

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Charakterisierung von Proteinen und Untersuchung des IGF- Systems im Eberseminalplasma

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anja Heike Hochschulz
aus Hamburg

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: : Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Für Thomas und meine Eltern

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	3
2.1	Das Seminalplasma	3
2.2	Chemische Zusammensetzung	3
2.2.1	Ionen und anorganische Bestandteile	4
2.2.2	Kleine organische Moleküle	4
2.2.3	Steroide und Prostaglandine	4
2.2.4	Proteinische Komponenten	5
2.2.5	Andere proteinische Komponenten	5
2.2.5.1	Proteine im Eberseminalplasma	5
2.2.5.2	Proteine im Bullenseminalplasma	6
2.2.5.3	Proteine im Hengstseminalplasma	6
2.3	Komponenten des IGF-Systems im Seminalplasma	9
2.4	Einfluß des IGF-Systems auf die Fertilität	11
2.5	Funktion von Proteinen im Eberseminalplasma	13
2.5.1	Einfluß auf die Spermienmotilität	13
2.5.2	Einfluß auf die Kapazitation, Akrosomreaktion, Erkennung und Bindung der Eizelle	15
2.5.3	Einfluß auf die Ovulation	18
2.6	Effektiver Nachweis von Proteinen im Seminalplasma mittels 2D-Gelelektrophorese	19
2.7	Einsatz der 2D-Gelelektrophorese zur Ermittlung der Fertilität	21
3.	Material und Methoden	24
3.1	Probennahme	24
3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	26
3.3	Aufbereitung der Proben für die Elektrophorese	27
3.3.1	Zentrifugation	27
3.3.2	Deglycosylierung	27
3.4	Gel-Elektrophorese von Proteinen	28
3.4.1	1D-SDS-Gel-Elektrophorese (Laemmli 1970)	28
3.4.2	2D-Gel-Elektrophorese (O'Farrel 1975)	29
3.4.2.1	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	29
3.4.2.2	SDS-Gel-Elektrophorese (2. Dimension)	31
3.5	Färbungen von Proteingelen	32
3.5.1	Coomassie-Färbung	32
3.5.2	Silber-Färbung nach Blum (Blum et al. 1987)	32
3.5.3	Trocknen der Gele	33
3.6	Immunblotting und Western Liganden Blotting	33

3.6.1	Semi-dry Western Blotting _____	33
3.6.2	Ponceau S Färbung der Membran _____	34
3.6.3	Immundetektion _____	34
3.6.4	Western-Liganden-Blotting (Hossenlopp et al. 1986; Wolf et al. 1997) _____	36
3.7	Identifikation von 2D-Proteinspots mittels Massenspektrometrie _____	37
3.7.1	Tryptische Spaltung von Proteinen im Gel _____	37
3.7.2	Mikroentsalzung der tryptisch gespaltenen Peptidlösung _____	38
3.7.3	MALDI-TOF-TOF-Analyse der tryptisch gespaltenen Proteine _____	38
3.8	Herstellung von Antikörpern _____	39
3.8.1	Präparation der Antigene _____	39
3.8.2	Immunisierung der Tiere _____	39
3.8.3	Entbluten der Tiere _____	40
3.9	Feststellung der Antiserentiter mittels ELISA _____	40
3.9.1	Beschichten von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Seminalplasma _____	41
3.9.2	Feststellung der Antiserentiter mit Seminalplasma-beschichteten Mikrotiterplatten _____	41
3.10	Radioimmunassay _____	42
3.11	Statistische Auswertung _____	42
3.12	Materialien und Materialienbezug _____	43
3.12.1	Allgemein verwendete Chemikalien _____	43
3.12.2	Antikörper und andere Proteine _____	45
3.12.3	Verschiedenes _____	45
3.12.4	Geräte _____	46
3.12.5	Verwendete Software _____	47
3.12.6	Verwendete Versuchstiere _____	47
4.	Ergebnisse _____	48
4.1	Untersuchung des IGF-Systems im Eberseminalplasma _____	48
4.1.1	Ergebnisse der Proteinbestimmung _____	48
4.1.2	Ergebnisse zur Untersuchung der PSP-I Intensität _____	50
4.1.3	Ergebnisse der IGF-I und IGF-II Konzentrationsbestimmung _____	51
4.1.4	Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von IGFBPs _____	52
4.1.4.1	Reproduzierbarkeit der IGFBP-Aktivitätsbestimmung mittels 1D-Western-Ligandenblot _	52
4.1.4.2	Vergleich der IGFBP-Aktivität einzelner Eber an verschiedenen Probenahmeterminen __	54
4.1.4.3	Isovolumetrischer Vergleich der IGFBP-Aktivität im 1D-Western-Ligandenblot_____	55
4.1.4.4	2D-Ligandenblot _____	57
4.1.4.5	Ergebnisse der MALDI-PMF-Massenspektrometrie _____	59
4.2	Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie _____	60
4.2.1	Verbesserung der 2D-Gelqualität _____	60
4.2.1.1	Zentrifugation _____	60

4.2.1.2	Deglycosylierung	62
4.2.1.3	Verwendung des pH-Bereiches 4 bis 7	64
4.2.2	Ergebnisse der Massenspektrometrie	66
4.2.3	Spezifität der anti-PSP-I Antikörper	71
4.2.3.1	Etablierung eines ELISAs für die anti-PSP-I Antikörper Bestimmung	71
4.2.3.2	1D-Westernblot	72
4.2.3.3	2D-Westernblot	73
5.	Diskussion	75
5.1	Diskussion des IGF-Systems im Eberseminalplasma	75
5.1.1	Gesamtprotein- und PSP-I Konzentration im Eberseminalplasma	75
5.1.2	IGF-I /II-Konzentrationen im Eberseminalplasma	77
5.1.3	IGFBP-Aktivität im Eberseminalplasma	78
5.2	Diskussion der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie	80
5.2.1	Anwendung der 2D-Gelelektrophorese zur Charakterisierung von Proteinen im Eberseminalplasma	80
5.2.2	Verfahren zur Verbesserung der Gelqualität	81
5.2.3	Anwendung der Massenspektrometrie zur Identifizierung der Proteine im Eberseminalplasma	83
5.2.4	Beeinflussung der 2D-Gelelektrophorese durch PSP-I	84
6.	Zusammenfassung	86
7.	Summary	88
8.	Literaturverzeichnis	90

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aSFP	acidic Seminal Fluid Protein (saures Seminalplasmaprotein)
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serum Albumin
BSP	Bovine Seminal Proteine (Bovines Seminalprotein)
CASA	Computergestützte Spermienauswertung
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CSC	Chondroitinsulfat
CRISP	Cysteine-Rich-Secretory-Proteins (Cystein-reiche Sekretions-Proteine)
DIS	Dilution of Semen (Verdünnung des Spermas)
DS	Dermatansulfat
DTE	1,4- Dithioerithrit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Enzymgebundener Immunabsorptionsassay)
FnII-Typ	Fibronectin Typ II-Domäne
HA	Hyaluronsäure
HSP	Horse Seminal Protein (Pferde Seminalprotein)
GAG	Glycosaminoglycane
IGF	Insulin-like Growth Factor (insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IPG	Immobilierter pH Gradient
LSC	Low Sulfated Chondroitin Sulfate (niedrig sulfatiertes Chondroitinsulfat)
kDa	kiloDalton
KB	Künstliche Besamung
NRR	Non-Return-Rate
NEPHGE	Nonequilibrium pH Gradient Elektrophorese
MALDI-TOF/TOF MS	Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Time of Flight Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAP	Prostatic Acid Phosphatase (saure Phosphatase der Prostata)
pB1	Boar protein 1 (Eberprotein 1)
pAIF	porcine Adhesion-Inducing Protein (porcines Adhäsions-induzierendes Protein)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
pI	Isoelektrischer Punkt
PSA	Prostate Specific Antigen (spezifisches Antigen der Prostata)
PSP	Porcines Seminalprotein
RIA	Radioimmunassay
rbGH	recombinant bovine Growth Hormone (rekombinantes bovines Wachstumshormon)
RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SMI	Spermienmotilitätsinhibitor
SMIF	Sperm Motility Inhibiting Factor (Spermienmotilität inhibierender Faktor)
SPMI	Spermienmotilitätsinhibitor
SSP-7	Stallion Seminal Plasma Protein (Hengstseminalplasma-Protein)
TEMED	N N' N' N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic Acid (Trifluoressigsäure)
TMB	Tetramethylbenzidin
2D	zweidimensional

1. Einleitung

In der Reproduktionsmedizin wurden in den letzten Jahren umfangreiche wissenschaftliche Arbeiten durchgeführt, deren Ziel die Untersuchung der komplexen Interaktionen des Seminalplasmas mit befruchtungsrelevanten Kriterien war. Zum einen beeinflusste Seminalplasma im Ejakulat die Spermienmotilität positiv, zum anderen wurde dem Seminalplasma eine ovulationsauslösende Wirkung zugeschrieben. Bis dato ist nur bekannt, dass diese Beeinflussung der Ovulation von einem niedermolekularen Anteil des Seminalplasmas ausgeht (Waberski et al. 1995). Im Seminalplasma des Ebers wurde eine Proteinfamilie, die Spermadhäsine identifiziert, denen ein maßgeblicher Anteil an der Beeinflussung der Dekapazitation und Gameteninteraktion zum Zeitpunkt der Befruchtung zugeschrieben wird (Toepfer-Petersen et al. 1998).

Die Untersuchung von Komponenten des IGF (insulin-like growth factor)-Systems im Human- und Bullenseminalplasma ergab signifikante Zusammenhänge mit verschiedenen Fruchtbarkeitsparametern. Das System der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren setzt sich aus den beiden Liganden IGF-I und IGF-II und sechs IGF-Bindungsproteinen (IGFBPs) zusammen. IGFs werden von einer Vielzahl von Zellen sezerniert und übernehmen die Hauptrolle als wachstumsfördernde Faktoren in der Zirkulation wie der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation und Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen (Stewart et al. 1996). Diese Funktion wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren ausgeübt. Im Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten sind IGF-I und IGF-II an IGFBPs gebunden, die neben ihrer Carrierfunktion auch auf die Bioaktivität von IGF einen positiven oder negativen Einfluss ausüben können.

Die Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit von Ejakulaten ist ein zentrales Anliegen in der Reproduktionsmedizin. Zusätzlich zu den schon etablierten spermatologischen Untersuchungen würde eine molekulare Identifizierung fertilitätsbeeinflussender Proteinkomponenten im Seminalplasma eine Erweiterung der Ejakulatuntersuchung darstellen.

Zur Analyse komplexer Proteingemische, wie der im Seminalplasma von Ebern vorhandenen Proteine, bietet sich die *Proteomics*-Technik an.

Als Proteomics wird die Analyse von Proteomen (Gesamtheit der exprimierten Proteine in einem Gewebe- oder Zelltyp) bezeichnet. Grundlage dieser Technik ist die Auftrennung des Proteingemisches mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese und die Identifizierung ausgeschnittener Proteinspots durch MALDI-TOF/TOF (Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Time of Flight) Massenspektrometrie.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von IGFs und IGFBPs im Eberseminalplasma. Das Vorhandensein von Komponenten des IGF-Systems im Eberseminalplasma und deren Konzentration bzw. relative Intensität wird mittels Radioimmunassay (RIA) und Western-Ligandenblot untersucht. Außerdem wird der Einfluss möglicher identifizierter Komponenten des IGF-Systems auf die Fruchtbarkeit überprüft.

Des weiteren ist es Ziel der Arbeit mittels der 2D-Gelelektrophorese das Proteingemisch im Eberseminalplasma zu analysieren. Hierfür wird zunächst ein effizientes Verfahren für die Probenvorbereitung etabliert. Die Testung verschiedener Aufreinigungsmethoden des Seminalplasmas und die Separierung abundant vorkommender Proteine im Eberseminalplasma sind dafür erforderlich. Dann können durch Anwendung der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese und der MALDI-TOF-TOF Massenspektrometrie Proteine des Eberseminalplasmas identifiziert werden.

2. Literatur

2.1 Das Seminalplasma

Als Seminalplasma wird der spermienfreie Anteil des Spermas bezeichnet (Busch et al. 1991). Zum Zeitpunkt der Ejakulation wird das Seminalplasma aus Testis, Epididymis und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen abgegeben (Scheunert 1987). Beim Eber findet man als akzessorische Geschlechtsdrüsen die Samenblasendrüse (Glandula vesicularis), die Prostata (Corpus prostatae mit Pars disseminata) und die Harnröhrenzwiebeldrüse (Glandula bulbourethralis) (Nickel et al. 1987).

Das Seminalplasma dient dem Transport der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt (Mann 1981) und übernimmt aufgrund seiner nutritiven Komponenten auch die Ernährung der Spermien (White 1980). In letzter Zeit wurde dem Seminalplasma neben diesen Aufgaben weitere wichtige Funktionen in Bezug auf den Befruchtungsvorgang zugesprochen (Waberski 1995a):

direkte Wirkungen auf die Spermien	indirekte Wirkungen auf den weiblichen Genitaltrakt
Ernährung	Vorverlegung der Ovulation
Schutz	Anregung der Uterusmotorik
Regulation der Motilität	Erschlaffung des Eileiteristhmus
Kapazitation	Beeinflussung von Immunvorgängen
Erkennung und Bindung an Eizelle	

Tab. 1: Wirkungen des Seminalplasmas auf die Spermien und den weiblichen Genitaltrakt

2.2 Chemische Zusammensetzung

Das Seminalplasma setzt sich aus einer Vielzahl von unterschiedlichen chemischen Substanzen zusammen. Es lassen sich folgende Hauptgruppen unterscheiden: Ionen und anorganische Bestandteile, kleine organische Moleküle, Steroide und Prostaglandine, proteinische Komponenten und andere proteinische Komponenten.

2.2.1 Ionen und anorganische Bestandteile

Die Mineralien und Spurenelemente stammen zum Großteil aus den Nebenhoden (Scheunert 1987). Die Ionenkomposition spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich des pH-Werts, der Ionenstärke, der Pufferkapazität und des osmotischen Drucks. In Wechselwirkung mit dem Energiestoffwechsel des Spermiums wird so die Volumenregulation, das elektrische Transmembranpotential und indirekt der Funktionszustand der Plasmamembran des Spermatozoons geregelt (Busch et al. 2001).

2.2.2 Kleine organische Moleküle

Im Seminalplasma sind organische Substanzen in hoher Konzentration vertreten (Mann 1981). Bei den freien Aminosäuren hat die Glutaminsäure den größten Anteil (Mann 1981). Monosaccharide wie Fructose dienen als Substrate für den Energiestoffwechsel der Spermien (Tso et al. 1980). Beim Eber werden Fructose, Zitronensäure, Inositol und Ergothionine in der Glandula vesicularis gebildet. Inositol kommt nur beim Eber in größeren Mengen (530 mg/100 ml) vor (Busch et al. 1991).

2.2.3 Steroide und Prostaglandine

Östrogene und Testosteron kommen als Steroidhormone im Seminalplasma vor. Die Gesamtkonzentration von Östrogen wird mit Maximalwerten von 15,3 µg/Ejakulat angegeben (Claus et al. 1987). 17β-Östradiol und Östrone treten in unkonjugierter und konjugierter Form im Seminalplasma auf (Claus et al. 1985). Der Hauptanteil der Östrogene wird in den Tubuli testis gebildet. Nur 22% der konjugierten und 12% der unkonjugierten Östrogene werden von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen produziert (Claus et al. 1987). Die Sekretionsorgane von Testosteron entsprechen denen der Östrogene, jedoch sezernieren die akzessorischen Geschlechtsdrüsen 20% konjugiertes und 55% unkonjugiertes Testosteron (Claus et al. 1985). Die Gesamtkonzentration von Prostaglandinen unterschreitet im Seminalplasma den Wert von 0,34 ng/ml (Hunter et al. 1983). Waberski et al. (1995c) wiesen nach Gefrierung weder PGE-2 noch PGF-2α im Seminalplasma nach. Aufgrund der geringen Konzentration der Prostaglandine im Eberseminalplasma wurde als fraglich diskutiert, ob sie eine Funktion im männlichen Reproduktionstrakt ausüben (Mann 1981).

2.2.4 Proteinische Komponenten

Im Seminalplasma treten verschiedene Arten von Enzymen auf. Nukleolytische Enzyme (Nukleasen, Nukleotidasen, Nukleosidasen) sind in hohen Konzentrationen vertreten und werden vom Epididymis sezerniert. Es kommen unterschiedliche Phosphatasen in verschiedenen Sekretionsorganen vor: saure Monophosphoesterase (Prostata), alkalische Monophosphoesterase (Prostata), saure Phosphatase (Prostata), alkalische Phosphatase und ATP-asen (akzessorische Geschlechtsdrüsen). Glycosidasen (β -Glucuronidase, α -Mannosidase, α -Fucosidase, β -Galactosidase) und Glykoprotein-Glykosyltransferasen sind testikulären und epididymalen Ursprungs. Unterschiedliche Sezernierungsorgane dieser Enzyme ermöglichen die Nutzung ihrer Aktivität im Seminalplasma als Parameter für die Sekretionsleistung des jeweiligen Gebietes (Mann 1981; Busch et al. 2001).

2.2.5 Andere proteinische Komponenten

Bei Eber, Bulle und Hengst sind unterschiedliche Proteine im Seminalplasma identifiziert und es werden ihre möglichen Funktionen im Rahmen der Befruchtung diskutiert (Calvete et al. 1995d). Die spezieübergreifend auftretenden Proteine werden in verschiedene Gruppen eingeteilt: Spermadhäsine, FnII-Typ Proteine, die nach der heparin- und gelatinbindenden Domäne des Fibronectins (Fibronectin Typ II-Domäne) bezeichnet sind, und Cysteine-Rich-Secretory-Proteins (CRISP), die fest an Postakrosom und Mittelstück des Spermatozoons binden.

2.2.5.1 Proteine im Eberseminalplasma

Die Spermadhäsine, die Heparin und die Kohlenhydratseitenketten der Zona pellucida binden können, bilden den größten Anteil im Eberseminalplasma (Toepfer-Petersen et al. 1998). Es treten hier AQN-1, AQN-2 (PSP-I), AQN-3, AWN-1 und AWN-2 auf (Sanz et al. 1991; Sanz et al. 1992b; Sanz et al. 1992c; Kwok et al. 1993b). Ein Protein mit der N-terminalen Sequenz DQH ist auch identifiziert (Jonakova et al. 1998). Es wird der Familie der FnII-Typ Proteine zugerechnet und trägt den Namen boar protein 1 (pB1) (Calvete et al. 1997). pB1 ist identisch mit dem porcine adhesion-inducing protein (pAIF) (Plucienniczak et al. 1999). Für die

Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration im Eberseminalplasma wurde das Sperma bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es ergab sich eine Konzentration von 28-30 mg/ml. Die Konzentrationen für die einzelnen Proteine betragen (Dostalova et al. 1994):

Protein	Konzentration (mg/ml)
AWN	1,8
AQN-1	1,1
AQN-2	6,4
AQN-3	0,5

Tab. 2: Konzentration der Spermadhäsine im Seminalplasma

2.2.5.2 Proteine im Bullenseminalplasma

Beim Bullen sind FnII-Typ Proteine die Hauptproteine des Seminalplasmas. Diese Proteine haben neben Heparin- auch Phosphorylcholinbindungseigenschaften. Als Hauptproteine wurden Bovine Seminal Proteins (BSP-A1/2 (PDC 109), BSP-A3 und BSP-30-kDa) charakterisiert (Chandonnet et al. 1990). Mittels eines spezifischen RIAs wurde die Gesamtproteinkonzentration (73,5-93 mg/ml) und die BSP-Konzentration (31,4-46,7 mg/ml) bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration und die BSP-Konzentration variierten innerhalb der Proben eines Bullen und auch zwischen den Bullen. Dabei bedingte eine hohe Gesamtproteinkonzentration nicht eine hohe BSP-Konzentration, bei einer niedrigen Gesamtproteinkonzentration war die BSP-Konzentration hoch oder niedrig (Nauc et al. 2000). Ein weiteres Protein des Bullenseminalplasmas ist das acidic Seminal Fluid Protein (aSFP), das eine 43% Sequenzidentität zu den porcinen Spermadhäsinen aufweist (Einspanier et al. 1994). Auch Z13, ein erst kürzlich charakterisiertes Protein konnte der Familie der Spermadhäsine zugeordnet werden (Tedeschi et al. 2000).

2.2.5.3 Proteine im Hengstseminalplasma

Beim Hengst existieren FnII-Typ Proteine in Form von Horse Seminal Protein (HSP)-1 und HSP-2 (Calvete et al. 1995b; Calvete et al. 1995c). Auf einem eindi-

mensionalen Gel stellte sich der relative Gehalt an Hauptproteinen zwischen den Hengsten als einheitlich dar, die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ergab eine Varianz innerhalb der Proben eines Hengstes (Amann et al. 1987). Des weiteren ist SSP-7 identifiziert, das sich nur in 3 Aminosäuresequenzen von dem porcinen Spermadhäsin AWN unterscheidet (Reinert et al. 1996; Reinert et al. 1997). HSP-3 gehört zur CRISP-Familie (Magdaleno et al. 1997).

Die Sekretion der aufgeführten Proteine erfolgt in folgenden Drüsen (Toepfer-Petersen et al. 1998):

Spezies	Herkunft	Protein
Rind	Samenblase	BSP-A1/2 (PDC 109), BSP-A3 , BSP-30K, aSFP
Pferd	Ampulla	HSP-2, SSP-7, HSP-3
	Epididymis	HSP-1, SSP-7
Schwein	Unbekannt	pB1
	Epididymis	AWN
	Samenblase	AQN-1,AQN-2,AQN-3, AWN

Tab. 3: Sekretionsorgane der Seminalplasmaproteine bei den verschiedenen Spezies

Aus der Gruppe der proteinischen Komponenten sind noch IGF-I, IGF-II und die IGFBPs zu nennen, die im Seminalplasma unterschiedlicher Spezies nachgewiesen wurden (siehe 2.1.3.). IGF-I und IGF-II beeinflussen die Differenzierung und Funktion der Leydigzellen. Zu den weiteren Funktionen zählen die Stimulation der Steroidbiosynthese (Lin 1995; Lejeune et al. 1996) und die Entwicklung und Differenzierung von Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatischen (Spiteri-Greech et al. 1992; Zhou et al. 1993).

Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Seminalplasmas sind einerseits essentiell für die Klärung der Wirkung und Funktion des Seminalplasmas zum einen auf Spermien direkt und zum anderen im weiblichen Genitaltrakt, haben aber andererseits auch diagnostische Bedeutung. Bestimmte Anteile des Seminalplasmas können als diagnostische Marker eingesetzt werden, um Funktion bzw. mögliche Entzündungsgeschehen im männlichen Geschlechtstrakt festzustellen. So sind z.B.

Zink, Zitronensäure, γ -Glutamyl-Transpeptidase und saure Phosphatase Indikatoren für die Funktion der Prostata, Glycerolphosphorylcholin und Carnitin für die Nebenhoden (Nieschlag et al. 1996).

Eine Übersicht der einzelnen Komponenten des Eberseminalplasmas (Busch et al. 1991) bieten die folgenden Tabellen 3, 4 und 5:

Anorganische Bestandteile (mg/100 ml)		Lipide (mg/100 ml)	
Hydrogencarbonat	50	Phospholipid	1,9-2,6
Kalzium	5 (2-6)	Phosphatidylserin	0,24-0,33
Chlorid	330 (260-430)	Phosphatidylethanolamin	0,55-0,77
Magnesium	11 (5-14)	Phosphatidylcholin	0,19-0,28
Prostaglandine		Phosphor	
A+B	0,00002	Gesamt	357
E	0,00005	Anorganisch	17
F	0,00002	In Säure gelöst	171
Fette	6	Sphingomyelin	0,6-0,89
Kalium	240 (80-380)	Testosteron (frei)	0,102
Natrium	650 (290-850)	Gesamt-Lipid	4,7-6,1
Schwefel	16 (12-27)		
Zink	2,2		

Tab. 3: Konzentrationen der anorganischen Bestandteile und Lipide im Seminalplasma

Stickstoffreiche niedermolekulare Bestandteile (mg/100 ml)		Niedermolekulare organische Bestandteile (mg/100 ml)	
Ammoniak	1,5 (0,5-2,0)	Ascorbinsäure	3,5 (2-5)
Kreatinin	0,3	Zitronensäure	130 (30-330)
Ergothionin	15 (16-20)	Glycerolphosphorylcholin	110-240
		Fructose	13 (3-50)
		Galactose	(4-20)
		Glycerol	(10-20)
		Glycerylphosphorylinositol	260
		(nmol/ml)	
		Inositol	530 (380-630)
		Lactat	27
		Sorbitol	12 (6-18)

Tab. 4: Konzentrationen der niedermolekularen stickstoffreichen und organischen Bestandteile des Seminalplasmas

Freie Aminosäuren (µmol/100 ml)					
Neutral		Sauer		Basisch	
Alanin	23,8	Asparaginsäure	18,0	Arginin	1,2
Cystein	147,7	Glutaminsäure	204,7	Histidin	3,2
Glycin	4,7			Lysin	Spuren
Isoleucin	10,7				
Leucin	2,4				
Methionin	6,4				
Phenylalanin	3,8				
Prolin	8,9				
Threonin	5,9				
Thyrosin	14,3				
Serin	17,1				

Tab. 5: Konzentrationen der freien Aminosäuren im Seminalplasma

2.3 Komponenten des IGF-Systems im Seminalplasma

Die Komponenten des IGF-Systems wurden in der letzten Zeit auch im Seminalplasma ausführlich untersucht. IGF-I/II werden hauptsächlich im Testis von Leydig- und Sertolizellen (Lejeune et al. 1996) bzw. Peritubularzellen (Zhou et al. 1993) sezerniert. IGF-I wurde im Human-, Bullen- und Hengstseminalplasma ($113,23 \pm 17,88$ ng/ml, 144 ± 9 ng/ml, bzw. 20 ng/ml) identifiziert. Die Konzentration von IGF-II im humanen Seminalplasma beträgt 72 ± 24 ng/ml, im Bullenseminalplasma 144 ± 10 ng/ml (Hoeflich et al. 1999; Lackey et al. 2002). Der Testis wird auch als Sekretionsort der IGF-BPs genannt (Zhou et al. 1993).

Die Prostata wird für die Komponenten des IGF-Systems als weiterer Produktionsort angeführt, da *in vitro* Experimente zeigten, dass die humane Prostata in der Lage ist, IGF-I/II und IGF-BPs zu produzieren. Man spricht hier auch von der IGF-Achse in der Prostata (Cohen et al. 1994c), denn beim Menschen existiert auch noch ein Prostate Specific Antigen (PSA), das als IGF-BP-3 Protease bekannt ist (Cohen et al. 1992).

Von den IGF-BPs wurden im humanem Seminalplasma IGF-BP-2 und IGF-BP-4 identifiziert. IGF-BP-3 existiert als Fragment gespalten von PSA. Dieses Enzym wirkt auch proteolytisch auf IGF-BP-4 und IGF-BP-5, wobei für IGF-BP-5 noch eine weitere Protease zu existieren scheint (Blum et al. 1993; Lee et al. 1994).

Die Untersuchung des Bullenseminalplasmas ergab andere Resultate, denn hier wurden IGF-BP-3 und IGF-BP-5 sowie eine geringe Menge von IGF-BP-4 nachgewiesen (Hoeflich et al. 1999). Auch im Hengstseminalplasma zeigt sich ein eigenes IGF-BP-Muster mit identifiziertem IGF-BP-2 und IGF-BP-5 (Macpherson et al. 2002). Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Mechanismen der IGF-Liganden-Kontrolle in den untersuchten Spezies hin.

Die Beeinflussung der IGF-Bioverfügbarkeit durch IGF-BPs ist ein weiterer interessanter Aspekt des IGF-Systems. IGF-BP-2 werden positive und negative regulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Bei humanen Patienten mit Prostatakrebs wurden erhöhte IGF-BP-2 Konzentrationen im Serum gemessen, obwohl die Stromazellen der Prostata keine Unregelmäßigkeiten bezüglich ihrer Sekretion zeigten (Cohen et al. 1993). Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) hingegen war IGF-BP-2 in den Stromazellen erniedrigt. Dies lässt darauf schließen, dass das hyperplastische Wachstum bei BPH teilweise von einem reduzierten IGF-BP-2 Spiegel in den Stromazellen verursacht wird. Auch die inhibitorische Wirkung auf die IGF-II Aktivität wurde nachgewiesen (Cohen et al. 1994a). Des weiteren untermauern Ergebnisse außerhalb des männlichen Reproduktionstraktes den negativen Einfluß von IGF-BP-2 auf IGF (Hoflich et al. 1998).

IGF-BP-3 nimmt aufgrund seiner Spaltung durch PSA eine besondere Rolle im humanen Seminalplasma ein. Die Zugabe von PSA zu Prostatazellen *in vitro* führte zu einer erhöhten Zellproliferation, die mit der verursachten IGF-BP-3 Proteolyse korrelierte (Cohen et al. 1994b). Durch IGF-BP-3 Proteolyse soll eine erhöhte Bioverfügbarkeit des IGF-BP-3 gebundenen IGF-Pools erreicht werden, wodurch das Zellwachstum angeregt wird (Kelley et al. 1996). Diesen Vermutungen über die fördernde Rolle der IGF-BP-3 Proteolyse in Bezug auf das Zellwachstum stehen Erkenntnisse über die inhibitorische Wirkung von intaktem IGF-BP-3 gegenüber. IGF-BP-3 vermindert die Affinität des IGF-I Rezeptors für seinen Liganden und beeinflusst so das Zellwachstum negativ (Mohseni et al. 1997).

IGFBP-4 zeigt eine inhibitorische Wirkung auf die IGF-stimulierte Zellproliferation. Bis jetzt sind nur negative Effekte nachgewiesen worden, so dass ein solcher Effekt des IGFBP-4 im Seminalplasma wahrscheinlich ist (Kelley et al. 1996). Über Effekte des IGFBP-5 ist weniger bekannt. Nach Untersuchungen über die Rückbildung der ventralen Prostata der Ratte postulierten Guenette et al. (1994), dass IGFBP-5 ein Verursacher dieser Apoptose sei, indem das IGF-Signalkaskadensystem abgeschwächt wird. Dieses wurde durch weitere Untersuchungen in Frage gestellt, da bei der kastrationsinduzierten Apoptose der ventralen Prostata der Ratte am 4. Tag Maximalwerte für die Anzahl apoptotischer Zellen und für die IGFBP-5 Konzentration festgestellt wurden. Da die IGFBP-5 Konzentration schon vor dem 4.Tag erhöht sein müsste, um als Signal für die Apoptose zu dienen, sprechen die Resultate eher dafür, dass IGFBP-5 ein Inhibitor der Zellproliferation ist (Thomas et al. 1998).

2.4 Einfluß des IGF-Systems auf die Fertilität

Der Einfluß des IGF-Systems auf die Fertilität ist in verschiedenen Spezies untersucht worden. Die Untersuchungen des humanen Seminalplasmas auf IGFBP-3 Fragmente und IGFBP-5 von gesunden Probanden, vasktomierten Patienten und Patienten mit idiopathischer Azoospermie ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Lee et al. 1994).

Bei der Untersuchung von 69 Patienten mit unterschiedlicher Qualität des Spermas und 11 Patienten nach Vasektomie wurden andere Ergebnisse erzielt. Die IGF-I Konzentration korrelierte positiv mit der Prozentzahl an morphologisch intakten Spermatozoen und der Spermienkonzentration, negativ hingegen mit der PSA Konzentration. Des weiteren war die IGF-I Konzentration in Bezug auf das Gesamtejakulat nach Vasektomie erniedrigt (Glander et al. 1996). Die Wachstumshormonbehandlung von Männern mit Oligo- oder Asthenozoospermie führte zu einer Erhöhung des IGF-I Spiegels im Blutserum und Seminalplasma und des IGFBP-3 Spiegels im Blutserum. Des weiteren wurde eine Verbesserung der Spermienmotilität bei gleichbleibender Spermienzahl beobachtet (Ovesen et al. 1996).

Resultate über den Zusammenhang zwischen Fertilität und IGF-System liegen auch im Bullenseminalplasma vor. Das Seminalplasma des Bullen enthält eine Familie von vier eng miteinander verwandten Proteinen: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 und BSP-30-kDa. Diese Proteine weisen zwei homologe Domänen auf, die der Typ-II-Struktur in der Bindungsdomäne des IGF-II Rezeptors ähneln. Es wurde gezeigt, dass diese Proteine an den IGF-II Rezeptor binden und so möglicherweise die Aktivität von IGF-II regulieren (Desnoyers et al. 1994a). Die Untersuchung des Effektes von IGF-I/II auf gewaschene Spermien in einem *in vitro* System ohne IGFBPs ergab, dass die Spermienmotilität und -geschwindigkeit durch IGF-I/II positiv beeinflusst wurde (Henricks et al. 1998).

Die *in vivo* Untersuchung des IGF-Systems im Bullenseminalplasma ergab andere Ergebnisse (Hoeflich et al. 1999). Als Bewertungskriterien wurden 60 Tage Non-Return-Rate (NRR-60) und Spermienmotilität genommen. Die Einteilung der Bullen, die routinemäßig für die künstliche Besamung (KB) eingesetzt wurden, erfolgte in Gruppen (hohe NRR >76,8%, durchschnittliche NRR 72,8%-73,4%, niedrige NRR <67%). Diese Gruppen wiesen alle eine Massenbewegung von >3 und eine Einzelmotilität von >60% auf. Zusätzlich wurden Tiere mit schlechter Samenqualität (Massenbewegung <2, Einzelmotilität <30%) untersucht. Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen IGF-I/II Konzentration und NRR. Bei den Tieren mit schlechter Samenqualität wurden aber höhere IGF-I und niedrigere IGF-II Konzentrationen im Gegensatz zu den KB-Bullen festgestellt. Hoeflich et al. (1999) postulierten, dass *in vitro* wahrscheinlich andere Ergebnisse erzielt wurden als *in vivo*, da durch IGFBPs die Bioverfügbarkeit und die Rezeptorinteraktion von IGF-I/II im Organismus beeinflusst werden. Die Varianz in der Aktivität der IGFBPs zwischen den einzelnen Tieren korrelierte nicht mit der Befruchtungsfähigkeit *in vivo* oder *in vitro* bzw. mit den IGF-I/II Konzentrationen.

GH (Growth Hormone) ist ein Regulator der IGF-I Konzentration (Jones et al. 1995). In einer Studie, die sich mit der rbGH (recombinant bovine)-Behandlung von KB-Bullen beschäftigte, wurde im Blutserum eine erhöhte IGF-I Konzentration und im Seminalplasma eine erhöhte IGFBP-3-Konzentration festgestellt. Das Ejakulatvolumen nahm ab, aber die Spermienkonzentration und -motilität war erhöht. Die Abweichungen in der Spermienmorphologie waren verringert, die NRR erhöhte sich um 6,0%. Nach Sauerwein et al. (2000) ist die verbesserte NRR auf positive

Veränderungen der Spermienumgebung, d.h. des Seminalplasmas durch GH zurückzuführen. Wahrscheinlich wird diese Wirkung durch eine Erhöhung von Komponenten des IGF-Systems hervorgerufen.

Beim Hengst wurde durch IGF-I Behandlung *in vitro* eine längere Aufrechterhaltung der Spermienmotilität erreicht. Die Bewegungscharakteristika (mittlere Linearität, kurvilineare Geschwindigkeit, lineare Geschwindigkeit, seitliche Kopfauslenkung und mittlere Bahngeschwindigkeit) änderten sich nicht (Champion et al. 2002). In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass IGF-I- und IGFBP-2-Konzentrationen im Seminalplasma zwischen sexuell aktiven oder sexuell nicht aktiven Tieren keine Unterschiede aufwiesen. Sexuell nicht aktive Tiere mit hohem IGF-I-Spiegel hatten höhere IGFBP-2 Konzentrationen und mehr morphologisch normale Spermien als sexuell nicht aktive Tiere mit niedrigem IGF-I Spiegel. Bei sexuell aktiven Tieren zeigten die Hengste mit hoher IGF-I Konzentration eine erhöhte Spermienmotilität im Vergleich mit Tieren, die eine niedrige IGF-I Konzentration hatten. Ein hoher IGF-I Spiegel bei sexuell aktiven und sexuell nicht aktiven Tieren korrelierte signifikant mit erhöhten Trächtigkeitsraten pro Saison (Macpherson et al. 2002). Des Weiteren wurden die IGF-I Konzentration von Hengsten im Alter von 6 Monaten bis 23 Jahren im Blutserum und im Testis untersucht. Dabei ergab sich kein Hinweis, dass IGF-I Konzentration mit sinkender Fertilität zusammenhängen könnte. Jedoch war die IGF-I Konzentration bei Hengstfohlen jünger als zwei Jahre höher im Gegensatz zu Hengsten älter als 5 Jahre, die eine erst abnehmende und dann gleichbleibende IGF-I Konzentration aufwiesen. Dies deutet auf eine Rolle des IGF-I in der Entwicklung des Testis hin (Hess et al. 2001).

2.5 Funktion von Proteinen im Eberseminalplasma

2.5.1 Einfluß auf die Spermienmotilität

Spermatozoen befinden sich in der Cauda epididymis in einem Ruhezustand und werden erst beim Zusammenkommen mit dem Seminalplasma motil. Diese Motilitätsstimulation wird auf das Vorhandensein von katalytisch aktiven Substanzen (Ionen, Nucleotide) und Nährstoffen (Fructose, Milchsäure) zurückgeführt (Mann 1981). Im Bullenseminalplasma wurde das Sperm Forward Motility Protein

charakterisiert, das aus den ineffektiven Bewegungen der Spermien aus der Cauda epididymidis eine vorwärtsgerichtete Motilität der ejakulierten Spermatozoen macht (Acott et al. 1978). Tso et al. (1980) zeigten, dass eine positive Beeinflussung der Spermienmotilität durch das Eberseminalplasma vorlag. Durch viermaliges Waschen mit Tris-HCl immotil gewordene Spermien erlangten nach Zugabe von Seminalplasma ihre Vorwärtsbeweglichkeit zurück. Dieser Effekt war eberspezifisch und konzentrationsabhängig (Wiederherstellung der ursprünglichen Motilität bei 10 % der organischen Seminalplasmakonzentration in Puffer). Eine Untersuchung von Ejakulaten mit guter bzw. schlechter Spermienmotilität ergab, dass die Zugabe von gepooltem Seminalplasma sich im Vergleich zu homologem Seminalplasma unterschiedlich auf den Anteil motiler Spermien und ihre Geschwindigkeit auswirkte. Verbesserungen wurden bei Kombination von Spermaproben mit schlechten Motilitätswerten und Seminalplasmaproben aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten festgestellt. Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich in der Geschwindigkeit linear beweglicher Spermien (Nehring et al. 1994). Die möglicherweise proteinischen Bestandteile des Seminalplasmas, die diese Wirkungen verursachten, wurden noch nicht identifiziert. Es wurden aber einige Proteine charakterisiert, die eine negative Wirkung auf die Spermienmotilität ausüben. Im Eberseminalplasma wurde ein Spermienmotilitätsinhibitor (SMI) nachgewiesen (Jeng et al. 1993), dessen Aminosäuresequenz und Molekulargewicht (15 kDa) mit porcinem β -Microseminoprotein übereinstimmte (Chao et al. 1996). β -Microseminoprotein wurde in der Sekretionsflüssigkeit der Prostata als ein Hauptprotein identifiziert (Manaskova et al. 2002).

Ein weiterer Spermienmotilitätsinhibitor (SPMI), der als Motility-Dynein-ATPase Inhibitor fungiert, wurde aus dem Eberseminalplasma aufgereinigt (Iwamoto et al. 1992). SPMI hat unter natürlichen Bedingungen ein Molekulargewicht von 54 kDa, in der Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) waren drei Polypeptide mit 14, 15 und 18 kDa sichtbar. Die weitere Untersuchung des 54 kDa Glycoproteinkomplexes ergab das Vorhandensein eines Sperm Motility Inhibiting Factors (SMIF), der bevorzugt an das 15 kDa Protein des 54 kDa Komplexes band und eine sofortige Hemmung der Spermienmotilität verursachte. SMIF induziert Veränderungen in der Molekularorganisation der Spermienmembran, die sich auf den energetischen Zustand und die biochemischen Funktionen der Spermienstruktur negativ auswirkten (Kordan et al. 1998). Das 15 kDa Protein des 54 kDa Glyco-

proteinkomplexes wurde als pB1 identifiziert, das der Familie der Heparin-bindenden Proteine des FnII-Typs zugerechnet wird. Diese Proteinfamilie beinhaltet Kapazitationsfaktoren, so dass die Bindung von SMIF an pB1 in einen Zusammenhang mit der Funktion der exogenen Kapazitationsfaktoren gebracht werden kann (Kordan et al. 1998).

Mittels computergestützter Spermienauswertung (CASA) wurde keine Korrelation zwischen Spermienmotilität und Fertilität festgestellt (Aumueller et al. 1988). Andererseits stellten Holt et al. (1997) eine Korrelation zwischen dem Inseminationsergebnis und der Spermienmotilität fest. In zwei Versuchsdurchläufen wurden CASA-Parameter (kurvilineare Geschwindigkeit, mittlere Bahngeschwindigkeit, lineare Geschwindigkeit, seitliche Kopfauslenkung, Geradlinigkeit, mittlere Linearität, mittlere Winkelauslenkung, Schlagfrequenz) mit der Ferkelzahl und der NRR verglichen. Dabei korrelierte im ersten Versuchsdurchlauf die Spermienmotilität mit der Ferkelzahl, im zweiten Versuchsdurchlauf mit der NRR. In einer neueren Studie hingegen korrelierte die NRR nicht mit der Spermienmotilität bzw. -kopfgröße der untersuchten Eber. Eine Gruppierung nach Ferkelzahl ergab aber eine signifikante Korrelation (Hirai et al. 2001).

2.5.2 Einfluß auf die Kapazitation, Akrosomreaktion, Erkennung und Bindung der Eizelle

Die Kapazitation ist die Voraussetzung für die Hyperaktivierung und die Akrosomreaktion der Spermien und entscheidend für die Interaktion der Spermien mit der Eizelle. Seminalplasmaproteine können die Feinregulierung der Kapazitation, d.h. Verhinderung der vorschnellen Reifung bzw. Stimulierung der Kapazitation beeinflussen (Florman et al. 1988a; Florman et al. 1988b). Der erste Schritt ist ein Verlust der Proteine, die mit den Spermien im Nebenhoden oder erst zum Zeitpunkt der Ejakulation in Berührung kommen und die Spermien auf dem Transportweg vom Uterus in den Eileiter vor verfrühter Kapazitation und Akrosomreaktion schützen (Nieschlag et al. 1996). Heparin stimuliert die *in vitro* Kapazitation (Miller et al. 1990). Der positive Effekt von Heparin auf den Kapazitationsvorgang wird durch heparinbindende Proteine vermittelt, die durch Interaktion mit den Phospholipiden der Spermienmembran fest gebunden sind (Therien et al. 1995). Außerdem sind diese

membrangebundenen Moleküle lektinähnlich, d.h. sie sind in der Lage, Kohlenhydratseitenketten der Zona pellucida zu binden und so als Rezeptor zu fungieren (Sinowatz et al. 1989).

Im Eberseminalplasma wird den Spermadhäsinen eine Mitwirkung bei diesen Reaktionsprozessen zugesprochen. Diese Spermadhäsine bestehen aus 109 (111) bis 133 Aminosäuren, haben ein Molekulargewicht von 12-14 (16) kDa und weisen 40-60% Sequenzhomologie auf (Calvete et al. 1993). Die ersten 3 Aminosäuren der beiden unterschiedlichen Proteingruppen geben den Spermadhäsinen ihren Namen: AQN-1, AQN-2, AQN-3, AWN-1 und AWN-2. Es handelt sich um lektinähnliche Moleküle, die auch in der Lage sind, Heparin zu binden (Calvete et al. 1994). Nach der Ejakulation bedecken AQN-1, AQN-2, AQN-3 und AWN das apikale Drittel des Spermatozoons. Teile der Spermadhäsine sind nur locker an die Spermienoberfläche gebunden und fungieren als Dekapazitationsfaktoren. Nach drei Stunden *in vitro*-Kapazitation sind 60% der absorbierten AQN 1, 2, und 3 nicht mehr vorhanden. Die AWN-1 Menge sinkt auf ein Level wie bei Nebenhodenspermien und AWN-2 ist gänzlich entfernt (Dostalova et al. 1994). Nicht-aggregierte AQN-3 und AWN-1 sind in der Lage mit Phosphorylcholin zu reagieren (Dostalova et al. 1995b). Möglicherweise bilden diese Moleküle die erste Schicht auf der Spermienoberfläche, indem sie mit den Spermienlipiden reagieren (Calvete et al. 1996). Die Analyse von Spermienmembranproteinen mit Affinität für immobilisierte porcine Zona pellucida zeigte die Anwesenheit von AQN-3 und AWN-1 (Ensslin et al. 1995). Des weiteren erfolgte der Nachweis von AWN Epitopen auf Spermatozoa, die aus der uterotubalen Verbindung besamter Sauen isoliert wurden (Toepfer-Petersen et al. 1995). Wahrscheinlich gehen AWN (AQN-3) eine enge Bindung zur Spermienoberfläche ein und wirken so als positive Kapazitationsfaktoren. Die Bindung von Spermien an die Zona pellucida der Eizelle könnte eine Hauptaufgabe von AWN-1 sein, da das Molekül in der Lage ist Oligosaccharidketten der Zona pellucida Glycoproteine zu erkennen (Gal-GalNAc und Gal-GlcNAc Sequenzen) (Dostalova et al. 1995a; Calvete et al. 1996).

AWN-2 unterscheidet sich durch seine N-terminale Azetylierung von AWN-1 (Sanz et al. 1992a). Es bindet während der Ejakulation an die Spermien und kann nach der Kapazitation nicht mehr auf der Spermienoberfläche nachgewiesen werden. So ist es

wahrscheinlich, dass diese Isoform einen ausschließlichen Dekapazitationsfaktor darstellt (Dostalova et al. 1994).

AQN-1 und AWN sind spermienassoziierte Akrosininhibitor Akzeptor Moleküle (Sanz et al. 1992a). Akrosin, eine Serinproteinase, hat für die Penetration des Spermiums durch die Zona pellucida besondere Bedeutung. Während der Ejakulation binden Serinproteinaseinhibitoren an den akrosomalen Teil des Spermiums und schützen so die spezifischen Zonabindungsstellen während der Uteruspassage. Bei der Kapazitation werden diese abgelöst und die Rezeptorstellen stehen für eine Bindung an die Zona pellucida wieder zur Verfügung (Jonakova et al. 1992). Dies spricht dafür, dass diese Proteine eine Rolle im Kapazitationsvorgang und bei der Gametenbindung spielen (Sanz et al. 1992a).

AQN-2 ist als einziges Spermadhäsin glycosyliert und zwar besteht es aus zwei Glycoproteinen. Bei einer Komponente handelt es sich um die glycosylierte Form des AQN-3, die andere Komponente ist identisch mit PSP-I, einem Hauptprotein des porcinen Seminalplasmas. AQN-2 besitzt schwache Zona pellucida Bindungsfähigkeit (Calvete et al. 1993).

PSP-I ist N-glycosyliert (Rutherford et al. 1992) und bindet Endo- β -galactosidase, verdautes ZP 3, Trypsin Inhibitor, IgA, IgG und α -Kasein (Kwok et al. 1993a). Spezifische N-Glycoformen bilden ein Heterodimer mit PSP-II. PSP-I und PSP-II besitzen als Monomere Heparinbindungsfähigkeit, aber der PSP-I/PSP-II Komplex weist diese nicht auf. Das Heterodimer ist in der Lage, Zona pellucida Glycoproteine und Trypsin Inhibitor zu binden. Diese Bindungsstellen befinden sich in der PSP-II Einheit. Trotzdem bindet der PSP-I und PSP-II Komplex nur lose an die Spermienoberfläche und wird während der *in vitro* Kapazitation leicht abgetrennt (Calvete et al. 1995a).

Die Analyse des biologischen Ursprungs, des Ligandenverhaltens und der Lokalisation auf der Oberfläche der Spermien lassen darauf schließen, dass die Spermadhäsine multifunktionelle Proteine sind (Calvete et al. 1995c). Auch Untersuchungen der Primärstruktur, der posttranslationalen Modifizierung und die quantitative Bestimmung der die Eizelle überziehenden Spermadhäsine in den verschiedenen Lebensstadien des Spermiums bestätigen diese These.

2.5.3 Einfluß auf die Ovulation

Die Vorverlegung der Ovulation kann als wichtige Funktion des Seminalplasmas bezeichnet werden (Brutgans 1983; Weitze et al. 1990a; Weitze et al. 1990b). Die Seminalplasmaapplikation zu Beginn der stehenden Rausche (Stunde 0) übte die größte Wirkung auf die Ovulationsvorverlegung aus (Weitze et al. 1990a). Zu diesem Zeitpunkt war eine Ovulationsvorverlegung um 10,7 Stunden möglich. 24 Stunden nach Brunstfeststellung rief die Behandlung mit Seminalplasma keinen Effekt mehr auf den Ovulationszeitpunkt hervor (Waberski et al. 1994; Soede et al. 1995).

Das Intervall Brunstbeginn-Ovulation ist bei Sauen sehr variabel. Physiologischerweise bewegt es sich in einem Zeitrahmen von 10–60 Stunden (Soede et al. 1995; Weitze et al. 1994). Eine Vereinheitlichung dieser Zeitspanne ist wünschenswert, da der Zeitpunkt der Insemination relativ zum Ovulationszeitpunkt sehr wichtig für die Fertilitätsrate ist (Soede et al. 1998).

Als wirksame Komponente wurde Östrogen, das in hohen Mengen im Seminalplasma vorkommt, vermutet. Östrogeninfusion (10-11,5 µg Östrogen) verlegte den Ovulationszeitpunkt um 3-7 Stunden vor (Weitze et al. 1990a). Eine östrogengesteuerte Prostaglandinfreisetzung wurde als Wirkmechanismus vorgeschlagen. Dabei gab das Endometrium PGF-2 α an die Uterusvene ab, wo nach Östrogeninfusion (10 µg Östrogen) eine erhöhte PGF-2 α Konzentration festgestellt wurde (Claus et al. 1987). Da die alleinige Applikation von Östrogen im Vergleich mit der Seminalplasmainfusion einen schwächeren Effekt auf die Ovulationsvorverlegung hatte (Weitze et al. 1990b), wurde vermutet, dass noch andere Bestandteile des Seminalplasmas diesen Vorgang beeinflussen. Die Applikation von unterschiedlichen Molekulargewichtsfractionen aktivkohlebehandelten Seminalplasmas zeigte, dass eine Proteinfraction im Molekulargewichtsbereich von 1-10 kDa eine additive Wirkung auf die Ovulationsvorverlegung ausübte. Nach Zusatz des eiweißspaltenden Enzyms Pronase zu der aktivkohlebehandelten Seminalplasmafraction konnte keine ovulationsauslösenden Wirkung mehr festgestellt werden. Waberski et al. (1995) vermuteten, dass die unbekannte Komponente ein Peptid sei. Der Vergleich des Intervalls Infusion-Ovulation mittels dem Mariensee-Modell (das linke Uterushorn der Sau fungierte als Kontrolle, indem es vom Gebärmutterkörper abgesetzt wurde und somit der Infusion nicht zugänglich war) zeigte eine frühere Ovulation am Ovar

ipsilateral zum infundierten Horn. Es wurde auf einen lokalen Effekt zwischen Uterus und Ovar geschlossen (Waberski 1995b). Die aktiven Substanzen müssen anscheinend Kontakt mit dem Epithelium der uterotubalen Verbindung haben (Waberski 1999).

2.6 Effektiver Nachweis von Proteinen im Seminalplasma mittels 2D-Gelelektrophorese

Mittels der 2D-Gelelektrophorese können 3000-10 000 Proteinen aufgetrennt und auf einem analytischen 2D-Gel visualisiert werden (Issaq 2001). Eine mehrmalige Glycosylierung der Probenproteine kann ein Verschmieren der Proteinspots in der 2. Dimension bewirken (Fryksdale et al. 2002). Deglycosylierung von N- oder O-glycosylierten Proteinen führt durch Verlust von Zuckerketten zu einer Abnahme des Molekulargewichtes (Lottspeich et al. 1998).

In einer früheren Studie wurden mittels der Gel Disc Elektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamid 18 Proteine im Eberseminalplasma dargestellt (Lavon et al. 1973). Durch 2D-Gelelektrophorese wurden zu einem späteren Zeitpunkt schon bedeutend mehr Proteine aufgetrennt. Die Verwendung von Trägerampholyten und Nonequilibrium pH Gradient Electrophoresis (NEPHGE) führte bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 300 µg in der Silberfärbung zur Darstellung von über 200 Proteinen (Peterson et al. 1983; Russell et al. 1984).

Auch im Humanseminalplasma ergaben sich ähnliche Resultate: Bei der Benutzung von Trägerampholyten für die 1. Dimension wurden in der 2. Dimension ca. 200 Proteine identifiziert (Edwards et al. 1981; Ayyagari et al. 1987). Die Benutzung von Trägerampholyten und NEPHGE führte zu einer Auftrennung von über 300 Proteinen (Naaby-Hansen et al. 1997). Die neueste Studie verwendete immobilisierte pH-Gradienten (IPG) für die 1. Dimension (Bjellqvist et al. 1982). Immobilisierte pH-Gradienten trugen im Gegensatz zu Trägerampholyten dazu bei, dass ohne Verzerrung des pH-Gradienten eine größere Menge an Gesamtproteingemisch aufgetragen werden konnte. Dies ermöglichte die Darstellung von Proteinen mit niedriger Konzentration (Bjellqvist et al. 1993). Außerdem wurde durch die Anwendung von immobilisierten pH-Gradienten mit einem sehr engen pH-Bereich die

Auflösung des 2D-Geles in diesem gegebenen Bereich erhöht (Wildgruber et al. 2000). So wurden ca. 750 Proteine aufgetrennt und die Analyse von 2 Hauptproteinen mittels MALDI-TOF führte zur Identifizierung von Prostate Specific Antigen (PSA) und Prostatic Acid Phosphatase (PAP) (Starita-Geribaldi et al. 2001).

Im Bullenseminaleplasma wurden ca. 250 Proteine dargestellt, von denen 24 mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert wurden. Es stellte sich ein Proteinmuster unterschiedlich vom Menschen dar, wobei im bovinen Seminaleplasma schon beschriebene Proteine wie PC-109 und aSFP identifiziert wurden. Es wurden aber auch Proteine dargestellt, die vorher noch nicht im männlichen Reproduktionstrakt dokumentiert waren, wie EPV20, TIMP-II und Clusterin, bzw. solche Proteine, die beim Bullen noch nicht identifiziert wurden. So stimmten zwei Spots mit ihrer N-terminalen Sequenz zu 50% mit porcinem PSP-I überein (Mortarino et al. 1998). Die 2D-Gelelektrophorese wurde auch zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) und des Molekulargewichtes von den Hauptproteinen des Bullenseminaleplasmas genutzt (Desnoyers et al. 1994a):

Protein	Molekulargewicht (kDa)	IP
BSP-A1	16,5	4,7-5,0
BSP-A2	16	4,9-5,2
BSP-A3	15	4,8-5,2
BSP-30kDa	28	3,9-4,6

Tab. 6: pI und Molekulargewicht der Hauptproteine des Bullenseminaleplasmas

Es zeigte sich, dass die BSPs in verschiedenen Isoformen vorliegen und einen sauren pH-Wert aufweisen (siehe Tab. 6).

Im equinen Seminaleplasma wurde eine Proteinmappe mittels 2D-Gelelektrophorese angefertigt und die Proteine in Gruppen eingeteilt (a1-a8, b1-b5, c1, d1, e1-e2, f1-f2 und g). Die Proteinspots b1-b4 und d1 kamen in allen aufgetrennten Seminaleplasmen vor, der Spot g in 7 Seminaleplasmen. Des Weiteren waren die Spots a1, a5, b9, m2 und m5 bei jeweils zwei Probandentieren vorhanden, die Spots b6 und m1 bei jeweils

einem Probandentier. Nach Bestimmung des isoelektrischen Punktes und des Molekulargewichtes im 2D-Gel postulierten Frazer et al. (1996), dass es sich bei Spot b4 um HSP-1 und bei Spot d1 um HSP-2 handeln könnte.

2.7 Einsatz der 2D-Gelelektrophorese zur Ermittlung der Fertilität

Das hohe Auflösungsvermögen der 2D-Gelelektrophorese ermöglicht die Analyse der unterschiedlichen Expression von Proteinen in verschiedenen Individuen (Yanagida 2002).

Die 2D-Gelelektrophorese kam bei der Untersuchung des Verhaltens von Glycosaminoglycanen (GAG) bei normalen und vasktomierten Männern zum Einsatz. Das Ejakulat normaler Männer zeichnete sich durch das Fehlen von Dermatansulfat (DS) aus. Dagegen waren Chondroitinsulfat (CSC), Hyaluronsäure (HA) und LSC (low sulfated chondroitin sulfate) in relativ hohen Konzentrationen vorhanden. Bei vasktomierten Individuen wurde eine hohe Konzentration an DS festgestellt, wohingegen HA in unterschiedlichen Mengen und CSC nur bei einigen Patienten vorkam. So kann das Fehlen von DS im Ejakulat normaler Männer als Anhaltspunkt der unterschiedlichen Zusammensetzung von GAGs im Seminalplasma von normalen und vasktomierten Probanden gedeutet werden (Binette et al. 1996). Die Charakterisierung des Proteinmusters bei normalen und vasktomierten männlichen Probanden ergab das Fehlen einer Reihe von Spots von ca. 30 kDa im sauren pH-Bereich des Geles (Edwards et al. 1981). Weitere Hinweise in diese Richtung lieferte die Evaluierung der unterschiedlichen Zusammensetzung von Seminalplasma normaler und vasktomierter Männer und Patienten mit Anarchie oder Azoospermie. Unterschiede ergaben sich im Bereich pI 3,4 bis 6,5 und Molekulargewicht 14 bis 41 kDa. Proteingruppen G1, G2 und G3 und sieben unterschiedliche Proteine (S3-S7, S9, S16) waren im Seminalplasma von vasktomierten Männern und Patienten mit Anarchie nicht mehr zu finden. Die Seminalplasmen von Patienten mit Azoospermie zeichneten sich durch ein Fehlen von den Proteingruppen G1 und G2 und Proteinen S3-S7, S9, S16 aus. Die Abwesenheit verschiedener Proteine im Seminalplasma von infertilen Männern, könnte für die Entwicklung von diagnostischen Markern auf Proteinebene genutzt werden (Starita-Geribaldi et al. 2001).

An Bullen wurden ähnliche Untersuchungen durchgeführt. Die Tiere wurden anhand ihrer KB-Daten in hohe und niedrige Fertilität eingeteilt. Dabei wurde die Durchschnittsfertilität gleich Null gesetzt, Bullen mit niedriger Fertilität rangierten im Prozentpunktbereich –8,5 bis 0, Bullen mit hoher Fertilität im Prozentpunktbereich 0-4,5. Es wurden vier Proteine nachgewiesen, die in den Seminalplasmen von Bullen mit erhöhter und erniedrigter Fertilität Unterschiede in der Dichte aufwiesen. Protein 1 (26 kDa, pI 6,2) und Protein 2 (55 kDa, pI 4,5) zeigten bei Bullen mit hoher Fertilität eine erhöhte Dichte im Vergleich zu Bullen mit niedriger Fertilität. Protein 3 (16 kDa, pI 4,1) und Protein 4 (16 kDa, pI 6,7) hingegen waren in dieser Gruppe mit hoher Dichte vorhanden, wohingegen sie bei Bullen mit hoher Fertilität nur eine geringe Dichte aufwiesen. Die Entwicklung eines Regressionsmodells zur Vorhersage der Fertilität anhand der Dichte dieser vier Proteine ergab eine positive Korrelation (Killian et al. 1993). Die Proteine, die eine verstärkte Dichte bei den Bullen mit hoher Fertilität aufwiesen, wurden mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Elektroelution isoliert. Das 55 kDa Protein wies in einer 15stelligen Aminosäuresequenz 86% Homologie mit dem bovinem Osteopontin-k Prekursor auf. Im 2D-Westernblot ergab polyklonales Antiserum, das gegen dieses Protein generiert wurde, wie auch rekombinantes humanes polyklonales Antiserum einen deutlichen Spot (Cancel et al. 1997). Für die Beeinflussung der Fertilität durch Osteopontin existieren zwei Thesen, um den Wirkmechanismus zu erklären: 1. Osteopontin könnte die Epitheloberfläche der akzessorischen Geschlechtsdrüsen vor bakteriellen Infektionen schützen (Cancel et al. 1999). 2. Im Epididymis könnte Osteopontin auf der Zelloberfläche und in den Endosomen der Epithelzellen Ca^{2+} Kristalle binden und so eine Kalziumaggregation im Lumen verhindern (Luedtke et al. 2002). Das 26 kDa Protein zeigte eine zu 75% identische und zu 100% homologe N-terminale Sequenz mit Lipocalin-Typ Prostaglandin D Synthase (Gerena et al. 1998). Die Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt, aber Gerena et al. (1998) vermuten, dass das Protein eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Reifung von Spermien spielt. Außerdem könnten die identifizierten Proteine mögliche Fertilitätsmarker beim Bullen sein (Killian et al. 1993).

Zur Untersuchung des equinen Seminalplasmas wurden die Probandentiere in Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (Hengste), Gruppe 2 (Jährlinge) und Gruppe 3 (Jährlinge, die mit Testosteron behandelt wurden). Es ergaben sich folgende

Unterschiede im Proteinmuster dieser Gruppen: Proteingruppe 1 (60 kDa, pI 7) und Proteingruppe 2 (23 kDa, pI 4-5) waren bei Hengsten und Jährlingen stärker vertreten, Proteingruppe 3 (25-30 kDa, pI 5,5-6,0), Proteingruppe 4 (23 kDa, pI 7-8) und Proteingruppe 5 (15-20 kDa, pI 6-7,5) traten bei mit Testosteron behandelten Jährlingen verstärkt auf (McDowell et al. 1996). Fertilitätsuntersuchungen im Hengst mittels 2D-Gelelektrophorese ergaben wiederum vier Proteine, die mit der Fertilität in Verbindung gebracht wurden. Die Dichte des Protein 1 (72 kDa, pI 5,6) korrelierte positiv mit der Fertilität. Die Dichten der Proteine 2 (75 kDa, pI 6,0), 3 (18 kDa, pI 4,3) und 4 (16 kDa, pI 6,5) korrelierten negativ mit der Fertilität. 2D-Westernblot mit polyklonalem anti-Osteopontin Antiserum reagierte positiv gegen Protein 1 wie auch gegen die bovine Kontrolle. Diese antigenetische Homologie deutet darauf hin, dass es sich bei dem Protein 1 um equines Osteopontin handeln könnte. Diese Proteine im equinen Seminalplasma könnten auch als Marker zur Vorhersage der Fertilität eingesetzt werden (Brandon et al. 1999).

3. Material und Methoden

3.1 Probennahme

Die Proben wurden von Ebern genommen, die in der Bayerischen Besamungsgenossenschaft Landshut, Gut Berndorf gehalten wurden. Es handelte sich um Pietrain-Eber, die routinemäßig zur künstlichen Besamung eingesetzt wurden.

Eber	Probennummer	NRR %	Ferkelzahl
Fabro	1	82,2	9,1
Zinkel	2	79,8	9,1
Corfu	3	85,8	9,1
Vort	4	87,5	9,1
Kirmes	5	86,2	9,5
Marzipan	6	88,7	9,6
Rustikal	7	81,2	10,3
Comisar	8	81,3	10,5
Rubbel	9	83,2	10,5
Friese	10	87,9	10,3
Citrus	11	87,9	11,5
Tictac	12	87,9	11,7
Caustik	13	77,8	8,2
Vorzug	14	83,69	8,91
Viertel	15	83,45	9,08
Relief	16	83,50	9,69
Convoi	17	87,5	9,58
Mor	18	77,14	10,6
Marlin	19	80,3	10,1
Mar	20	85,31	11,3
Magis	21	82,03	10,9
Manux	22	83,19	11,48

Tab. 7: NRR und Ferkelzahl der Pietrain-Eber

Als Auswahlkriterien diente die 60-90-Tage-NRR und die Ferkelzahl. Die Ejakulate zeigten mindestens 70 % Spermienmotilität, < 20 % zytoplasmatische Tropfen und eine Dichte > 10×10^9 . Die Probennahme erfolgte viermal pro Eber im Abstand von einer Woche. Pro Eber wurde unverdünntes Ejakulat separiert und je 2 ml Eppendorfgefäß 1,67 µl Proteaseinhibitor hinzugefügt. Das Seminalplasma wurde durch Zentrifugation (15 min mit 10000 Umdrehungen/min, Zentrifuge Typ:2043, Hettich) gewonnen. Dann wurden die Seminalplasmaproben für den Transport in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zusätzlich wurden Proben von Ebern genommen, die in den Besamungsstationen Varkens Keldonk und Varkens Vught, Holland gehalten wurden.

Eber	Herdbuchnummer	Gruppe
a	80146	Hoch
b	80250	Hoch
c	80119	Hoch
d	80206	Hoch
e	80249	Niedrig
f	80159	Niedrig
g	80298	Niedrig
h	80237	Niedrig
i	80236	Niedrig
j	80296	Niedrig
k	80198	Niedrig

Tab. 8: Einteilung der Hybrid-Eber mittels DIS in eine Gruppe mit hoher und eine Gruppe mit niedriger Fertilität

Diese Eber wurden nach einem besonderen Selektionsverfahren ausgewählt. Dabei handelt es sich um die statistische Repräsentation der Möglichkeit, das Sperma zu verdünnen (DIS=Dilution of semen). Es wird angenommen, dass bei einer gegebenen hohen Spermienkonzentration die erzielte Ferkelzahl maximal ist (fixierter Eber-effekt). Bei stetiger Verdünnung wird eine Ferkelzahl von Null erreicht. Statistisch ausgedrückt, stellt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen dar:

$$\frac{a-b}{x}$$

a= fixierter Eber effekt
b= DIS
x= Spermienkonzentration

Die DIS der Eber wurde an 1,5-3,0 Inseminationen ermittelt. Anhand der DIS wurden die Hybrid-Eber in eine niedrige und eine hohe Gruppe eingeteilt. Proben dieser schon charakterisierten Eber wurden innerhalb einer Woche zweimal genommen. Dabei hatten die Tiere einen Tag Pause zwischen den Probenahmen. Die Seminalplasmagewinnung erfolgte wie oben beschrieben.

3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976).

Bradford-Reagenz:

Zur Herstellung des Bradford-Reagenz wurden 10 mg Coomassie G-250 in 5 ml Ethanol gelöst und 10 ml 85% Phosphorsäure hinzugefügt. Es wurde nun mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und die Lösung mit einem Faltenfilter (Typ 595, Fa. Schleicher & Schuell) filtriert.

Erstellung einer Eichgerade:

Für jedes Bradford-Reagenz wurde eine Eichgerade mittels einer BSA-Verdünnungsreihe (0 µg/ml Leerwert, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 37,5 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 87,5 µg/ml, 100 µg/ml) erstellt. Dazu wurden zu jeweils 100 µl der Bovine Serum Albumin (BSA)-Stammlösungen 1 ml Bradford-Reagenz zugegeben und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Die optische Dichte der Lösungen wurde bei 595 nm mittels eines Photometers (DU 640, Fa. Beckman) bestimmt. Die erhaltenen Messwerte wurden gegen die BSA-Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Der Bradford-Assay wurde mit jeweils 100 µl von 1/500 und 1/1000 verdünnten Seminalplasmaproben durchgeführt. Anhand der Eichgerade erfolgte die

Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Verdünnungen, die Proteinkonzentration der jeweiligen Seminalplasmaprobe wurde berechnet und der Mittelwert bestimmt.

3.3 Aufbereitung der Proben für die Elektrophorese

3.3.1 Zentrifugation

Es wurden Mikrokonzentratoren verschiedener Hersteller verwendet:

Centricon 10 Mikrokonzentratoren, Fa. Amicon

Vivaspin 2, 10000 PES, Fa. Vivascience

Microcon-Mikrokonzentratoren, Typ Microcon YM-10, Fa. Millipore

Die Amicon und Vivaspin Mikrokonzentratoren wurden jeweils mit 750 µl Lysepuffer (siehe Abschnitt 3.4.2.1.) und 250 µl Seminalplasma befüllt. Dann wurde bei 5°C eine halbe Stunde bei 7000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Typ: GS-15 R, Fa. Beckman). Nach weiterer Zugabe von 500 µl Lysepuffer wurde nochmals für 20 min zentrifugiert. Schließlich wurde 2 min bei 1000 x g zentrifugiert, um den Überstand zu gewinnen.

Bei Verwendung der Millipore Mikrokonzentratoren wurden 350 µl Lysepuffer und 150 µl Seminalplasma benutzt. Die Zentrifugation wurde bei 5°C und 14000 x g für eine halbe Stunde durchgeführt. Nach nochmaliger Befüllung mit 175 µl Lysepuffer wurde für weitere 20 min zentrifugiert. Die Gewinnung des Überstandes erfolgte durch Zentrifugation mit 1000 x g für 3 min.

3.3.2 Deglycosylierung

Für die Deglycosylierung wurde das N-Glycosidase F Deglycosylierungskit (Nr. 1836552, Fa. Roche) verwendet. Die Lösungen wurden laut Herstellerangaben für die Benutzung vorbereitet. Für den Doppelansatz der zu untersuchenden Probe und der Kontrollproteine wurden jeweils 2 Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet. Die Reaktionsgefäße wurden mit jeweils 5 µl Probe bzw. 5 µl Kontrollproteinen befüllt. Darauf wurde 5 µl reduzierter Denaturierungspuffer zu jedem Reaktionsgefäß pipettiert und bei 95°C 3 min inkubiert. Die erhitzte Lösung wurde herunterzentrifugiert. Dann wurde 10 µl Reaktionspuffer zu jedem Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Für die Deglycosylierungsreaktion wurde einem Eppendorf-Reaktionsgefäß des jeweiligen Doppelansatzes 10 µl rekonstituierte N-Glycosidase F beigefügt, dem anderen Reaktionsgefäß wurde 10 µl Reaktionspuffer zugegeben. Nun wurde für

eine Stunde bei 37°C inkubiert. Da Elektrophoresen empfindlich gegenüber Salzen sind (Lottspeich et al. 1998) wurde zur Entfernung ionischer und nichtionischer Detergenzien, die im Denaturierungs- und Reaktionspuffer enthalten waren, 1 ml kaltes Aceton in jedes Reaktionsgefäß gegeben und nochmals für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. 950 µl Überstand wurde abgezogen und das Pellet mit Aceton reextrahiert. Danach wurde das Pellet in der „Speed Vac“ (Vacuum Concentrator, Fa. Bachhofer) getrocknet. Für den Probenauftrag auf ein Gel wurde das Pellet in Wasser gelöst.

3.4 Gel-Elektrophorese von Proteinen

3.4.1 1D-SDS-Gel-Elektrophorese (Laemmli 1970)

Herstellen der Gele (7 cm x 8 cm x 0,75 mm):

Folgende Gel-Lösungen wurden hergestellt und 15 min entgast:

<u>4 %iges Sammelgel (für 10 ml):</u>	6,1 ml	H ₂ O
	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	1,3 ml	(w/v) Acrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5/1)
	100 µl	10 % (w/v) SDS-Lösung
<u>12 %iges Trenngel (für 40 ml):</u>	13,4 ml	H ₂ O
	10,0 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	16,0 ml	(w/v) Acrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5/1)
	400 µl	10 % (w/v) SDS-Lösung

Für den Start der Polymerisation wurden zu 40 ml Trenngel-Lösung 200 µl einer 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) Lösung und 20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) gegeben und gemischt. Anschließend wurde das Gel in der Apparatur gegossen (Mini-Protean, Fa. BioRad) und langsam mit H₂O überschichtet. Die Gele polymerisierten über Nacht. Am folgenden Tag wurde das Wasser auf dem Trenngel entfernt und das Sammelgel gegossen. Dafür wurden zu 10 ml Sammelgel-

Lösung 50 µl 10 % (w/v) APS-Lösung und 10 µl TEMED zugegeben und die Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen. Dann wurden die Kämme eingesetzt. Die Polymerisation der Sammelgele erfolgte in einem Zeitraum von mindestens 30 min.

Probenauftrag und Elektrophoresebedingungen:

Die Seminalplasmaproben wurden mit dem unten beschriebenen sechsfach konzentrierten Probenpuffer versetzt:

6-fach Probenpuffer: 7 ml Tris HCl pH 6,8
 1 g SDS
 3,6 ml Glyzerin
 200 µg gesättigte Bromphenolblau-Lösung
 ad 10 ml H₂O
 der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert

Die so aufbereiteten Proben und ein mit Probenpuffer rekonstituierter Marker (Dalton Mark VII-L, Fa. Sigma) wurden für 2 min auf 95°C erhitzt, anschließend in Eis abgekühlt und dann auf das Gel aufgetragen. Der Laufpuffer wurde wie folgt hergestellt:

Laufpuffer: 5 g Tris
 14,4 g/l Glycin
 1 g/l SDS

Das Gel wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V elektrophoresiert bis die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht hatte (nach ca. 1h).

3.4.2 2D-Gel-Elektrophorese (O'Farrel 1975)

3.4.2.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die Auftrennung erfolgte nach dem isoelektrischen Punkt. Hierfür wurde die Schutzfolie der Gelstreifen (Immobiline DryStrip pH 3-10 bzw. pH 4-7, 18 cm, linear,

Amersham Biosciences) entfernt und eine Rehydratisierungskassette (Amersham Biosciences) mit den Streifen bestückt. Anschließend wurde die Kassette mit 25 ml des folgenden Puffers befüllt:

<u>Rehydratisierungspuffer:</u>	12 g	Harnstoff
	0,5 g	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)
	38 mg	1,4-Dithioerithrit (DTE)
	200 µl	gesättigte Bromphenolblau-Lösung in H ₂ O
	0,5 ml	Pharmalyte pH 3-10 mit H ₂ O auf 25 ml

Die Gelstreifen wurden über Nacht gequollen und am folgenden Tag in die Elektrophoreseapparatur (Multiphor II mit Immobiline DryStrip Kit, Amersham Biosciences) laut Anleitung montiert. Die Proben wurden mit dem unten beschriebenen Lysepuffer versetzt:

<u>Lysepuffer:</u>	0,6 g	Harnstoff
	0,4 g	CHAPS
	48 mg	Tris
	100 mg	DTE
	200 µl	Pharmalyte pH 3-10 ad 10 ml H ₂ O

Es wurden zwischen 100 µg und 1000 µg Probe pro Gel aufgetragen. Der Probenauftrag erfolgte in Probenöpfchen (Sample Cups, Amersham Biosciences) auf das Gel, das anschließend mit Silikonöl (Cover Fluid, Amersham Biosciences) bedeckt wurde. Die Elektrophorese erfolgte nach untenstehendem Protokoll:

<u>Protokoll für die isoelektrische</u>	300 V konstant über 4h	1200 Vh
<u>Fokussierung</u>	Rampe von 300 V bis 2000 V über 8 h	9200 Vh
	Rampe von 2000 V bis 5000 V über 4 h	14000 Vh
	5000 V konstant über 6 h	30000 Vh
	<hr/>	
	Total	54400 Vh

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Apparatur entnommen, mit einem Filterpapier abgetupft und in Petrischalen überführt, die bei -80°C aufbewahrt wurden.

3.4.2.2 SDS-Gel-Elektrophorese (2. Dimension)

Die Auftrennung erfolgte nach der Molmasse. Dafür wurde die Herstellung der Gele (18 cm x 16 cm x 0,1 cm) laut dem in Abschnitt 3.3.1. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Elektrophorese wurde mit einer 2D-Gelelektrophorese-Apparatur (Protean II, Fa. BioRad) durchgeführt. Zur Equilibrierung der aus der isoelektrischen Fokussierung erhaltenen Gele wurde folgender Puffer verwendet:

<u>Equilibrierungspuffer:</u>	50 mM	Tris
	6 M	Harnstoff
	30 %	(v/v) Glyzerin
	2 %	(w/v) SDS

Die Equilibrierung unter zusätzlicher Spaltung und Acetylierung vorhandener Disulfidbrücken erfolgte nach untenstehendem Protokoll:

1. Schritt (15 min) 15 ml Equilibrierungspuffer + 1 % DTE
2. Schritt (15 min) 15 ml Equilibrierungspuffer + 2,5 % Iodacetamid + 200 μl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

Die Durchführung des Protokolls wurde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur vorgenommen. Dabei wurden durch die Bromphenolblau-Lösung die Gele blau gefärbt, um eine sichtbare Lauffront während der Elektrophorese zu erhalten. Parallel dazu wurde eine 0,5 %ige Agarose-Lösung in Laufpuffer hergestellt (siehe Abschnitt 3.4.1.). Die equilibrierten Gelstreifen wurden auf das Sammelgel aufgebracht und mit der Agarose-Lösung luftblasenfrei bedeckt. Die Elektrophorese wurde bei 9°C und einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel durchgeführt bis die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreichte (nach ca. 4,5 h).

3.5 Färbungen von Proteingelen

3.5.1 Coomassie-Färbung

Für die Coomassie-Färbung der Proteine im Gel wurden folgende Lösungen verwendet:

Färbelösung: 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 40 % (v/v) H₂O

Entfärbelösung: 5 % (v/v) Methanol
 7 % (v/v) Essigsäure
 88 % (v/v) H₂O

Bei allen Waschschritten wurde das Gel vollständig mit den Lösungen bedeckt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 4 h unter leichtem Schütteln in Färbelösung inkubiert. Dann erfolgte die Entfärbung wiederum unter leichtem Schütteln, solange bis das Gel farblos war und die Proteinspots bzw. Proteinbanden eine tiefblaue Färbung zeigten. Die Entfärbelösung wurde halbstündlich gewechselt.

3.5.2 Silber-Färbung nach Blum (Blum et al. 1987)

Die Silber-Färbungen wurden mit einem modifizierten Protokoll nach Blum durchgeführt. Dabei wurde das Gel vollständig von den Lösungen bedeckt und unter leichtem Schütteln nach folgendem Protokoll gefärbt und inkubiert:

Schritt	Lösung	Zeitraum
Fixieren	50 % (v/v) Methanol	über Nacht
	12 % (v/v) Essigsäure	(mindestens 1 h)
Waschen	30 % (v/v) Ethanol	3 x 30 min
Imprägnieren	0,22 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O	1 min
Waschen	H ₂ O	3 x 1 min

Versilbern	2 g/l AgNO ₃ 0,667 ml/l Formaldehyd (37 %)	> 20 min
Waschen	H ₂ O	4 x 1 min
Reduzieren	60 g/l Na ₂ CO ₃ (0,57 M) 0,5 ml/l Formaldehyd (37 %) 4 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O	1-10 min (bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität nach ca. 5 min)
Waschen	H ₂ O	3 x 5 min
Stoppen	7 % (v/v) Essigsäure	2 x 10 min
Waschen	H ₂ O	2 x 10 min
Konservieren	3 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) Methanol	30 min

Tab. 9: Protokoll für die Silber-Färbung nach Blum

3.5.3 Trocknen der Gele

Die Gele wurden laut Anleitung des Herstellers in die Trocknungsapparatur (Gel Drying Kit, 17,5 cm x 20 cm) eingespannt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.6 Immunblotting und Western Liganden Blotting

3.6.1 Semi-dry Western Blotting

Beim Blotting kam folgender Transferpuffer zur Anwendung:

<u>Transferpuffer:</u>	5,8 g/l	Tris
	2,9 g/l	Glycin
	0,37 g/l	SDS
	20 %	(v/v) Methanol

Für jedes Gel wurden 6 Blottingpapiere (Blotting Papier, 460 x 570 mm, Roth) auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten. Die Inkubation der Blottingpapiere erfolgte 10 min in Transferpuffer, der die Blottingpapiere vollständig bedeckte. Parallel dazu

wurde für das Blotten eine Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zugeschnitten und in Wasser inkubiert. Anschließend wurden auf die Anode der Blottingapparatur (H. Hölzel GmbH) luftblasenfrei drei der getränkten Blottingpapiere gelegt. Auf diesem Blottingpapierstapel fand die Nitrozellulosemembran Platz. Darauf wurde das Gel aufgelegt und mit Parafilm (Parafilm M, Fa. Roth) abgedeckt. Der Abschluß des Stapels erfolgte mit den letzten drei getränkten Blottingpapieren. Dann wurde die Kathode laut Herstellerangaben auf die Anode montiert und der Blottingvorgang wurde bei 0,8 mA/cm² Gelfläche für 1,5 h durchgeführt.

3.6.2 Ponceau S Färbung der Membran

Um die Membran und die darauf geblotteten Proteine zu färben, wurde das folgende Konzentrat 10-fach verdünnt eingesetzt:

<u>10-fach konzentrierte Ponceau S Lösung:</u>	2 %	(w/v) Ponceau S
	30 %	(w/v) Trichloressigsäure
	30 %	(w/v) Sulfosalicylsäure
		in H ₂ O

Die Membran wurde mit einfach konzentrierter Ponceau S Lösung bedeckt und bei Raumtemperatur für 5 min geschüttelt. Die Membran wurde mit H₂O solange gewaschen, bis nur noch die rot gefärbten Proteinbanden bzw. Proteinspots sichtbar waren.

3.6.3 Immundetektion

Der folgende PBS-T Puffer fand bei allen Schritten Anwendung:

<u>PBS-T Puffer:</u>	14,2 g/l	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
	2,8 g/l	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
	5,8 g/l	NaCl
	0,1 %	(v/v) Tween 20
		in H ₂ O

Vor der Detektion wurde die Membran mit jeweils 0,1 ml Lösung pro cm² nach folgendem Protokoll behandelt:

Schritt	Lösung	Zeitraum
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min
Blockieren	5 % (w/v) BSA in PBS-T	über Nacht (mindestens 2 h)
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min
Lösung für primäre Antikörper	In PBS-T verdünntes Serum (serumabhängige Verdünnung siehe Ergebnisteil)	1 x 60 min
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min
Lösung für sekundäre Antikörper	In PBS-T verdünntes Serum (serumabhängige Verdünnung siehe Ergebnisteil)	4 x 1 min
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min

Tab. 10: Protokoll für die Immundetektion

Nach dieser Behandlung bei Raumtemperatur in einem Hybridisierungssofen (Fa. Bachhofer) wurde die Membran mit Filterpapier (Gel-Blotting Papier, Fa. Roth) von überschüssiger Flüssigkeit befreit und mit Chemolumineszenz-Substratlösung (SuperSignal, Fa. Pierce) bedeckt (0,1 ml pro cm² Membranfläche).

Die Membran wurde 5 min in der Substratlösung inkubiert, dann wurde die Substratlösung abgegossen und die Membran in Klarsichtfolie verpackt. Anschließend wurde die Membran auf Röntgenfilme (XAR5, Fa. Kodak) mit Expositionszeiten von 1 s, 10 s, 30 s und 1 min aufgelegt und die Röntgenfilme mit einem Röntgenfilmentwickler (Typ: 1120, Fa. Protec) entwickelt.

3.6.4 Western-Liganden-Blotting (Hossenlopp et al. 1986; Wolf et al. 1997)

Die Gele wurden laut dem Protokoll in Abschnitt 3.3.1. angefertigt. Zur Aufbereitung der Seminalplasmaproben wurde ein nichtreduzierender Lämmli-Puffer verwendet:

<u>2-fach Probenpuffer:</u>	20 ml	Glycerin
	4 g	SDS
	12,5 ml	1 M TrisHCl pH 6,8
	2 ml	1 % Bromphenolblau-Lösung
		ad 100 ml H ₂ O
		der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert

Wurden 2D-Gele hergestellt, wurde das Seminalplasma mit Lysepuffer ohne DTE versetzt (Weber et al. 1999).

Der folgende Tris-Saline Puffer (pH 7,4) fand bei allen Schritten Anwendung:

<u>Tris-Saline Puffer, pH 7,4 :</u>	2,42 g	Tris
	17,53 g	NaCl
		ad 2 l H ₂ O

Vor der Detektion wurde die Membran mit jeweils 0,1 ml Lösung pro cm² nach folgendem Protokoll behandelt:

Schritt	Lösung	Zeitraum
Waschen	Tris-Saline + 3 % Nonidet P 40 (NP-40)	20 min
Blockieren	Tris-Saline + 1 % Fischgelatine	1 h
Waschen	Tris-Saline + 0,1 % Tween-20	15 min
Inkubieren	Tris-Saline + 1 % Fischgelatine + 0,1 % Tween-20 + 500000 cpm/ml [¹²⁵ I]IGF-II (mindestens 20 h) Tracer	über Nacht
Waschen	Tris-Saline + 0,1 % Tween-20	2 x 30 min
	Tris-Saline + 3 % Nonidet P 40 (NP-40)	3 x 30 min

Tab. 11: Protokoll für die Western-Ligandenblot Detektion

Die Behandlung der Membran erfolgte in einem Hybridisierungssofen bei 4°C in einem Kühlraum. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur 10 min getrocknet, dann in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine PhosphorImager Kassette (PhosphorImager Screen, Fa. Molecular Dynamics) eingelegt. Die Exposition der Membran fand über Nacht statt. Dann wurde die PhosphorImager Kassette bei 695 nm gescannt (Storm 860 PhosphorImager, Molecular Dynamics). Die Auswertung der relativen Intensität der Banden wurde mit dem ImageQuantNT Software Packet (Fa. Amersham Biosciences) vorgenommen.

3.7 Identifikation von 2D-Proteinspots mittels Massenspektrometrie

3.7.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im Gel

Die Coomassie bzw. Silber gefärbten Proteinspots wurden für die Analyse mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und in silanisierte Reaktionsgefäße (SafeSeal, Sorensen Bioscience) überführt. Das Gelstück wurde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen:

Schritt	Lösung	Zeitraum
Waschen	H ₂ O	2 x 15 min
	50 mM NH ₄ HCO ₃	2 x 15 min

Danach wurde das Gelstück mit einer Pinzette zerkleinert und die Gelstücke wurden knapp mit 50 mM NH₄HCO₃-Lösung überdeckt. Es wurden 70 ng Trypsin zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 40 µl 50 mM NH₄HCO₃-Lösung zugegeben und diese Lösung in ein weiteres silanisiertes Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Gelstücke wieder gewaschen:

Schritt	Lösung	Zeitraum
Waschen	50 mM NH ₄ HCO ₃	3 x 10 min
	70 % Acetonitril (ACN)	3 x 10 min

Die Waschlösung wurde jeweils der NH_4HCO_3 -Lösung in dem anderen Reaktionsgefäß zugefügt und dann wurde diese Peptidlösung in der Speed Vac auf ca. 10 μl eingeeengt und bei -80°C gelagert.

3.7.2 Mikroentsalzung der tryptisch gespaltenen Peptidlösung

Die Mikroentsalzung wurde mit ZipTips (C18, Fa. Millipore) vorgenommen. Am Ende dieser Pipettenspitzen befanden sich RP-HPLC (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography) Säulen, auf welche die Lösungen mit einer Pipette aufgebracht wurden. Dann wurden die Lösungen langsam mittels Druckluft, die von einer Pipette erzeugt wurde, durch die Säule gepresst. Das Eluat wurde in silanierten Reaktionsgefäße aufgefangen. Die Mikroentsalzung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Lösung	Häufigkeit
Anfeuchten	50 % ACN	2 x
Equilibrieren	0,1 % TFA (Trifluoracetic Acid)	2 x
Probenauftrag	Probenkonzentrat + 10 μl 0,1 % TFA	2 x
Waschen	0,1 % TFA	2 x
Eluieren	50 % ACN in 0,1 % TFA	2 x

Tab. 12: Mikroentsalzung der tryptisch gespaltenen Peptidlösung

Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.7.3 MALDI-TOF-TOF-Analyse der tryptisch gespaltenen Proteine

Die Analysen wurden mit einem MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometer (4700 Proteomics Analyser, Applied Biosystems) am Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Dr. Lottspeich durchgeführt. Bei der MALDI-MS wird durch Einbetten der Probe in eine geeignete Matrix aus kleinen Molekülen, die eine hohe Absorption bei gegebener Laserwellenlänge zeigen, eine höhere Intensität der Analytmolekülionen erhalten. Die Massenanalyse erfolgt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF-Analysator), der die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine genaue

elektronische Messung der Zeit (Start der Ionen in der Quelle bis Eintreffen am Detektor) vornimmt. Der 4700 Proteomics Analyser ist mit einem Nd-YAG-Laser (Yttrium-Aluminium-Granat-Kristalle dotiert mit Neodym) ausgestattet, der eine Impulskraft von 200 Hz und eine Wellenlänge von 355 nm produziert (Medzihradszky et al. 2000). 1 µl der Probe wurde mit 5 µl Matrix-Lösung gemischt und 1 µl der Mischung auf das Target aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Massenanalyse wurde im positiven Reflektormode durchgeführt. Die Identifizierung der MS/MS-Spektren erfolgte durch eine Datenbanksuche mit MASCOT (www.matrixscience.com).

3.8 Herstellung von Antikörpern

3.8.1 Präparation der Antigene

Mittels MALDI-TOF-TOF identifizierte Proteinspots wurden mit einem Skalpell aus einem Coomassie gefärbten Gel exzidiert und in silanisierte Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde das Gelstück mit einer Pinzette zerkleinert und das Protein aus dem Gel eluiert. Dabei wurden die Gelstücke unter Schütteln bei Raumtemperatur abwechselnd mit 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung und 70 % Acetonitril überdeckt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Das Eluat wurde in einem weiteren silanisierten Reaktionsgefäß aufgefangen und mittels eines QiaSchredders wurden überschüssige Gelstückchen entfernt. Dann wurde die Proteinlösung in der „Speed Vac“ einrotiert und bei -80°C gelagert.

3.8.2 Immunisierung der Tiere

Für die Immunisierung wurden weibliche, adulte New Zealand White Kaninchen verwendet. Die Tiere erhielten Pellets, Heu und Wasser ad libitum und wurden in Paarhaltung im Milieukäfig gehalten. Das Proteinkonzentrat wurde in sterilem PBS, pH 7,2, wieder in Lösung gebracht. Das gelöste Antigen wurde mit Freund'schem Adjuvans (Freund 1956) zu gleichen Teilen solange gemischt, bis eine weiße homogene Emulsion entstand. Hierfür wurde einmal komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet und dreimal inkomplettes Freund'sches Adjuvans. Es wurde bei jeder Immunisierung viermal subkutan im dorsalen Rückenbereich injiziert. Pro Injektion

wurde 100 µl Emulsion verwendet, so dass insgesamt 400 µl Emulsion injiziert wurden. Die Antigenverabreichung wurde in einem Abstand von 3 Wochen vorgenommen. Ab der zweiten Injektion wurde jeweils 10 Tage nach der jeweiligen Injektion Probeblut aus der medialen Ohrarterie genommen. Das Blut wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und dann für 30 min bei 4°C mit 10000 x g zentrifugiert (Zentrifuge: Sigma 202MK, Trommelrotor). Darauf wurde das Serum abpipettiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.8.3 Entbluten der Tiere

Die Tiere wurden 10 Tage nach der letzten Injektion entblutet. Dabei wurden durch einen horizontalen Schnitt kaudal der Ohren im dorsalen Halsbereich die Halsgefäße eröffnet und das Blut aufgefangen. Die Gewinnung des Serums wurde wie in Abschnitt 3.8.2. vorgenommen.

3.9 Feststellung der Antiserentiter mittels ELISA

Folgende Puffer wurden bei den ELISAs (enzyme-linked immuno sorbent assay) verwendet:

<u>Beschichtungspuffer:</u>	17,5 mM	NaHCO ₃
	7,5 mM	Na ₂ CO ₃
		auf pH 9,6 titriert
<u>Waschpuffer:</u>	2 g	KH ₂ PO ₄
	14,4 g	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O
	2 g	KCl
	80 g	NaCl
	5 ml	Tween 20
		in 10 l H ₂ O
<u>Blockierlösung:</u>	5 %	(w/v) BSA in Waschpuffer

3.9.1 Beschichten von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Seminalplasma

Die Beschichtung der 96er Mikrotiterplatten (Nunc, Maxisorb) mit Seminalplasma wurde nach folgendem Protokoll vorgenommen:

Schritt	Volumen pro Well	Lösung	Inkubation
Beschichten	50 µl	50 µg/ml Seminalplasma in Beschichtungspuffer	3 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Blockieren	350 µl	Blockierlösung	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min

Tab. 13: Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Seminalplasma

Die beschichteten Platten wurden bei –20°C gelagert.

3.9.2 Feststellung der Antiserentiter mit Seminalplasma-beschichteten Mikrotiterplatten

Für die ELISA-Analysen wurde als sekundärer Antikörper ein Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper des Herstellers Dako verwendet. Die Substratlösung wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt:

<u>TMB-Substratlösung:</u>	10 ml	H ₂ O
	9,9 ml	0,2 M Natriumacetat
	100 µl	0,2 M Zitronensäure
	200 µl	TMB (Tetramethylbenzidin) in DMSO (0,1 g TMB in 10 ml DMSO lösen, aliquotieren und bei –20 °C lagern)
	8 µl	H ₂ O ₂

Die Titerbestimmung mittels ELISA-Analyse wurde mit den bereits beschichteten Mikrotiterplatten nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Volumen pro Well	Lösung	Inkubation
Inkubation mit primärem Antikörper	50 µl	Verdünnungsreihe von 1:200 bis 1:25600 in Waschpuffer	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Inkubation mit sekundärem Antikörper	50 µl	1:2000 verdünnt in Waschpuffer	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Reaktion	50 µl	TMB-Substratlösung	10 min
Stoppen der Reaktion	25 µl	2 M H ₂ SO ₄	

Tab. 14: Protokoll zur Titerbestimmung mit dem ELISA

Die optische Dichte (OD) der Verdünnungsreihen in den Wells wurde mit einem ELISA-Platten-Lesegerät (Biolumin960, Fa. Molecular Dynamics) bei 450 nm gemessen.

3.10 Radioimmunassay

Die Radioimmunoassays (RIA) wurden in der Kinderklinik Tübingen von PD Dr. M. Elmlinger durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode bestand in der Konkurrenzreaktion zwischen Antigen in der Probe und einem radioaktiv-markierten Antigen als Tracer an einem spezifischen Antikörper. Durch einen Zweitantikörper wurde das gebundene von nicht-gebundenem Antigen getrennt (Immunpräzipitierung). Die Quantifizierung erfolgte mittels Standardkurve.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde von Herrn Stanglmeier, Institut für Tierzucht, mit dem SAS-Programm vorgenommen. Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit

dem F-Test durchgeführt, um Gruppenunterschiede festzustellen. Für die einzelnen Untersuchungsgruppen wurden signifikante Unterschiede der IGF-I/II Konzentrationen mittels des LS-means-Test (Methode der kleinsten Quadrate) analysiert. Die Unterschiede in der IGFBP-Aktivität der Pietrain-Eber wurden durch den selben Test verglichen. Der t-Test fand bei der Unterscheidung der IGFBP-Aktivität der Hybrid-Eber Anwendung. Ebenso wurden die ermittelten Proteinkonzentrationen mit Hilfe des t-Tests beurteilt.

3.12 Materialien und Materialienbezug

3.12.1 Allgemein verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril (Chromasolv für HPLC)	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Acrylamidlösung 30 %: Acrylamid : Bisacrylamid 37,5:1 (rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Roth
Agarose SERVA high EEO	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat z.A. (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampholyte pH 3-10 (Bio-Lyte)	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
CHAPS:3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Chemolumineszenz-Substratlösung SuperSignal	Pierce, Bonn, Deutschland
Coomassie G-250	Sigma
Coomassie R-250	Sigma
DMSO: Dimethylsulfoxid z.A.	Fluka, Taufkirchen, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
DTE: Dithioerythrit	Roth
EDTA : Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Essigsäure 99-100 %	Riedel de Haen
Ethanol z.A. ca. 96 %	Merck
Formaldehyd 36,5-38 %	Riedel de Haen
Freund's Adjuvans inkomplett	Sigma
Freund's Adjuvans komplett	Sigma
Gelatine (IGSS Qualität)	Amersham Biosciences, Braunschweig, Deutschland
Glycin ≥ 99 %	Roth
Glyzerin ≥ 99 %	Sigma
Harnstoff $\geq 99,5$ %	Roth
Iodacetamid ≥ 98 %	Sigma
Kaliumchlorid z.A. (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat z.A. (KH_2PO_4)	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol z.A.	Roth
Molekulargewichtsmarker: Dalton Mark VII	Sigma
Natriumcarbonat z.A. (Na_2CO_3)	Roth
Natriumchlorid z.A. (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat z.A. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Natriumhydrogencarbonat z.A. (NaHCO_3)	Merck
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat z.A. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Nonidet P-40	Sigma
Phosphorsäure z.A. (85 %)	Merck
Ponceau S	Sigma
Salzsäure (1N)	Roth
Schwefelsäure konz. (H_2SO_4)	Merck
SDS: Natriumlaurylsulfat ca. 99 %	Sigma
Silbernitrat z.A. (AgNO_3)	Roth
Silikonöl DryStrip Cover Fluid	Amersham

Chemikalien	Hersteller
	Biosciences
Stickstoff (flüssig)	Linde, Unterschleißheim, Deutschland
Sulfosalicylsäure z.A.	Merck
TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin z.A.	Roth
Trichloressigsäure z.A.	Riedel de Haen
Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan z.A.	Roth
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 % H ₂ O ₂	Aldrich
Zitronensäure z.A.	Merck

3.12.2 Antikörper und andere Proteine

Antikörper	Hersteller
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP	Dako, Glostrup, Denmark
Bovines Albumin Fraction V (BSA)	Sigma
Porcines Trypsin	Promega, Mannheim, Deutschland

3.12.3 Verschiedenes

Material	Hersteller
Faltenfilter Typ: 595	Schleicher & Schuell, Einbeck, Deutschland
Film, Kodak X-OMAT XAR-5	Sigma
Gel Drying Film 17,5 x 20 cm	Promega
Gel-Blotting Papier 460 x 570 cm	Roth
IEF-Gele: Immobiline DryStrips pH 3-10, 18 cm	Amersham Biosciences
IEF-Gele: Immobiline DryStrips pH 4-7, 18 cm	Amersham Biosciences
Mikrokonzentrator Centricon 10	Amicon, Danvers, USA
Mikrokonzentrator Microcon YM 10	Millipore, Eschborn, Deutschland

Material	Hersteller
Mikrokonzentrator Vivaspin 2, 10000 PES	Vivascience, Hannover, Deutschland
Mikrotiterplatten: Maxisorb	Nunc, Roskilde, Dänemark
N-Glycosidase F Deglycosylierungskit	Roche, Mannheim, Deutschland
Parafilm M	Roth
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Qiashredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Transfer Membran Biotrace NT 0,45 µm	Pall Gelman Sciences, Dreieich, Deutschland
Transfer Membran Protran	Schleicher & Schuell
ZipTip C18	Millipore

3.12.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophorese Apparatur Mini-Protean	Bio-Rad
Elektrophorese Apparatur Multiphor II	Amersham Biosciences
Elektrophorese Apparatur Protean II	Bio-Rad
ELISA-Platten-Lesegerät Biolumin 960	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Gel Drying Kit 17,5 x 20 cm	Promega
Hybridisierungssofen	Bachofer
Laserscanner Storm 860	Molecular Dynamics
Lyophyle Alpha 2-4	Christ
Photometer DU 640	Beckman, Unterschleiß- heim, Deutschland
Rehydratisierungskassette	Amersham Biosciences
Röntgenfilmentwickler 1120	Protec
Scanner: Powerlook II	Umax, Willich, Deutschland
Schüttler GFL 3015	Bachofer
Semi Dry Blotting Apparatur	Hölzel GmbH, Wörth, Deutschland

Gerät	Hersteller
Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics
Stromversorgung: Model 200/2.0	Bio-Rad
Stromversorgung: PAC 300	Bio-Rad
Stromversorgung: PAC 3000	Bio-Rad
Stromversorgung: PNC 6000-100	Knürr-Heinzinger
Thermostat RM 6	MGW Lauda
Tischzentrifuge Typ 2005	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge Typ 2045	Hettich
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H	Bandelin
Vacuum Concentrator	Bachhofer
Zentrifuge: GS-15 R	Beckman
Zentrifuge: 202MK	Sigma

3.12.5 Verwendete Software

Software und Datenbanken	Link bzw. Hersteller
Imagequant V5.0	Amersham Biosciences
SWISS-Prot and TrEMBL	www.expasy.org/sprot
SIM-Alignment	www.expasy.org/tools

3.12.6 Verwendete Versuchstiere

Versuchstier	Hersteller
Weibliche New Zealand White Kaninchen	Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung des IGF-Systems im Eberseminalplasma

4.1.1 Ergebnisse der Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration im Eberseminalplasma wurde bestimmt, um die Beladung von 2D-Gelen anhand der Proteinkonzentration vornehmen zu können. Mittels des Bradford-Assays wurden für die Pietrain-Eber Nr. 13 bis 22 aus der Besamungsstation Gut Berndorf die Proteinkonzentrationen der vier Seminalplasmaproben pro Eber, die im Abstand von je einer Woche gewonnen wurden, in einer 1:500 und 1:1000 Verdünnung gemessen.

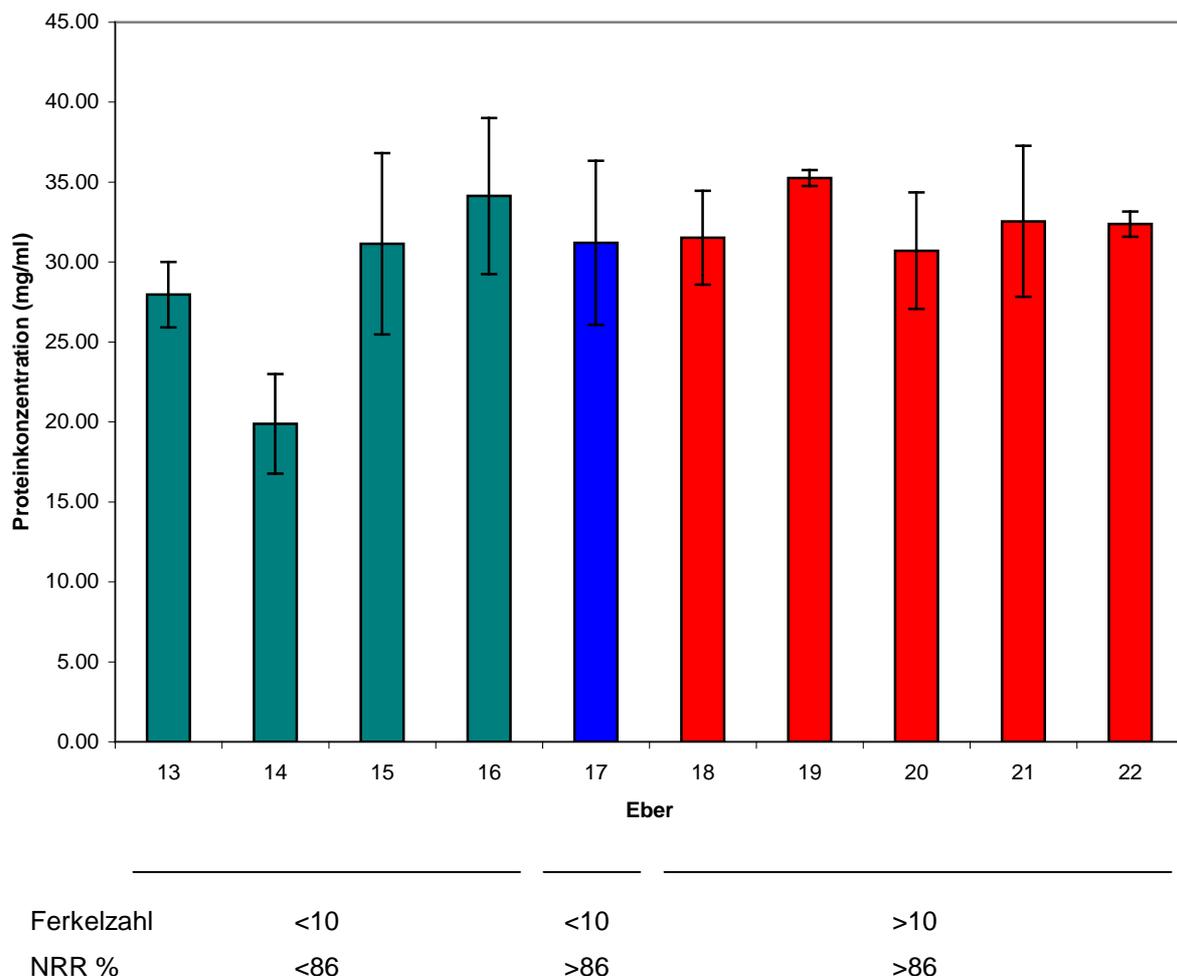


Abb. 1: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Seminalplasma von 10 Pietrain-Ebern (Mittelwert und Standardabweichung aus der 1:500 und 1:1000 Verdünnung)

Die Gesamtproteinkonzentrationen bewegten sich im Bereich von 19,9 bis 35,3 mg/ml. Eine Einteilung der Eber in Gruppen (Gruppe 1: Ferkelzahl<10, Gruppe 2: Ferkelzahl>10) ergab grenzwertig signifikante Unterschiede der Proteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,05$). Die Proteinkonzentrationen der Seminalplasmen der einzelnen Eber für jede Probennahme unterschieden sich (siehe Abb. 1).

Des weiteren wurde die Gesamtproteinkonzentration der mit einem Tag Pause gewonnenen zwei Seminalplasmaproben pro Hybrid-Eber a bis k aus der Besamungsstation Varkens, Holland mittels Bradford-Assay in einer 1:500 und 1:1000 Verdünnung bestimmt.

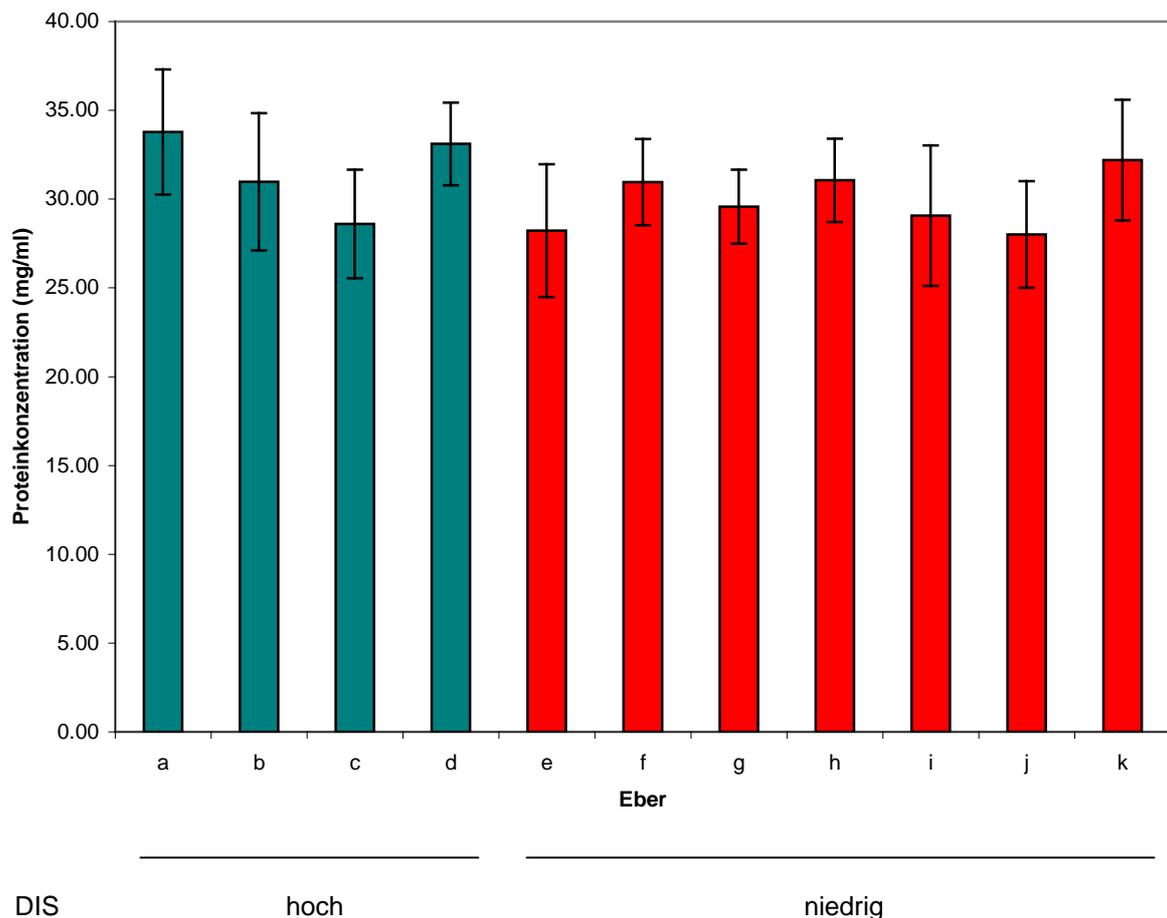


Abb. 2: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Seminalplasma von 11 Hybrid-Ebern (Mittelwert und Standardabweichung aus der 1:500 und 1:1000 Verdünnung)

Die Gesamtproteinkonzentrationen erstreckten sich über einen Bereich von 28,0 bis 33,8 mg/ml. Die Einteilung der Eber in Gruppen (Gruppe 1: hohe DIS, Gruppe 2: niedrige DIS) ergab keine Unterschiede der Proteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,15$). Die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben innerhalb eines Ebers unterschieden sich (siehe Abb. 2).

4.1.2 Ergebnisse zur Untersuchung der PSP-I Intensität

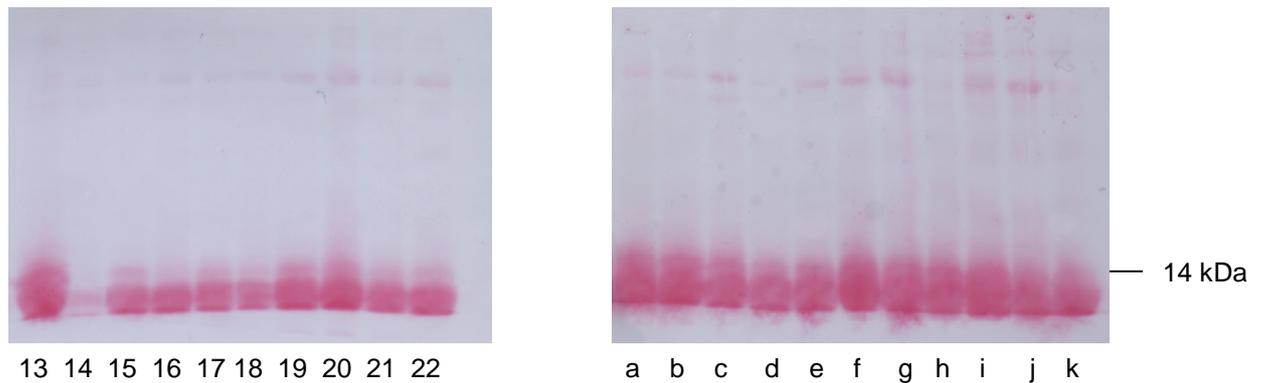


Abb. 3: Ponceau-S-Färbung der Seminalplasmen von 10 Pietrain-Ebern (13-22) und 11 Hybrid-Ebern (a-k) zur Visualisierung des PSP-I Gehaltes

Die Intensität der PSP-I Banden wurde auf Unterschiede zwischen den einzelnen Ebern überprüft. Nach dem Semidry-Blotting des Minigeles und Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S zur Kontrolle zeigte sich bei den Ebern 13 bis 22 eine rosarote Färbung der Banden im 14 kDa-Bereich. Hierbei handelte es sich um Banden des PSP-I (siehe Abb. 27). Die Farbintensität der einzelnen Banden unterschied sich. Die Banden der Eber Nr.13, 19 und 20 wiesen eine vergleichbare kräftige Färbung auf, die Banden der Eber Nr. 15 bis 18 sowie 21 und 22 waren in ihrer Intensität schwächer. Die PSP-I Bande von Eber Nr.14 zeigte die schwächste Intensität. Bei den Ebern a bis k wiesen alle PSP-I Banden eine in der Intensität vergleichbare, kräftige rosarote Färbung auf.

4.1.3 Ergebnisse der IGF-I und IGF-II Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der IGF-I und IGF-II Konzentrationen im Eberseminalplasma von den Pietrain-Ebern Nr. 1 bis 12 untersuchte mittels eines spezifischen Radioimmunoassays, ob Unterschiede zwischen den einzelnen Ebern bestanden. Es wurden vier Proben je Eber genommen, die anhand ihrer NRR und Ferkelzahl in vier Gruppen eingeteilt wurden: Gruppe 1 (Ferkelzahl < 10, NNR < 86%), Gruppe 2 (Ferkelzahl < 10, NNR > 86%), Gruppe 3 (Ferkelzahl > 10, NNR < 86%) und Gruppe 4 (Ferkelzahl > 10, NNR > 86%).

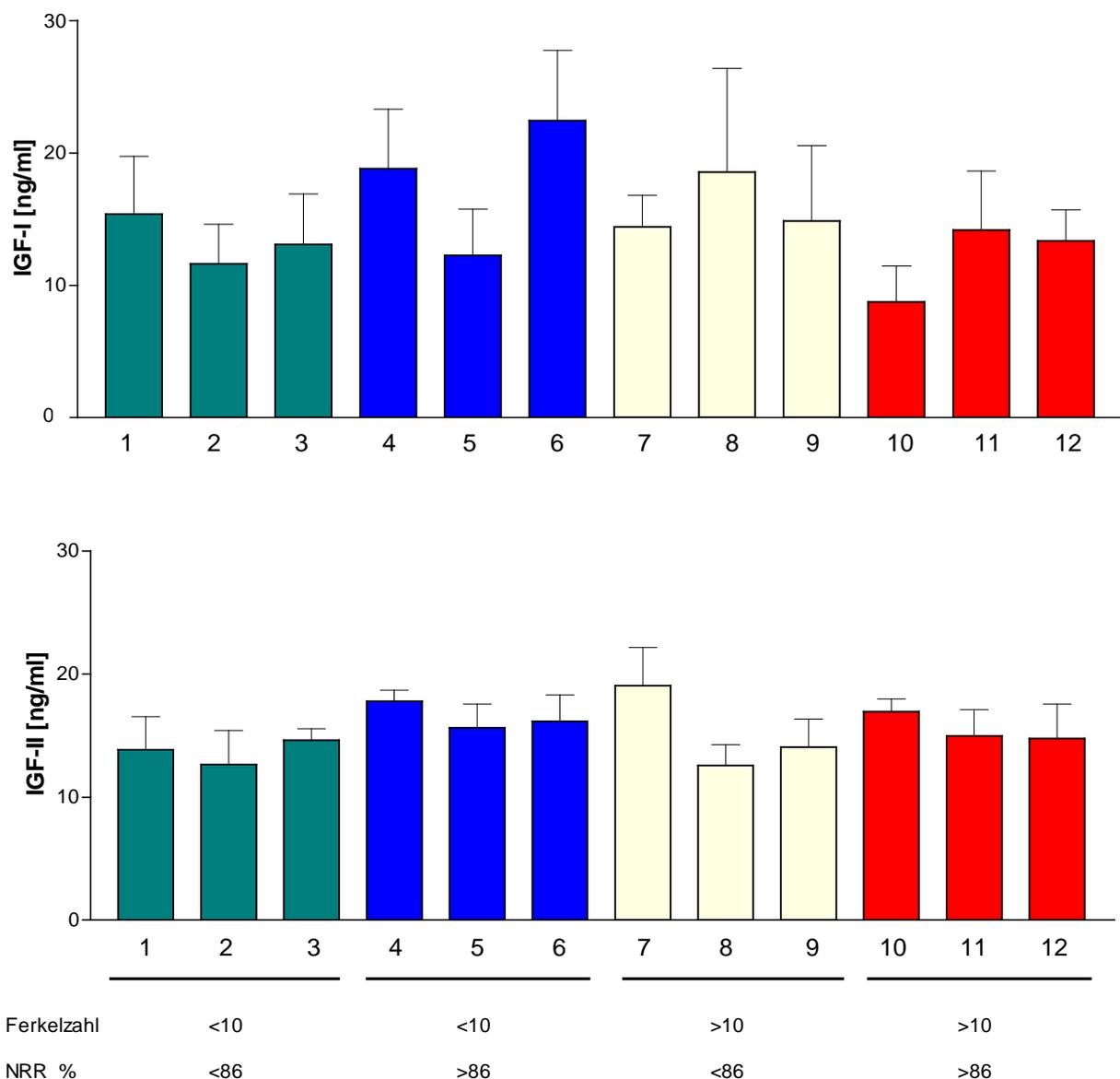


Abb. 4: IGF-I/II-Konzentrationen im Seminalplasma der Eber Nr. 1-12

Die IGF-I Konzentrationen im Seminalplasma dieser Eber betragen zwischen 8,4 und 22,2 ng/ml. Die IGF-II Konzentrationen rangierten im Bereich von 12,1 bis 19,8 ng/ml. Durchschnittlich wurde eine IGF-I Konzentration von $14,8 \pm 4,1$ ng/ml (Mittelwert \pm Standardabweichung) und eine IGF-II Konzentration von $15,3 \pm 2,4$ ng/ml ermittelt. Die IGF-I/II Konzentrationen unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen ($p > 0,05$).

4.1.4 Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von IGFBPs

4.1.4.1 Reproduzierbarkeit der IGFBP-Aktivitätsbestimmung mittels 1D-Western-Ligandenblot

Für die Untersuchung der Reproduzierbarkeit des 1D-Western-Ligandenblots wurden zwei individuelle Blots der gleichen Probe der Eber 13 bis 22 von der Besamungsstation Gut Berndorf angefertigt. Die Werte der Membran 1 wurden mit den Werten der Membran 2 mittels der linearen Korrelationsanalyse verglichen. Der Wert des Ebers 18 wurde aus der Analyse herausgenommen, da er sich in der Sättigung befand.

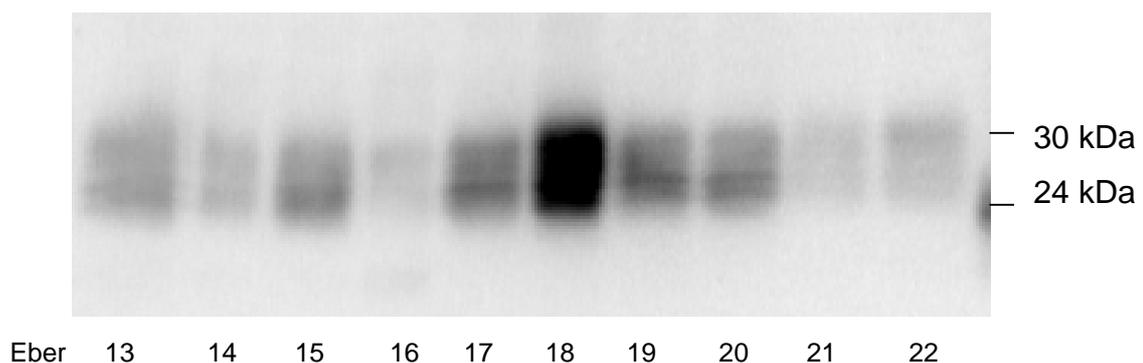


Abb. 5: IGFBP-Aktivität der Eber 13-22 auf der Membran 1

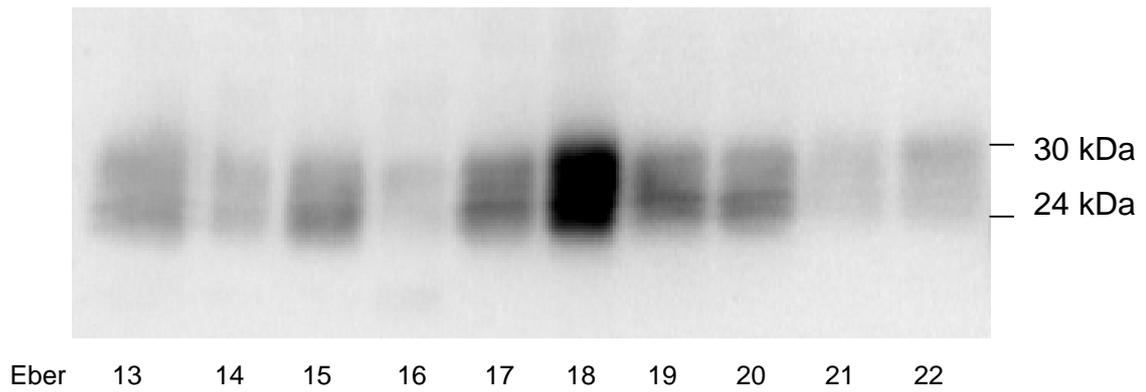


Abb. 6: IGF1BP-Aktivität der Eber 13-22 auf der Membran 2

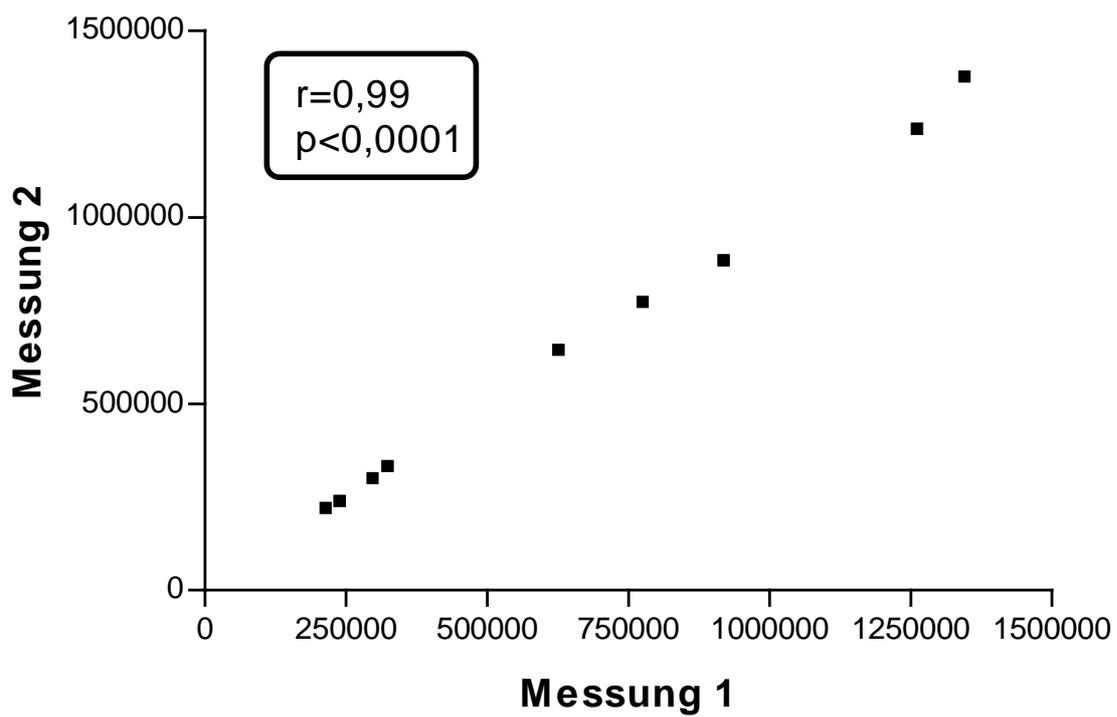


Abb. 7: Vergleich der Werte der Membran 1 mit den Werten der Membran 2

In Abbildung 7 zeigte sich die Reproduzierbarkeit des 1D-Western-Ligandenblots.

4.1.4.2 Vergleich der IGFBP-Aktivität einzelner Eber an verschiedenen Probenahmeterminen

Anhand der Hybrid-Eber a bis k aus der Besamungsstation Varkens, Holland wurde untersucht, wie sich die IGFBP-Aktivität einzelner Eber für unterschiedliche Probenahmeterminen unterschied.

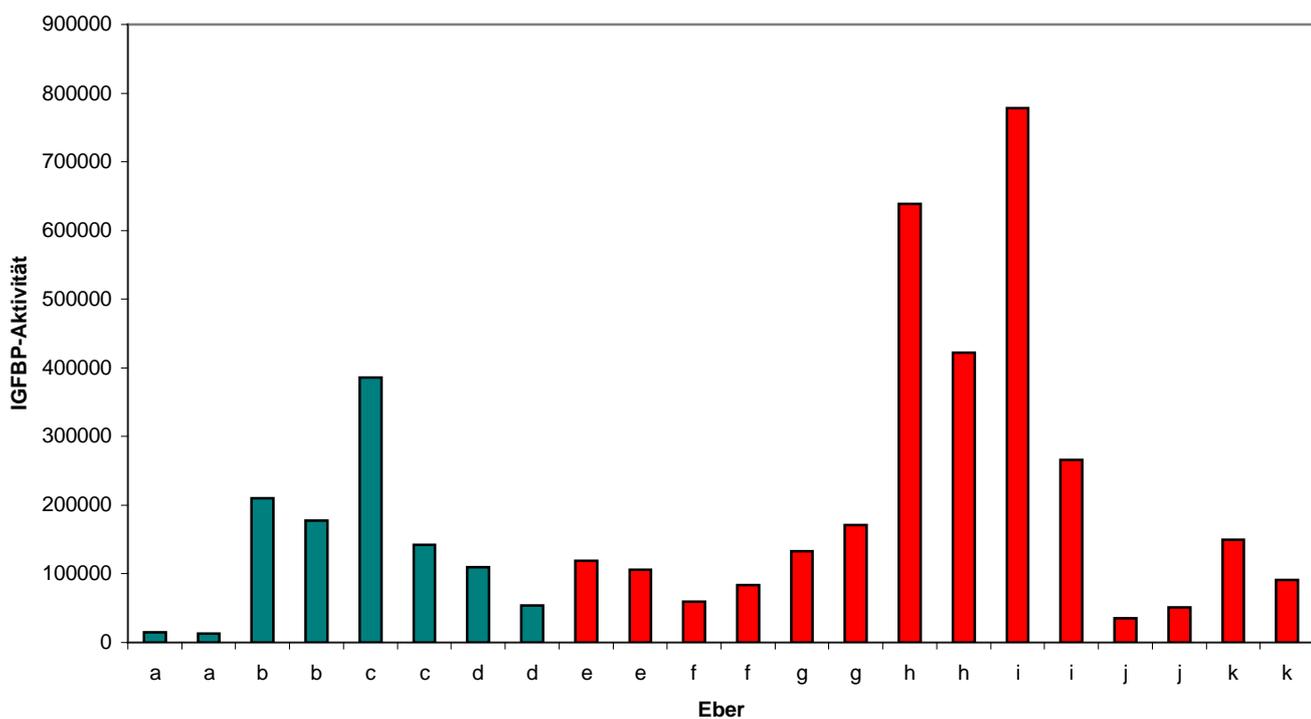
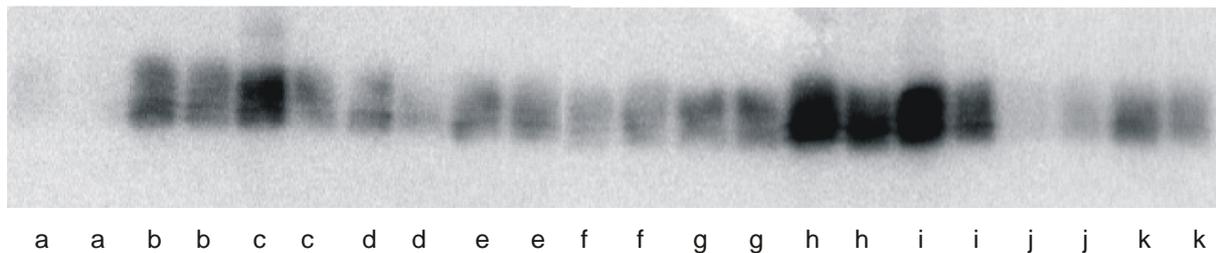
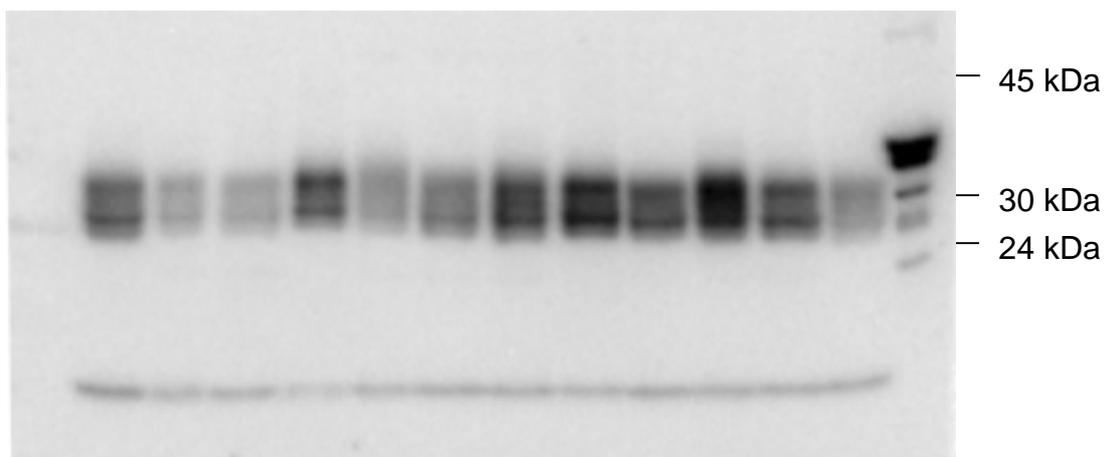


Abb. 8: IGFBP-Aktivität der Hybrid-Eber a-k an zwei unterschiedlichen Probenahmeterminen

Die IGFBP-Aktivitäten der einzelnen Eber an den 2 Probenahmen unterschieden sich. Dabei zeigten Eber mit einer hohen IGFBP-Aktivität bei beiden Probenahmen eine hohe IGFBP-Aktivität. Eber mit einer niedrigen IGFBP-Aktivität hatten bei beiden Probenahmen eine niedrige IGFBP-Aktivität.

4.1.4.3 Isovolumetrischer Vergleich der IGFBP-Aktivität im 1D-Western-Ligandenblot

Untersucht wurden die Seminalplasmaproben von insgesamt 22 Ebern aus der Besamungsstation Gut Berndorf auf Unterschiede in ihrer IGFBP-Aktivität. Porcines Serum wurde als Kontrolle aufgetragen. Im 1D-Western-Ligandenblott des Seminalplasmas zeigten sich zwei Banden bei einem Molekulargewicht von 29 und 31 kDa. Die relative Intensität der Banden unterschied sich zwischen den einzelnen Ebern. Für die Gruppe 1 (Ferkelzahl < 10, NNR < 86%) und 2 (Ferkelzahl < 10, NNR > 86%) ergaben sich in der Intensität schwächere Banden. In den Gruppen 3 (Ferkelzahl > 10, NNR < 86%) und 4 (Ferkelzahl > 10, NNR > 86%) waren die Intensitäten der Banden stärker.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Serum
Ferkelzahl	< 10			< 10			> 10			> 10			
NNR %	< 86			> 86			< 86			> 86			

Abb. 9: IGFBP-Aktivität im Seminalplasma der Pietrain-Eber 1-12

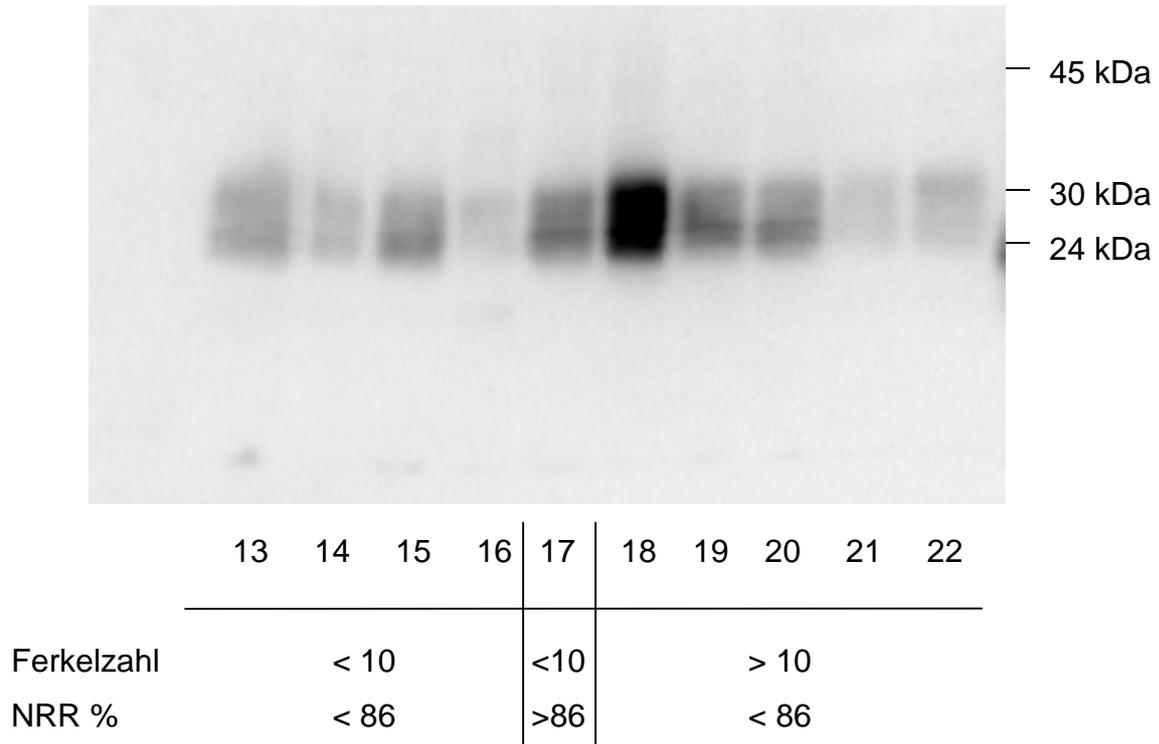


Abb. 10: IGFBP-Aktivität im Seminalplasma der Pietrain-Ebern 13-22

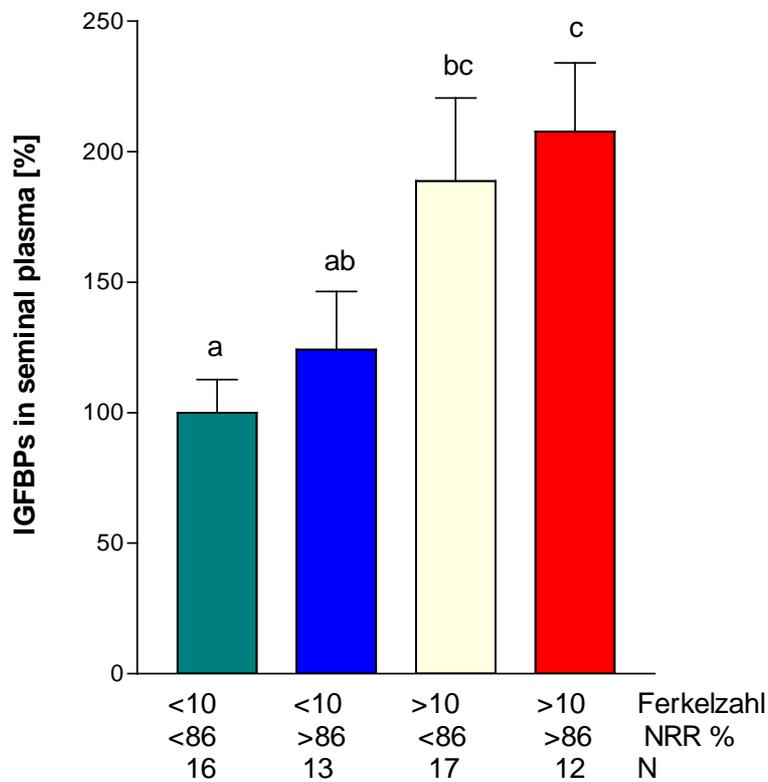


Abb.11: Bestimmung der IGFBP-Aktivität im Seminalplasma (Mittelwert und Standardabweichung) der 4 Gruppen

Sichtbar ist in Abbildung 11, dass der Gehalt von IGFBP in den Gruppen 3 und 4 höher war als in den Gruppen 1 und 2. Die IGFBP-Aktivität im Seminalplasma der Eber mit einer Ferkelzahl >10 war signifikant höher ($p < 0,05$) als im Seminalplasma der Eber mit einer Ferkelzahl <10. Zwischen den Gruppen 2 und 3 bestand keine Signifikanz.

Des Weiteren wurden 11 holländische Hybrid-Eber auf ihre IGFBP-Aktivität untersucht.

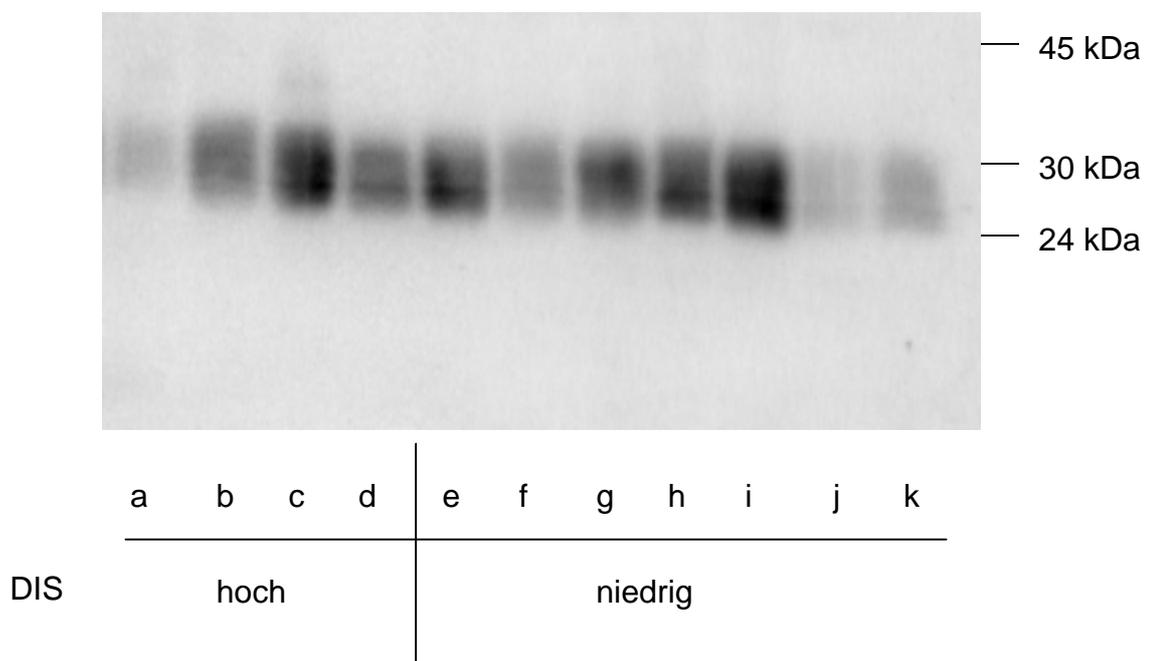


Abb. 12: IGFBP-Aktivität im Seminalplasma von 11 Hybrid-Ebern

Im 1D-Western Ligandenblot unterschieden sich die Eber der beiden Gruppen nicht in der IGFBP-Aktivität ($p > 0,05$).

4.1.4.4 2D-Ligandenblot

Das Laufverhalten des im 1D-Western-Ligandenblot detektierten IGFBPs wurde im 2D-Western-Ligandenblot untersucht. Für den 2D-Western-Ligandenblot des Seminalplasma eines Ebers mit hoher IGFBP-Aktivität wurden Seminalplasmafragmente verwendet, die mittels „Size-Exclusion“-Chromatographie und RP-Chromatographie

im endokrinologischen Labor, Medizinische Klinik II von Herrn Spöttl gereinigt wurden und im 1D-Western-Ligandenblot eine hohe IGFBP-Aktivität zeigten.

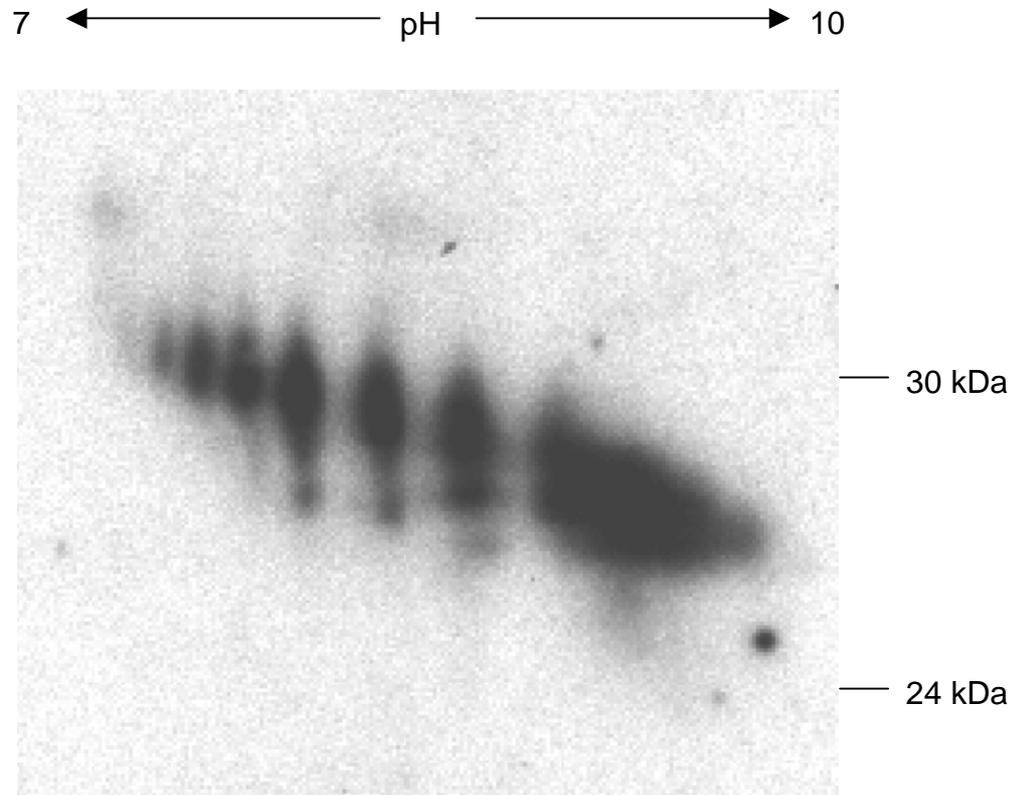


Abb. 13: 2D-Western-Ligandenblot von Seminalplasma-IGFBP

Der 2D-Western Ligandenblot zeigte eine Reihe von Signalen im pH-Bereich von 7 bis 10 und Molekulargewichtsbereich von 27 bis 31 kDa. Die IGFBP-Hauptkomponente befand sich im Trennbereich von pH 9 bis 10 und MW 27-29 kDa. Des Weiteren wurden Signale von sechs IGFBP-Subspezies im Trennbereich von pH 7 bis 9 und MW von 28 bis 31 kDa detektiert (siehe Abb. 13).

4.1.4.5 Ergebnisse der MALDI-PMF-Massenspektrometrie

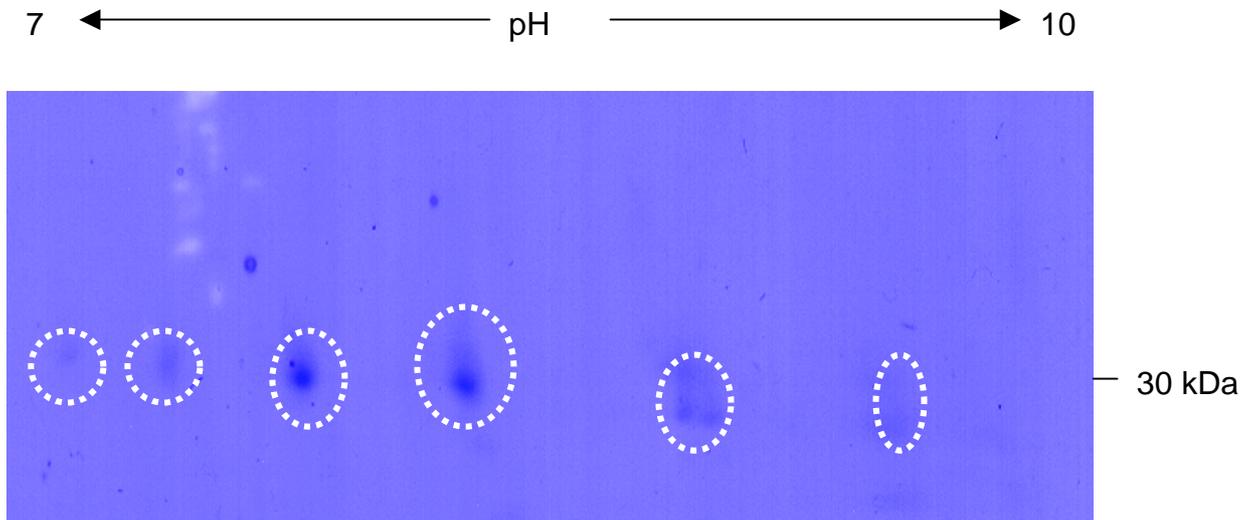


Abb. 14: Präparatives 2D-Coomassie-Gel (1 mg gereinigtes Seminalplasma aufgetragen)

Im Trennbereich von pH 7 bis 10 und MW 30 kDa wurden sechs tiefblau gefärbte Spots dargestellt (siehe Abb. 14). Die Identifizierung der exziierten und enzymatisch gespaltenen 2D-Spots wurde mittels MALDI-PMF-Massenspektrometrie von der Firma Toplab, Martinsried, durchgeführt.

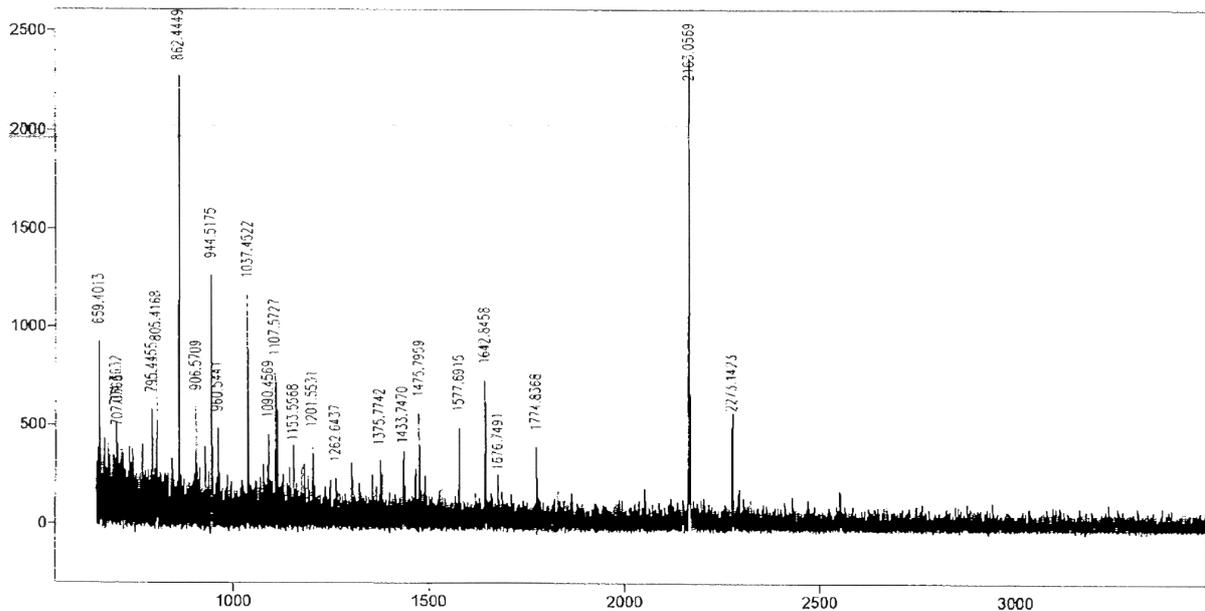


Abb. 15: MALDI-PMF-Analyse der 2D-Spots

Considered modifications: | Peptide N-terminal Gln to pyroGlu | Oxidation of M | Protein N-terminus Acetylated |

Min. # Peptides to Match	Peptide Mass Tolerance (+/-)	Peptide Masses are	Digest Used	Max # Missed Cleavages	Cysteines Modified by	Peptide N terminus	Peptide C terminus
4	50.000 ppm	monoisotopic	Trypsin	1	carbamidomethylation	Hydrogen (H)	Free Acid (O H)

Result Summary

Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	Accession #	Protein Name
1	455	5/9 (55%)	30323.3 / 8.56	PIG	Q28985	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 5 PRECURSOR (IGFBP-5) (IBP-5) (IGF-BINDING PROTEIN 5)
2	454	4/9 (44%)	30372.3 / 8.48	MOUSE	Q07079	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 5 PRECURSOR (IGFBP-5) (IBP-5) (IGF-BINDING PROTEIN 5)
3	451	4/9 (44%)	30570.6 / 8.58	HUMAN	P24593	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 5 PRECURSOR (IGFBP-5) (IBP-5) (IGF-BINDING PROTEIN 5)
4	31.9	4/9 (44%)	60999.9 / 8.90	YEAST	P24783	P68-LIKE PROTEIN
5	22.2	4/9 (44%)	29144.0 / 5.37	MYCPN	P75100	HYPOTHETICAL PROTEIN MPN013 (D12_ORF257)

Abb.16: Datenbank-Recherche der PMF-Daten

Die Datenbanksuche der PMF-Daten gegen alle bisher bekannten Proteine ergab für alle untersuchten Spots, dass es sich um IGFBP-5 handelte.

4.2 Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

4.2.1 Verbesserung der 2D-Gelqualität

4.2.1.1 Zentrifugation

Bei der Herstellung eines 2D-Geles von unbehandeltem Seminalplasma zeigte sich eine verstärkte vertikale Streifung, die sich durch Verschmieren der Proteinspots darstellte. Zur Verringerung der vertikalen Streifung wurde mit Mikrokonzentratoren von drei verschiedenen Herstellern zentrifugiert. Es zeigte sich bei Verwendung der Amicon und Vivascience Mikrokonzentratoren, dass die Membran schon während des ersten Zentrifugationsschrittes undurchlässig wurde. Eine Verlängerung der Zentrifugationszeit bzw. eine Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung konnte die Impermeabilität nicht verhindern. Das Hindurchtreten der Probenflüssigkeit durch die Membran dieser Mikrokonzentratoren war unvollständig, so dass es nicht möglich war, einen aufkonzentrierten Überstand von 10 µl zu erreichen. Mit einem Überstand

größer als 10 µl war die Zugabe von zusätzlichem Lysepuffer und der anschließende zweite Zentrifugationsschritt ineffizient. Der Auftrag dieser unvollständig aufbereiteten Proben auf ein 2D-Gel erzielte keinen Unterschied im Vergleich zum Auftrag unbearbeiteter Proben. Die Zentrifugation mit Millipore Mikrokonzentratoren erfolgte in drei Zentrifugationsschritten und resultierte in vollständiger Wiedergewinnung des Überstandes. Das Auftragen dieser mikrokonzentrierten Proben auf ein 2D-Gel zeigte eine teilweise Verbesserung der Gelqualität (siehe Abb. 17 und 18).

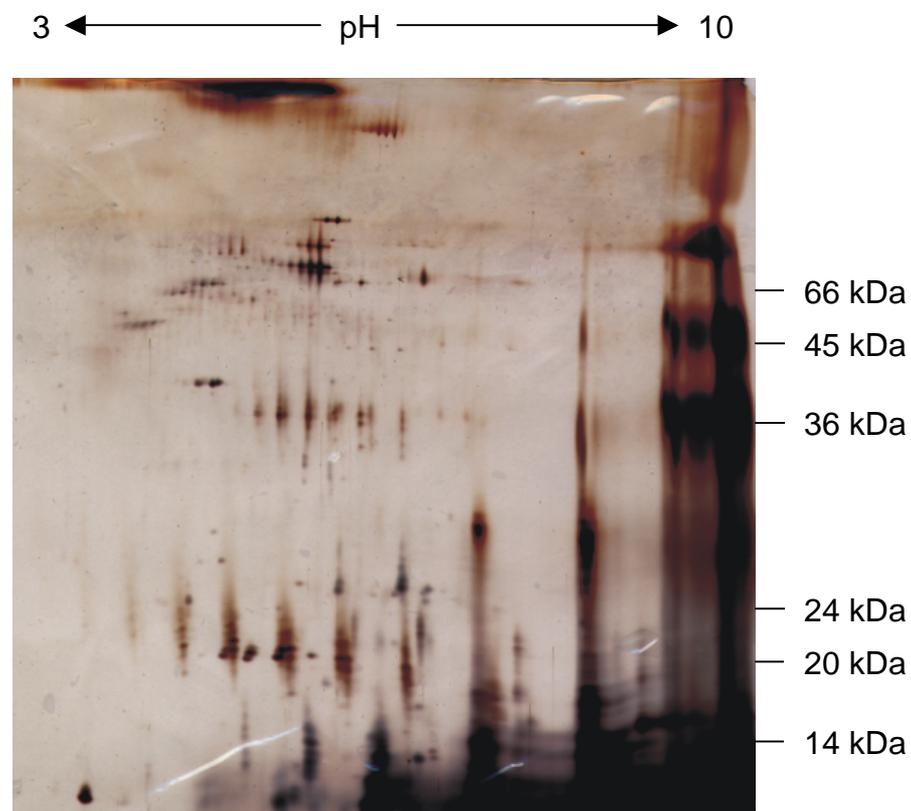


Abb. 17: Silber-gefärbtes 2D-Gel von unbehandeltem Seminalplasma (100 µg aufgetragen)

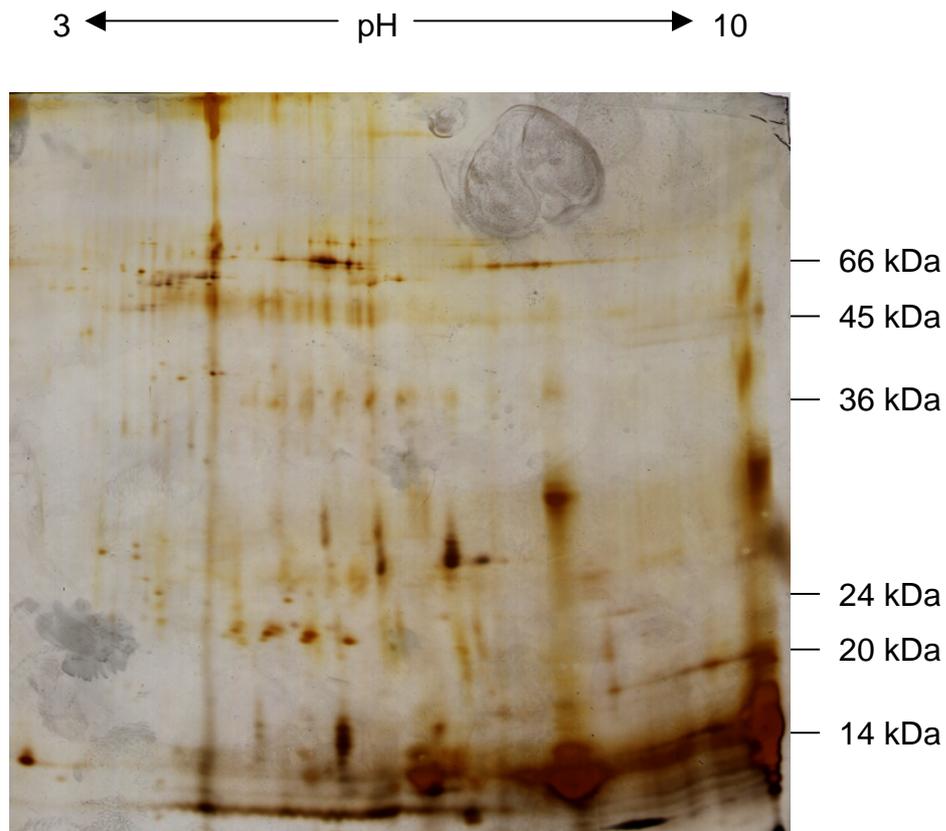


Abb. 18: Silber-gefärbtes 2D-Gel von mit Millipore-Mikrokonzentration behandeltem Seminalplasma (100 µg aufgetragen)

Im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa und 36 kDa stellten sich vorher verschmierte Proteinspots schärfer begrenzt dar, aber in höheren Molekulargewichtsbereichen waren die Proteinspots weiterhin verschmiert. Dort waren einige Proteinspots auch in ihrer Intensität im Gegensatz zu 2D-Gelen von unbehandelten Proben verringert (siehe Abb. 18).

4.2.1.2 Deglycosylierung

Im Trennbereich von pI 7 bis 9 und MW 14 bis 16 kDa eines 2D-Geles von unbehandeltem Seminalplasma waren drei Isoformen von PSP-I (Identifizierung siehe Abb. 28) sichtbar. Für eine schärfere Begrenzung der drei Spots wurde das N-Glycosidase F Deglycosylierungskit verwendet. Die PSP-I N-Deglycosylierung war erkennbar in einem 1D-Kontrollgel, das Coomassie gefärbt wurde.

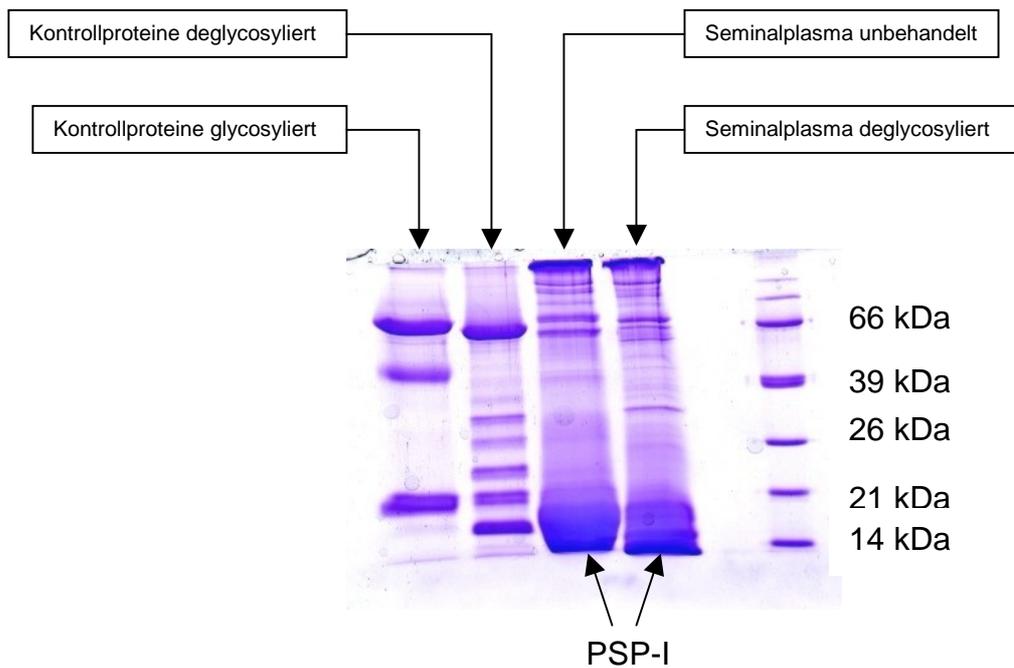


Abb. 19: 1D-Coomassie-Kontrollgel

In der unbehandelten Probe zeigte sich eine PSP-I Proteinbande, während in der behandelten Probe zwei PSP-I Proteinbanden sichtbar waren. Des weiteren wurde im Molekulargewichtsbereich von 66 kDa eine weitere Deglycosylierung sichtbar.

4 ————— pH —————> 10

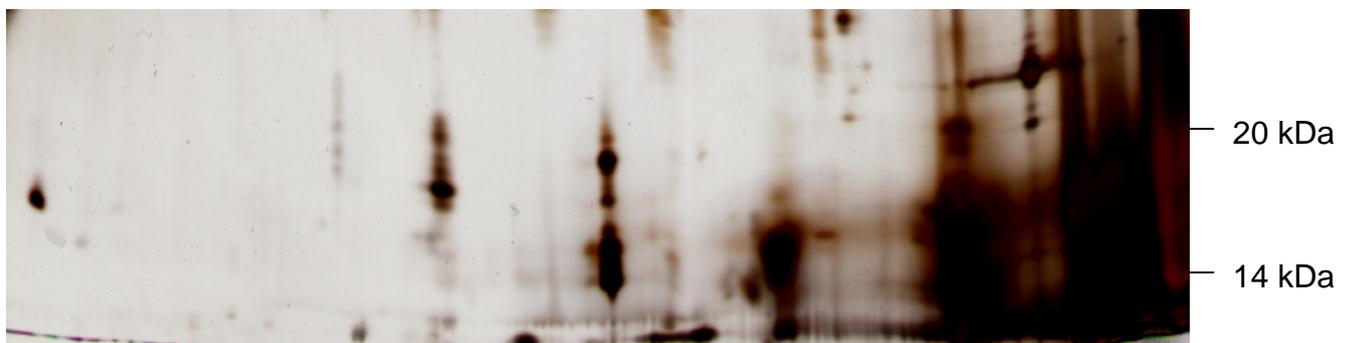


Abb. 20: Ausschnitt aus einem 2D-Gel von unbehandeltem Seminalplasma (100 µg aufgetragen)

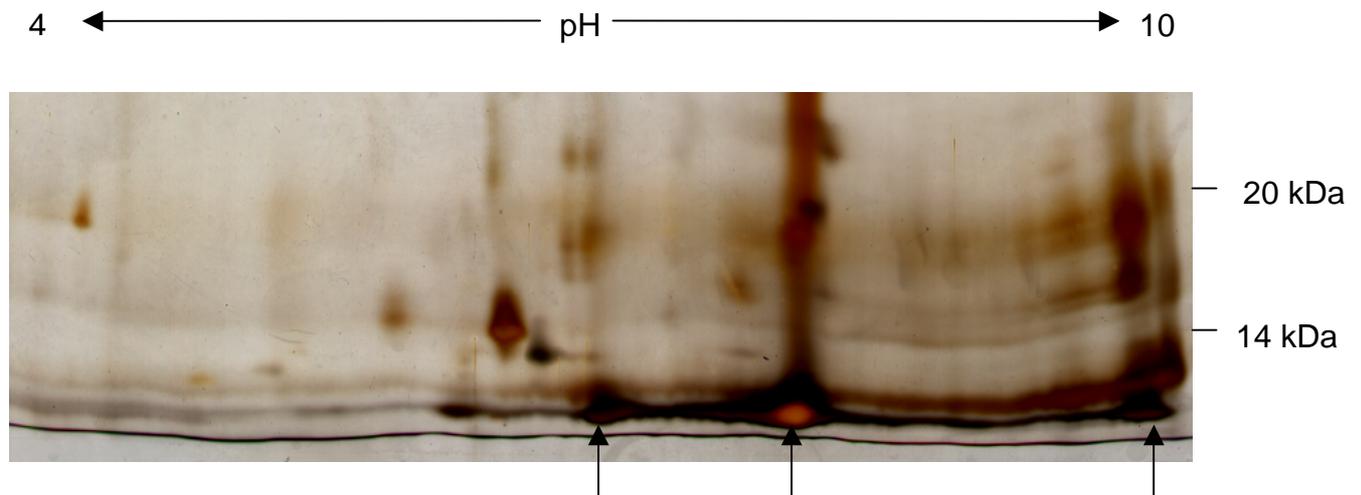


Abb. 21: Ausschnitt aus einem 2D-Gel von deglycosyliertem Seminalplasma (100 μ g aufgetragen)

Nach Auftrag von deglycosyliertem Seminalplasma auf ein 2D-Gel und anschließende Silber-Färbung zeigten sich im Trennbereich von pH 7 bis 9 und MW 11 kDa drei Spots.

4.2.1.3 Verwendung des pH-Bereiches 4 bis 7

Bei der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese in einem pH-Bereich von 3 bis 10 wurde 100 μ g porcines Seminalplasma aufgetragen. Das 2D-Gel zeigte im Trennbereich von pl 7 bis 9 und MW 14 bis 16 drei niedermolekulare Spots von großer Intensität. Die Spots waren des weiteren von beträchtlichem Umfang und ihre vertikale Streifung erstreckte sich fast über den gesamten Molekulargewichtsbereich des Geles. Im pH-Bereich von 3,8 bis 6,9 zeigten sich im höheren Molekulargewichtsbereich eine Vielzahl von Spots niedrigerer Intensität. Für eine Verbesserung des Trennvermögens fand der pH-Bereich 4 bis 7 mit 300 μ g porcinem Seminalplasma Anwendung. Der pH-Bereich, in dem die PSP-I Isoformen weitgehend nicht erfasst wurden, zeigte eine besseren Trennleistung, d.h. mehr sichtbare Spots.

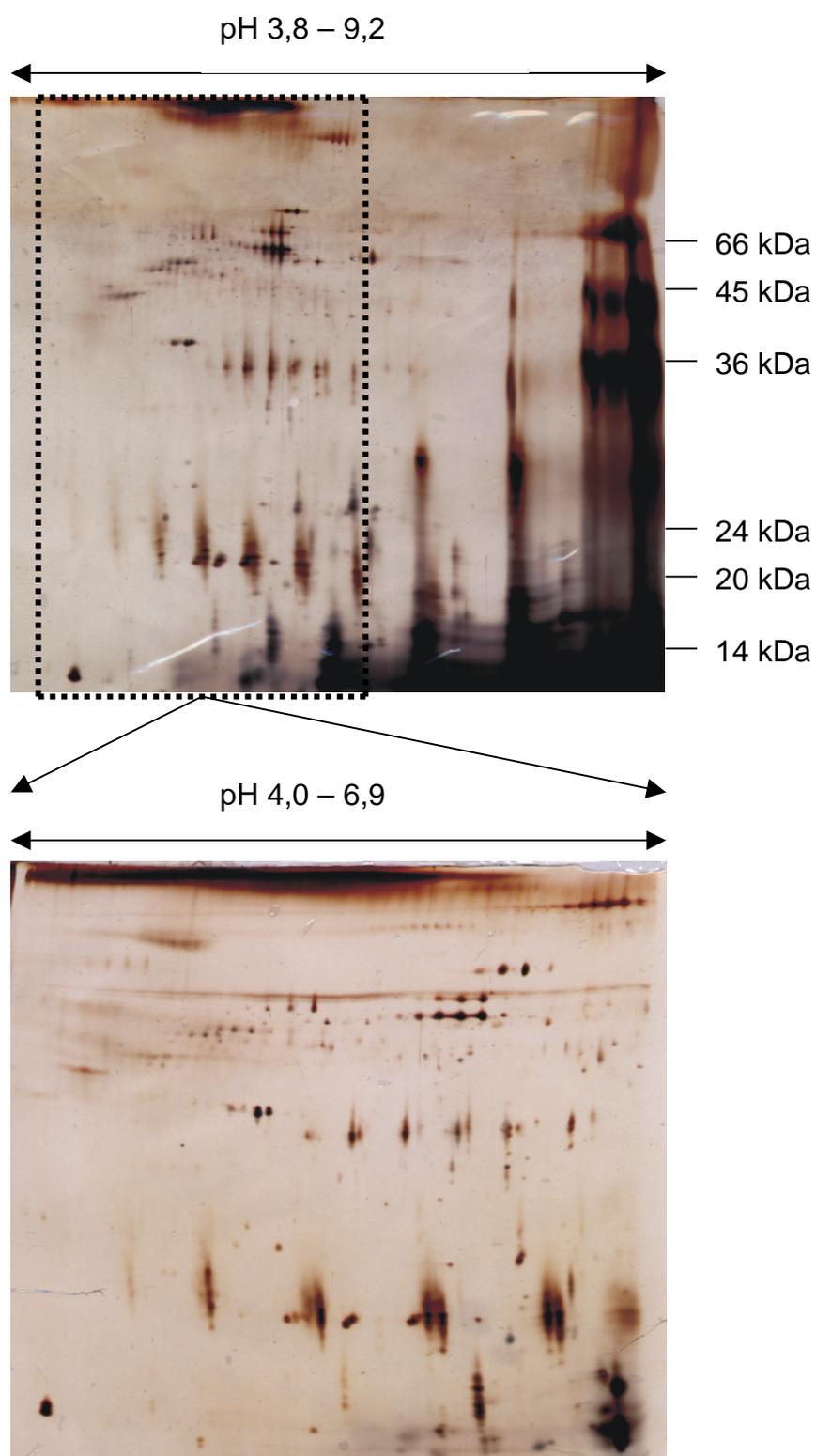


Abb. 22: Vergleich des 2D-Gelmusters von porcinem Seminalplasma unter Einbeziehung (pH 3,8-9,2) und Ausschluss (pH 4,0-6,9) der majoren PSP-I-Isoformen

4.2.2 Ergebnisse der Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurden die mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Spots mit einer MS-kompatiblen Coomassie-Färbung visualisiert, um die Spots zu identifizieren.

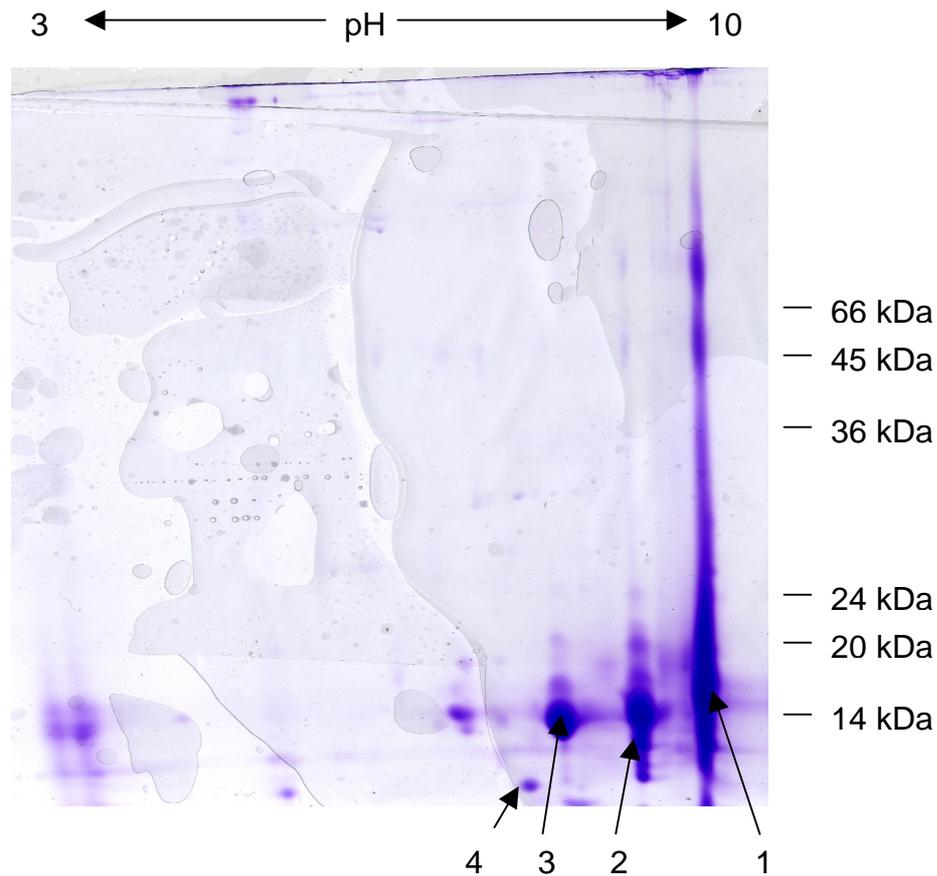


Abb. 23 :Präparatives Coomassie-Gel (1 mg aufgetragen)

Es wurden im niedermolekularen Molmassenbereich tiefblaue Proteinspots dargestellt. Die exzidierten und enzymatisch gespaltenen Proteinspots wurden am Max-Planck-Institut, Arbeitsgruppe Lottspeich untersucht. Die Identifizierung erfolgte mittels der Datenbank Mascot (www.matrixscience.com).

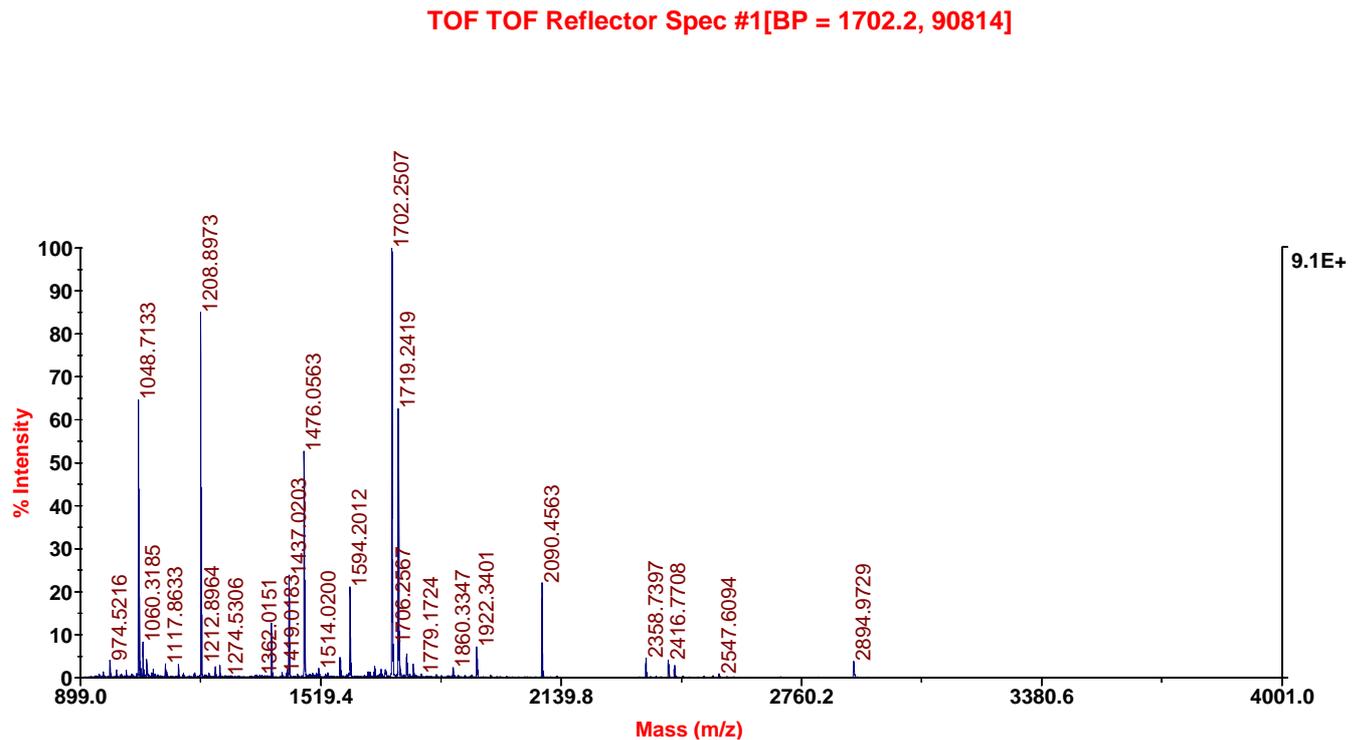


Abb. 24: MALDI-MS Spektrum von Spot 1

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 543110	12217	75	spermadhesin PSP-I - pig
2.	gi 1346879	14719	57	MAJOR SEMINAL PLASMA GLYCOPROTEIN PSP-I PRECURSOR
3.	gi 108346	12203	54	spermadhesin PSP-I - pig
4.	gi 3986746	44544	54	(AF105228) tuftelin [Bos taurus]
5.	gi 13654235	27612	48	(NM_003702) regulator of G-protein signalling 20;
6.	gi 18027402	26790	47	(AF289599) unknown [Homo sapiens]
7.	gi 9910292	187873	44	(NM_019962) kinesin family member 21B [Mus muscul
8.	gi 16151353	54412	43	(Z84572) 49J10.1.2 (androgen-induced prostate pro
9.	gi 7305413	57969	42	(NM_013639) peripherin [Mus musculus]
10.	gi 18576047	10467	42	(XM_089701) hypothetical protein XP_089701 [Homo
11.	gi 6754558	67103	41	(NM_010722) lamin B2 [Mus musculus]
12.	gi 4885583	159102	40	(NM_005406) Rho-associated, coiled-coil containin
13.	gi 1438506	64921	40	(X97053) plectin [Homo sapiens]
14.	gi 17433628	28252	40	(XM_067092) similar to Testis-specific chromodoma
15.	gi 8102033	44404	40	(AF262988) TRF2-interacting telomeric RAP1 protei
16.	gi 3334475	54349	40	Peripherin

Abb. 25: Datenbanksuche für Spot 1

TOF TOF Reflector Spec #1[BP = 2366.2, 67796]

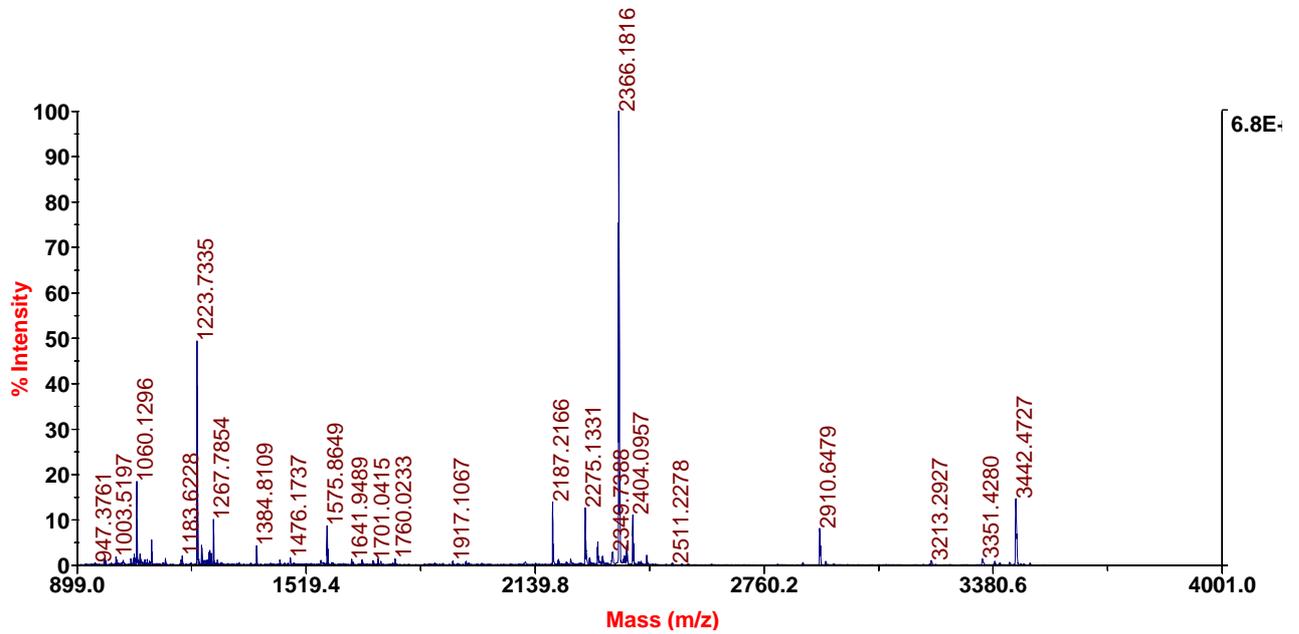


Abb. 26: MALDI-MS Spektrum für Spot 4

TOF TOF MS/MS Precursor 1223.73 Spec #1 MC[BP = 843.5, 23002]

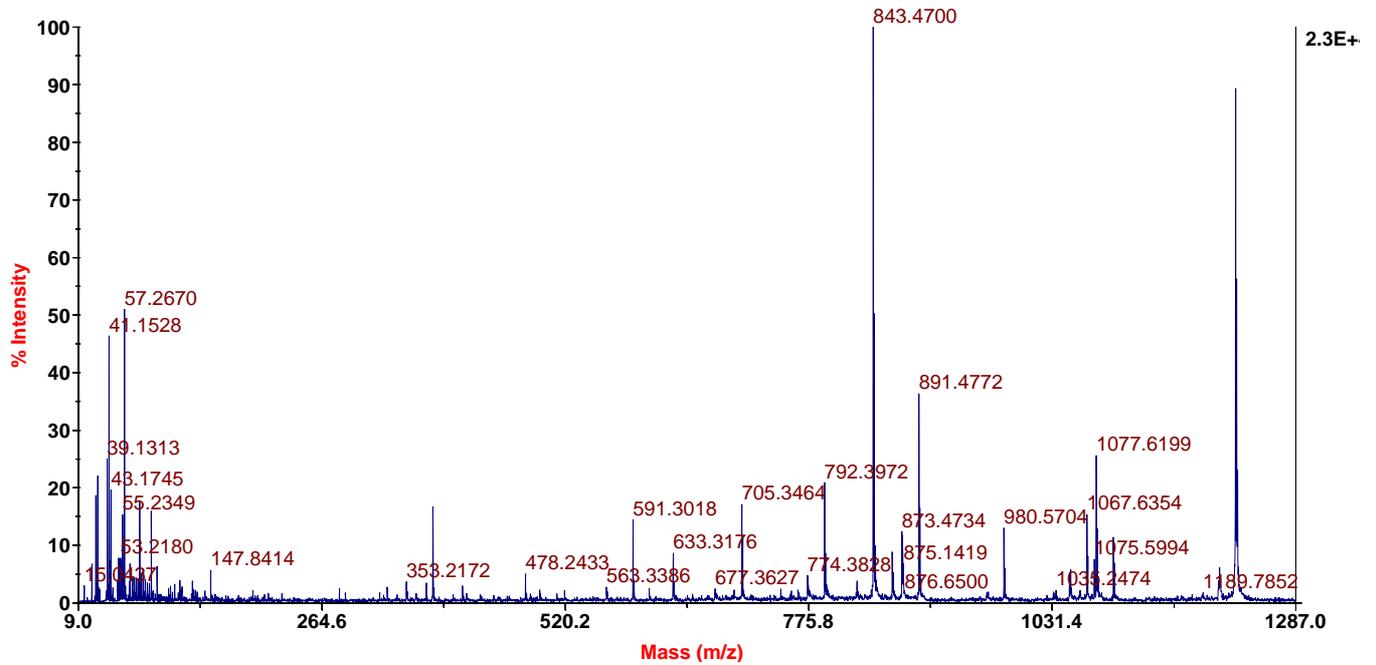


Abb. 27: MS/MS-Spektrum für Peak 1223,73

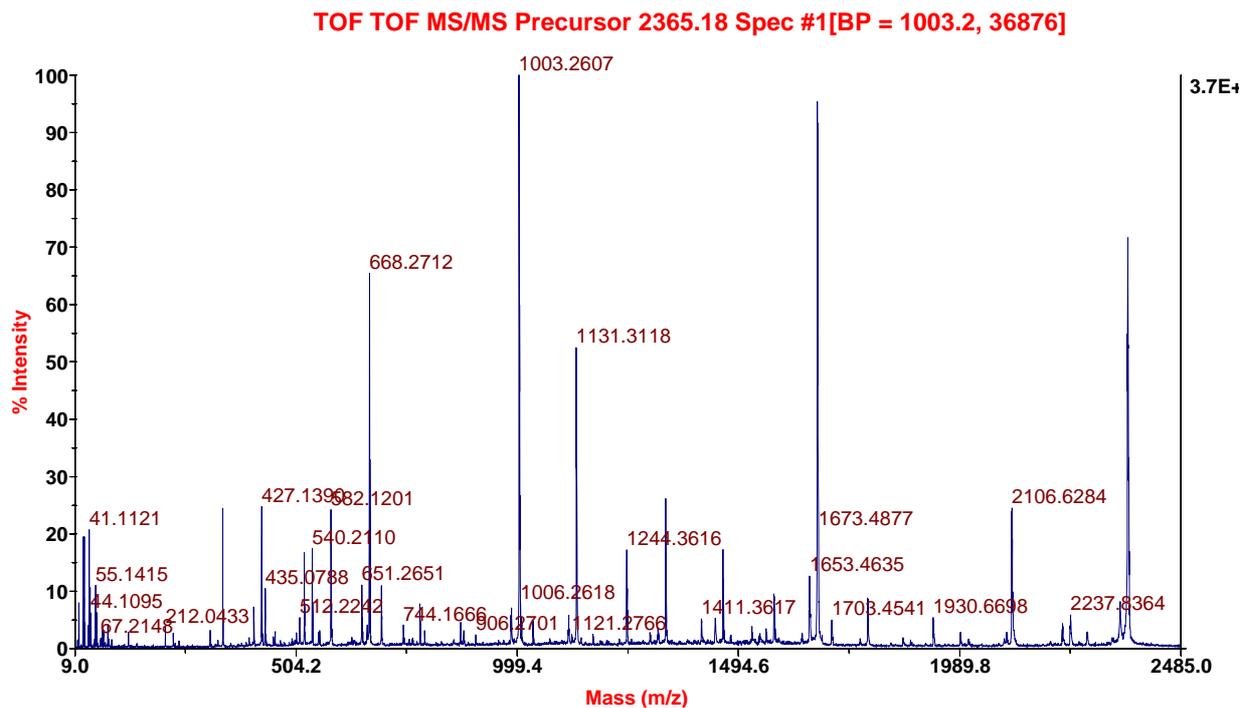


Abb. 28: MS/MS-Spektrum für Peak 2365,18

Protein View

Match to: **gi|1085429**; Score: **45**; **beta-microseminoprotein - pig**; Nominal mass (Mr): **10658**;

Calculated pI value: **7.00**; NCBI BLAST search of [gi|1085429](#) against nr;

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Sus scrofa domestica](#); Fixed modifications: Carbamidomethyl (C);

Variable modifications: Oxidation (M), Pyro-glu (N-term Q); Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P; Sequence Coverage: **12%**; Matched peptides shown in **Bold Red**

1 ZCYFIPNQSL KPNECQDLKG VSHPLNSVWK** TKDCEECTCG QDAISCCNTA**

51 AIPTGYDTNK CQKILNKKTC TYTVVEKKDP GKTCDVTGWV L

Abb. 29: Identifizierung von Spot 4

Der Proteinspot 1 wurde als PSP-I identifiziert. Die Proteinspots 2 und 3 stellten Isoformen des PSP-I dar und wiesen ein äquivalentes MALDI-Spektrum auf. Der Proteinspot 4 wurde als β -Microseminoprotein identifiziert. Für die weiteren Coomassie gefärbten Proteinspots wurden keine auswertbaren MS-Spektren erstellt. Durch Anwendung einer MS-kompatiblen Silber-Färbung ohne Formaldehyd im Versilberungsschritt wurden auch Proteine geringerer Konzentration in einem präparativen 2D-Gel dargestellt:

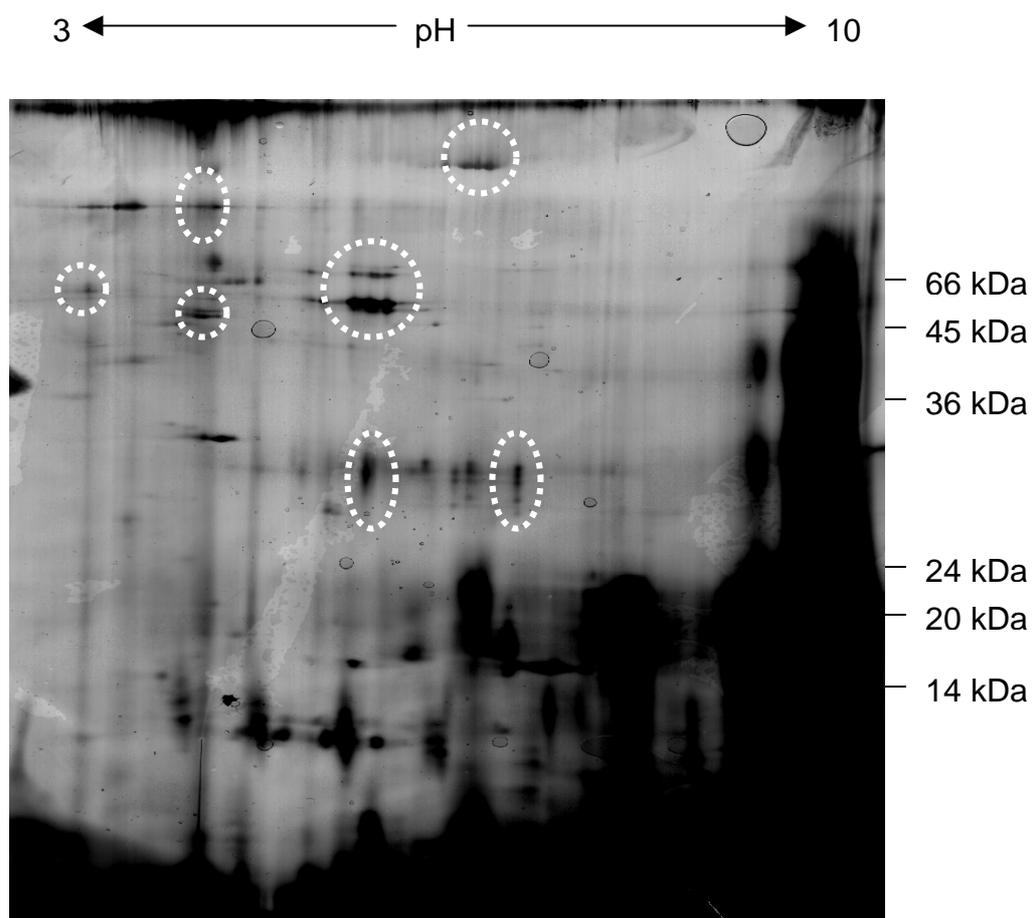


Abb. 30: Präparatives 2D-Silbergel (1 mg aufgetragen)

Für die MALDI-TOF-TOF Massenspektrometrie wurden diesmal Spots im höheren Molekulargewichtsbereich ausgeschnitten, die eine geringe bis mittlere Intensität aufwiesen. Diese Proteinspots ergaben im MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer keine auswertbaren MALDI-Spektren.

4.2.3 Spezifität der anti-PSP-I Antikörper

4.2.3.1 Etablierung eines ELISAs für die anti-PSP-I Antikörper Bestimmung

Für eine Reduzierung des PSP-I Gehaltes vor der 2D-Gelelektrophorese wurden Antikörper gegen zwei PSP-I Isoformen generiert. Die Sensitivität der Antiseren der immunisierten Kaninchen wurde mittels eines ELISAs ermittelt. Es wurde 50 µg/ml Seminalplasma in Beschichtungspuffer benutzt (siehe Abschnitt 3.9.). Damit wurde ein für die Sensitivitätstestung ausreichende Bindung des Antigens an die Oberfläche der Mikrotiterplatten erreicht. Es wurden jeweils die Präimmunseren als Kontrolle und die Immunseren der zwei immunisierten Kaninchen getestet. Die Extinktion der Farblösung ist dabei proportional zur Antikörper-Konzentration im Serum.

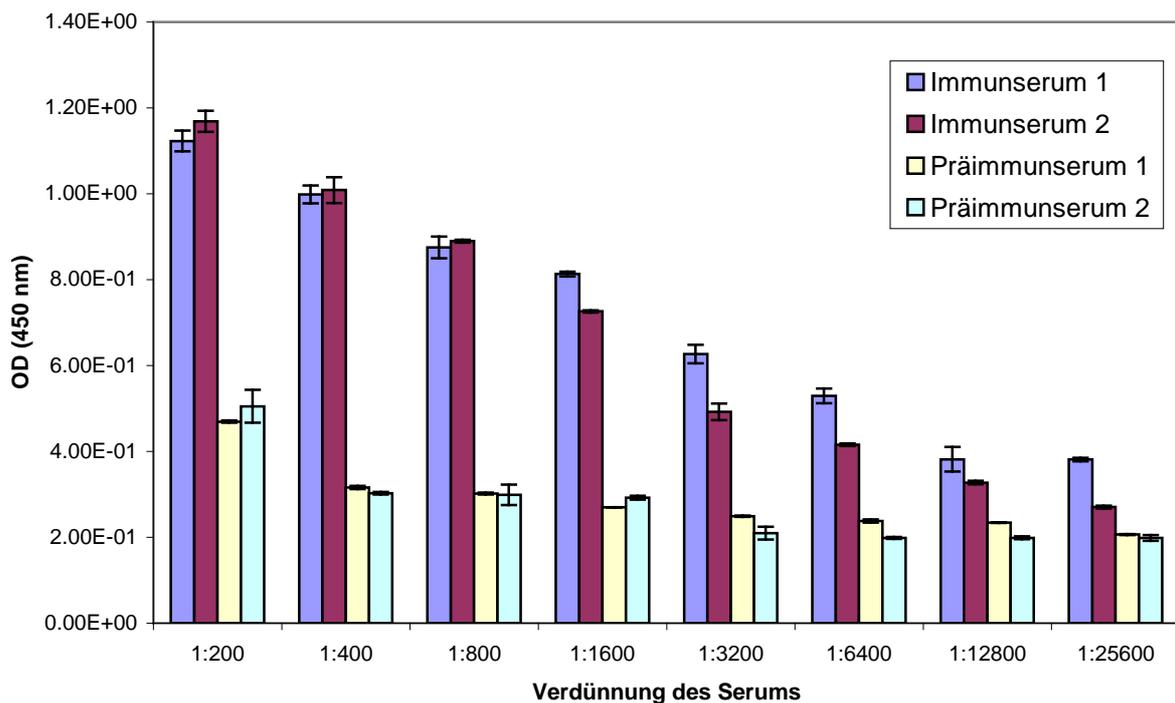


Abb. 31: Titration der anti-PSP-I Seren gegen natives Gesamt PSP-I im Seminalplasma

Die Titer aller Seren fielen in einer exponentiellen Kurve ab. Im Verhältnis wiesen die Präimmunseren einen niedrigeren Antikörper-Titer auf als die beiden Immunseren (siehe Abb. 31), so dass die Sensitivität der Seren für natives PSP-I im Seminalplasma bestätigt wurde.

4.2.3.2 1D-Westernblot

Der 1D-Westernblot wurde durchgeführt, um die Detektionsgrenze der gegen PSP-I generierten Antikörper festzustellen. Es wurde porcines Seminalplasma in einer Verdünnungsreihe von 1 µg bis 32 ng auf ein Minigel aufgetragen und mittels Semidry-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Für die Immundetektion wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T verwendet, der sekundäre Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung in PBS-T. Die Präimmunsereen wurden als Kontrolle aufgetragen.

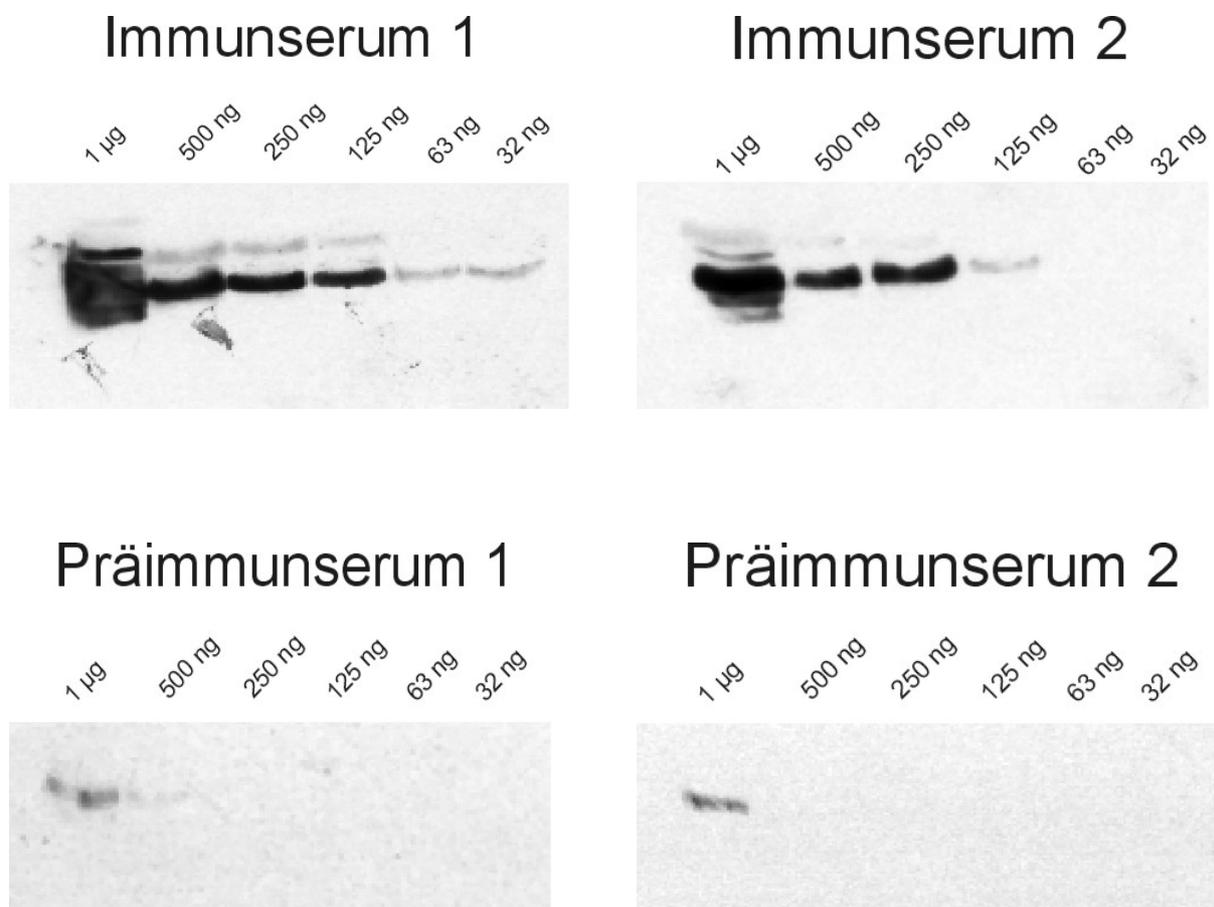


Abb. 32: Sensitivitätstest der anti-PSP-I Antiseren

Immunsereum 1 detektierte PSP-I hintergrundfrei bis zu einer Proteinkonzentration von 32 ng, während Immunsereum 2 PSP-I bis 125 ng detektierte. Daraus ergab sich, dass Immunsereum 1 in der Detektion von PSP-I sensitiver war. Beide Immunsereen wiesen einen hohen Titer an spezifischen Antikörpern auf.

4.2.3.3 2D-Westernblot

Die Durchführung des 2D-Westernblots erfolgte, um die Isoform-Spezifität der gegen die PSP-I Isoformen generierten Antikörper zu überprüfen.

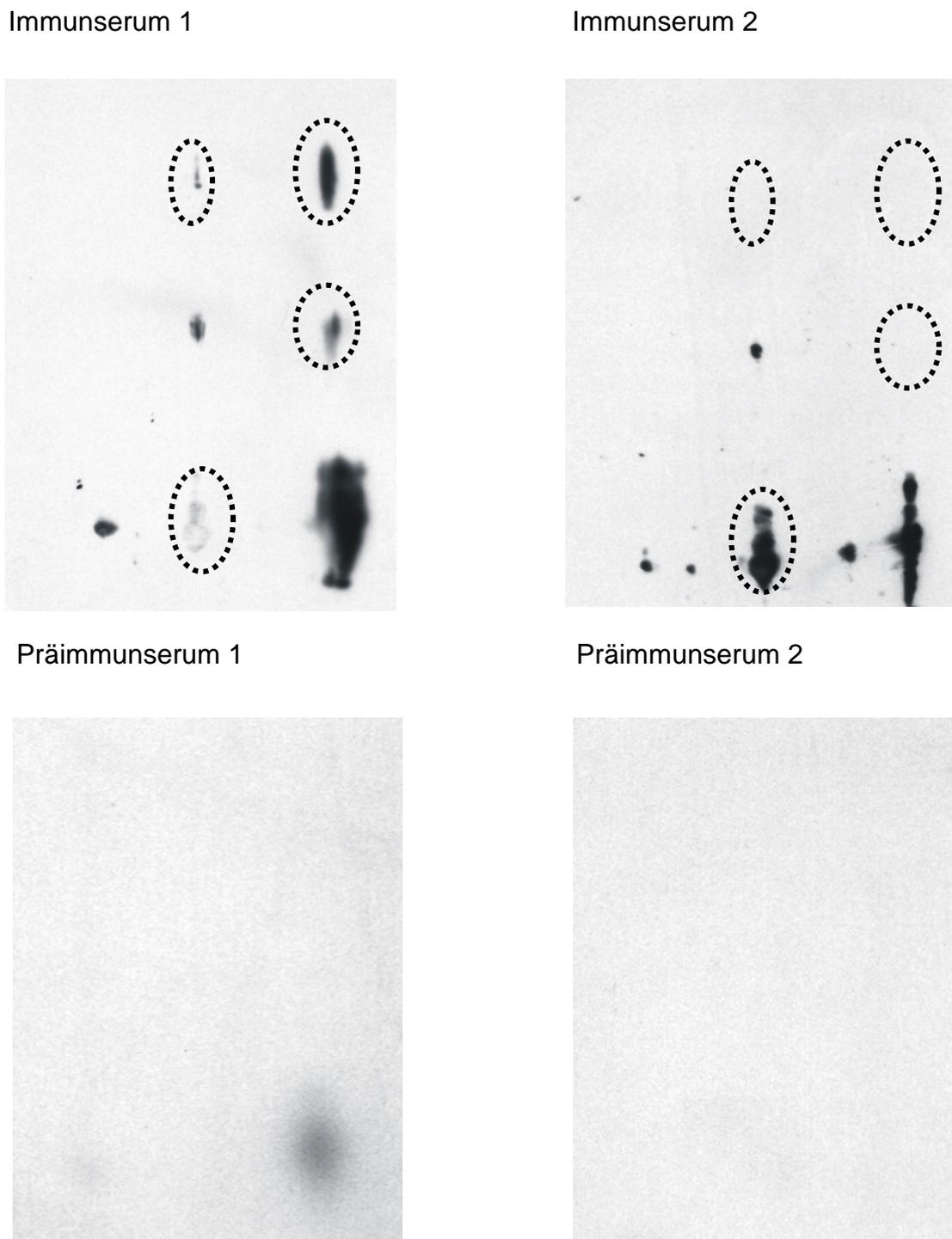


Abb. 33: Erkennungsmuster der anti-PSP Seren im 2D-Western-Immunsblot von porcinem Seminalplasma

Mittels 2D-Gelelektrophorese wurde porcines Seminalplasma aufgetrennt und durch Semidry-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Für den 2D-Westernblot wurden der primäre und sekundäre Antikörper wie in Abschnitt 4.2.3.2 angewendet. Zur Kontrolle wurden die Präimmunseren der beiden Kaninchen aufgetragen. Der 2D-Westernblot des Immunserums 1 zeigte, dass dieses Immunserum die Isoform von PSP-I, gegen die der Antikörper generiert worden war, hintergrundfrei detektierte. Andere Isoformen von PSP-I erkannte der Antikörper nicht. Der 2D-Westernblot des Immunserums 2 ergab, dass dieser Antikörper beide Hauptisoformen von PSP-I, die als Antigene zur Immunisierung verwendet wurden, hintergrundfrei detektierte.

5. Diskussion

5.1 Diskussion des IGF-Systems im Eberseminalplasma

5.1.1 Gesamtprotein- und PSP-I Konzentration im Eberseminalplasma

Für eine reproduzierbare Beladung der 2D-Gele mit porcinem Seminalplasma ist die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen unerlässlich. Die in dieser Arbeit festgestellten Gesamtproteinkonzentrationen im Eberseminalplasma waren mit 19,9 bis 35,3 mg/ml für die Pietrain-Eber 13 bis 22 und 28,0 bis 33,8 mg/ml für die Hybrid-Eber a bis k höher als in einer früheren Studie (Dostalova et al. 1994). Dieser Unterschied kann auf die Behandlung des Seminalplasmas mit Proteaseinhibitor sofort nach der Gewinnung des Ejakulates und die Lagerung der Proben bei -80°C zurückgeführt werden, da die Proteine im Seminalplasma während der Verflüssigung des Spermas nach der Ejakulatgewinnung durch Proteasen gespalten werden (Edwards et al. 1981). Dies kann die Proteinkonzentration beeinflussen, so dass die Anwendung eines Proteaseinhibitors nötig ist. Es wurde überprüft, ob die Gesamtproteinkonzentration im Eberseminalplasma Unterschiede zwischen den einzelnen Ebergruppen (gute bzw. schlechte Befruchter) aufwies. Unterschiede in den Proteinkonzentrationen der Pietrain-Ebergruppen waren grenzwertig signifikant ($p=0,05$). Eine Durchführung des Versuchs mit mehr Probetieren würde eine endgültige Aussage über die Signifikanz ermöglichen. Bei den Hybrid-Ebergruppen unterschieden sich die Proteinkonzentrationen nicht ($p>0,05$). Für den Eber Nr. 14 wurde eine niedrigere Gesamtproteinkonzentration (19,9 mg/ml) als für die anderen Eber ermittelt, die mit der niedrigen Fertilität dieses Ebers (NRR < 86%, Ferkelzahl < 10) in Zusammenhang stehen könnte. Die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Eber bei den verschiedenen Probenahmen unterschieden sich. Diese Varianz wurde auch schon beim Bullen und Hengst gezeigt (Nauc et al. 2000; Amann et al. 1987). Als Ursache dieser Varianz könnten biologisch bedingte Schwankungen verantwortlich sein, denn die Komponenten des akzessorischen Sekrets werden über eine ausgelöste, aber nicht geregelte Sekretion abgegeben, die unmittelbar zur Erzeugung des Seminalplasmas führt (Busch et al. 2001).

Des Weiteren resultierte die Untersuchung des PSP-I Gehalts im Eberseminalplasma in einer unterschiedlichen Färbung der Banden auf einer Nitrozellulosemembran (siehe Abb. 3). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zum Hengstseminalplasma, wo der Vergleich der Seminalplasmen einzelner Hengste eine einheitliche Färbung der Hauptproteine ergab (Amann et al. 1987). Der Eber Nr. 14 zeigte eine Bande mit schwacher Färbung, so dass auch der PSP-I Gehalt mit der Fertilität dieses Ebers in Verbindung stehen könnte. Hier zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zwischen niedriger Gesamtproteinkonzentration und niedriger PSP-I Konzentration. Bei den anderen Ebern ist so ein Zusammenhang nicht ohne weiteres erkennbar, da die Messung der PSP-I Konzentration anhand der Intensität der Färbung für eine aussagekräftige Korrelationsanalyse mit der Fertilität nicht geeignet ist. Mit einem BSP-spezifischen RIA wurden die Konzentrationen der Hauptproteine im Bullenseminalplasma gemessen und dabei Unterschiede zwischen den einzelnen Bullen festgestellt (Nauc et al. 2000). Die unterschiedliche Färbung der Banden der Pietrain-Eber deutete darauf hin, dass auch beim Eber Unterschiede in der PSP-I Konzentration bestehen. Für die effektive Quantifizierung der PSP-I Konzentration im Eberseminalplasma wäre der Einsatz des in dieser Arbeit generierten Anti-PSP-I Serums für einen einfach nutzbaren und reproduzierbaren Assay sinnvoll. Es wäre dann auch ein Vergleich zwischen Gesamtproteinkonzentration und PSP-I Konzentration eines jeden Ebers möglich. Ein Vergleich der Gesamtproteinkonzentration und der BSP-Konzentration verschiedener Bullen ergab, dass eine hohe Gesamtproteinkonzentration nicht eine hohe BSP-Konzentration bedingte, bei einer niedrigen Gesamtproteinkonzentration war die BSP-Konzentration hoch oder niedrig (Nauc et al. 2000). Die Autoren vermuteten, dass mit mehr Probetieren ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern hergestellt werden könnte und auch eine Korrelation mit der Fertilität feststellbar wäre. So erscheint es sinnvoll, den Zusammenhang zwischen Gesamtproteinkonzentration und PSP-I Konzentration auch beim Eber zu untersuchen und eine Korrelationsanalyse dieser Parameter mit der Fertilität durchzuführen.

5.1.2 IGF-I/II-Konzentrationen im Eberseminalplasma

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob eine Korrelation zwischen IGF-I/II Konzentrationen im Eberseminalplasma und Fruchtbarkeitsparametern besteht. Die in dieser Arbeit ermittelten IGF-I/II Konzentrationen ($14,8 \pm 4,1$ ng/ml / $15,3 \pm 2,4$ ng/ml) waren niedriger als im humanen, bovinen und equinen Seminalplasma (Hoeflich et al. 1999; Lackey et al. 2002). Hier scheinen speziesspezifische Unterschiede in der Expression der IGFs im Seminalplasma vorzuliegen. Im Humanseminalplasma wurde eine Korrelation zwischen der IGF-I Konzentration und der Spermienkonzentration und -qualität festgestellt (Glander et al. 1996). Im Bullenseminalplasma wurde bisher in einem *in vitro*-System die Stimulation der Spermienmotilität und –geschwindigkeit durch IGF-I/II gezeigt (Henricks et al. 1998). Eine erhöhte IGF-I Konzentration im Hengstseminalplasma korrelierte signifikant mit erhöhten Trächtigkeitsraten pro Saison (Macpherson et al. 2002). Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Zusammenhang zwischen IGF-I/II Konzentrationen und der Fertilität (siehe Abb. 4). Dieses Resultat wurde auch bei einer anderen Studie des Bullenseminalplasmas, die keine Verbindung zwischen IGF-I Konzentration im Seminalplasma und verminderter Fertilität feststellte (Hoeflich et al. 1999) und einer Studie des Hengstseminalplasmas, die keine Zusammenhänge zwischen IGF-I Konzentration und sinkender Fertilität ermittelte (Hess et al. 2001), erzielt.

Da GH die IGF-I Konzentration in auf IGF-I ansprechenden Geweben steuert (Jones et al. 1995), wurden Untersuchungen der GH-Behandlung von männlichen Patienten mit Astheno- oder Oligozoospermie durchgeführt, bei denen eine Verbesserung der Spermienmotilität erzielt wurde (Ovesen et al. 1996). Dieser Effekt der GH-Behandlung könnte durch IGF-I vermittelt worden sein, da die IGF-I Konzentration im Seminalplasma und Serum der subfertilen Patienten stieg (Ovesen et al. 1996). Obwohl es also Hinweise auf eine Korrelation zwischen den IGF-I/II Konzentrationen im Seminalplasma und der Fertilität gab, wurde in dieser Arbeit für das porcine Seminalplasma kein Zusammenhang gefunden, so dass die Untersuchung anderer Komponenten (z.B. IGFBPs) des IGF-Systems sinnvoll erschien.

5.1.3 IGFBP-Aktivität im Eberseminalplasma

Da IGFBPs die Bioverfügbarkeit von IGF beeinflussen, war die Identifizierung von IGFBPs im Eberseminalplasma und die Überprüfung möglicher Zusammenhänge mit der Fertilität ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Im Humanseminalplasma wurde bei der Untersuchung von IGFBP-3-Fragmenten und IGFBP-5 keine Korrelation mit der Fertilität festgestellt (Lee et al. 1994). Im Bullenseminalplasma wurde dieses Ergebnis einerseits bestätigt (Hoefflich et al. 1999), andererseits wurde eine erhöhte IGFBP-3-Konzentration im Seminalplasma nach rbGH-Behandlung mit einer erhöhten NRR in Verbindung gebracht (Sauerwein et al. 2000). Beim Hengst korrelierten hohe IGFBP-2 Konzentrationen sexuell nicht aktiver Tiere mit einer erhöhten Anzahl an morphologisch normalen Spermien (Macpherson et al. 2002). Im porcinen Seminalplasma wurden in dieser Arbeit Eber zweier verschiedener Rassen mit unterschiedlichen Auswahlkriterien untersucht. Die IGFBP-Aktivitäten der holländischen Hybrideber zeigten keinen Zusammenhang mit der DIS ($p > 0,05$). Beim Vergleich der Ebergruppen aus dem Gut Berndorf ergaben sich Unterschiede zwischen den IGFBP-Aktivitäten der einzelnen Gruppen (siehe Abb. 11). Dabei hatten Eber mit einem hohem IGFBP-Gehalt eine hohe Ferkelzahl, Eber mit einem niedrigem IGFBP-Gehalt eine niedrige Ferkelzahl. Dieser Zusammenhang war auch signifikant ($p < 0,05$), außer für den Vergleich der Gruppe 2 (Ferkelzahl < 10 , NRR $> 86\%$) mit der Gruppe 3 (Ferkelzahl > 10 , NRR $< 86\%$). Die statistische Auswertung ergab aufgrund der hohen Standardabweichung der Einzelwerte der Gruppe 3 keine Unterschiede. Ein Zusammenhang mit der NRR bestand nicht. Beim Eber wurde in einer früheren Arbeit, die die Korrelation zwischen Spermienmotilität bzw. -kopfgröße und Fertilität untersuchte, ähnliche Ergebnisse erzielt (Hirai et al. 2001). Die Ferkelzahl korrelierte mit der Spermienmotilität, hingegen wurde bei der Verwendung der NRR als Auswahlkriterium keine Korrelation mit den Spermienparametern festgestellt. So war die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Ferkelzahl und IGFBP-Aktivität von besonderem Interesse. Eine Verwendung der Spermienmotilität als Vergleichsparameter für die IGFBP-Aktivität wurde nicht realisiert, da dieser Parameter und sein Zusammenhang mit der Fertilität in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Hirai et al. 2001; Aumueller et al. 1988; Holt et al. 1997). Der Auswahl der Kriterien für die Einteilung der Eber in Fertilitätsgruppen ist besondere Bedeutung beizumessen, da sich bei den holländischen Ebern ein

Zusammenhang zwischen IGFBP-Aktivität und den hier ausgewählten Fertilitätsparametern nicht bestätigte. Für eine endgültige Aussage muss aber abgewartet werden, wie die Bestimmung der IGFBP-Aktivitäten der Eber, die zur Zeit noch in gute und schlechte Befruchter eingeteilt werden, ausfällt, da momentan nur eine geringe Anzahl an charakterisierten Ebern zur Verfügung steht. Es wird sich dann auch zeigen, ob bei unterschiedlichen Rassen die IGFBP-Aktivität als Fertilitätsparameter genutzt werden kann.

Die Nutzung der Korrelation zwischen Ferkelzahl und IGFBP-Aktivität wäre für die Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit von Ejakulaten ein neues und aussagekräftiges Verfahren. Dazu müsste ein Test entwickelt werden, der sich durch kurze Testzeiten und hohen Probendurchsatz auszeichnet. Eine einfache Handhabung bedingt eine hohe Spezifität, Sensivität und das Vorhandensein nicht-radioaktiver Reagenzien. Hierfür war zunächst die Identifizierung der detektierten IGFBP-Banden notwendig. Bei der MALDI-PMF-Identifizierung mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennter Spots wurde nachgewiesen, dass es sich bei allen Spots um IGFBP-5 handelte, wobei sich eine Hauptkomponente mit einigen Subspezies auf dem Gel zeigte. Es handelt sich hierbei um ein sehr aufwendiges Identifizierungsverfahren, so dass aus diesem Grund nur das Seminalplasma eines Ebers untersucht wurde. Trotzdem ist es höchst unwahrscheinlich, dass es sich bei den Banden der anderen Eber nicht um IGFBP-5 handelte, da im 1D-Western-Ligandenblot diese Doppelbande immer bei 29 und 31 kDa sichtbar war (siehe Abb. 9 und 10). Im 2D-Western-Ligandenblot zeigten sich Spots der porcinen IGFBP-5 Isoformen im Trennbereich von MW 27 bis 31 kDa und pH 7-10 (siehe Abb. 13). Humanes IGFBP-5 zeigte Signale im Trennbereich Mw 30/31, pH 6,4-8. Alle anderen humanen IGFBPs liefen im 2D-Western-Ligandenblott in einem anderen Trennbereich (IGFBP-1: 30 kDa, pl 4,0-4,8; IGFBP-2: 33 kDa, pl 6,6-7,1; IGFBP-3: 41/45 kDa, pl 4,8-8,2; IGFBP-4: 29 kDa, pl 6,1/6,3; IGFBP-6: 30 kDa, pl 4,8-5,8) (Weber et al.). So sprachen auch der pl und das MW dafür, dass es sich um IGFBP-5 handelte.

Für eine einfache Handhabung eines IGFBP-5-Testes ist eine hohe Spezifität, Sensivität und das Vorhandensein nicht-radioaktiver Reagenzien nötig. Geeignet wäre ein Western-Immunoblot mit spezifischen anti-IGFBP-5 Antikörpern, da dieses Verfahren alle Anforderungen an einen reproduzierbaren IGFBP-5-Test erfüllt. Im Rahmen dieser Arbeit getestete anti-IGFBP-5 Antikörper, die kommerziell erworben

oder auf Peptidbasis selbst hergestellt wurden, waren nicht in der Lage, IGFBP-5 im Eberseminalplasma zu detektieren. Wahrscheinlich ist die IGFBP-5 Konzentration im Eberseminalplasma zu niedrig, so dass sie die Detektionsgrenze dieser Antikörper unterschreitet. Hierfür spricht auch, dass auf einem silbergefärbten 2D-Gel von Eberseminalplasma im Molmassen- und pI-Bereich des IGFBP-5 keine Spots erkennbar waren, die IGFBP-5 darstellen könnten, obwohl die Silberfärbung eine sehr sensitive Färbungsmethode ist.

5.2 Diskussion der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

5.2.1 Anwendung der 2D-Gelelektrophorese zur Charakterisierung von Proteinen im Eberseminalplasma

Mittels der 2D-Gelelektrophorese ist es möglich, die unterschiedliche Expression von Proteinen zu analysieren, da durch das hohe Auflösungsvermögen 3000 bis 10000 Proteine dargestellt werden können (Yanagida 2002; Issaq 2001). So eignet sich die 2D-Gelelektrophorese besonders zur Untersuchung komplexer Proteingemische, wie hier dem Eberseminalplasma. 2D-Gele des Eberseminalplasmas zeigten im gesamten Trennbereich eine Vielzahl von Spots. Dadurch wurde die Leistungsfähigkeit der angewandten Methode bestätigt, weil die Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten in der 1. Dimension eine entscheidende Verbesserung zu früher angewendeten Verfahren bedeutete. Bei der Auftrennung von porcinem Seminalplasma mittels Trägerampholyten in der 1. Dimension wurden Proteine mit einem pH größer als 6,6 nicht mehr aufgetrennt. Für die Darstellung der basischen Proteine musste NEPHGE verwendet werden (Russell et al. 1984). Die Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten im Gegensatz zu Trägerampholyten trägt dazu bei, dass ohne Verzerrung des pH-Gradienten eine größere Menge an Gesamtproteingemisch aufgetrennt werden kann. Dadurch ist es erst möglich, Proteine niedriger Konzentration im 2D-Gel darzustellen (Bjellqvist et al. 1993). So stellen immobilisierte pH-Gradienten durch ihre leichte Handhabung eine Zeit- und Arbeitersparnis bei verbessertem Ergebnis dar.

Die Auftrennungen von Eberseminalplasma mittels 2D-Gelelektrophorese erzielten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Normalerweise zeichnen sich 2D-Gele von guter Qualität durch scharf begrenzte Spots aus, hier war eine vertikale Streifung im gesamten Bereich des Geles sichtbar (siehe Abb. 17). In der 2. Dimension kann es durch hohe Gesamtproteinkonzentration in der Probe und Benutzung von immobilisierten pH-Streifen mit einem weiten pH-Gradienten zu vertikaler Streifung kommen (Bjellqvist 1993). Auch ein Vorhandensein von stark glycosylierten Proteinen in der Probe kann ein Verschmieren der Proteinspots in der 2. Dimension bewirken (Fryksdale, 2002). Es zeigten sich auch im pI-Bereich von 7 bis 9 verschiedene Isoformen von PSP-I, die sich als großflächige Spots darstellten und deren vertikale Streifung sich teilweise über den ganzen Molekulargewichtsbereich erstreckten (siehe Abb. 17). So war das Ziel eine Verbesserung der Gelqualität zu erreichen. Dazu wurden verschiedene Methoden zur Vorbehandlung des Seminalplasmas untersucht.

5.2.2 Verfahren zur Verbesserung der Gelqualität

Die Anwendung von Mikrokonzentratoren diente zur Reduktion der Proteinkonzentration im unteren Molmassenbereich. Hierfür erwiesen sich die Amicon- und Vivascience-Mikrokonzentratoren als ungeeignet, da durch die Impermeabilität der Membran eine effiziente Zentrifugation des Seminalplasmas nicht möglich war. Dieses Phänomen wurde wahrscheinlich durch stark gelierende Faktoren des Eberseminalplasmas (Busch et al. 2001) verursacht. Die Impermeabilität der Membran trat bei Anwendung der Millipore Konzentratoren nicht auf. Diese Mikrokonzentratoren haben eine spezielle niedrigbindende Membran, so dass das Hängenbleiben von Probenbestandteilen verringert wird. Die Auftrennung von Seminalplasma, das mit Millipore-Konzentratoren behandelt wurde, zeigte nur eine teilweise Verbesserung der Gelqualität. Spots im niederen Molekulargewichtsbereich erschienen schärfer fokussiert, während dieses nicht für den höheren Molekulargewichtsbereich zutraf. Dort zeigten Spots von sowieso schon geringer Intensität eine weitere Intensitätsverringerung (siehe Abb. 18). Dafür könnte ein teilweiser Verlust von Proteinen während der Zentrifugation verantwortlich sein. Die Zentrifugation mit Mikrokonzentratoren ist somit für die Aufbereitung des Seminalplasmas auf die 2D-Gelelektrophorese kein geeignetes Verfahren.

Da die PSP-I-Isoformen sich im Trennbereich von MW 14 bis 16 kDa und pI 7 bis 9 stark verschmiert zeigten, war das Ziel der Deglycosylierung eine scharf begrenzte Darstellung dieser Spots zu erreichen. Da PSP-I N-glycosyliert ist (Rutherford et al. 1992), war die N-Deglycosylierung erfolgreich. Dies konnte in einem 1D-Gel, das Coomassie gefärbt wurde, gezeigt werden. Der Auftrag auf ein 2D-Gel erzielte unbefriedigende Ergebnisse (siehe Abb. 19). Im Denaturierungs- und Reaktionspuffer des N-Glycosidase F Kits waren ionische bzw. nicht-ionische Detergenzien enthalten, deren vollständige Entfernung auch durch Fällung mit Aceton nicht möglich war. Ein zu salzhaltiges Probengemisch ist für die 2D-Gelelektrophorese problematisch, weil dadurch zusätzlich Ionen in das System gelangen (Lottspeich et al. 1998). Deshalb wurden zwar im Molekulargewichtsbereich von 11 kDa drei Spots von verringerter Intensität dargestellt, aber diese Spots waren weiterhin verschmiert. Die Verringerung des Molekulargewichtes der PSP-I-Isoformen ist auf einen Verlust der Zuckerketten durch die Deglycosylierung zurückzuführen (Lottspeich et al. 1998), dabei wurde auch schon früher ein Molekulargewicht von 11 kDa beobachtet (Rutherford et al. 1992). Obwohl die N-Deglycosylierung von PSP-I offensichtlich funktioniert, ist eine Verwendung dieser Methode für die Probenvorbereitung zur 2D-Gelelektrophorese erst praktikabel, wenn eine vollständige Entsalzung möglich ist.

Ein weiterer Versuch zur besseren Darstellung des Eberseminalplasmas auf einem 2D-Gel war die Verwendung von einem engen pH-Gradienten. Dadurch kann die Auflösung der 2D-Gele in dem verwendeten Bereich erhöht werden (Wildgruber et al. 2000). Hier fanden IPG-Streifen mit dem pH-Bereich von 4 bis 7 Anwendung. In diesem Trennbereich wurde der Bereich von pH 7 bis 9 nicht dargestellt, so dass auch die PSP-I-Isoformen nicht auf dem 2D-Gel erschienen. 2D-Gele dieses Trennbereiches zeigten ein wesentlich besseres Auflösungsvermögen (siehe Abb. 22), so dass die Verwendung dieser IPG-Streifen für den begrenzten Trennbereich sinnvoll ist. Für die vollständige Analyse des Proteingemisches im Eberseminalplasma ist aber ein möglichst weiter Trennbereich wünschenswert, der auch den pH-Bereich von 7 bis 9 mit einschließt.

5.2.3 Anwendung der Massenspektrometrie zur Identifizierung der Proteine im Eberseminalplasma

Durch das hohe Auflösungsvermögen und die Präzision der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist eine exakte Messung der Molmassen von Biomolekülen möglich (Yanagida et al. 2002). In Bezug auf die Sensitivität und Präzision stand mit dem hier verwendeten MALDI-TOF-TOF-Gerät ein noch leistungsfähigeres Gerät zur Verfügung (Medzihradzky et al. 2000). Für die MALDI-TOF-TOF-MS wurden Gele verwendet, die mit einer MS-kompatiblen Coomassie-Färbung gefärbt wurden. Die Herstellung von Coomassie-Gelen, auf die 1 mg Seminalplasma aufgetragen wurde, ergab die Darstellung von nur vier Spots, die für die Analyse enzymatisch gespalten wurden (siehe Abb. 23). Diese vier Spots hatten problemlos zu identifizierende Spektren, so dass die Probenvorbereitung für diese Spots einwandfrei war. Drei der Spots wurden als PSP-I-Isoformen identifiziert (siehe Abb. 25), die auch hier wieder die größte Intensität von den Proteinen im Eberseminalplasma aufwiesen. Die Identifizierung des Spots vier als β -Microseminoprotein zeigte (siehe Abb. 29), dass auch Proteine mit geringerer Konzentration identifiziert werden können. Es ist bekannt, dass PSP-I und β -Microseminoprotein im Eberseminalplasma vorkommen (Rutherford et al. 1992; Chao et al. 1996; Manaskova et al. 2002), aber in dieser Arbeit wurden die beiden Proteine erstmals mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-TOF-MS identifiziert. Dies zeigte die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens, aber die Identifizierung einer größeren Anzahl von Proteinen im Eberseminalplasma war wünschenswert. Deshalb wurde die sensitivere Silber-Färbung angewendet, um auch Proteine mit einer geringeren Konzentration exzidieren zu können. Für diese Spots wurden keine auswertbaren Spektren erzielt, so dass eine Identifizierung nicht möglich war. Dies kann einerseits daran liegen, dass die Sensitivität der Silber-Färbung zu einer Darstellung von Proteinen mit einer zu geringen Konzentration für die MALDI-TOF-TOF-Analyse führte. Bei Unterschreiten der angestrebten Proteinkonzentration von 1-10 μ M können Ionenströme die Nachweisgrenze der Detektoren erreichen (Lottspeich et al. 1998). Andererseits ist bei Proteinen geringer Konzentration meist nicht die Basisempfindlichkeit der MALDI-Massenspektrometrie, sondern die Probenvorbereitung der entscheidende, empfindlichkeitsbegrenzende Faktor (Lottspeich et al. 1998). So könnte eine ungenügende Entsalzung, irreversible Adsorptionseffekte oder mangelnde Löslichkeit

der Probe dazu geführt haben, dass keine auswertbaren Spektren zur Analyse erhalten wurden.

5.2.4 Beeinflussung der 2D-Gelelektrophorese durch PSP-I

Da PSP-I das Hauptprotein des Eberseminalplasmas mit dem größten Anteil an der Gesamtproteinkonzentration ist (Dostalova et al. 1994), wurde mit der 2D-Gelelektrophorese ein komplexes Muster der unterschiedliche Isoformen von PSP-I dargestellt (siehe Abb. 33). Durch das Vorhandensein von PSP-I im Eberseminalplasma ergaben sich verschiedene Probleme bei der 2D-Gelelektrophorese. Zum ersten hatte der hohe Anteil des PSP-I an der Gesamtproteinkonzentration des Seminalplasmas die Wirkung, dass die Isoformen des PSP-I im pI-Bereich von 7 bis 9 das 2D-Gel im unteren Molmassenbereich fast ganz ausfüllten. So konnten weniger intensiv gefärbte Proteine in diesem Bereich erst gar nicht dargestellt werden. Zum zweiten wurde gezeigt, dass PSP-I eine Reihe von Proteinen spezifisch binden kann. Darunter waren Endo- β -Galactosidase, Trypsin-Inhibitor, IgA, IgG und α -Kasein (Kwok et al. 1993a). Da die 2D-Gelelektrophoresen in dieser Arbeit zeigten, dass ein Großteil des Gesamtproteingehaltes im Seminalplasma auf PSP-I entfiel, kann davon ausgegangen werden, dass diese beträchtliche Menge an PSP-I Proteine des Seminalplasmas bindet. Dies hatte zur Folge, dass diese Proteine im 2D-Gel erst gar nicht dargestellt und auch nicht identifiziert wurden. Dieser Effekt wie auch der hohe Anteil des PSP-I an der Gesamtproteinkonzentration wirkten sich negativ auf die 2D-Gelelektrophorese aus. Diese Problematik zeigte sich auch bei der Massenspektrometrie, da dort MS-kompatible Coomassie-gefärbte Gele nur wenige Spots zeigten, die dann auch als PSP-I identifiziert wurden.

Um reproduzierbare Gele herstellen zu können, ist die Reduzierung der Konzentration von PSP-I im Eberseminalplasma notwendig. Dafür wurden Antikörper gegen zwei PSP-I Isoformen generiert, indem die entsprechenden Spots aus einem Gel ausgeschnitten und nach sorgfältiger Reinigung zwei Kaninchen getrennt injiziert wurden. Zur Immunisierung wurden Kaninchen verwendet, damit eine möglichst große Menge an Antiserum zur Verfügung stand. Beide Seren zeigten einen hohen Titer an spezifischen Antikörpern gegen PSP-I (siehe Abb. 30). Das erste Serum

erkannte nur die Isoform gegen die es generiert wurde, das zweite Serum detektierte hingegen beide Isoformen. So ist das zweite Serum für eine effektive Reduzierung des PSP-I Gehalts im Seminalplasma geeignet. Sinnvoll wäre es in diesem Zusammenhang eine Abreicherung des PSP-I mit der Affinitätschromatographie durchzuführen. Damit stände Eberseminalplasma mit einer verringerten PSP-I Konzentration zur Verfügung und es könnte mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese reproduzierbare 2D-Gele hergestellt werden. Dies würde auch die Identifizierung der Proteine des Eberseminalplasmas ermöglichen. Da in der Reproduktionsmedizin immer nach neuen Verfahren gesucht wird, um die Fertilität zu bestimmen, bietet die Untersuchung des Einflusses von Proteinen im Eberseminalplasma auf die Fertilität eine interessante Ergänzung zu spermatologischen Routineuntersuchungsmethoden. In dieser Arbeit wurde anhand der Untersuchung von IGFBP aufgezeigt, wie ein spezifischer Test für ein fertilitätsbeeinflussendes Protein aussehen könnte. Durch die Leistungsfähigkeit der *Proteomics*-Technik wäre aber ein holistischer Proteomansatz möglich und die Untersuchung aller Proteine im Eberseminalplasma und ihr Einfluss auf die Fertilität.

6. Zusammenfassung

Die Vorhersage der Fertilität und die Aufklärung von Zusammenhängen zwischen der Befruchtungsfähigkeit und Parametern im Organismus ist in der Reproduktionsmedizin ein zentrales Anliegen, um eine effizientere Selektion hochfertiler Tiere zu erreichen. Das Seminalplasma wurde als geeigneter Parameter zur Beurteilung der Fertilität identifiziert, da die positive Beeinflussung der Spermienmotilität und die Vorverlegung der Ovulation durch Seminalplasma nachgewiesen wurde. Jedoch sind bis dato die für diese positiven Effekte verantwortlichen Komponenten im Seminalplasma auf molekularer Ebene noch nicht identifiziert worden. Untersuchungen bei Mensch, Bulle und Hengst, die sich mit dem IGF-System als einer proteinischen Komponente des Seminalplasmas beschäftigten, ergaben eine Korrelation zwischen IGF-I und IGFBP-Konzentrationen und der Fertilität.

Ziel dieser Arbeit war es, Komponenten des IGF-Systems im Eberseminalplasma zu identifizieren und ihren Einfluss auf die Fertilität zu überprüfen. Des Weiteren war die Darstellung des komplexen Proteinmusters des Eberseminalplasmas mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese und Identifizierung aufgetrennter Spots durch MALDI-TOF-TOF das Ziel dieser Arbeit.

Durch die vorliegende Arbeit wurden die IGF-I/II-Konzentrationen im Eberseminalplasma bestimmt. Es wurde kein Zusammenhang mit der Fertilität festgestellt. Die Darstellung der IGFBP-Aktivität mittels Western-Ligandenblot zeigte beim Vergleich der verschiedenen Pietrain-Ebergruppen signifikante Unterschiede in der relativen Intensität der IGFBP-Banden. Zusätzlich untersuchte holländische Hybrid-Eber bestätigten diese Ergebnisse nicht, aber eine endgültige Aussage ist erst mit einer größeren Probenanzahl möglich. Um eine möglichst einfache, nicht radioaktive Testung dieser IGFBP-Aktivität zu ermöglichen, war es nötig, zu ermitteln, um welche IGFBPs es sich bei diesen Banden handelte. In einer Seminalplasmaprobe wurde IGFBP-5 mittels MALDI-MS identifiziert. Ein Western-Blot mit gegen IGFBP-5 generierten Antikörpern wäre ein effektives Verfahren zur Ermittlung der IGFBP-5-Aktivität im Eberseminalplasma.

Die Untersuchung der Gesamtproteinkonzentration im Eberseminalplasma ergab, dass die Proteinkonzentration innerhalb der verschiedenen Proben eines Ebers variierte. Ein Zusammenhang mit der Fertilität wurde nicht festgestellt. Des Weiteren zeigte die Darstellung des Seminalplasmas auf einer 1D-Membran, dass die Konzentration von PSP-I, einem Hauptprotein des Eberseminalplasmas, zwischen den verschiedenen Ebern unterschiedlich war.

Die Nutzung der *Proteomics*-Technik zur Darstellung des Proteinmusters im Eberseminalplasma erwies sich als problematisch. Zwar wurde mit immobilisierten pH-Gradienten in der 1. Dimension die Auftrennung über einen weiten pH-Bereich erreicht, aber die 2D-Gele zeigten eine vertikale Streifung. Auch waren im pH-Bereich von 7 bis 9 Spots sichtbar, die sich durch eine starke Intensität auszeichneten und deren vertikale Streifung sich teilweise über den ganzen Molmassenbereich erstreckte. Aufreinigungsversuche des Seminalplasmas mittels Mikrokonzentratoren erzielten nur im unteren Molmassenbereich teilweise befriedigende Ergebnisse. Darstellung des Seminalplasmas im Trennbereich 4 bis 7 zeigte ein besseres Trennvermögen, da die Proteine hoher Konzentration im pH-Bereich 7 bis 9 nicht mehr dargestellt wurden. Wünschenswert ist aber die Auftrennung des Seminalplasmas in einem möglichst weiten pH-Bereich. Zur Identifizierung der Spots wurden Coomassiegele mit 1 mg Probenauftrag angefertigt, die aber nur im Molekulargewichtsbereich von 14-16 kDa tiefblau gefärbte Spots zeigten, deren Identifizierung mittels MALDI-TOF-TOF PSP-I und seine Isoformen ergab. Außerdem wurde β -Mikroseminalprotein identifiziert. Um möglicherweise von PSP-I maskierte Proteine geringerer Intensität darstellen zu können, war es nötig, den PSP-I Gehalt vor der 2D-Gelelektrophorese zu verringern. Antikörper, die gegen zwei Hauptisoformen des PSP-I generiert wurden, zeigten hohe Titer gegen PSP-I und waren auch in der Lage natives PSP-I zu erkennen. Damit ist die affinitätschromatographische Abreicherung von PSP-I möglich und dadurch die Verbesserung der Trennleistung, so dass die 2D-Gelelektrophorese zur Identifizierung positiver Proteinkomponenten im Seminalplasma effizient genutzt werden kann.

7. Summary

Characterization of proteins and analysis of the IGF-system in boar seminal plasma

In reproduction medicine the prediction of fertility and the evaluation of the connection between fertility and parameters in the organism is a central issue in order to achieve a more effective selection of animals with high fertility. Verification of the positive influence on sperm motility and timing of ovulation identified seminal plasma as a capable parameter to assess fertility. However up to now seminal plasma components at the molecular level which are responsible for such positive effects have not been identified. Studies of the human, bull and stallion which dealt with the IGF-system as a proteinic component of seminal plasma demonstrated a correlation between IGF-I- and IGFBP-concentrations and fertility.

The aim of this study was to identify the components of the IGF-system in boar seminal plasma and to verify their influence on fertility. Besides this study aimed at the display of the complex protein pattern of boar seminal plasma by high resolution 2D-gel electrophoresis and the identification of separated spots.

IGF-I/II-concentrations in boar seminal plasma were determined in this study. There was no correlation with fertility. The comparison of the IGFBP activity by Western Ligand Blot revealed a significant difference in the relative IGFBP intensity for the different groups of Pietrain boars. Additionally examined hybrid-boars from the Netherlands did not confirm this findings but a final conclusion is not possible until a higher sample number is tested. The detection of the IGFBP identity was necessary in order to achieve a preferably easy, non-radio-active test of the IGFBP activity. MALDI-MS identified IGFBP-5 in one seminal plasma sample. Western immunoblotting with antibodies generated against IGFBP-5 would be an effective technique to quantify IGFBP-5 activity in boar seminal plasma.

Analysis of the total protein concentration in boar seminal plasma resulted in variation within boar samples. There was no correlation with fertility. Besides the display of

seminal plasma on a 1D-membrane revealed, that the concentration of PSP-I, a major protein of seminal plasma, differed between boars.

Use of *Proteomics*-technique to display the protein pattern in boar seminal plasma resulted in some difficulties. Although the use of immobilized pH-gradients in the 1. dimension achieved a separation over a wide pH-range, 2D-gels depicted vertical streaking. In the pH-range 7 to 9 spots were visible which featured vertical streaking over the complete molecular weight range. Experiments to purify seminal plasma with microconcentrators were partly successful only in the lower molecular weight range. The display of seminal plasma in the pH-range 4 to 7 resulted in a better separation because highly concentrated proteins in the pH-range 7 to 9 were not depicted. The separation of seminal plasma in a preferably wide pH-range is desirable. To identify spots Coomassie stained gels were produced, which revealed blue stained spots only in the molecular weight range 14 to 16 kDa. MALDI-TOF-TOF identified these spots as PSP-I and its isoforms. β -Microseminoprotein was identified as well. To display low intensity proteins possibly masked by PSP-I it was necessary to reduce the PSP-I concentration prior to 2D-gel electrophoresis. Antibodies generated against two major isoforms of PSP-I revealed high titers against PSP-I and were able to recognize native PSP-I. Therefore it is possible to strip PSP-I by affinity chromatography and to enhance the separation capacity so that 2D-electrophoresis represents an efficient tool for the identification of protein components with positive effects in seminal plasma.

8. Literaturverzeichnis

- Acott T. S., Hoskins D. D. (1978). Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. J Biol Chem **253**(19): 6744-50.
- Amann R. P., Cristanelli M. J., Squires E. L. (1987). Proteins in stallion seminal plasma. J Reprod Fertil Suppl **35**: 113-20.
- Aumueller R., Willeke H. (1988). Computer controlled analysis of boar semen with the "Cellsoft" system. In: Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland **MS227**.
- Ayyagari R. R., Fazleabas A. T., Dawood M. Y. (1987). Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. Am J Obstet Gynecol **157**(6): 1528-33.
- Binette J. P., Ohishi H., Burgi W., Kimura A., Suyemitsu T., Seno N., Schmid K. (1996). "The content and distribution of glycosaminoglycans in the ejaculates of normal and vasectomized men." Andrologia **28**(3): 145-9.
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R., Postel W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods **6**(4): 317-39.
- Bjellqvist B., Sanchez J. C., Pasquali C., Ravier F., Paquet N., Frutiger S., Hughes G. J., Hochstrasser D. (1993). Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. Electrophoresis **14**(12): 1375-8.
- Blum H., Beier H., Gross H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**: 93-99.
- Blum W. F., Horn N., Kratzsch J., Jorgensen J. O., Juul A., Teale D., Mohnike K., Ranke M. B. (1993). Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay. Growth Regul **3**(1): 100-4.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brandon C. I., Heusner G. L., Caudle A. B., Fayrer-Hosken R. A. (1999). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. Theriogenology **52**(5): 863-73.
- Brutgans Y. P. (1983). The role of boar seminal plasma in fertilization. Pig News and Inf. **4**: 250.
- Busch W., Holzmann A. (2001). Verinärmedizinische Andrologie. Stuttgart, New York, Schattauer.
- Busch W., Löhle R., Peter G. (1991). Künstliche Besamung bei Nutztieren. Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Calvete J. J., Sanz L., Dostalova Z., Toepfer-Petersen, E. (1994). Spermadhesins: structure - function relationships. Assisted Reproduction Technology/Andrology **6**: 316-330.
- Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Raida M., Sanz L., Topfer-Petersen E. (1995a). Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. FEBS Lett **365**(2-3): 179-82.
- Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Sanz L., Reinert M., Nessau S., Raida M., Topfer-Petersen E. (1995b). Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. Biochem J **310**(Pt 2): 615-22.

- Calvete J. J., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Topfer-Petersen E. (1997). Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine- binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. FEBS Lett **407**(2): 201-6.
- Calvete J. J., Sanz L., Dostalova Z., Toepfer-Petersen E. (1995c). Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. Fertilität **11**: 35-40.
- Calvete J. J., Sanz L., Reinert M., Dostalova Z., Toepfer-Petersen E. (1995d). Heparin-Binding Proteins on Bull, Boar, Stallion and Human Spermatozoa. Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy **166**: 515-524.
- Calvete J. J., Sanz L., Toepfer-Petersen E. (1996). Sperm surface proteins. Reprod Domest Anim **31**: 101-10.
- Calvete J. J., Solis D., Sanz L., Diaz-Maurino T., Schafer W., Mann K., Topfer-Petersen E. (1993). Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. Eur J Biochem **218**(2): 719-25.
- Cancel A. M., Chapman D. A., Killian G. J. (1997). Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. Biol Reprod **57**(6): 1293-301.
- Cancel A. M., Chapman D. A., Killian G. J. (1999). Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. Biol Reprod **60**(2): 454-60.
- Champion Z. J., Vickers M. H., Gravance C. G., Breier B. H., Casey P. J. (2002). Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. Theriogenology **57**(7): 1793-800.
- Chandonnet L., Roberts K. D., Chapdelaine A., Manjunath P. (1990). Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. Mol Reprod Dev **26**(4): 313-8.
- Chao C. F., Chiou S. T., Jeng H., Chang W. C. (1996). The porcine sperm motility inhibitor is identical to beta- microseminoprotein and is a competitive inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase. Biochem Biophys Res Commun **218**(2): 623-8.
- Claus R., Hoang-Vu C., Ellendorff F., Meyer H. D., Schopper D., Weiler U. (1987). Seminal oestrogens in the boar: origin and functions in the sow. J Steroid Biochem **27**(1-3): 331-5.
- Claus R., Schopper D., Hoang-Vu C. (1985). Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. Acta Endocrinol (Copenh) **109**(2): 281-8.
- Cohen P., Graves H. C., Peehl D. M., Kamarei M., Giudice L. C., Rosenfeld R. G. (1992). Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. J Clin Endocrinol Metab **75**(4): 1046-53.
- Cohen P., Peehl D. M., Baker B., Liu F., Hintz R. L., Rosenfeld R. G. (1994a). Insulin-like growth factor axis abnormalities in prostatic stromal cells from patients with benign prostatic hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab **79**(5): 1410-5.
- Cohen P., Peehl D. M., Graves H. C., Rosenfeld R. G. (1994b). Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. J Endocrinol **142**(3): 407-15.
- Cohen P., Peehl D. M., Rosenfeld R. G. (1994c). The IGF axis in the prostate. Horm Metab Res **26**(2): 81-4.
- Cohen P., Peehl D. M., Stamey T. A., Wilson K. F., Clemmons D. R., Rosenfeld R. G. (1993). Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. J Clin Endocrinol Metab **76**(4): 1031-5.
- Desnoyers L., Manjunath P. (1994a). Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. J Biol Chem **269**(8): 5776-80.

- Desnoyers L., Therien I., Manjunath P. (1994b). Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Mol Reprod Dev **37**(4): 425-35.
- Dostalova Z., Calvete J. J., Sanz L., Topfer-Petersen E. (1994). Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. Biochim Biophys Acta **1200**(1): 48-54.
- Dostalova Z., Calvete J. J., Sanz L., Topfer-Petersen E. (1995a). Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. Eur J Biochem **230**(1): 329-36.
- Dostalova Z., Calvete J. J., Topfer-Petersen E. (1995b). Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. Biol Chem Hoppe Seyler **376**(4): 237-42.
- Edwards J. J., Tollaksen S. L., Anderson N. G. (1981). Proteins of human semen. I. Two-dimensional mapping of human seminal fluid. Clin Chem **27**(8): 1335-40.
- Einspanier R., Krause I., Calvete J. J., Topfer-Petersen E., Klostermeyer H., Karg H. (1994). Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. FEBS Lett **344**(1): 61-4.
- Ensslin M., Calvete J. J., Thole H. H., Sierralta W. D., Adermann K., Sanz L., Topfer-Petersen E. (1995). Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN. Biol Chem Hoppe Seyler **376**(12): 733-8.
- Florman H. M., First N. L. (1988a). The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. Dev Biol **128**(2): 453-63.
- Florman H. M., First N. L. (1988b). Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. Dev Biol **128**(2): 464-73.
- Frazer G. S., Bucci D. M. (1996). Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Theriogenology **46**: 1389-1402.
- Freund J. (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuberc. Res. **7**: 130-148.
- Fryksdale B. G., Jedrzejewski P. T., Wong D. L., Gaertner A. L., Miller B. S. (2002). Impact of deglycosylation methods on two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry for proteomic analysis. Electrophoresis **23**(14): 2184-93.
- Gerena R. L., Irikura D., Urade Y., Eguchi N., Chapman D. A., Killian G. J. (1998). Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. Biol Reprod **58**(3): 826-33.
- Glander H. J., Kratzsch J., Weisbrich C., Birkenmeier G. (1996). Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. Hum Reprod **11**(11): 2454-60.
- Guenette R. S., Tenniswood M. (1994). The role of growth factors in the suppression of active cell death in the prostate: an hypothesis. Biochem Cell Biol **72**(11-12): 553-9.
- Henricks D. M., Kouba A. J., Lackey B. R., Boone W. R., Gray S. L. (1998). Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. Biol Reprod **59**(2): 330-7.
- Hess M. F., Roser J. F. (2001). The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions. Theriogenology **56**(5): 723-33.

- Hirai M., Boersma A., Hoeflich A., Wolf E., Foll J., Aumuller T. R., Braun J. (2001). Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. J Androl **22**(1): 104-10.
- Hoeflich A., Reichenbach H. D., Schwartz J., Grupp T., Weber M. M., Foll J., Wolf E. (1999). Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. Domest Anim Endocrinol **17**(1): 39-51.
- Hoflich A., Lahm H., Blum W., Kolb H., Wolf E. (1998). Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. FEBS Lett **434**(3): 329-34.
- Holt C., Holt W., Moore H., Reed H., Curnock R. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcome of on-farm inseminations: results of two fertility trials. J Androl **18**(3): 312-23.
- Hossenlopp P., Seurin D., Segovia-Quinson B., Hardouin S., Binoux M. (1986). Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. Anal Biochem **154**(1): 138-43.
- Hunter R. H., Cook B., Poyser N. L. (1983). Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **14**(4): 225-32.
- Issaq H. J. (2001). The role of separation science in proteomics research. Electrophoresis **22**(17): 3629-38.
- Iwamoto T., Tsang A., Luterman M., Dickson J., de Lamirande E., Okuno M., Mohri H., Gagnon C. (1992). Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. Mol Reprod Dev **31**(1): 55-62.
- Jeng H., Liu K. M., Chang W. C. (1993). Purification and characterization of reversible sperm motility inhibitors from porcine seminal plasma. Biochem Biophys Res Commun **191**(2): 435-40.
- Jonakova V., Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Schmid E. R., Topfer-Petersen E. (1992). The complete primary structure of three isoforms of a boar sperm-associated acrosin inhibitor. FEBS Lett **297**(1-2): 147-50.
- Jonakova V., Kraus M., Veselsky L., Cechova D., Bezouska K., Ticha M. (1998). Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. J Reprod Fertil **114**(1): 25-34.
- Jones J. I., Clemmons D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev **16**(1): 3-34.
- Kelley K. M., Oh Y., Gargosky S. E., Gucev Z., Matsumoto T., Hwa V., Ng L., Simpson D. M., Rosenfeld R. G. (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. Int J Biochem Cell Biol **28**(6): 619-37.
- Killian G. J., Chapman D. A., Rogowski L. A. (1993). Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. Biol Reprod **49**(6): 1202-7.
- Kordan W., Holody D., Eriksson B., Fraser L., Rodriguez-Martinez H., Strzezek J. (1998). Sperm Motility Inhibiting Factor (SMIF) - A Plasmatic Peptide with Multifunctional Biochemical Effects on Boar Spermatozoa. Reprod Dom Anim **33**: 347-354.
- Kwok S. C., Soares M. J., McMurtry J. P., Yurewicz E. C. (1993a). Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. Mol Reprod Dev **35**(3): 244-50.
- Kwok S. C., Yang D., Dai G., Soares M. J., Chen S., McMurtry J. P. (1993b). Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: new members of the spermadhesin family. DNA Cell Biol **12**(7): 605-10.

- Lackey B. R., Gray S. L., Henricks D. M. (2002). Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. Physiol Res **51**(3): 309-11.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(259): 680-5.
- Lavon U., Briggs P. A., Bourns J. C. (1973). Electrophoresis of protein fractions from boar seminal plasma, vesicular secretion and epididymal plasma. Journal of Reproduction and Fertility **33**: 39-51.
- Lee K. O., Oh Y., Giudice L. C., Cohen P., Peehl D. M., Rosenfeld R. G. (1994). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP- 3) fragments and IGFBP-5 proteolytic activity in human seminal plasma: a comparison of normal and vasectomized patients. J Clin Endocrinol Metab **79**(5): 1367-72.
- Lejeune H., Chuzel F., Thomas T., Avallet O., Habert R., Durand P., Saez J. (1996). Paracrine regulation of Leydig cells. Ann Endocrinol **57**(1): 55-63.
- Lin T. (1995). Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. J Androl **16**(3): 193-6.
- Lottspeich F., Zorbas H. (1998). Bioanalytik. Heidelberg, Berlin,, Spektrum Akademischer Verlag.
- Luedtke C. C., McKee M. D., Cyr D. G., Gregory M., Kaartinen M. T., Mui J., Hermo L. (2002). Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. Biol Reprod **66**(5): 1437-48.
- Macpherson M. L., Simmen R. C., Simmen F. A., Hernandez J., Sheerin B. R., Varner D. D., Loomis P., Cadario M. E., Miller C. D., Brinsko S. P., Rigby S., Blanchard T. L. (2002). Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. Biol Reprod **67**(2): 648-54.
- Magdaleno L., Gasset M., Varea J., Schambony A. M., Urbanke C., Raida M., Topfer-Petersen E., Calvete J. J. (1997). Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. FEBS Lett **420**(2-3): 179-85.
- Manaskova P., Rylava H., Ticha M., Jonakova V. (2002). Characterization of proteins from boar prostate. Am J Reprod Immunol **48**(4): 283-90.
- Mann L.-M. (1981). Male reproductive function and semen. Berlin (u.a.), Springer Verlag.
- McDowell K. J., Little T. V., Timoney P. J., Adams M. H. (1996). Characterization of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplemented with testosterone. Res Vet Sci **61**(1): 33-7.
- Medzihradzky K. F., Campbell J. M., Baldwin M. A., Falick A. M., Juhasz P., Vestal M. L., Burlingame A. L. (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. Anal Chem **72**(3): 552-8.
- Miller D. J., Ax R. L. (1990). Carbohydrates and fertilization in animals. Mol Reprod Dev **26**(2): 184-98.
- Mohseni S., Binoux M. (1997). Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. Endocrinology **138**: 5645-8.
- Mortarino M., Tedeschi G., Negri A., Cecilian F., Gottardi L., Maffeo G., Ronchi S. (1998). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. Electrophoresis **19**(5): 797-801.
- Naaby-Hansen S., Flickinger C. J., Herr J. C. (1997). Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. Biol Reprod **56**(3): 771-87.

- Nauc V., Puttaswamy M. (2000). Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons, and their quantification in seminal plasma and sperm. Biol Reprod **63**: 1058-1066.
- Nehring H., Wicke I., Staehr B. (1994). Beeinflussung des Motilitätsverhaltens von Eberspermien durch heterologes Eberseminalplasma. Reprod Domestic Anim **29**: 182.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1987). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II. Berlin, Hamburg, Verlag Paul Parey.
- Nieschlag E., Behre, H. M. (1996). Andrologie. Berlin (u.a.), Springer Verlag.
- O'Farrel P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem **250**(10): 231-243.
- Ovesen P., Jorgensen J. O., Ingerslev J., Ho K. K., Orskov H., Christiansen J. S. (1996). Growth hormone treatment of subfertile males. Fertil Steril **66**(2): 292-8.
- Peterson R. N., Russell L. D., Hunt W., Bundman D., Freund M. (1983). Characterization of boar sperm plasma membranes by two-dimensional PAGE and isolation of specific groups of polypeptides by anion exchange chromatography and lectin affinity chromatography. J Androl **4**(1): 71-81.
- Plucienniczak G., Jagiello A., Plucienniczak A., Holody D., Strzezek J. (1999). Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54- kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. Mol Reprod Dev **52**(3): 303-9.
- Reinert M., Calvete J. J., Sanz L., Mann K., Topfer-Petersen E. (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona- pellucida-binding protein of the spermadhesin family. Eur J Biochem **242**(3): 636-40.
- Reinert M., Calvete J. J., Sanz L., Topfer-Petersen E. (1997). Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. Andrologia **29**(4): 179-86.
- Russell L. D., Peterson R. N., Hunt W., Strack L. E. (1984). Posttesticular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. Biol Reprod **30**(4): 959-78.
- Rutherford K. J., Swiderek K. M., Green C. B., Chen S., Shively J. E., Kwok S. C. (1992). Purification and characterization of PSP-I and PSP-II, two major proteins from porcine seminal plasma. Arch Biochem Biophys **295**(2): 352-9.
- Sanz L., Calvete J. J., Jonakova V., Topfer-Petersen E. (1992a). Boar spermadhesins AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor proteins. FEBS Lett **300**(1): 63-6.
- Sanz L., Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Schmid E. R., Amselgruber W., Sinowatz F., Ehrhard M., Topfer-Petersen E. (1992b). The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. FEBS Lett **300**(3): 213-8.
- Sanz L., Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Schmid E. R., Topfer-Petersen E. (1991). The amino acid sequence of AQN-3, a carbohydrate-binding protein isolated from boar sperm. Location of disulphide bridges. FEBS Lett **291**(1): 33-6.
- Sanz L., Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Schmid E. R., Topfer-Petersen E. (1992c). The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. Eur J Biochem **205**(2): 645-52.
- Sauerwein H., Breier B. H., Gallaher B. W., Gotz C., Kufner G., Montag T., Vickers M., Schallenberger E. (2000). Growth hormone treatment of breeding bulls used for artificial insemination improves fertilization rates. Domest Anim Endocrinol **18**(1): 145-58.
- Scheunert T. (1987). Lehrbuch der Veterinärphysiologie. Berlin, Hamburg, Paul Parey Verlag.

- Sinowatz F. (1989). Cytochemical analysis of mammalian sperm membranes. Stuttgart - New York, Fischer.
- Soede N. M., Bouwman E. G., Kemp B. (1998). Seminal plasma does not advance ovulation in hCG-treated sows. Anim Reprod Sci **54**(1): 23-9.
- Soede N. M., Wetzels C. C., Zondag W., de Koning M. A., Kemp B. (1995). Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. Journal of Reproduction and Fertility **104**: 99-106.
- Spiteri-Greech N. (1992). Role of growth hormone and insulin-like growth factor in the regulation of male reproductive function. Hormon Research **38**(suppl. 1): 22-27.
- Starita-Geribaldi M., Poggioli S., Zucchini M., Garin J., Chevallier D., Fenichel P., Pointis G. (2001). Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis." Mol Hum Reprod **7**(8): 715-22.
- Stewart C. E., Rotwein P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiol Rev **76**(4): 1005-26.
- Tedeschi G., Oungre E., Mortarino M., Negri A., Maffeo G., Ronchi S. (2000). Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. Eur J Biochem **267**(20): 6175-9.
- Therien I., Bleau G., Manjunath P. (1995). Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. Biol Reprod **52**(6): 1372-9.
- Thomas L. N., Cohen P., Douglas R. C., Lazier C., Rittmaster R. S. (1998). Insulin-like growth factor binding protein 5 is associated with involution of the ventral prostate in castrated and finasteride-treated rats. Prostate **35**(4): 273-8.
- Toepfer - Petersen E. (1995). One year in the life of the spermadhesin family. Fertilität **11**: 233-241.
- Toepfer-Petersen E., Waberski D., Hess O. (1998). Bedeutung des Seminalplasmas für die Befruchtung. Tierärztliche Umschau **53**: 447-454.
- Tso W. W., Lee W. M. (1980). Seminal plasma and progressive motility of boar spermatozoa. Int J Androl **3**(3): 243-50.
- Waberski D. (1994). Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. Theriogenology **42**: 831-840.
- Waberski D. (1995a). Einfluß von Seminalplasma auf das Befruchtungsgeschehen beim Schwein. Forschungsbericht 1995 der Arbeitsgruppe Prof. Weitze zur Tagung des Zentralverbandes der Deutschen Schweinezüchter (ZDS), Bogensee, 19.-20. September 1995.
- Waberski D. (1995b). The induction of ovulation by transcervical infusions of seminal plasma in gilts: Evidence for a locally active mechanism. Reprod Domest Anim **30**: 337.
- Waberski D. (1999). Studies on a local effect of boar seminal plasma on ovulation time in gilts. Zentralbibliothek Veterinärmedizin A **46**(7): 431-438.
- Waberski D., Sudhoff H., Hahn T., Jungblut P. W., Kallweit E., Calvete J. J., Ensslin M., Hoppen H. O., Wintergalen N., Weitze K. F. (1995). Advanced ovulation in gilts by the intrauterine application of a low molecular mass pronase-sensitive fraction of boar seminal plasma. J Reprod Fertil **105**(2): 247-52.
- Weber M. M., Spottl G., Gossl C., Engelhardt D. (1999). Characterization of human insulin-like growth factor-binding proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and Western ligand blot analysis. J Clin Endocrinol Metab **84**(5): 1679-84.
- Weitze K. F., Rath D., Willmen T., Waberski D., Lotz J. (1990a). Advancement of ovulation in the sow related to seminal plasma application before insemination. Reprod Domest Anim **25**: 61-67.

- Weitze K. F., Lotz J., Everwand A., Willmen T., Waberski D. (1990b). Interaction between inseminate, uterine and ovarian function in the sow. Reprod Domest Anim **25**: 197-204.
- Weitze K. F., Wagner-Rietschel H., Waberski D., Richter L., Krieter J. (1994). The onset of heat after weaning, heat duration, and ovarian function in the sow." Reprod Dom Anim **25**: 197-204.
- White (1980). Secretions of the male reproductive tract and seminal plasma. Philadelphia, Lea&Fiebiger.
- Wildgruber R., Harder A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W., Fey S. J., Larsen P. M., Gorg A. (2000). Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. Electrophoresis **21**(13): 2610-6.
- Wolf E., Jehle P., Weber M., Sauerwein H., Daxenberger A., Breier B., Besenfelder U., Frenyo L., Brem G. (1997). Human insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in the mammary glands of transgenic rabbits: yield, receptor binding, mitogenic activity, and effects on IGF-binding proteins. Endocrinology **138**: 307-313.
- Yanagida M. (2002). Functional proteomics; current achievements. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **771**(1-2): 89- 106.
- Zhou J., Bondy C. (1993). Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. Fertil Steril**60**(5):897-904.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit auf äußerst freundliche Weise geleistete Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Dem Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e.V. und dem bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten bin ich für die Bezahlung meiner Stelle zum Dank verpflichtet.

Ich danke Dr. Georg Arnold und Thomas Fröhlich vom Genzentrum für die freundliche Aufnahme in ihre Laborräume und die geleistete Hilfe bei wissenschaftliche Fragestellungen.

Außerdem danke ich Dr. Andreas Höflich und Dr. Marc Boelhauve vom Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Genzentrum) für die Anregungen und Diskussionen zu dem Seminalplasma-Projekt.

Dr. Aumüller und Mitarbeitern von der Niederbayerischen Besamungsgenossenschaft (NBG) danke ich sehr für die äußerst zahlreiche Bereitstellung der Spermaproben, die ich auch außerhalb der normalen Absamungstermine der Eber erhalten konnte.

Ich danke Dr. Hanneke Feitsma und Mitarbeitern von der van Varkens-Besamungsgenossenschaft für die reibungslose Organisation der Spermaprobennahme, die das Zusammenlegen von Absamungsterminen möglich machte.

Vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Dr. Lottspeich danke ich Dr. Elisabeth Hochleitner für die Messung meiner Proben mit dem MALDI-TOF-TOF und die Hilfestellung in Fragen der Probenvorbereitung.

Des Weiteren danke ich Barbara Kessler und Sonja vom Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Moor- und Versuchsgut Oberschleißheim) für die äußerst gewissenhafte Pflege und Versorgung meiner Immunisierungskaninchen und die Hilfestellung beim Umgang mit den Tieren.