6. Zusammenfassung

Das Zelloberflächenantigen CD52 kommt auf Lymphozyten und im männlichen Genitaltrakt vor. Bei identischem Peptidrückgrat unterscheiden sich die beiden Formen aber in der Struktur des GPI-Ankers und der komplexen N-Glykane. Das Genitaltrakt-HE5/CD52 ist als Hauptreifungsantigen entscheidend für die Spermienreifung im Nebenhoden. In dieser Arbeit wurde HE5/CD52 rekombinant exprimiert und charakterisiert. Wichtig war hierbei die Immunreaktivität sowohl des nativen als auch des rekombinant exprimierten HE5/CD52 mit einem spermienspezifischen, infertilitätsassoziierten Antikörper H6-3C4. Für die Genitaltraktform des HE5/CD52, das im Unterschied zum Lymphozyten-CD52 periphere α1-3-Fucosylierung zeigt, ist die Frage nach den im Nebenhoden vorhandenen α1-3-Fucosyltransferasen sehr wichtig. Diese wurden auf mRNA-Ebene im Nebenhoden sowie in den auch zum männlichen Genitaltrakt zählenden Organen Hoden sowie Prostata quantifiziert. Die Modifizierung des HE5/CD52 durch die auf mRNA-Ebene häufigste α1-3-Fucosyltransferase FUT6 wurde hinsichtlich der **Immunreaktivität** dem spermienspezifischen Antikörper H6-3C4 untersucht.

Die beiden Allele des Spermienoberflächen-Glykoproteins HE5/CD52 wurden rekombinant in BHK-21 Zellen exprimiert. Das rekombinant exprimierte HE5/CD52 ist ebenso wie das native Produkt N-glykosyliert, zeigt in der Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE aber ein weniger komplexes Bandenmuster als das native HE5/CD52. Die Mikroheterogenität ist demnach vermutlich nicht so ausgeprägt wie im Falle des HE5/CD52 aus Seminalplasma. Mit dem spermienspezifischen Antikörper H6-3C4, der gegen eine Glykokomponente des HE5/CD52 gerichtet ist, lässt sich keine Immunreaktivität beobachten. Die durch den Antikörper H6-3C4 erkannte Glykokomponente des nativen HE5/CD52 besteht aus β1-4-verknüpften N-Acetylglucosamin- und Galaktoseeinheiten (Typ II), die in Galaktose am nicht reduzierenden Ende terminiert werden. Dieses Strukturmotiv wird durch terminale Sialinsäure maskiert. Bei *In-vitro*-Fucosylierung des nativen HE5/CD52 durch humane α1-3-Fucosyltransferase VI aus *Spodoptera frugiperda* tritt keine Immunreaktivität mit dem spermienspezifischen Antikörper H6-3C4 mehr auf.

Es wurde ein fluoreszenzbasierter Echtzeit-RT-PCR-Assay entwickelt, mit dem die bisher bekannten α 1-3-Fucosyltransferasen auf Transkriptebene in jedem Humangewebe quantifiziert werden können. Mit diesem Assay wurden α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA-Mengen im humanen männlichen Genitaltrakt, hauptsächlich im Nebenhoden, bestimmt.

Im Testis lässt sich keine dominierende α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA ermitteln. Die weit häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA in den posttestikulären Organen Nebenhoden und Prostata ist die der FUT6. Die FUT6-mRNA ist sowohl im Gesamtnebenhoden als auch in jeder der Regionen Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens die häufigste.

Bei Langzeit-Anti-Androgen-Behandlung geht die Menge an FUT6-mRNA im Nebenhoden zurück, die häufigste α1-3 Fucosyltransferasen mRNA ist die der FUT4, deren Transkriptmenge bei Anti-Androgen-Behandlung deutlich ansteigt.

Es wurde des Weiteren eine Methode entwickelt, um mit fluoreszenzbasierter Echtzeit RT-PCR kostengünstiger und außerdem zeitsparender Ergebnisse vergleichbarer Qualität wie mit der konventionellen Methode zu erhalten. Bei der konventionellen Methode wird in jedem Experiment eine Reihe von Proben bekannter Amplikonkonzentration zusätzlich zu den eigentlichen Proben vermessen. Dieses ist bei der alternativen Methode nicht der Fall, hier muss nur in einem einzigen Experiment eine Reihe bekannter Amplikonkonzentrationen vermessen werden. In allen weiteren Messungen ist kein Vermessen von Standards bekannter Amplikonkonzentration mehr nötig.

7. Summary

The cell surface glycoprotein HE5/CD52 is found on lymphocytes and also in the male genital tract. In both cell types it has an identical peptide backbone but differs in its posttranslational modifications GPI-anchor and N-linked glycan. The male genital tract product is also known as the major maturation-associated antigen, reflecting its essential role concerning sperm maturation in the epididymis. In this study HE5/CD52 was recombinantly expressed and characterized laying an emphasis on its immunreactivity of both, the native as well as the recombinantly expressed CD52, with a sperm-specific, infertility-associated antibody H6-3C4. As HE5/CD52 from the male genital tract differed from the lymphocyteproduct by peripheral α 1-3-fucosylation, the α 1-3-fucosyltransferases were investigated. They were quantified on the mRNA level in the human epididymis as well as in other male gential tract organs, i. e. testis and prostate. Modification of HE5/CD52 by the most abundant α 1-3-fucosyltransferase on the mRNA level was investigated by looking at immunreactivity with the sperm-specific antibody H6-3C4.

Both alleles of HE5/CD52 were expressed recombinantly in BHK-cells. Recombinantly expressed HE5/CD52 is N-glycosylated like the native product, however, showing a less complex pattern in Western-Blot-analysis. Its microheterogeneity probably is not as elaborated as it is for the native product isolated from seminal plasma. With the recombinantly expressed HE5/CD52 no immunreactivity with the sperm-specific antibody H6-3C4 which is directed against a glyco-structure can be detected. The glycotope of the native HE5/CD52 which is recognized by H6-3C4 consists of β1-4-linked acetyl-glucosamine- and galactose-units (type II) being terminated by galactose at the non-reducing end. This motive is masked by terminal sialic acid. HE5/CD52 which has been modified by *in-vitro*-fucosylation using α1-3-fucosyltrasferaseVI from *spodoptera frugiperda* no longer shows any immunreactivity with the sperm-specific antibody H6-3C4.

A fluorescence-based RT-PCR assay was developed for quantifying on a transcript level all known $\alpha 1$ -3-fucosyltransferases in every human tissue of interest. Using this assay $\alpha 1$ -3-fucosyltransferase mRNA quantities were determined in the male genital tract focusing on epididymis. In the testis there is no pre-dominant $\alpha 1$ -3-fucosyltransferase mRNA. In the epididymis as well as in the prostate FUT6 was the by far most abundant $\alpha 1$ -3-fucosyltransferase mRNA. This was true for the whole epididymis as well as for each of the anatomical regions caput, corpus and cauda.

Concerning the methodology an alternative way of quantification was developed by using a fluorescence-based RT-PCR-assay which is less expensive and time-consuming. The results obtained were of a quality which is comparable to those obtained by using the conventional method. Using the conventional method a series of samples of known amplicon-concentration in addition to the samples of interest has to be measured in each experiment. Using the alternative method, this series of samples containing amplicons of known concentration has to be measured only once. In all following experiments only the samples of interest have to be measured.