

## 6 Zusammenfassung

Die Arbeit beinhaltet die detaillierte Strukturanalyse eines humanen Spermienmembran-Antigens, das einen Hauptteil der Spermenglycocalyx ausmacht.

Das humane CD52-Antigen tritt in zwei ganz unterschiedlichen Geweben auf: auf Lymphozyten (Ly-CD52) sowie im Nebenhoden und auf Spermien. Das Spermienantigen (SP-CD52) gelangt erst nach der Spermio-genese während der Nebenhodenpassage von den Epithelzellen des Nebenhodens auf die Oberfläche der Spermien und läßt sich im Ejakulat sowohl auf Spermien als auch im Seminalplasma nachweisen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das SP-CD52-Antigen aus Seminalplasma aufgereinigt und eine vollständige Strukturanalyse durchgeführt.

Durch Folch-Extraktion ließ sich das Glycolipid-ähnliche SP-CD52 aus Spermien und Seminalplasma anreichern. Der Folch-Extrakt konnte im Anschluß gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, *Westernblot*-Analysen ergaben ein für Glycopeptide typisches mikroheterogenes Muster aus fünf bis sechs aufeinanderfolgenden Einzelbanden. Weiterhin wurde festgestellt, daß SP-CD52 von Spermien und aus Seminalplasma keine Unterschiede in seinem elektrophoretischen Laufverhalten aufwies. Auch zwischen den Ejakulaten von 20 Einzelspendern konnten keine Unterschiede hinsichtlich des immunoreaktiven Bandenmusters nachgewiesen werden. Die Bindung von den sialinsäurespezifischen Lektinen SNA und MAA im Rahmen von Lektinblots deutete auf eine Sialylierung des Antigens in (2-3) als auch (2-6)-Position hin. Nach der Abspaltung der Sialinsäuren durch Sialidase veränderte sich das Laufverhalten des Antigens nicht. Das charakteristische Bandenmuster wurde demzufolge nicht durch die negativen Ladungen der Sialinsäuren hervorgerufen.

Verdauversuche unter Verwendung von N-Glycosidase F resultierten dagegen in einer dramatischen Reduktion des Molekulargewichtes im *Westernblot* von 14-20 kD auf 6 kD, begleitet von einem Verlust der Mikroheterogenität. Vergleichende Untersuchungen von CD52 aus Seminalplasma und Lymphozyten dokumentierten, daß sich die gewebespezifischen Antigene nicht nur bezüglich ihrer N-Glycosylierung, sondern auch bezüglich ihres GPI-Ankers unterschieden.

Durch *in-vitro*-Kapazitationsversuche mit lebenden Spermien, gefolgt von Folch-Extraktion und *Westernblot*-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß das SP-CD52-Antigen bei der *in-vitro*-Kapazitation nicht von der Spermienoberfläche verschwindet und somit weitere Funktionen im weiblichen Genitaltrakt erfüllen kann. Trotz der Verwendung gleicher Spermienzahlen verstärkte sich das *Westernblot*-Signal erheblich durch die Kapazitation, die Ursache hierfür konnte allerdings nicht ermittelt werden.

Mittels des japanischen 2E5-mAks konnte bestätigt werden, daß es sich bei SP-CD52 um das seit langem bekannte Spermien-agglutinierende Antigen (H6-3C4-Antigen; Isojima et al., 1987) handelte.

Die Aufreinigung des Antigens aus zuerst 400ml Seminalplasma wurde anfangs in Ermangelung einer ausreichenden Menge des CAMPATH-1-Antikörpers rein chromatografisch versucht. Es wurde jedoch nur eine sehr geringe Ausbeute erzielt. Trotz der hohen Menge an Ausgangsmaterial konnten

mittels NMR-Untersuchungen keine N-Glycane detektiert werden. Eine Komponentenanalyse bestätigte lediglich Inositol in der Probe, außerdem konnte durch Dionex-HPAEC-PAD-Analyse Sialinsäure nachgewiesen werden.

Die Affinitätschromatografische Aufreinigung von 138nmol SP-CD52 (etwa 1,1mg) aus 600ml Seminalplasma gelang schließlich unter Einsatz von 300mg des CAMPATH-1-m-Aks. Die in fünf Schritten aufgereinigte SP-CD52-Probe war vollständig N-glycosyliert und enthielt keinerlei Proteinverunreinigungen mehr, was durch Aminosäuresequenzierung belegt werden konnte. Die erhaltene Sequenz war identisch mit der Sequenz des Lymphozytenantigens. MALDI/TOF-MS-Analyse des intakten Moleküls ergab ein sehr breites Signal von  $m/z = 6800$  bis  $m/z = 9000$  mit einem Maximum bei  $m/z = 7605$ .

Um eine Aufklärung der gesamten Molekülstruktur zu erreichen, wurden die N-Glycane enzymatisch abgespalten und N-Glycane sowie Anker mittels *reversed phase*-HPLC getrennt isoliert. Auf diese Weise ließen sich zwei *Pools* von GPI-Peptiden gewinnen, die nur unwesentlich getrennt von der Säule eluierten. Die Aminosäuresequenzierung der isolierten deglycosylierten GPI-Peptide in den Fraktionen dokumentierte die Deglycosylierung des Moleküls, da an der Position des vorher nicht detektierbaren Asparagins der N-Glycosylierungsstelle Aspartat in der Sequenz identifiziert wurde. Auch die Mengenverhältnisse der unterschiedlich hydrophoben *Pools* ließen sich so bestimmen: der hydrophobere *Pool* enthielt 40mal mehr SP-CD52-Antigen.

Die HPAEC-PAD-Analyse der von der einzigen N-Glycosylierungsstelle abgespaltenen N-Glycane ergab eine enorme Mikroheterogenität der Glycanformen. Eine präparative MonoQ-Auftrennung der mikroheterogenen Fraktion in neun Ladungsgruppen vereinfachte die Analyse der N-Glycane erheblich. Die charakteristischen Strukturmerkmale der hochkomplexen N-Glycane sowie ihre quantitative Verteilung innerhalb der einzelnen Ladungsgruppen konnten durch den kombinierten Einsatz von HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, enzymatischen Spaltungsreaktionen und Methylierungsanalyse im Rahmen einer detaillierten Kohlenhydratstrukturanalyse ermittelt werden.

Die Durchführung ergab, daß es sich bei den N-Glycanen von SP-CD52 um hochgeladene (bis zu sieben NeuAc) diantennäre bis hexaantennäre *complex-type* Strukturen vom Typ II handelte. In fast allen Ladungsgruppen konnten bis zu fünf Lactosamin-Einheiten nachgewiesen werden. Alle Ladungsgruppen bis auf die zweifach geladene Gruppe beinhalteten N-Glycane mit Verzweigungen an den Galactosen der Antennen. Bei linearen Antennen trat somit das Sialyl-I-Motiv auf, während verzweigte Antennen das Sialyl-II-Motiv besaßen.

In der zweifach negativ geladenen Gruppe waren knapp 30% der Sialinsäuren  $\alpha(2-6)$  an die Galactose gebunden. Das Verhältnis verschob sich jedoch mit zunehmender Komplexität der N-Glycane hin zur  $\alpha(2-3)$ -Bindung der Sialinsäure, so daß der überwiegende Teil der Sialinsäuren  $\alpha(2-3)$ -gebunden vorlag. 10-15% der N-Glycane in den unteren Ladungsgruppen besaßen neben einer fast vollständigen proximalen Fucosylierung auch eine periphere Fucosylierung. In den penta- und hexaantennären Ladungsgruppen waren sogar bis zu 30% der N-Glycane peripher fucosyliert. Die

---

Untersuchungsergebnisse deuteten hierbei auf das Vorliegen eines VIM2-artigen Strukturmotives anstelle eines klassischen Lewis<sup>X</sup>-Motives.

Die Vorversuche mit dem GPI-Peptid zeigten, daß SP-CD52 nur in geringem Maße durch PI-PLC spaltbar war, während die RP-HPLC-Trennungen auf mindestens zwei Gruppen unterschiedlicher Hydrophobizität hindeuteten.

Die ESI-MS-Analyse des enzymatisch deglycosylierten SP-CD52 dokumentierte eine beträchtliche Heterogenität auch dieses Molekülteils. Die zur Strukturanalyse des GPI-Peptids verwendeten unterschiedlichen Analysemethoden ergaben, daß SP-CD52 einen monoalkylierten, bei 80% der Moleküle Inositol-acylierten GPI-Anker besaß. Als zusätzliche Modifikationen wies der Anker noch ein (60%) bzw. zwei (40%) Ethanolaminphosphate an seinem Trimannosyl-*core* auf. Die Alkylketten waren entweder C16- oder C18- Fettalkohole im Verhältnis 2 : 3, während die Inositol-Acylierung neben Spuren anderer Fettsäuren fast nur aus Palmitinsäure bestand.

Die Ergebnisse belegen eindeutig eine Zelltyp-spezifische Modifikation nicht nur des N-Glycans von Seminalplasma-CD52, sondern ebenso seines GPI-Ankers.

Obwohl dieser Befund an sich nicht unerwartet ist, bildet er doch die Grundlage für zukünftige Untersuchungen zur Zelltyp-spezifischen Funktion dieses Moleküls sowie für anwendungsorientierte Fragestellungen im Hinblick auf eine Eignung von CD52 als ein Zielmolekül für alternative Verhütungsmethoden.

## 7 Summary

This thesis deals with the detailed structural analysis of the human sperm membrane antigen SP-CD52, which forms a major part of the sperm glycocalyx.

The human CD52 is exclusively expressed on lymphocytes (Ly-CD52) and in the male genital tract (SP-CD52), where it is shed from the epithelial cells of the epididymal duct into the lumen of the epididymis. In the course of the epididymal passage, this antigen of post-testicular origin is integrated into the surface of the spermatozoa and can be detected after ejaculation both on the spermatozoa and in the seminal plasma.

The SP-CD52 antigen has been purified to a very high degree from pooled human ejaculates and a complete structural analysis has been performed. Taking advantage of the glycolipid-like properties of the SP-CD52 antigen, it was extracted from sperm and seminal plasma using the Folch extraction method. The Folch extracts were subsequently submitted to gelelectrophoretic separation. The Western blot analysis revealed a highly complex pattern, typical for glycosylated proteins. Five to six separate bands ranging from 14 kD to 20 kD identified. It was also shown, that electrophoretic patterns of SP-CD52 from sperm and seminal plasma were similar. The pattern of single donor samples was equally heterogeneous as that of pooled ejaculates. The immunoreactive bands were also stained by sialic acid-specific lectins SNA (binds to sialic acids in  $\alpha(2-6)$ -linkage) and MAA (binds to sialic acids in  $\alpha(2-3)$ -linkage), indicating the presence of terminal sialic acids on the antigen. The treatment with neuraminidase did not change the immunoreactive pattern, suggesting that the negative charge did not affect the electrophoretic mobility.

PNGase F digestion resulted in a drastically reduced electrophoretic mobility suggesting a large N-glycosylation site. The bands at 14-20 kD disappeared, giving rise to a relatively sharp band around 6 kD. Comparative studies using Folch extracts from sperm and from lymphocytes showed that there were cell type-specific differences not only concerning the N-glycosylation sites, but also in regard to the GPI-anchors. It was further demonstrated by *in-vitro*-capacitation studies of live sperm, followed by Folch extraction and Western blot analysis, that SP-CD52 still remained on the sperm surface even after the capacitation reaction. The SP-CD52 antigen therefore seems capable to perform further functions in the female genital tract. The signal intensity on the blot even increased though equal sperm counts were used, but the reason for this could not be elucidated.

SP-CD52 was shown to be identical with the sperm-agglutinating antigen (H6-3C4-Antigen; Isojima et al., 1987) since it was bound by the monoclonal antibody 2E5 which is specific for this antigen.

Purification of the antigen from 400ml seminal plasma first was attempted omitting affinity chromatography, using various chromatographic methods. Only minor amounts of SP-CD52 were obtained, and using NMR examination, no N-glycans were detected. Though, compositional analysis of the preparation confirmed the presence of inositol, and by HPAEC-PAD analysis, also sialic acid

was identified. Using 300mg of the CAMPATH-1 monoclonal antibody, the purification implying affinity chromatography and four other steps resulted in 138nmol (~1,1mg) of SP-CD52, purity of which was confirmed by sequential Edman degradation. The antigen was shown to be fully N-glycosylated and did not contain any protein impurities. The sequence obtained was identical with the cDNA sequence of Ly-CD52. MALDI-TOF analysis of the native SP-CD52 antigen yielded a very broad molecular ion signal, ranging from  $m/z = 6800$  to  $m/z = 9000$  with an apex at  $m/z = 7605$ .

To accomplish a complete structural analysis, N-glycans were enzymatically liberated from the molecule by action of PNGase F, and the N-Glycans and the GPI-anchor were separated by RP-C8-HPLC. The GPI-anchor eluted in two partly overlapping pools of different electrophoretic mobility. Dot blot analysis employing the CAMPATH-1 antibody as well as Edman sequencing revealed complete deglycosylation of the molecule, since the formerly missing asparagine from the N-glycosylation site had been turned into an aspartate by the deglycosylation reaction. The later eluting and hence more hydrophobic pool contained nearly 40 times more material

HPAEC-PAD analysis of the cleaved and isolated N-glycans revealed an enormous microheterogeneity. They were preparatively separated into nine charge groups by MonoQ FPLC, whereas this step greatly simplified further structural analysis of the N-glycans. Detailed structural analysis of the carbohydrates was performed using HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, enzymatical cleaving experiments and methylation analysis. It was found, that the SP-CD52-N-glycans were based on bi- up to hexaantennary structures of highly charged (up to  $-7$ ) terminally sialylated complex-type sugars of type II. Nearly all charge groups contained up to five lactosamine repeats. All charge groups but M2 contained branched lactosamine repeats at the 6-position of the galactose of the linear lactosamines, giving rise to the Sialyl-i-antigen (linear structures) and the Sialyl-I-antigen (branched structures). In charge group M2, around 30% of the sialic acids were  $\alpha(2-6)$ bound to galactose, but the degree of  $\alpha(2-6)$ bound sialic acids decreased with growing complexity. Overall, sialic acids were mostly  $\alpha(2-3)$ bound to galactose. Besides complete proximal fucosylation, 10-15% of the N-glycans in charge groups M2 to M4 contained an additional peripheral fucosylation. In charge groups M5 to M6, nearly 30% of N-glycans were peripherally fucosylated. This finding indicated the presence of a VIM2-motif instead of a classical Lewis<sup>X</sup>-motif.

Preliminary experiments with the GPI-peptide showed, that only minor amounts of SP-CD52 could be cleaved by action of phosphoinositolspecific phospholipase C. Moreover, the RP-C8-HPLC separations also indicated at least two groups of GPI-peptides of differing hydrophobicity. The ESI-MS analysis demonstrated a substantial heterogeneity also of this part of the molecule. The various methods used for structural analysis of the GPI-anchor revealed, that the majority of SP-CD52-molecules (~80%) were inositol-acylated. The trimannosylcore of the GPI-anchor possessed one or two additional ethanolaminophosphate substituents. Only C16:0- or C18:0- alkyl chains were detected, whereas the inositol acylation consisted mostly of palmitic acid. Only traces of myristic acid or stearic acid could be detected. The results clearly reveal a cell type-specific modification not only of the N-

---

glycans of seminal plasma CD52, but also of the GPI-anchor. Though this result is not surprising, it is yet the basis for both examinations of the cell type-specific function of this molecule. Moreover, the usage of SP-CD52 in terms of applicability as a target molecule for alternative contraception can only be performed, when the exact structure of the molecule is known.