methode nach Sato II .....	34
Abbildung 4.5	Bestimmung der Kettenlänge I .....	35
Abbildung 4.6	Bestimmung der Kettenlänge II .....	36
Abbildung 5.1	C7/C9-HPLC-Analyse von bovinen Spermien I.....	44
Abbildung 5.2	C7/C9-HPLC-Analyse von bovinen Spermien II .....	47
Abbildung 5.3	C7/C9-HPLC-Analyse von humanen Spermien I.....	48
Abbildung 5.4	C7/C9-HPLC-Analyse von humanen Spermien II .....	49
Abbildung 5.5	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien I.....	50
Abbildung 5.6	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien II ....	51
Abbildung 5.7	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen boviner Spermien III ...	52
Abbildung 5.8	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien I....	53
Abbildung 5.9	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien II ..	54
Abbildung 5.10	Bestimmung der PolySia-Kettenlängen humaner Spermien III	55
Abbildung 5.11	Bestimmung von Kettenlängen $\alpha$ 2,9-verknüpfter PolySia I.....	56
Abbildung 5.12	Darstellung $\alpha$ 2,9-verknüpfter, partiell laktonisierter PolySia ...	57
Abbildung 5.13	Bestimmung von Kettenlängen $\alpha$ 2,9-verknüpfter PolySia II ...	58
Abbildung 5.14	<i>Western Blot</i> Analyse von bovinen Spermien I .....	60
Abbildung 5.15	<i>Western Blot</i> Analyse von bovinen Spermien II .....	61
Abbildung 5.16	<i>Western Blot</i> Analyse von humanen Spermien .....	63
Abbildung 5.17	Immunfluoreszenz boviner Spermien I .....	64
Abbildung 5.18	Immunfluoreszenz boviner Spermien II.....	65

Abbildung 5.19	Immunfluoreszenz boviner Spermien - Negativ-Kontrolle .....	65
Abbildung 5.20	Immunfluoreszenz humaner Spermien I.....	66
Abbildung 5.21	Immunfluoreszenz humaner Spermien II.....	67
Abbildung 5.22	Immunfluoreszenz humaner Spermien - Negativ-Kontrolle ....	67
Abbildung 6.1	Mögliches Modell einer zytoprotektiven Funktion von polysialyliertem NCAM und ST8SiaII im Ejakulat .....	76

## 11 Literaturverzeichnis

- Abou-haila, A. und Tulsiani, D. R. P.; Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009; 485(1): 72-81
- Afzelius, B. A., Dallai, R., Lanzavecchia, S. und Bellon, P. L.; Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms; *Tissue and Cell*, 1995; 27(3): 241-247
- Amann, R. P.; The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit?; *J Androl*, 2008; 29(5): 469-487
- Angata, T. und Varki, A.; Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective; *Chem Rev*, 2002; 102(2): 439-469
- Arenas, M. I., de Miguel, M. P., Bethencourt, F. R., Fraile, B., Royuela, M. und Paniagua, R.; Lectin histochemistry in the human epididymis; *J Reprod Fertil*, 1996; 106(2): 313-320
- Arya, M. und Vanha-Perttula, T.; Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria; *Am J Anat*, 1986; 175(4): 449-469
- Barbeau, D., Liang, J. J., Robitalille, Y., Quirion, R. und Srivastava, L. K.; Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995; 92(7): 2785-2789
- Barry, G. T. und Goebel, W. F.; Colominic Acid, a Substance of Bacterial Origin related to Sialic Acid; *Nature*, 1957; 179(4552): 206-206
- Bearer, E. L. und Friend, D. S.; Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation; *J Electron Microscop Tech*, 1990; 16(4): 281-297
- Bedford, J. M.; The status and the state of the human epididymis; *Human Reproduction*, 1994; 9(11): 2187-2199
- Bedford, J. M., Moore, H. D. M. und Franklin, L. E.; Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals; *Experimental Cell Research*, 1979; 119(1): 119-126
- Benoff, S.; Carbohydrates and fertilization: an overview; *Molecular Human Reproduction*, 1997; 3(7): 599-637
- Bergmann, M.; Spermatogenese; In: Krause, W. und Weidner, W.; *Andrologie; Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*; Stuttgart, 1998; Ferdinand Enke Verlag; 3. Auflage, 9-14
- Bhattacharjee, A. K. und Jennings, H. J.; Determination of the linkages in some methylated, sialic acid-containing, meningococcal polysaccharides by mass spectrometry; *Carbohydrate Research*, 1976; 51(2): 253-261
- Bhattacharjee, A. K., Jennings, H. J., Kenny, C. P., Martin, A. und Smith, I. C.; Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance; *Journal of Biological Chemistry*, 1975; 250(5): 1926-1932
- Bonfanti, L.; PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis; *Progress in Neurobiology*, 2006; 80(3): 129-164
- Brinkmann, V. und Zychlinsky, A.; Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs; *Nat Rev Microbiol*, 2007; 5(8): 577-582
- Bruses, J. L. und Rutishauser, U.; Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development; *Biochimie*, 2001; 83(7): 635-643
- Chao, C.-F., Chuang, H.-C., Chiou, S.-T. und Liu, T.-Y.; On the Biosynthesis of Alternating alpha-2,9/alpha-2,8 Heteropolymer of Sialic Acid Catalyzed by the Sialyltransferase of *Escherichia coli* Bos-12; *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(26): 18206-18212

- Chen, Y. und Tang, B. L.; Unique Intracellular Trafficking Processes Associated With Neural Cell Adhesion Molecule and Its Intracellular Signaling; *Cell Communication and Adhesion*, 2011; 17(4-6): 69-74
- Cheng, M.-C., Lin, C.-H., Lin, H.-J., Yu, Y.-P. und Wu, S.-H.; Hydrolysis, lactonization, and identification of alpha2,8/alpha2,9 alternatively linked tri-, tetra-, and polysialic acids; *Glycobiology*, 2004; 14(2): 147-155
- Clermont, Y.; The cycle of the seminiferous epithelium in man; *Am J Anat*, 1963; 112: 35-51
- Cooper, T. G.; Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem; *Asian J Androl*, 2007; 9(4): 533-539
- Cooper, T. G. und Yeung, C. H.; Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet; *Microscopy Research and Technique*, 2003; 61(1): 28-38
- Cooper, T. G. und Yeung, C. H.; Physiologie der Spermienreifung und Fertilisation; In: Nieschlag, E. und Behre, H. M.; *Andrologie*; Berlin, 2009; Springer; 3. Auflage, 64-86
- Cornwall, G. A.; New insights into epididymal biology and function; *Hum Reprod Update*, 2009; 15(2): 213-27
- Cortes, P. P., Orihuela, P. A., Zuniga, L. M., Velasquez, L. A. und Croxatto, H. B.; Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface; *Biol Reprod*, 2004; 71(4): 1262-1269
- Crocker, P. R., Paulson, J. C. und Varki, A.; Siglecs and their roles in the immune system; *Nat Rev Immunol*, 2007; 7(4): 255-266
- Croxatto, H. B.; Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube; *Reprod Biomed Online*, 2002; 4(2): 160-169
- Curreli, S., Arany, Z., Gerardy-Schahn, R., Mann, D. und Stamatou, N. M.; Polysialylated Neuropilin-2 Is Expressed on the Surface of Human Dendritic Cells and Modulates Dendritic Cell-T Lymphocyte Interactions; *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(42): 30346-30356
- de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. und Wreford, N.; Spermatogenesis; *Human Reproduction*, 1998; 13(suppl 1): 1-8
- Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Patankar, M. und Clark, G. F.; The glycobiochemistry of gametes and fertilization; *Biochim Biophys Acta*, 1999; 1473(1): 196-205
- DeMott, R. P., Lefebvre, R. und Suarez, S. S.; Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium; *Biology of Reproduction*, 1995; 52(6): 1395-1403
- Dobrinski, I., Smith, T. T., Suarez, S. S. und Ball, B. A.; Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro; *Biology of Reproduction*, 1997; 56(4): 861-869
- Eddy, E. M., Vernon, R. B., Muller, C. H., Hahnel, A. C. und Fenderson, B. A.; Immunodissection of sperm surface modifications during epididymal maturation; *Am J Anat*, 1985; 174(3): 225-237
- Ehmcke, J. und Schlatt, S.; A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates; *Reproduction*, 2006a; 132(5): 673-680
- Ehmcke, J., Wistuba, J. und Schlatt, S.; Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives; *Human Reproduction Update*, 2006b; 12(3): 275-282
- Faillard, H.; The early history of sialic acids; *Trends in Biochemical Sciences*, 1989; 14(6): 237-241
- Fawcett, D. W.; The mammalian spermatozoon; *Developmental Biology*, 1975; 44(2): 394-436
- Frenette, G. und Sullivan, R.; Prostate-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface; *Mol Reprod Dev*, 2001; 59(1): 115-121
- Frosch, M., G6rgen, I., Boulnois, G. J., Timmis, K. N. und Bitter-Suermann, D.; NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens:

- Isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci; *Immunol*, 1985; 82: 1194-1198
- Fujihara, Y., Murakami, M., Inoue, N., Satouh, Y., Kaseda, K., Ikawa, M. und Okabe, M.; Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse; *J Cell Sci*, 2010; 123(9): 1531-1536
- Gahmberg, C. G. und Tolvanen, M.; Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins; *Trends Biochem Sci*, 1996; 21(8): 308-311
- Galuska, S. P., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Mühlenhoff, M. und Geyer, H.; Enzyme-dependent Variations in the Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in Vivo; *J Biol Chem*, 2008; 283(1): 17-28
- Galuska, S. P., Geyer, R., Mühlenhoff, M. und Geyer, H.; Characterization of Oligo- and Polysialic Acids by MALDI-TOF-MS; *Anal Chem*, 2007; 79(18): 7161-7169
- Galuska, S. P., Oltmann-Norden, I., Geyer, H., Weinhold, B., Kuchelmeister, K., Hildebrandt, H., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R. und Mühlenhoff, M.; Polysialic Acid Profiles of Mice Expressing Variant Allelic Combinations of the Polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV; *J Biol Chem*, 2006; 281(42): 31605-31615
- Galuska, S. P., Rollenhagen, M., Kaup, M., Eggers, K., Oltmann-Norden, I., Schiff, M., Hartmann, M., Weinhold, B., Hildebrandt, H., Geyer, R., Mühlenhoff, M. und Geyer, H.; Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010; 107(22): 10250-10255
- Green, P. J., Yuen, C.-T., Childs, R. A., Chai, W., Miyasaka, M., Lemoine, R., Lubineau, A., Smith, B., Ueno, H., Nicolaou, K. C. und Feizi, T.; Further studies of the binding specificity of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin, towards sulphated oligosaccharides – suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems; *Glycobiology*, 1995; 5(1): 29-38
- Guttman, J. A., Kimel, G. H. und Vogl, A. W.; Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertoli cell junction plaques (ectoplasmic specializations); *J Cell Sci*, 2000; 113(12): 2167-2176
- Halttunen, M., Kämäräinen, M. und Koistinen, H.; Glycodelin: a reproduction-related lipocalin; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000; 1482(1-2): 149-156
- Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J.-M. und Oriol, R.; Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes; *BMC Evolutionary Biology*, 2008; 8(1): 258 doi: 10.1186/1471-2148-8-258
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.-A., Samyn-Petit, B., Julien, S. und Delannoy, P.; The human sialyltransferase family; *Biochimie*, 2001; 83(8): 727-737
- Haselhorst, T., Stummeyer, K., Mühlenhoff, M., Schaper, W., Gerardy-Schahn, R. und von Itzstein, M.; Endosialidase NF appears to bind polySia DP5 in a helical conformation; *Chembiochem*, 2006; 7(12): 1875-1877
- Hinsby, A. M., Berezin, V. und Bock, E.; Molecular mechanisms of NCAM function; *Front Biosci*, 2004; 9: 2227-2244
- Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B. A. und Edelman, G. M.; Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes; *J Biol Chem*, 1982; 257(13): 7720-7729
- Holstein, A. F.; Männliche Geschlechtsorgane; In: Drenckhahn, D. und Zenker, W.; *Benninghoff Anatomie*; München, 1994; Urban & Schwarzenberg; 15. Auflage, 69-114
- Holt, W. V.; Surface-Bound Sialic Acid on Ram and Bull Spermatozoa: Deposition During Epididymal Transit and Stability During Washing; *Biology of Reproduction*, 1980; 23(4): 847-857

- Holt, W. V. und Fazeli, A.; The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection; *Molecular Reproduction and Development*, 2010; 77(11): 934-943
- Ijuin, T., Kitajima, K., Song, Y., Kitazume, S., Inoue, S., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A. und Inoue, Y.; Isolation and identification of novel sulfated and nonsulfated oligosialyl glycosphingolipids from sea urchin sperm; *Glycoconj J*, 1996; 13(3): 401-413
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M. und Okabe, M.; Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte; *The Journal of Clinical Investigation*, 2010; 120(4): 984-994
- Inoue, S. und Iwasaki, M.; Characterization of a new type of glycoprotein saccharides containing polysialosyl sequence; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1980; 93(1): 162-165
- Inoue, S., Lin, S.-L., Lee, Y. C. und Inoue, Y.; An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis; *Glycobiology*, 2001; 11(9): 759-767
- Isomura, R., Kitajima, K. und Sato, C.; Structural and Functional Impairments of Polysialic Acid by a Mutated Polysialyltransferase Found in Schizophrenia; *Journal of Biological Chemistry*, 2011; 286(24): 21535-21545
- Ivell, R.; Mini symposium. The role of carbohydrates in reproduction; *Human Reproduction Update*, 1999; 5(4): 277-279
- Johnson, C. P., Fujimoto, I., Rutishauser, U. und Leckband, D. E.; Direct Evidence That Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Polysialylation Increases Intermembrane Repulsion and Abrogates Adhesion; *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280(1): 137-145
- Johnson, L. und Varner, D. D.; Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis; *Biology of Reproduction*, 1988; 39(4): 812-817
- Kanato, Y., Kitajima, K. und Sato, C.; Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization; *Glycobiology*, 2008; 18(12): 1044-1053
- Kasturi, L., Eshleman, J. R., Wunner, W. H. und Shakin-Eshleman, S. H.; The Hydroxy Amino Acid in an Asn-X-Ser/Thr Sequon Can Influence N-Linked Core Glycosylation Efficiency and the Level of Expression of a Cell Surface Glycoprotein; *Journal of Biological Chemistry*, 1995; 270(24): 14756-14761
- Katsumata, T., Noguchi, S., Yonezawa, N., Tanokura, M. und Nakano, M.; Structural Characterization of the N-Linked Carbohydrate Chains of the Zona Pellucida Glycoproteins from Bovine Ovarian and Fertilized Eggs; *European Journal of Biochemistry*, 1996; 240(2): 448-453
- Katz, D. F. und Yanagimachi, R.; Movement Characteristics of Hamster Spermatozoa Within the Oviduct; *Biology of Reproduction*, 1980; 22(4): 759-764
- Kean, E. L.; Sialic acid activation; *Glycobiology*, 1991; 1(5): 441-447
- Kelm, S. und Schauer, R.; Sialic acids in molecular and cellular interactions; *Int Rev Cytol*, 1997; 175: 137-240
- Kielczynski, W., Bartholomeusz, R. K. und Harrison, L. C.; Characterization of ganglioside associated with the thyrotrophin receptor; *Glycobiology*, 1994; 4(6): 791-796
- Kitazume, S., Kitajima, K., Inoue, S., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A., Lennarz, W. J. und Inoue, Y.; The Occurrence of Novel 9-O-Sulfated N-Glycolylneuraminic Acid-capped 25-O-linked Oligo/PolyNeu5Gc Chains in Sea Urchin Egg Cell Surface Glycoprotein; *Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271(12): 6694-6701
- Koehler, J. K.; Lectins as probes of the spermatozoon surface; *Arch Androl*, 1981; 6(3): 197-217
- Koyama, K., Hasegawa, A. und Komori, S.; Functional aspects of CD52 in reproduction; *Journal of Reproductive Immunology*, 2009; 83(1-2): 56-59
- Kwiatkowski, B., Boschek, B., Thiele, H. und Stirm, S.; Endo-N-acetylneuraminidase associated with bacteriophage particles; *J Virol*, 1982; 43(2): 697-704
- Lefebvre, R., Lo, M. C. und Suarez, S. S.; Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition; *Biology of Reproduction*, 1997; 56(5): 1198-1204

- Lefièvre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C. und Barratt, C. L. R.; Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human\*; *Human Reproduction*, 2004; 19(7): 1580-1586
- Légaré, C., Bérubé, B., Boué, F., Lefièvre, L., Morales, C. R., El-Alfy, M. und Sullivan, R.; Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein; *Molecular Reproduction and Development*, 1999; 52(2): 225-233
- Lehmann, U.; *Paläontologisches Wörterbuch*; Stuttgart, 1996; Enke; 4. Auflage
- Leiding, C.; Künstliche Besamung beim Rind; In: Busch, W. und Waberski, D.; *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*; Stuttgart, 2007; Schattauer; 1. Auflage, 147-167
- Li, L. H., Jester, W. F., Jr. und Orth, J. M.; Expression of 140-kDa neural cell adhesion molecule in developing testes in vivo and in long-term Sertoli cell-gonocyte cocultures; *J Androl*, 1998; 19(3): 365-373
- Liedtke, S., Geyer, H., Wuhler, M., Geyer, R., Frank, G., Gerardy-Schahn, R., Zahringer, U. und Schachner, M.; Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule; *Glycobiology*, 2001; 11(5): 373-384
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G. und Primakoff, P.; A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg; *The Journal of Cell Biology*, 1994; 125(5): 1157-1163
- Lu, D. P., Tian, L., O' Neill, C. und King, N. J.; Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos; *Cell Res*, 2002; 12(5-6): 373-383
- Lui, W.-Y., Mruk, D., Lee, W. M. und Cheng, C. Y.; Sertoli Cell Tight Junction Dynamics: Their Regulation During Spermatogenesis; *Biology of Reproduction*, 2003; 68(4): 1087-1097
- Marengo, S. R.; Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane; *Animal Reproduction Science*, 2008; 105(1): 52-63
- Marquez, B. und Suarez, S. S.; Different Signaling Pathways in Bovine Sperm Regulate Capacitation and Hyperactivation; *Biology of Reproduction*, 2004; 70(6): 1626-1633
- McGuire, E. J. und Binkley, S. B.; The Structure and Chemistry of Colominic Acid\*; *Biochemistry*, 1964; 3(2): 247-251
- Middendorff, R., Muller, D., Mewe, M., Mukhopadhyay, A. K., Holstein, A. F. und Davidoff, M. S.; The Tunica Albuginea of the Human Testis Is Characterized by Complex Contraction and Relaxation Activities Regulated by Cyclic GMP; *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87(7): 3486-3499
- Mikkonen, M., Soininen, H., Alafuzof, I. und Miettinen, R.; Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease; *Rev Neurosci*, 2001; 12(4): 311-325
- Miyata, S., Sato, C. und Kitajima, K.; Glycobiology of Polysialic Acids on Sea Urchin Gametes; *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2007; 19(106): 85-98
- Miyata, S., Sato, C., Kitamura, S., Toriyama, M. und Kitajima, K.; A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an  $\alpha$ 2,9-linked poly-N-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue; *Glycobiol*, 2004; 14(9): 827-840
- Miyata, S., Sato, C., Kumita, H., Toriyama, M., Vacquier, V. D. und Kitajima, K.; Flagelliasialin: a novel sulfated  $\alpha$ -2,9-linked polysialic acid glycoprotein of sea urchin sperm flagella; *Glycobiol*, 2006; 16(12): 1229-1241
- Miyata, S., Yamakawa, N., Toriyama, M., Sato, C. und Kitajima, K.; Co-expression of two distinct polysialic acids,  $\alpha$ -2,8- and  $\alpha$ -2,9-linked polymers of N-acetylneuraminic acid, in distinct glycoproteins and glycolipids in sea urchin sperm; *Glycobiol*, 2011; 21(12): 1596-1605
- Mruk, D. D. und Cheng, C. Y.; Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis; *Endocr Rev*, 2004; 25(5): 747-806

- Münster, A.-K., Eckhardt, M., Potvin, B., Mühlenhoff, M., Stanley, P. und Gerardy-Schahn, R.; Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: A nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 95(16): 9140-9145
- Naaby-Hansen, S., Flickinger, C. J. und Herr, J. C.; Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa; *Biology of Reproduction*, 1997; 56(3): 771-787
- Neugebauer, D. C., Neuwinger, J., Jockenhövel, F. und Nieschlag, E.; '9 + 0' Axoneme in spermatozoa and some nasal cilia of a patient with totally immotile spermatozoa associated with thickened sheath and short midpiece; *Human Reproduction*, 1990; 5(8): 981-986
- Oehninger, S.; Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction; *Cells Tissues Organs*, 2001; 168(1-2): 58-64
- Oltmann-Norden, I., Galuska, S. P., Hildebrandt, H., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H. und Mühlenhoff, M.; Impact of the Polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on Polysialic Acid Synthesis during Postnatal Mouse Brain Development; *J Biol Chem*, 2008; 283(3): 1463-1471
- Orihuela, P. A., Ortiz, M. E. und Croxatto, H. B.; Sperm Migration into and through the Oviduct Following Artificial Insemination at Different Stages of the Estrous Cycle in the Rat; *Biology of Reproduction*, 1999; 60(4): 908-913
- Pang, P. C., Tissot, B., Drobnis, E. Z., Sutovsky, P., Morris, H. R., Clark, G. F. und Dell, A.; Expression of bisecting type and Lewisx/Lewisy terminated N-glycans on human sperm; *J Biol Chem*, 2007; 282(50): 36593-36602
- Pedersen, H.; The postacrosomal region of the spermatozoa of man and *Macaca arctoides*; *Journal of Ultrastructure Research*, 1972; 40(3-4): 366-377
- Pesch, S. und Bergmann, M.; Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation; *Micron*, 2006; 37(7): 597-612
- Pisal, D. S., Kosloski, M. P. und Balu-Iyer, S. V.; Delivery of therapeutic proteins; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 99(6): 2557-2575
- Primakoff, P. und Myles, D. G.; Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction; *Science*, 2002; 296(5576): 2183-2185
- Rabionet, M., van der Spoel, A. C., Chuang, C.-C., von Tümppling-Radosta, B., Litjens, M., Bouwmeester, D., Hellbusch, C. C., Körner, C., Wiegandt, H., Gorgas, K., Platt, F. M., Gröne, H.-J. und Sandhoff, R.; Male Germ Cells Require Polyenoic Sphingolipids with Complex Glycosylation for Completion of Meiosis; *Journal of Biological Chemistry*, 2008; 283(19): 13357-13369
- Rademacher, T. W., Parekh, R. B. und Dwek, R. A.; Glycobiology; *Annu Rev Biochem*, 1988; 57: 785-838
- Robitaille, G., Sullivan, R. und Bleau, G.; Identification of epididymal proteins associated with hamster sperm; *Journal of Experimental Zoology*, 1991; 258(1): 69-74
- Russell, L.; Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis; *Am J Anat*, 1977; 148(3): 313-328
- Rutishauser, U. und Landmesser, L.; Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions; *Trends Neurosci*, 1996; 19(10): 422-427
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., Lohmeyer, J. und Preissner, K. T.; Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones; *PLoS One*, 2012; 7(2): e32366; doi: 10.1371/journal.pone.0032366
- Saffarzadeh, M. und Preissner, K. T.; Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection; *Curr Opin Hematol*, 2013; 20(1): 3-9
- Sato, C.; Chain Length Diversity of Sialic Acids and Its Biological Significance; *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2004; 16(91): 331-344

- Sato, C., Inoue, S., Matsuda, T. und Kitajima, K.; Development of a Highly Sensitive Chemical Method for Detecting alpha-2,8-linked Oligo/Polysialic Acid Residues in Glycoproteins Blotted on the Membrane; *Anal Biochem*, 1998; 261: 191-197
- Sato, C., Kitajima, K., Tazawa, I., Inoue, Y., Inoue, S. und Troy, F. A., 2nd; Structural diversity in the alpha 2-->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms; *J Biol Chem*, 1993; 268(31): 23675-84
- Schauer, R.; Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man; *Zoology*, 2004; 107: 49-64
- Schauer, R.; Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions; *Current Opinion in Structural Biol*, 2009; 19: 507-514
- Schnorr, B.; *Embryologie der Haustiere*; Stuttgart, 2006; Enke; 5. Auflage, 10-13
- Schroeter, S., Osterhoff, C., McArdle, W. und Ivell, R.; The glycocalyx of the sperm surface; *Human Reproduction Update*, 1999; 5(4): 302-313
- Schwarzkopf, M., Knobeloch, K.-P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W. und Horstkorte, R.; Sialylation is essential for early development in mice; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99(8): 5267-5270
- Seitz, J.; *Nebenhoden und Samenleiter*; In: Krause, W. und Weidner, W.; *Andrologie; Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*; Stuttgart, 1998; Ferdinand Enke Verlag; 3. Auflage, 14-17
- Si, Y. und Okuno, M.; The Sliding of the Fibrous Sheath through the Axoneme Proximally Together with Microtubule Extrusion; *Experimental Cell Research*, 1993; 208(1): 170-174
- Simon, P., Bäumner, S., Busch, O., Rohrich, R., Kaese, M., Richterich, P., Wehrend, A., Müller, K., Gerardy-Schahn, R., Mühlhoff, M., Geyer, H., Geyer, R., Middendorff, R. und Galuska, S. P.; Polysialic acid is present in mammalian semen as a posttranslational modification of NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII; *J Biol Chem*, 2013; doi: 10.1074/jbc.M113.451112
- Sinowatz, F.; *Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane*; In: Busch, W. und Holzmann, A.; *Veterinärmedizinische Andrologie, Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*; Stuttgart, 2001; Schattauer, 1-22
- Soler, C., Yeung, C. H. und Cooper, T. G.; Development of sperm motility patterns in the murine epididymis; *Int J Androl*, 1994; 17(5): 271-278
- Soroka, V., Kolkova, K., Kastrup, J. S., Diederichs, K., Breed, J., Kiselyov, V. V., Poulsen, F. M., Larsen, I. K., Welte, W., Berezin, V., Bock, E. und Kasper, C.; Structure and Interactions of NCAM Ig1-2-3 Suggest a Novel Zipper Mechanism for Homophilic Adhesion; *Structure*, 2003; 11(10): 1291-1301
- Stein, K. K., Primakoff, P. und Myles, D. G.; Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane; *Journal of Cell Science*, 2004; 117(26): 6269-6274
- Suarez, S. S.; Formation of a reservoir of sperm in the oviduct; *Reprod Domest Anim*, 2002; 37(3): 140-3
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. und Frenette, G.; Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract; *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2005; 35(1): 1-10
- Swartley, J. S., Marfin, A. A., Edupuganti, S., Liu, L. J., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J. D. und Stephens, D. S.; Capsule switching of *Neisseria meningitidis*; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997; 94(1): 271-276
- Talbot, P., Shur, B. D. und Myles, D. G.; Cell Adhesion and Fertilization: Steps in Oocyte Transport, Sperm-Zona Pellucida Interactions, and Sperm-Egg Fusion; *Biology of Reproduction*, 2003; 68(1): 1-9
- Tulsiani, D. R. P., Abou-Haila, A., Loeser, C. R. und Pereira, B. M. J.; The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization; *Experimental Cell Research*, 1998; 240(2): 151-164
- Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., Saboor, F., Simon, P., Middendorff, R., Geyer, H., Henneke, I., Bayer, N., Rinne, S., Lutteke, T.,

- Bottcher-Friebertshäuser, E., Gerardy-Schahn, R., Schwarzer, D., Mühlenhoff, M., Preissner, K. T., Günther, A., Geyer, R. und Galuska, S. P.; Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung; *Cell Mol Life Sci*, 2013; doi: 10.1007/s00018-013-1342-0
- Velasquez, J. G., Canovas, S., Barajas, P., Marcos, J., Jimenez-Movilla, M., Gallego, R. G., Ballesta, J., Aviles, M. und Coy, P.; Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding; *Mol Reprod Dev*, 2007; 74(5): 617-628
- Vimr, E. und Lichtensteiger, C.; To sialylate, or not to sialylate: that is the question; *Trends Microbiol*, 2002; 10(6): 254-257
- Weinbauer, G. F., Gromoll, J., Simoni, M. und Nieschlag, E.; Physiologie der Hodenfunktion; In: Nieschlag, E. und Behre, H. M.; *Andrologie*; Berlin, 2009; Springer; 3. Auflage, 27-67
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlenhoff, M., Schertzing, F., Conzelmann, S., Marth, J. D., Gerardy-Schahn, R. und Hildebrandt, H.; Genetic Ablation of Polysialic Acid Causes Severe Neurodevelopmental Defects Rescued by Deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule; *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280(52): 42971-42977
- Weitze, K.-F.; Spermatologische Untersuchung; In: Busch, W., Holzmann, A.; *Veterinärmedizinische Andrologie, Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*; Stuttgart, 2001; Schattauer, 87-109, 119-137
- Westermeier, R.; *Elektrophorese-Praktikum*; Weinheim, 1990; VCH;
- Whyte, A. und Allen, W. R.; Equine endometrium at pre-implantation stages of pregnancy has specific glycosylated regions; *Placenta*, 1985; 6(6): 537-542
- Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T. und Kitajima, K.; Polysialic Acid in Human Milk; *Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278(16): 13875-13880
- Yanagimachi, R., Noda, Y. D., Fujimoto, M. und Nicolson, G. L.; The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa; *Am J Anat*, 1972; 135(4): 497-519
- Yang, Y. und Han, C.; GDNF stimulates the proliferation of cultured mouse immature Sertoli cells via its receptor subunit NCAM and ERK1/2 signaling pathway; *BMC Cell Biology*, 2010; 11(1): 78; doi: 10.1186/1471-2121-11-78
- Yeung, C. H., Cooper, T. G., Oberpenning, F., Schulze, H. und Nieschlag, E.; Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis; *Biol Reprod*, 1993; 49(2): 274-280
- Yeung, C. H., Pérez-Sánchez, F., Schröter, S., Kirchhoff, C. und Cooper, T. G.; Changes of the major sperm maturation-associated epididymal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation in capacitation conditions; *Molecular Human Reproduction*, 2001; 7(7): 617-624
- Yeung, C. H., Perez-Sanchez, F., Soler, C., Poser, D., Kliesch, S. und Cooper, T. G.; Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction; *Human Reproduction Update*, 1997; 3(3): 205-213
- Zhang, H. und Martin-Deleon, P. A.; Mouse Epididymal Spam1 (PH-20) Is Released in the Luminal Fluid With its Lipid Anchor; *J Androl*, 2003; 24(1): 51-58
- Zhang, Y. und Lee, Y. C.; Acid-catalyzed Lactonization of alpha2,8-Linked Oligo/Polysialic Acids Studied by High Performance Anion-exchange Chromatography; *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(10): 6183-6189
- Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A. und Roth, J.; Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain; *Journal of Biological Chemistry*, 1992; 267(14): 9965-9971

## 12 Publikation und Posterbeitrag

### Publikation:

Simon, P.\*, **Bäumner, S.\***, Busch, O.\*, Rohrich, R., Kaese, M., Richterich, P., Wehrend, A., Muller, K., Gerardy-Schahn, R., Muhlenhoff, M., Geyer, H., Geyer, R., Middendorff, R. und Galuska, S. P.; *Polysialic acid is present in mammalian semen as a posttranslational modification of NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII*; Journal of Biological Chemistry, 2013, 288: 18825-18833, doi: 10.1074/jbc.M113.451112

\* *These authors contributed equally to the work*

### Posterbeitrag:

SP Galuska, P Richterich, R Röhrich, **S Bäumner**, H Geyer, R Gerardy-Schahn, M Mühlenhoff, A Wehrend and R Geyer (2010). *Detection of Polysialylated Proteins in Mammalian Sperm*; 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 24.-26. Februar 2010, München, Deutschland

## **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.

---

Rik Sören Bäumner