

# **HE2, ein humanes Spermienoberflächenantigen epididymaler Herkunft**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Hans Henning von Horsten**

aus Marne

Hamburg, 2002

*Die Wissenschaft hilft uns vor allem, daß sie das Staunen, wozu wir von Natur aus berufen sind, einigermaßen erleichtere, sodann aber, daß sie dem immer gesteigerten Leben neue Fertigkeiten erwecke, zur Abwendung des Schädlichen und Einleitung des Nutzbaren.*

Johann Wolfgang von Goethe

# Inhaltsverzeichnis

## **I. Einleitung**

I.1 Kurze Übersicht über Anatomie und Funktion des männlichen Genitaltraktes_____	1
I.2 Die Anatomie des Nebenhodens_____	2
I.3 Die embryonale Frühentwicklung der Epididymis_____	3
I.4 Die postnatale Differenzierung der am Aufbau des Nebenhodenepithels beteiligten Zellen_____	4
I.5 Die Funktion der adulten Nebenhodenepithelzellen_____	5
I.6 Die Histologie des Nebenhodens_____	5
I.7 Die Absorption im Nebenhoden_____	5
I.8 Die Regulation der epididymalen Genexpression_____	6
I.9 Die physiologische Bedeutung des Nebenhodens_____	6
I.10 Die epididymalen Sekretproteine_____	7
I.11 Die Blut-Epididymis-Barriere und ihre Bedeutung für die immunologische Situation des Nebenhodens_____	10
I.12 Die Bedeutung antimikrobieller Peptide für die epitheliale Abwehr_____	11
I.13 Die Verwandtschaft des HE2-Gens zu den β-Defensinen_____	15
I.14 Zielsetzung der Arbeit_____	16

## **II. Material und Methoden**

II.1 Material_____	17
II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien_____	17
II.1.2 Medien_____	19
II.1.3 Puffer und Lösungen_____	20
II.1.4 Chemosynthetische Peptide und Anti-Peptid-Antiseren_____	24
II.1.5 E. coli Wirtsstämme_____	25
II.1.6 Lepidopteren-Zelllinien_____	25

II.1.7 Vektoren	25
II.1.8 Geräte	25
II.1.9 Chromatographie-Harze und -Säulen	26
II.1.10 Menschliche und tierische Materialien	27
II.2 Methoden	28
II.2.1 Fällern von Nukleinsäuren	28
II.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
II.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	28
II.2.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose	29
II.2.5 RNA-Extraktion aus Geweben	29
II.2.6 Einzelstrang cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	30
II.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
II.2.8 Restriktionsverdau von DNA	31
II.2.9 Subklonierung in Vektoren	32
II.2.10 Ligation von DNA	33
II.2.11 Präparation von transformations- kompetenten E. coli-Bakterien	33
II.2.12 Transformation von kompetenten E.coli-Bakterien	33
II.2.13 Einfrieren erfolgreich transformierter Klone	35
II.2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	35
II.2.15 DNA-Sequenzierung am LI-COR <sup>®</sup>	35
II.2.16 Heterologe Expression von HE2-Proteinen	37
II.2.17 Proteinbestimmung	43
II.2.18 Gewinnung aufkonzentrierter Proteinextrakte	44
II.2.19 N-Glykosidase F-Verdau	45
II.2.20 Herstellung von Kryotomschnitten aus Nebenhodengewebe	46
II.2.21 Immunhistochemische Untersuchung von Kryotomschnitten	46
II.2.22 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	47
SDS-PAGE	47
TRICINE-PAGE	47

CAU-PAGE	48
II.2.23 Revers-Zymogramm	50
II.2.24 Bestimmung von Trypsin-inhibitorischer Aktivität mit Hilfe des L-BAPNA-Substrates	52
II.2.25 Gel-Retardation-Assay	53
II.2.26 Gel Overlay Assay	55
II.2.27 Radialdiffusionstest	55
II.2.28 CFU-Assay ( <i>Colony Formig Unit Assay</i> )	56
II.2.29 Coomassie Färbung	56
II.2.30 Färbung von Western-Blot-PVDF-Membranen mit kolloidalem Silber	57
II.2.31 Western-Blot	57
II.2.32 Immunpräzipitation	58
II.2.33 Nachweis freier Sulfhydrylgruppen von PVDF-geblotteten Proteinen durch Alkylierung mit Biotin-Maleimid	59
II.2.34 Chromatographische Trennverfahren	60
II.2.35 Gewinnung von Elektrophorese- geeigneten Proteinproben aus stark salzhaltigen, verdünnten Proben	63
II.2.36 Untersuchung der Aggregatbildung von Proteinen durch Crosslinking mit Glutaraldehyd	64
II.2.37 Übersicht über Vektorkarten und Polylinker der verwendeten Plasmide	65

### **III. Ergebnisse**

III.1 Nachweis alternativer Spleißvarianten von HE2 im Nebenhodengewebe durch RT-PCR	68
III.2 Nachweis von HE2-Antigenen auf Proteinebene	71
III.2.1 Mindestens eines der HE2-Antigene bindet ionisch an die Oberfläche ejakulierter humaner Spermien	72
III.2.2 HE2-Proteine lassen sich auch im menschlichen Seminalplasma nachweisen	73

III.2.3 Der N-Terminus des 8 KDa-HE2-Proteins beginnt mit der Aminosäuresequenz DLLPPRT	76
III.2.4 Nachweis von weiteren HE2-Proteinen in der epididymalen Flüssigkeit	77
III.3 Einfluß von Anti-Androgenen auf die Expression von HE2-Proteinen im Nebenhodenepithel	79
III.4 Funktionelle Analyse von HE2-Proteinen	81
III.4.1 Anreicherung von HE2-Proteinen aus humanem Seminalplasma	81
III.4.2 Rekombinante Expression von HE2-Proteinen im Baculovirus-Expressionssystem	83
III.4.2.1 Subklonierung der HE2 $\beta$ 1 und HE2C cDNA in den pMelBacB-Vektor	83
III.4.2.2 Identifizierung positiver Virionen-Plaques	84
III.4.2.3 Expression und proteolytische Prozessierung von HE2 $\beta$ 1 und HE2C	85
III.4.3 Dreistufige Aufreinigung von rekombinantem HE2C	86
III.4.3.1 Reifes HE2C wirkt nicht antibiotisch gegen E. coli DH5 $\alpha$	89
III.4.4 Reifes HE2 $\beta$ 1 ist ein antimikrobiell aktives, $\beta$ -Defensin-ähnliches Protein	90
III.4.5 Expression von proHE2 $\alpha$ als MBP-Fusionsprotein im Cytosol von E. coli	90
III.4.5.1 proHE2 $\alpha$ läßt sich durch Spaltung mit Faktor Xa-Protease aus MBP-proHE2 $\alpha$ freisetzen	91
III.4.5.2. proHE2 $\alpha$ wird in vitro durch Furin gespalten	92
III.4.5.3 proHE2 $\alpha$ bindet an Heparin	93
III.4.5.4 Trennung von MBP und proHE2 $\alpha$ durch Gelfiltration	94
III.4.5.5 reifes HE2 $\alpha$ zeigt in vitro eine starke Neigung zur Aggregation	95
III.4.3 Untersuchungen mit dem synthetischen HE2 $\alpha$ -Peptid	97

III.4.3.1 Das HE2 $\alpha$ -Peptid multimerisiert in wässriger Lösung	98
III.4.3.2 Untersuchung der Proteinase-inhibitorischen Aktivität des HE2 $\alpha$ -Peptids	99
III.4.3.3 Im Gel Overlay Assay zeigt das Peptid antibakterielle Aktivität gegen E.coli DH5 $\alpha$	101
III.4.3.4 Bestimmung der Minimal Inhibitorischen Konzentration (MIC) durch CFU-Assay	102
III.4.3.5 Das HE2 $\alpha$ -Peptid bindet an DNA	104
III.4.3.6 proHE2 $\alpha$ ist inaktiv gegen E.coli DH5	105

## **IV.Diskussion**

IV.1 Organisation des HE2-Genlokus und Regulation der mRNA-Expression	107
IV.2 Nachweis der HE2-Proteine	109
IV.2.1 Die proteolytische Prozessierung der vom proximalen Promotor kodierten HE2-Proteine	109
IV.2.2 Die Lokalisation von HE2 $\beta$ 1 auf der Oberfläche ejakulierter Spermien	112
IV.3 Funktionelle Charakterisierung der $\beta$ -Defensin- ähnlichen HE2-Varianten	113
IV.4 Strukturelle Charakterisierung von HE2 $\alpha$ (bzw. HE2B)	114
IV.5 Analogie der HE2-Proteinfamilie zur Cathelicidinfamilie antimikrobieller Peptide	116
IV.6 Funktionelle Charakterisierung von HE2 $\alpha$ (bzw. HE2B)	118
IV.7 Mögliche alternative Funktionen der HE2-Peptide	119
IV.8 Schlußbetrachtung	121

<b>V.Zusammenfassung</b>	<b><u>122</u></b>
<b>V.Summary</b>	<b><u>124</u></b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b><u>126</u></b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b><u>130</u></b>

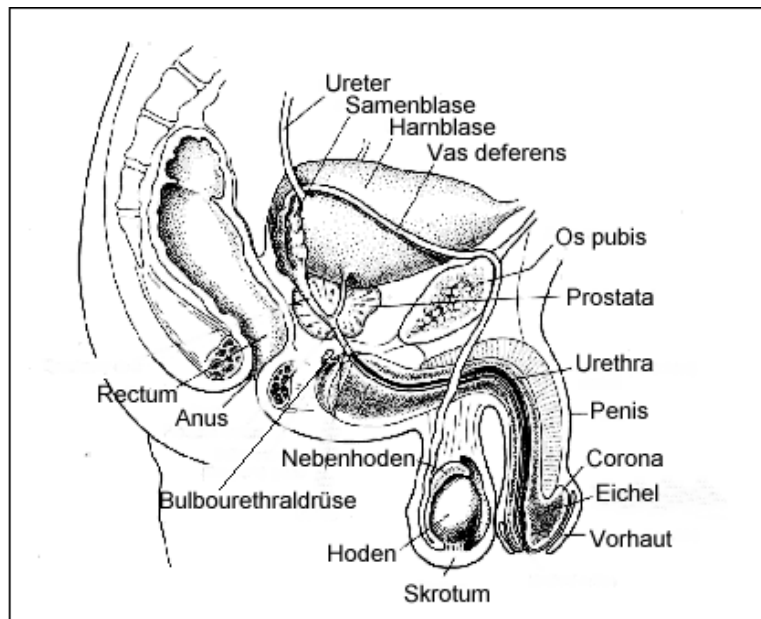


## I. Einleitung

Das im Rahmen einer differenziellen Genexpressionsanalyse des menschlichen Nebenhodengewebes identifizierte HE2-Gen (HE; Humanes Epididymisprodukt) kodiert eine Familie nebenhodenspezifischer Sekretproteine. In den folgenden Abschnitten wird daher zunächst auf Aufbau, Funktion und Bedeutung des Nebenhodens und schließlich auf die Überlegungen zur molekularen Funktion des HE2-Gens im physiologischen Kontext eingegangen, die den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zugrundeliegen.

### I.1 Kurze Übersicht über Anatomie und Funktion des männlichen Genitaltraktes

Das männliche Urogenitalsystem gruppiert sich um das Schambein (Os pubis). Seine wesentlichen Bestandteile sind der Hoden (Testis), der Nebenhoden (Epididymis), der Vas deferens, die akzessorischen Geschlechtsdrüsen und der Penis mit seinen Schwellkörpern (Corpora cavernosae). Zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen zählen die Samenleiterampulle, die Samenblasen-, die Vorsteher- (Prostata) und die Harnröhrenzwiebeldrüse (Bulbourethraldrüse) (Abb. 1). Mit Ausnahme der Prostata kommen diese Drüsen nicht bei allen Säugern vor. Beim Menschen fehlt die Samenleiterampulle, die bei Hund, Pferd und Wiederkäuer als spindelförmige Anschwellung des Vas deferens auszumachen ist. Das Seminalplasma des Menschen setzt sich aus den Sekreten des Hodens, des Nebenhodens und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zusammen. Die Samenblase sezerniert große Mengen von Semenogelin, welches dem frischen Ejakulat seine gelartige Konsistenz verleiht. Die Prostata sezerniert vor allem Proteasen wie das *Prostate Specific Antigen* (PSA) und Kallikreine, denen eine Rolle bei der Verflüssigung des Ejakulates durch Proteolyse des Semenogelins zukommt. Sympathische Erregung des Nervus pudendus, dessen Ausläufer an der glatten Muskulatur des Vas deferens-Abschnitts kurz hinter der Samenblaseneinmündung angedockt ist, führt zu Kontraktionen und zum Ausstoß des Ejakulats. Der Anteil epididymaler Flüssigkeit am Seminalplasma liegt bei  $\leq 10\%$  (Mann und Lutwak-Mann, 1976).

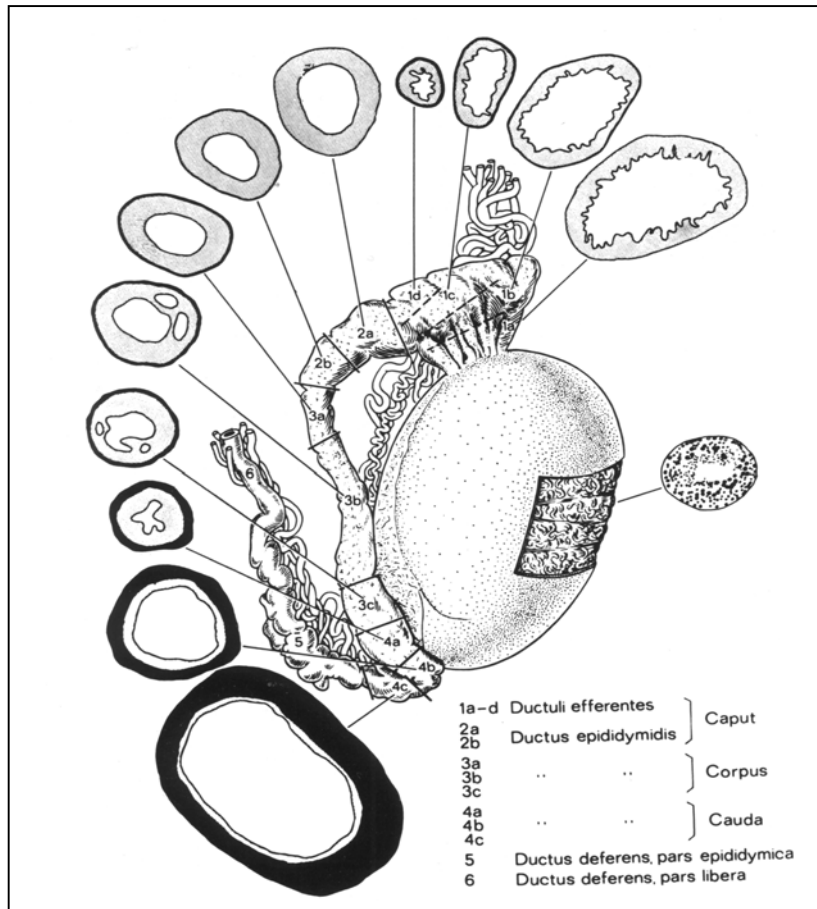


**Abbildung 1:** Die Anatomie des männlichen Urogenitalsystems (nach R.E. Jones; Human Reproductive Biology)

## I.2 Die Anatomie des Nebenhodens

Im adulten Zustand ist der Nebenhoden ein stark gewundener, beim Menschen ca. 7 m langer Tubulus, der nach grob-morphologischen Gesichtspunkten in die drei Segmente Caput, Corpus und Cauda unterteilt werden kann (Abbildung 2). Er lagert sich dem Hoden dorsolateral auf und ist eng mit der den Hoden umschließenden Tunica albuginea verbunden. Der Nebenhoden ist über das Ligamentum Caudae epididymidis am Fundus des Processus vaginalis befestigt und über das Ligamentum testis proprium mit dem distalen Hoden verbunden. Hoden und Nebenhoden sind im Hodensack (Skrotum) lokalisiert und werden vom Scheidenhautfortsatz (Processus vaginalis) umschlossen. Der bulböse Caput besteht aus dem Anfangsabschnitt des Nebenhodenkanals mit den hier einmündenden Ductuli efferentes (Holstein, 1969), die den Caput-Bereich mit dem Rete testis verbinden. Die Anzahl der Ductuli efferentes variiert je nach Tierart zwischen 4 und >20. Beim Menschen existieren 8 bis 16 Ductuli efferentes. Bindegewebige Septen halten die am Kopfende des Hodens austretenden, stark geschlängelten Ductuli zu keilförmigen Läppchen zusammen. Beim Menschen mündet nur ein Teil aller Ductuli in den Nebenhodengang, während die übrigen zum Teil blind enden oder Anastomosen bilden (Yeung et al., 1991). Der stark gewundene Nebenhodentubulus wird durch Bindegewebe zu einem Gangkonvolut zusammengehalten (Holstein, 1969). Distal geht der Nebenhoden in den Samenleiter (Vas deferens) über. Bei

Nagern, nicht jedoch beim Menschen, wird noch ein Initialsegment beschrieben, das zwischen Ductuli effentes und Caput epididymidis lokalisiert ist (Benoit, 1926).



**Abbildung 2:** Menschlicher Hoden, Nebenhoden und Vas deferens. Die abgebildeten Querschnitte zeigen die Dicke des Epithels (hellgrau) und der glatten Muskulatur (schwarz). (nach Holstein, 1969)

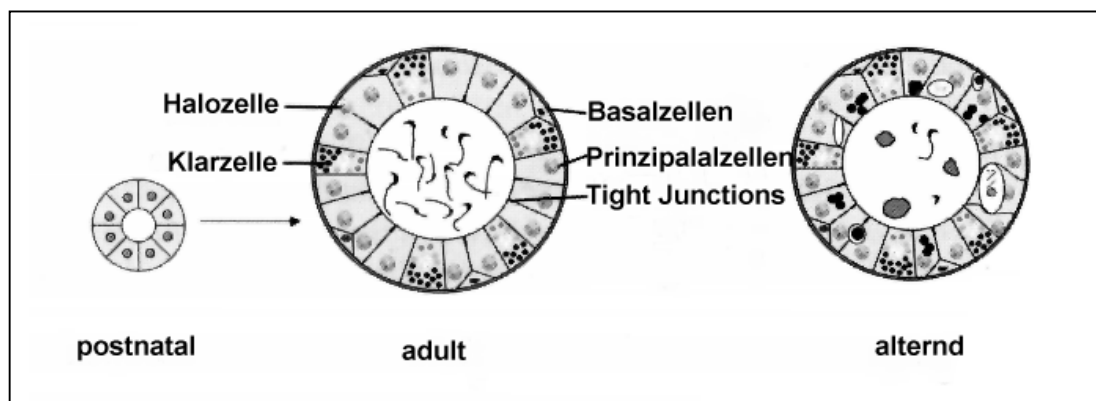
### I.3 Die embryonale Frühentwicklung der Epididymis

Nebenhoden und Vas deferens differenzieren sich bei Amnioten aus dem cranialen Pol des Wolff'schen Ganges (Pronephros), während die Ductuli effentes aus mesonephrischen Tubuli hervorgehen (Byskov und Høyer, 1988). Im weiteren Verlauf der Entwicklung verlängert sich der Nebenhodengang, und das Ausmaß seiner Verknäuelung nimmt vom cranialen zum distalen Pol hin zu. Im pränatalen Zustand lassen sich im Nebenhodenepithel keine morphologisch differenzierten Zelltypen erkennen. Der Entzug von Androgenen während des letzten Schwangerschaftsdrittels führt beim Fetus zur Regression des Nebenhodens (Robaire et al., 2000). Die normale Ontogenese der Epididymis ist außerdem abhängig von der Expression verschiedener Proteine wie dem Wachstumsfaktor Bmp8a (Zhao et al., 1998), der

Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-ros (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996), dem „paired box“-Protein Pax-2 (Oefelein et al., 1996), den Homeobox-Domänen-ähnlichen Proteinen der Hox-Familie (Podlasek et al., 1999, Lindsey et al., 1996) und Pem-2 (Sutton et al., 1998) (Übersicht s. Kirchoff, 1999).

#### I.4 Die postnatale Differenzierung der am Aufbau des Nebenhodenepithels beteiligten Zellen

Die nachgeburtliche Entwicklung der Epididymis wurde bisher weitestgehend am Ratten-Modell untersucht. Gegen Ende der zweiten Lebenswoche hat sich im Nebenhodenepithel eine Population ausdifferenzierter Immunzellen (Halo-Zellen) etabliert. Im Anschluß daran entwickeln sich aus den bislang undifferenzierten Epithelzellen Kolumnar- und Schmalzellen. Etwa vier Wochen nach der Geburt haben sich die Kolumnarzellen zu Basal- und Prinzipalzellen ausdifferenziert. Wenig später haben sich im Epithel des Initialsegments der Ratte die Apikalzellen als eine Subpopulation der Prinzipalzellen herausgebildet, während sich etwa zum gleichen Zeitpunkt aus den hinter dem Initialsegment lokalisierten Schmalzellen die Klarzellen entwickeln. Im Nebenhodenepithel adulter Ratten finden sich schließlich Prinzipal-, Basal-, Schmal-, Klar- und Halo-Zellen (Abbildung 3). Die Schmalzellen finden sich allerdings bei der adulten Ratte nur noch im Initialsegment, da sie sich im übrigen Nebenhoden zu den Klarzellen ausdifferenziert haben. Die Basalzellen sind im Nebenhodenepithel nicht die Vorläuferzellen der Prinzipalzellen, obwohl dies in anderen Epithelien der Fall ist (Clermont und Flanery, 1970).



**Abbildung 3:** Schematische Schnitte durch einen Tubulus des Caput epididymidis bei der neugeborenen, erwachsenen und alternden Ratte (nach Robaire et al., 2000)

### **I.5 Die Funktion der adulten Nebenhodenepithelzellen**

Die Prinzipalzellen sind der häufigste Zelltyp im Nebenhoden und dienen vor allem der Sekretion und Absorption (Robaire und Hermo, 1988). Die Basalzellen sind an der Stabilität des Epithels beteiligt und könnten an der Entgiftung reaktiver Sauerstoff-Spezies beteiligt sein (Yeung et al., 1994). Die genaue Funktion der Halo-Zellen ist noch ungeklärt. Sie zeigen jedoch deutliche Verwandtschaftsbeziehungen zu Monocyten und T-Lymphocyten (Serre und Robaire, 1999). Die Funktion von Schmal- und Klarzellen ist bislang ungeklärt. Für beide Zelltypen wird jedoch eine Rolle bei der Flüssigkeitsresorption diskutiert (Cooper, 1986; Robaire und Hermo, 1988).

### **I.6 Die Histologie des Nebenhodens**

Das zweireihige, hochprismatische Nebenhodenepithel besteht größtenteils aus den Stereozilien tragenden Prinzipalzellen sowie den kuboidalen Basalzellen. Die Epithelhöhe und die Länge der Stereozilien nimmt nach caudal hin ab, während die Dicke der außen anliegenden, zirkulär verlaufenden glatten Muskulatur sowie der Durchmesser des Ganglumens zur Cauda hin zunehmen (vgl. Abb.2). Das Zytoplasma der Prinzipalzellen, die den Hauptteil des Epithels ausmachen, beinhaltet einen gut ausgebildeten Golgi-Apparat und ein stark entwickeltes rauhes Endoplasmatisches Retikulum (rER) (Holstein, 1969). Obwohl im Caput-Bereich ein Großteil der aus dem Rete testis kommenden Flüssigkeit absorbiert wird (Robaire und Hermo, 1988), zeigen die Prinzipalzellen sowohl im Caput- als auch im Corpus-Bereich eine deutliche Sekretionstätigkeit. Das stark entwickelte rER der Prinzipalzellen ist ein Indiz dafür, daß diese Zellen intensiv Proteine produzieren.

### **1.7 Die Absorption im Nebenhoden**

Aufgrund einer aktiven Absorption von Natrium- und Chloridionen durch das Nebenhodenepithel und der damit verbundenen passiven Diffusion von Wasser (Wong et al., 1978), werden die Spermien im Nebenhoden stark aufkonzentriert. Die Ähnlichkeiten zwischen den Resorptionsvorgängen im Nebenhoden und denen in der ontogenetisch verwandten Niere sind auffällig (Robaire und Hermo, 1988). In geringerem Ausmaß findet an apikalen Plasmamembranen der Epithelzellen Endozytose statt (Glover und Nicander, 1971).

## **I.8 Die Regulation der epididymalen Genexpression**

Die bestuntersuchten und prominentesten Regulatoren der Genexpression im Nebenhoden sind die Androgene Testosteron und sein Reduktionsprodukt  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron ( $5\alpha$ -DHT). Das von den im Interstitium des Hodens lokalisierten Leydigzellen produzierte Testosteron wird an Proteine gebunden und in gebundener Form an seine Wirkorte transportiert. Im Blut ist das in der Leber produzierte Steroid Hormone Bindende Globulin (SHBG) das vorherrschende Androgen-Transportprotein, während in der luminalen Flüssigkeit des Hodens und Nebenhodens das von den Sertolizellen produzierte Androgen-Bindende-Protein (ABP) diese Funktion übernimmt (Bardin et al., 1996). Im Nebenhoden und in der Prostata, nicht aber im Hoden selbst, kann Testosteron durch die  $5\alpha$ -Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT) reduziert werden. Der nukleäre Androgenrezeptor zeigt eine größere Affinität zu DHT als zu Testosteron (Wilson und French, 1976). Die Bindung von Androgenen veranlaßt den Rezeptor zu einer Konformationsänderung, die dessen Dimerisierung auslöst. Als Dimer ist der ligandgebundene Androgenrezeptor in der Lage an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten Androgen-Responsiven-Elemente (AREs) in den Promotorbereichen androgenabhängig regulierter Gene zu binden und deren Transkriptionskontrolle direkt zu beeinflussen (Bardin et al., 1996). Eine indirekte Kontrolle kann vorliegen, wenn das direkt androgenresponsive Gen einen Transkriptionsfaktor kodiert, der aktivierend oder reprimierend weitere Genpromotoren ohne eigene Androgen Responsive Elemente beeinflusst (Verhoeven et al., 1992). Neben Androgenen regulieren auch andere, bislang unidentifizierte Faktoren, die mit der luminalen Flüssigkeit aus dem Hoden in den Nebenhoden gelangen, bestimmte Gene des Nebenhodenepithels (Viger und Robaire, 1991, Cornwall et al., 1992).

## **I.9 Die physiologische Bedeutung des Nebenhodens**

Die Spermatozoen der Säugetiere haben sich im Verlauf der Spermatogenese bereits stark ausdifferenziert, wenn sie den Hoden über die Tubuli seminiferi, das Rete testis und die Ductuli efferentes verlassen. Trotzdem besitzen diese testikulären Spermien noch nicht die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung und zur Interaktion mit der Eizelle. Diese beiden Eigenschaften, die eine Grundvoraussetzung der natürlichen Befruchtung sind, erlangen die Spermien erst während einer mehrtägigen Passage durch den Nebenhoden (Bedford, 1975; Saling, 1982; Cooper, 1986; Jones 1989, Blaquier et al., 1988). Die

Notwendigkeit epididymaler Spermienreifung bei Säugetieren steht dabei allerdings in deutlichem Gegensatz zur Spermienreifung der Invertebraten und Anammier, deren testikuläre Spermien bereits voll befruchtungsfähig und motil sind (Yanagimachi, 1994). Da die Verweilzeit der Spermatozoen im Nebenhoden allein nicht zu deren Fertilität führt (Cooper und Orgebin-Crist, 1975), scheint der Reifungsprozeß vielmehr mit einer Modifizierung der Spermienmembran durch spezifische Wechselwirkung mit Substanzen epididymaler Herkunft zu sein (Brooks und Higgins, 1980; Cuasnicu et al., 1984; Moore und Hartman, 1986). Die von den Prinzipalzellen des Nebenhodens in das Lumen sezernierten Sekretproteine haben dabei eine besondere Bedeutung, denn die Hemmung epididymaler mRNA- und Proteinsynthese verhindert die Entwicklung der Spermatozoen-Fertilität (Orgebin-Crist und Jahad, 1978). Während der Passage durch den Nebenhoden kommt die Spermienoberfläche sukzessiv in Kontakt mit den regional unterschiedlichen Sekretproteinen der Prinzipalzellen, wobei deren Interaktion mit der Oberfläche der Spermienmembran für die Fertilität von besonderer Bedeutung zu sein scheint (Cameo et al., 1976; Dacheux et al 1983; Moore et al., 1983; Cuasnicu et al., 1984; Klinefelter et al., 1985). Nachdem die WHO Ende der achtziger Jahre den Nebenhoden als mögliches Zielorgan für die Empfängnisverhütung beim Mann hervorgehoben hat (Waites, 1989), wurde Anfang der neunziger Jahre eine differentielle Genexpressionsanalyse des humanen Nebenhodengewebes durchgeführt (Kirchhoff et al., 1990), um die an der Spermienreifung beteiligten Sekretproteine des Menschen zu identifizieren. Die dabei entdeckten Proteine bieten sich möglicherweise als Ziel einer gesteuerten Immunkontrazeption beim Mann an.

### **I.10 Die epididymalen Sekretproteine**

Die ersten in der epididymalen Flüssigkeit der Ratte entdeckten Sekretproteine gehörten zu einem Proteinkomplex, der im nativen Polyacrylamidgel schneller als Albumin läuft. Entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in Bezug auf Albumin (A) wurden diese als Protein B,C,D und E bezeichnet (Cameo und Blaquier, 1976). Der ausschließlich im Caput sezernierte Proteinkomplex B/C besteht aus zwei Produkten eines Gens, die sich auf Proteinebene nur durch drei Aminosäuren am N-Terminus unterscheiden. Beide Proteine sind Mitglieder der Lipocalin-Familie und zeigen Bindungsvermögen für Retinolsäure. Nach der Nomenklatur für Retinoid-bindende Proteine (RBPs) wurde das B/C-Protein in „Extracellular Retinoic Acid Binding Protein“ (E-RABP, Newcomer, 1995) umbenannt. Der Proteinkomplex D/E, auch als Acidic Epididymal Glycoprotein (AEG) bezeichnet, besteht

ebenfalls aus zwei fast identischen Proteinen mit unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen (Brooks et al., 1986a,b). Die Proteine des D/E-Komplexes gehören der Familie der CRISP-Proteine an (CRISP= Cysteine Rich Secretory Protein). Obwohl es gelang, aus dem menschlichen Nebenhoden ein dem AEG-verwandtes Genprodukt zu klonieren (Hayashi et al., 1996), konnte ein E-RABP-Homologes beim Menschen bisher nicht nachgewiesen werden. Trotz der prominenten Expression der Proteinkomplexe B/C und D/E bei Nagern, zeigt sich beim Menschen ein völlig anderes Muster der epididymalen Proteinsekretion. Daher ist die Bedeutung des Nagernebenhodens als Modell für die humane Situation kritisch einzuschätzen. Durch eine differentielle Genexpressionsanalyse konnten Anfang der neunziger Jahre die mRNAs für die epididymalen Sekretproteine HE1 bis HE5 (HE; Humanes Epididymisprodukt) des Menschen kloniert werden. Durch Vergleich mit den im Hundenebenhoden differentiiell exprimierten Genprodukten wurden weitere humane, epididymis-spezifische Proteine identifiziert (Ivell et al., 1998), so daß zum jetzigen Zeitpunkt von 12 HEs bzw. CEs (CE; Canines Epididymisprodukt) ausgegangen werden kann.

#### *HE1:*

Bei HE1, dessen mRNA mehr als 2% der humanen, epididymalen mRNA ausmacht, handelt es sich um ein bei allen untersuchten Säugern vorkommendes, hochkonserviertes Sekretprotein, das eine Immunglobulin-Domäne besitzt und starke Ähnlichkeit zum Hauptallergen der Staubmilbe, Der f 2, aufweist (Kirchhoff et al., 1996). HE1 ist ein Cholesteroltransportprotein und wurde kürzlich als das zweite Niemann-Pick-Disease Typ C-Gen identifiziert (Naureckiene et al., 2000).

#### *HE2:*

Das HE2-Gen kodiert für eine Familie kleiner Sekretproteine des distalen Caput, von denen einige eine Homologie zu den antimikrobiellen  $\beta$ -Defensinen aufweisen. Das HE2-Gen ist auf dem kurzen p-Arm von Chromosom 8 in der Nähe des humanen Defensin-Genclusters lokalisiert (Jia et al., 2001).

#### *HE3:*

In der HE3-Genfamilie werden die beiden ribonukleaseähnlichen Sekretproteine HE3 $\alpha$ ,  $\beta$  sowie das intronlose Pseudogen HE3 $\gamma$  zusammengefaßt (Kirchhoff et al. 1994).



*HE4:*

HE 4 ist ein Sekretprotein mit zwei WAP-Domänen (WAP= whey acidic protein), das dem Proteinase-Inhibitor HUSI I/ SLPI (SLPI= Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor) ähnelt. HUSI I/SLPI und HE4 sind in räumlicher Nähe auf dem menschlichen Chromosom 20 lokalisiert, weshalb für beide Gene ein gemeinsamer evolutiver Ursprung postuliert werden kann (Kirchhoff et al., 1991; Kirchhoff, 1999). Das TOP-Protein (Trout Ovulatory Protein) aus der Coelomflüssigkeit der Regenbogenforelle zeigt von allen bisher bekannten Proteinen die höchste Homologie zu HE4 und ist ein antimikrobiell aktives Protein (Coffman et al., 2000). Bisher ist weder geklärt, ob HE4 antimikrobiell aktiv ist oder in Analogie zu SLPI/HUSI I als Proteinase-Inhibitor fungiert.

*HE5:*

HE5, dessen cDNA mit der des Leukozytenantigens CD52 übereinstimmt, ist ein hochglykosyliertes Dodekapeptid mit Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) und entspricht dem CD52 bis auf deutliche Unterschiede in der Glykostruktur und dem Lipidanker (Schröter et al., 1999). Antispermien-Antikörper aus dem Blutserum mancher immunologisch infertiler Frauen reagieren mit Glykotope des HE5 (Diekman et al., 1999; Diekman et al., 2000), welches auch als Haupttreifungsantigen bezeichnet wird (Kirchhoff, 1996).

*HE12:*

Das HE12-Protein besitzt zwei Fibronectin TypII-Module, die möglicherweise für seine Bindung an Membranen verantwortlich sind. Es kann sowohl im Seminalplasma als auch auf der Oberfläche ejakulierter Spermien nachgewiesen werden (Saalman et al., 2001).

Die durch epididymale Sekrete bedingten Veränderungen der Membraneigenschaften der Spermienoberfläche beinhalten die Integration und Adsorption epididymaler Sekretproteine und Cholesterol an bzw. in die Plasmamembran sowie die enzymatische Modifizierung membranständiger Makromoleküle durch Proteasen, hydrolytische Glykosidasen oder Glykosyltransferasen (Brooks, 1983 ; Jones, 1989). In der Cauda, der Hauptspeicherregion des Nebenhodens, dienen die Sekrete der Stabilisierung und der Blockierung der Spermien-Motilität. Im weiblichen Genitaltrakt findet dann die sogenannte Kapazitation statt, bei der diese blockierenden Sekrete von der Spermienoberfläche entfernt oder modifiziert werden. Dadurch wird die Spermienmembran sensibilisiert und kann schließlich die Akrosomreaktion vollziehen (Yanagimachi, 1994). Die genaue Funktion der meisten bisher bekannten

Sekretproteine ist jedoch noch ungeklärt. Bei der Ratte macht der Anteil an Sekretproteinen nur etwa 15% der Gesamtproteinsynthese des Nebenhodens aus, wobei keines dieser Proteine mengenmäßig dominiert (Brooks, 1981). Neben der Fähigkeit, die Zona pellucida der Eizelle zu erkennen, zu binden und mit dem Oolemma zu verschmelzen, erwerben die Spermatozoen im intraluminalen Nebenhodenmilieu auch die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung (Cooper, 1986). Das Milieu der Cauda unterbindet jedoch die Eigenbewegung der Spermien (Brooks, 1983). Erst nach Vermischung mit fruktosehaltigem Samenblasensekret während der Ejakulation nehmen sie ihre Eigenbewegung auf (Holstein, 1969).

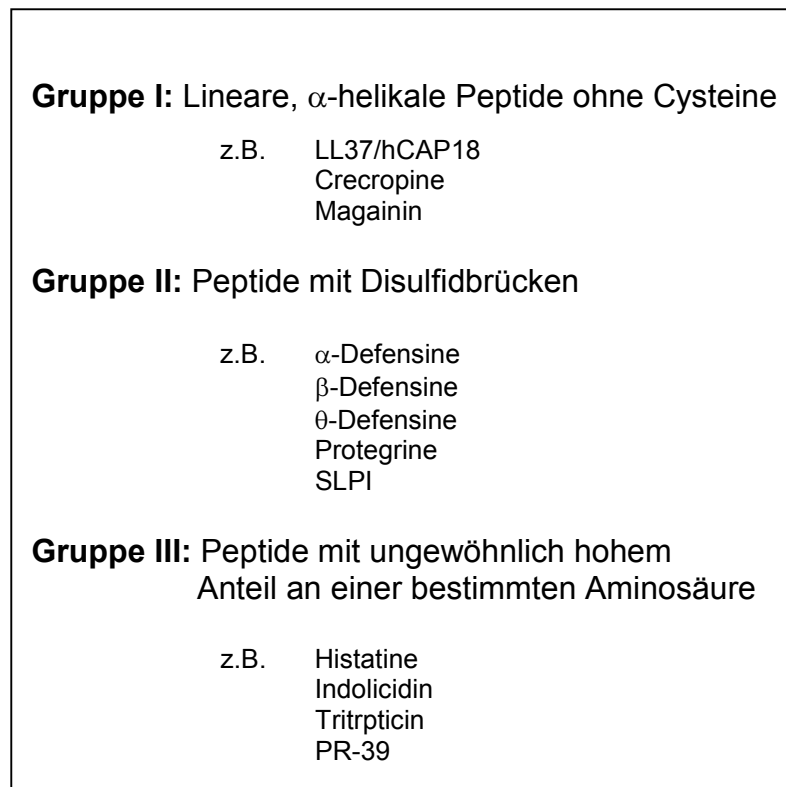
### **I.11 Die Blut-Epididymis-Barriere und ihre Bedeutung für die immunologische Situation des Nebenhodens**

Die Spermienproduktion beginnt mit Einsetzen der Pubertät, nachdem das Immunsystem eine Toleranz für Selbst-Antigene entwickelt hat (Vitale et al., 1973). Bereits die Spermatozyten der Pachytänphase werden vom Immunsystem als fremd erkannt und lösen Auto- und Allo-Immunität aus (Tung et al., 1978). Um die genomisch-neukombinierten Spermien vor den Mediatoren des erworbenen humoralen und adaptiven Immunsystems zu schützen, bilden adluminal *tight junctions* zwischen den Prinzipalzellen eine Blut-Epididymis Barriere (Cyr et al., 1999; Levy und Robaire, 1999). Ein durch Entzündung oder Vasektomie verursachter Gewebeschaden kann dem erworbenen, klonalen Immunsystem Zugang zu den Spermien ermöglichen, so daß es zur Ausbildung von Anti-Spermien-Antikörpern und damit verbundener immunologischer Infertilität beim Mann kommen kann. Obwohl aus diesem Grund das klassische, erworbene Immunsystem im intakten Gewebe keinen Zugang zum intraluminalen Milieu des Nebenhodens hat, sind epididymale Infektionen verhältnismäßig selten (Drotman, 1983, Pollänen und Cooper, 1994). Es wurde sogar festgestellt, daß epididymale Zysten und Spermatocele sich so gut wie niemals entzünden, während entzündete Zysten in der Niere, dem ontogenetisch verwandtesten Gewebe, relativ häufig vorkommen (Günaydin et al., 1995). Dieser trotz Abwesenheit des erworbenen Immunsystems vorhandene Infektionsschutz des epididymalen Gewebes wird aller Wahrscheinlichkeit nach von Mediatoren der innate Abwehr gewährleistet. Die über den alternativen Weg aktivierte Komplementkaskade ist ein typischer Bestandteil der angeborenen Immunität. Die terminalen Komplementkomponenten C5b bis C9 schädigen Bakterien durch Porenbildung in deren Membranen (Membranangreifender Komplex)(Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991; Esser, 1991). Das Komplementsystem ist jedoch aufgrund des massiven

Vorkommens an komplement-inhibierenden Faktoren im Seminalplasma und insbesondere in der epididymalen Flüssigkeit in seinem Leistungsvermögen stark eingeschränkt (Tarter und Alexander, 1984; Chowdhury et al., 1996; McDonald und Nelsestuen, 1997; Nonaka et al., 2001). Ob auch das in Reproduktionsorganen häufige Clusterin komplementregulatorische Aktivität besitzt, ist umstritten (Ibrahim et al., 1999; Hochgrebe et al. 1999). Es kann daher vermutet werden, daß vor allem andere, direkt antimikrobiell wirksame Faktoren an der epithelialen Immunabwehr des Nebenhodengewebes beteiligt sind.

### I.12 Die Bedeutung antimikrobieller Peptide für die epitheliale Abwehr

Seit Mitte der neunziger Jahre sind vor allem antimikrobielle Peptide als Mediatoren der innaten Abwehr erkannt worden. Die weitaus meisten antimikrobiellen Peptide sind amphipathische Moleküle mit kationischer Gesamtladung. Neben diesem Charakteristikum unterscheiden sich die antimikrobiellen Peptide verschiedener Familien in ihrer Größe, Aminosäuresequenz sowie in bestimmten strukturellen Motiven (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Klassifizierung der antimikrobiellen Peptide anhand von Strukturmotiven (nach Bowman, H.G., 1995)

Die Genfamilien der antimikrobiellen Peptide sind als Cluster im Genom angelegt und bei verschiedenen Säugerspezies auf syntenen chromosomalen Abschnitten lokalisiert. Das primäre Translationsprodukt ist in der Regel ein Prepropeptid, welches aus einer N-terminalen ER-dirigierenden Signalsequenz, einem Prosegment und einem C-terminalen, kationischen Peptid besteht, welches erst nach Abspaltung des Prosegments seine volle antimikrobielle Aktivität entfaltet. Sehr oft besitzt das Prosegment eine polare, meist anionische Ladung. Es wird vermutet, dass es an der korrekten Faltung des C-Terminus, dem intrazellulären Transport oder der Inhibierung der Aktivität des reifen Peptids beteiligt ist. Das Prosegment wird während späterer Stadien der intrazellulären Prozessierung oder nach Sekretion in den extrazellulären Raum abgespalten. Antimikrobielle Peptide werden entweder als Propeptid oder als reifes C-terminales Peptid gespeichert (Bals, 2000). Neben den klassischen, kationisch geladenen, antimikrobiellen Peptiden existieren auch solche mit negativer Gesamtladung bei neutralem pH (Brogden et al., 1999). In menschlichen Epithelien sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine, das einzige humane Cathelicidin hCAP-18/LL-37 und die Histatine von Bedeutung (Bals, 2000). Die Genexpression antimikrobieller Peptide wird vermutlich durch die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR= Toll-Like Receptors) und CD14 vermittelt (Bowman, 2000).

### *Defensine*

Die Defensine der Säuger sind kleine, kationische, relativ argininreiche, nichtglykosylierte Peptide mit einem Molekulargewicht von 3,5 bis 4,5 Kilodalton (kDa). Sie besitzen sechs Cysteine, die durch drei charakteristische Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Nach dem Abstand der Cysteine, dem Muster der Disulfidbrückenverknüpfung und der gesamten Molekularstruktur teilt man die Defensine in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine ein. Die  $\alpha$ -Defensine sind ca. 29 bis 35 Aminosäuren lang, die Cysteine sind im Muster 1-6, 2-5, 3-4 miteinander verknüpft und stabilisieren dadurch eine dreisträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur mit kationischer  $\beta$ -Haarnadelschleife. Beim Menschen sind bis heute sechs  $\alpha$ -Defensine identifiziert worden (Bals, R., 2000). Während die „*Human Neutrophil Peptides*“ (HNP1 bis 4) in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten vorkommen, kommen die beiden übrigen  $\alpha$ -Defensine HD-5 und 6 in den Paneth-Zellen des Dünndarms und Epithelzellen des weiblichen Urogenitalsystems vor (Quayle et al., 1998). Die  $\beta$ -Defensine sind zwischen 36 und 42 Aminosäuren lang und besitzen ein 1-5, 2-4, 3-6-Disulfidbrückenmuster. Ihre Konformation entspricht trotz abweichender Cystein-Verpaarung der dreisträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur der  $\alpha$ -Defensine. Im Unterschied zu den  $\alpha$ -Defensinen werden  $\beta$ -Defensine ausschließlich von

Epithelzellen produziert. Beim Menschen sind bisher vier  $\beta$ -Defensine bekannt (hBD-1 bis 4). Die aus Rhesusaffen-Neutrophilen isolierten  $\theta$ -Defensine besitzen hingegen eine Ringstruktur mit zusätzlichen Disulfidbrücken innerhalb des Rings. Die Ringstruktur der  $\theta$ -Defensine entsteht durch posttranslationale Ligation zweier trunkierter  $\alpha$ -Defensine nach einem bisher ungeklärten Mechanismus (Tang et al., 1999). Möglicherweise liegt hier eine Art Intein-vermittelten Proteinspleißens vor (Perler et al., 1997a,b). Da alle Defensin-Gene des Menschen auf Chromosom 8 in der Nähe des Segments p23 lokalisiert sind (Bals, 2000), wird für die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine ein gemeinsamer evolutiver Ursprung angenommen. Die  $\beta$ -Defensine hBD-1 und 4 (Valore et al., 1998; Garcia et al., 2001) sowie das Cathelicidin hCAP-18 (Malm et al., 2000) konnten im Nebenhoden nachgewiesen werden.

### *Cathelicidine*

Peptid-Antibiotika der Cathelicidin-Familie besitzen eine hochkonservierte Signalsequenz und Pro-Region („Cathelin“=Cathepsin L-Inhibitor), zeigen jedoch eine starke Heterogenität in ihrer C-terminalen Domäne, dem späteren reifen Peptid. Die Größe des reifen Peptids kann zwischen 12 und 80 oder mehr Aminosäuren variieren (Zanetti et al., 1995). Beim Menschen ist nur ein einziges Cathelicidin bekannt (LL-37/hCAP-18). Sein Gen besteht aus vier Exons und liegt auf Chromosom 3 (Malm et al., 2000).

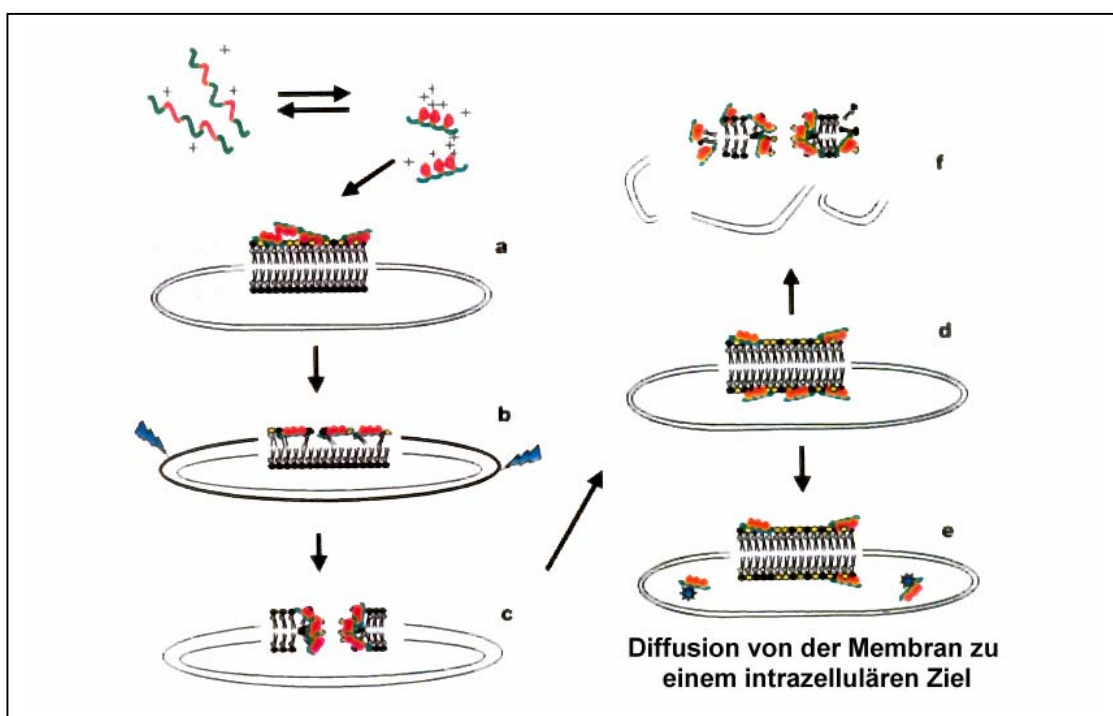
### *Histatine*

Die Histatine sind eine Familie Histidin-reicher Peptide, die in der humanen Speicheldrüse exprimiert werden (Oppenheim et al., 1988). Die Gene für die Histatine 1 bis 3 bestehen aus vielen Exons und sind auf Chromosom 4 Segment q13 lokalisiert. Histatine zeigen insbesondere fungizide Wirkung.

### *Wirkungsmechanismus antimikrobieller Peptide*

Antimikrobielle Peptide wie Defensine, Cathelicidine und Histatine zeigen ein breites Wirkspektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Pilze und hüllentragende Viren. Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) der Peptide liegt im Bereich von 0,1 bis 100  $\mu\text{g/ml}$  (Bals, 2000). In Analogie zu den terminalen Komplementkomponenten greifen antimikrobielle Peptide die bakteriellen Plasmamembranen an. Ein Modell, das die Aktivität der meisten antimikrobiellen Peptide erklärt, ist das Shai-Matsuzaki-Huang (SMH)-Modell (Zasloff, 2002) (Abbildung 4). Aufgrund seiner kationischen Gesamtladung wird das antimikrobielle Peptid

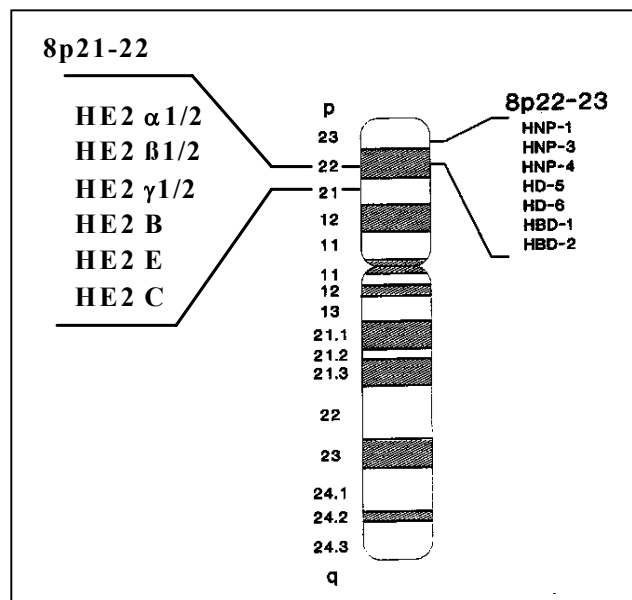
elektrostatisch von anionischen Membranlipiden der bakteriellen Zellmembran angezogen. Die Peptidmoleküle “docken“ teppichartig auf der Membranoberfläche an (4a). Mithilfe ihrer hydrophoben Struktur motive inserieren sie in die Membran und dünnen dadurch die äußere Lipidschicht des „*Bilayers*“ aus. Die Oberfläche der äußeren Lipidschicht vergrößert sich relativ zur inneren, was zu einer Spannung (4b; Blitze) innerhalb der Lipiddoppelschicht führt (4b). Es kommt schließlich zu einem Phasenübergang, der in der Ausbildung transients, membrandurchspannender Poren mündet (4c). Die Poren vermitteln einen Transport von Lipiden und Peptiden zur inneren Lipidschicht (4d), von wo aus die Peptide zu intrazellulären Zielen diffundieren (4e), oder die Membran zu Fragmenten zersprengen können (4f). Die Membrandisruption führt zum Verlust der zellulären Homöostase sowie zur Zerstörung des Membranpotentials. Hierdurch wird der unmittelbare Zelltod herbeigeführt. Interessanterweise sind die cholesterinhaltigen, eukaryontischen Membranen durch antimikrobielle Peptide nicht so leicht zerstörbar wie bakterielle, cardiolipinhaltige Membranen (Tytler et al., 1995; Hristova et al., 1997).



**Abbildung 4:** Shai-Matsuzaki-Huang-Modell des Wirkungsmechanismus eines antimikrobiellen Peptids (nach Zasloff, M.,2002)

### I.13 Die Verwandtschaft des HE2-Gens zu den $\beta$ -Defensin-Genen

Die HE2 cDNA-Klonfamilie repräsentiert eine sehr häufige mRNA des humanen Nebenhodens, die im Epithel des proximalen Nebenhodenganges, nicht aber in den Ductuli efferentes nachgewiesen werden kann (Krull et al., 1993). HE2 stellt die zweithäufigste der nebenhodenspezifischen mRNAs dar (Kirchhoff et al., 1990; Osterhoff et al., 1994). Die putativen Translationsprodukte mehrerer alternativer Spleißvarianten von HE2 zeigen den  $\beta$ -Defensin-Konsensus, was auf eine evolutive Verwandtschaft des HE2-Gens zu den  $\beta$ -Defensinen schließen läßt (Fröhlich et al., 2000; Hamil et al., 2001). Auch die Lokalisation des HE2-Gens in enger Nachbarschaft zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensin-Genen auf dem kurzen p-Arm von Chromosom 8 des Menschen (Abbildung 5) könnte ein Hinweis auf evolutive Verwandtschaft sein.



**Abbildung 5:** Cytogenetisches Ideogramm von Chromosom 8 des Menschen (modifiziert nach Schröder, 1999)

### **I.14 Zielsetzung der Arbeit**

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war der Nachweis und die Charakterisierung der HE2-Genprodukte auf Proteinebene. Ausgangspunkt der Untersuchungen war dabei die Herstellung von polyklonalen Antiseren, die gegen bestimmte Oligopeptid-Abschnitte aus den putativen HE2-Aminosäuresequenzen hergestellt wurden, um auf Proteinebene eine Diskriminierung zwischen den HE2-Varianten zu ermöglichen. Voraussetzung für erfolgreiche Western-Blot-Analysen war dabei zunächst die Ausarbeitung einer geeigneten Extraktionsmethode für HE2-Proteine. Da sich seltenere Proteine aus Seminalplasma generell nur schwer aufreinigen lassen, sollten rekombinant exprimierte Formen von HE2 zur Funktionsanalyse herangezogen werden. Aufgrund der in dieser Einleitung angestellten Überlegungen wurde der Schwerpunkt der funktionellen Studien auf die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener HE2-Varianten gelegt.



## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Acetonitril	Roth
Acrylamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma
Amyloseharz	New England Biolabs, Schwalb.
N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (L-BAPNA)	ICN-Biomedicals, Eschwege
Biotin-Maleimid	Sigma
$\alpha$ -Biotin-Antikörperkonjugat	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Casein	Sigma
$\alpha$ -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure	Sigma
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Eisen-II-sulfat	Sigma
Eisessig (96%)	Merck
Epoxy-aktivierte Sepharose 6B	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Merck
Ficoll	Sigma
FCS	Biochrom, Berlin
Formamid	Gibco-BRL, Karlsruhe
Gelatine	Sigma
Guanidiniumchlorid	Merck
Harnstoff	Sigma
Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma

Imidazol	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kupfersulfat	Fluka, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Roth
MetaPhor-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Methanol	Merck
Methylen-bis-acrylamid	Sigma
Methylgrün	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdeoxycholat	Merck
Natriumdisulfit	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumthiosulfat	Sigma
Nonidet P-40	Sigma
PCR-Wasser	Roth
Penicillin G	Sigma
Peroxidase- $\alpha$ -Kaninchen Antikörperkonjugat	Sigma
Petrischalen	Greiner GmbH, Nürtingen
Polyvinylidendifluorid-Membran 0,45 $\mu$ m	Millipore GmbH, Eschborn
Ponceau S	Sigma
Protein A – Agarose	Boehringer-Mannheim GmbH
Silbernitrat	Merck
Streptavidin	DAKO, Hamburg
Streptomycin	Sigma
n-Tributylphosphat	Sigma
Tricin	ICN-Biomedicals
Trifluoressigsäure	Sigma
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Sigma
Triton-X-100	Sigma

Tween 20	Sigma
Xylencyanol FF	Sigma
Zinkchlorid	Fluka

### 1.2 Medien

Luria-Bertani-(LB)-Medium:

20g LB-Pulver (Gibco BRL) auf 1 l

falls erforderlich wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Agarplatten enthielten 15g Agar (Bacto-Agar, Difco Laboratories)/ 1 Medium

Rich Medium:

10g Trypton

5g Hefeextrakt

5g NaCl

2g Glukose

nach Autoklavieren steriles Ampicillin auf 100 µg/ml hinzufügen

Grace's Insect Medium (Invitrogen)

TNM-FH-Medium: Grace's Insektenzell-Medium (Invitrogen) mit 10% FCS (Biochrom)

Ex-Cell-400 Serum-freies Medium (JRH-Biosciences)

### 1.3 Puffer und Lösungen

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,4

1mM EDTA, pH 8,0

10x TBE-Puffer:

1.34 M TRIS

0.45 M Borsäure

25 mM EDTA

pH 8.5

10x TAE-Puffer:

48,4 g TRIS

11,42 ml Eisessig

20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

10x DNA-Ladepuffer:

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol FF

15% Ficoll

5x Ligasepuffer I:

50 mM TRIS-HCl, pH 7,6

50 mM MgCl<sub>2</sub>

5x Ligasepuffer II:

2,5 mM rATP

50 mM DTT

TSS-Puffer:

2g PEG 4000 (Merck 9727)

1 ml 1M MgCl<sub>2</sub>

1ml DMSO

ad 20 ml mit LB-Medium auffüllen, steril filtrieren, bei +4°C lagern

10 x Blockierungs-Stammlösung:

5% Blockierungsreagenz (Boehringer) in

0.1M Maleinsäure-NaOH, pH 7.5

0.15M NaCl

Blockierungslösung:

45 ml 1x TBS

5 ml 10x Block-Stammlösung

Antikörperverdünnungspuffer:

49 ml 1x TBST

1ml 10x Block-Stammlösung

10x TBS-Puffer:

200 mM TRIS-HCl pH 7,6

1,37 M NaCl

TBST-Puffer:

1x TBS

0,05% Tween 20

2x SDS-PAGE-Ladepuffer:

2,4 ml 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8

2 ml 20% SDS

0,5 ml 1% Bromphenolblau

2 ml 100% Glycerol

2,1 ml destilliertes Wasser.

1 ml β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

SDS-PAGE-Laufpuffer:

25 mM TRIS-HCl, pH 6.8

250 mM Glycin

0,1% SDS

SDS-PAGE-Trenngelpuffer:

1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer:

1 M TRIS-HCl, pH 6,8

TRICIN-PAGE-Gelpuffer :

3M TRIS-HCl, pH 8.45

0,3% SDS

TRICIN-PAGE-Anodenpuffer :

200mM TRIS-HCl, pH 8.9

TRICIN-PAGE-Kathodenpuffer :

100 mM TRIS-HCl, pH 8.25

100 mM TRICIN

0.1% SDS

TRICIN-PAGE-Acrylamid-Stammlösung mit 2.7% Crosslinker (Methylenbisacrylamid):

30 g Acrylamid

0.8 g Bisacrylamid

1g BIORAD Mixed Bed Resin

mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen

TRICIN-PAGE-Acrylamid-Stammlösung mit 6% Crosslinker :

28.2g Acrylamid

1.8g Bisacrylamid

1g BIORAD Mixed Bed Resin

mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

CAU-PAGE-Laufpuffer :

5% Essigsäure

CAU-PAGE-Gel (12%) :

3.2 g Harnstoff

4.25 ml 30 :0.8 Acrylamid

2.4 ml Wasser

1.33 ml 43 %(v/v) Essigsäure

200 µl APS

30 µl TEMED

CAU-PAGE-Blotting-Puffer :

5% Essigsäure

10% Methanol

Coomassie-Färbelösung:

0,25 % Coomassie Brilliant Blue R

50 % (v/v) Ethanol

10% (v/v) Eisessig

40% (v/v) H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung:

50 % (v/v) Ethanol

10% (v/v) Eisessig

40% (v/v) H<sub>2</sub>O

Semidry-Blot-Puffer für stark basische Proteine (nach Szewczyk und Kozloff, 1985):

192 mM TRIS

25 mM Ethanolamin

20% Methanol

0,375 g SDS

2,93 g Glycin

MBP-Säulen-Puffer:

20 mM TRIS-HCl, pH 7,4

200 mM NaCl

1 mM EDTA

RIPA-Puffer:

0,1% SDS

1% Triton-X-100

1% Natrium-Deoxycholat

150 mM NaCl

10 mM TRIS-HCl, pH 7,4

1mM EDTA

PBS-Puffer (PBS; Phosphate Buffered Saline):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

mit HCl auf pH 7.4 titrieren

### 1.4 Chemosynthetische Peptide und Anti-Peptid-Antiseren

Die Peptide werden an der Festphase synthetisiert (Dr. Markus Koppitz, SCHERING AG, Berlin) und haben folgende Sequenzen: P1, H<sub>2</sub>N-GELRERAPGQGTNGC-COOH; P2, H<sub>2</sub>N-KRDLLPPRTPPYQVC-COOH; P3, H<sub>2</sub>N-ISHQEARGPSFKICVGFGLGPRWARGCSTGN-COOH (entspricht der HE2 $\alpha$ 1 Isoform, Osterhoff et al. 1994); P4, H<sub>2</sub>N-CVSNTDEEGKEKPEM-COOH; P5, H<sub>2</sub>N-GDVPLGIRNTIC-COOH. Die Peptide P1 und P2 werden jeweils mit einem künstlichen, C-terminalen Cystein-Rest für die spätere Kopplung synthetisiert. P4 und P5 enthalten je einen endogenen C-terminalen Cystein-Rest. Bei P3 wird der N-terminale Isoleucin-Rest für die Kopplung benutzt. Zur Immunisierung werden die Peptide als Haptene an den Carrier Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH, Sigma, Deisenhofen) gekoppelt. Pro Peptid werden drei Kaninchen immunisiert (Pineda-Antikörper-Service, Berlin) und die Seren nach 60, 90 und 125 Tagen getestet. Eine monospezifische



Reinigung der Antikörperfraktion erfolgt über Affinitätschromatographie der Seren an der jeweiligen Peptid-Sepharose, die durch Kopplung der Peptide an Epoxy-aktivierte Sepharose 6B (Amersham-Pharmacia) hergestellt wird.

### 1.5 E. coli-Wirtsstämme

DH5 $\alpha$  (Invitrogen)

K12 TB1 (NEB)

ER2508 (NEB)

CAG 597 (NEB)

### 1.6 Lepidopteren-Zelllinien

SF-9 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen)

High Five (*Trichoplusia ni*) (Invitrogen)

### 1.7 Vektoren

pMal c2x (NEB)

pMal p2x (NEB)

pMelBacB (Invitrogen)

pGEM T Easy (Promega)

### 1.8 Geräte

Brutschränke Typ B-12; Typ B-6120 (Hereaus)

Ultrazentrifuge J2-21; Rotor: JA-20 (Beckman)

Kühlzentrifuge Megafuge 2.0 R (Hereaus)

Waagen (Sartorius minisart und Sartorius research)

Vortexer (Janke und Kunkel)

Vortex-Evaporator (HBI, Haake Buchler)

Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf GmbH, Hamburg)

Rotator (Herolab GmbH, Wiesloch)

Transilluminator (Herolab)

Magnetrührer Ikamag Ret-G (Janke und Kunkel)

Wasserbäder (GFL)

Imago Compact Imaging System

Minigel-Elektrophoresekammern (Biometra)

Agarosegel-Elektrophoresekammern (Owl Separation Systems)

FPLC-Anlage (Pharmacia-LKB):

2249 Gradienten Pumpe

2141 variabler Wellenlängen Monitor

2211 superrac Fraktionskollektor

HPLC-Anlage System Gold (Beckman):

125 Solvent Module

166 Detektor

2156 Solvent Conditioner (Pharmacia-LKB)

LI-COR<sup>®</sup>-DNA-Sequencer (MWG-Biotech, Ebersberg)

Kryotom 2800 Frigocut (Reichert-Jung)

Multicycler PTC-200 (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)

PCR-Sprint (Hybaid, Heidelberg)

Filmmaterial Kodak X-O-MAT AR

Photometer Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech)

Mikroliter-Pipetten Pipetman (Gilson)

Fluoreszenzmikroskop Epiphot; Filterblöcke B-2A und G-2A(Nikon)

Lichtmikroskop Diaphot (Nikon)

Mikro-Dismembrator (B.Braun, Biotech International, Melsungen)

Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg)

ELISA-Reader Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac)

Sterilbänke

ELB 2472 (Heraeus)

Hera Safe HS-12

Hera Safe HS-18

Ultraschallgerät Sonifier B-12 Cell Disruptor (Branson Sonic Power Company, Danbury)

### 1.9 Chromatographie-Harze und Säulen

Amyloseharz (NEB)

QAE-Sephadex A25 (Pharmacia)

Q-Sepharose FF (Pharmacia)

AffiGel Heparin (Biorad)

Oasis MAX (Waters)

Chromabond SA (Macherey und Nagel)

Nucleobond 120-5-C4 (Macherey und Nagel)

CM Macroprep (BioRad)

Superose 12 (Pharmacia)

BIORAD Mixed Bed Resin AG501-X6

### 1.10 Menschliche und tierische Materialien

#### *Gewebe*

Menschliches Nebenhodengewebe stammte aus Orchidektomie-Operationen an Prostatakarzinom-Patienten. Es wurde jeweils unmittelbar nach der Operation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. In allen Fällen war in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Helsinki Deklaration die Zustimmung der Patienten gewährleistet.

Ratten-Nebenhodengewebe wurde aus frisch getöteten Tieren präpariert.

#### *Epididymale Flüssigkeit*

Humane epididymale Flüssigkeit wurde Kannulierung und retrograde Perfusion mehrerer Nebenhodengewebe gewonnen und freundlicherweise von Dr. Ching-Hei Yeung (Institut für Reproduktionsmedizin, Münster) zur Verfügung gestellt.

#### *Ejakulat*

Für die Studien mit Ejakulaten junger, gesunder Freiwilliger lag die Erlaubnis der Ethikkommission der Freien Hansestadt Hamburg vor.

## **2. Methoden**

### **2.1 Fällen von Nukleinsäuren**

(Sambrook et al., 1989)

Nukleinsäuren lassen sich aus wässriger Lösung durch Zugabe von Natriumacetat und absolutem Ethanol ausfällen. Durch Zentrifugation werden die ausgefällten Nukleinsäuren pelletiert und nach Entfernung des Überstandes mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Pellet getrocknet und in kleinem Volumen TE-Puffer oder Wasser aufgenommen. Zur Nukleinsäurelösung werden, wenn nicht anders angegeben, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2-6,0 und ein 2- bis 2,5-faches Volumen abs. Ethanol (-20°C) zupipettiert und gut gemischt. Die Nukleinsäuren werden anschließend über Nacht bei -20°C oder je nach Versuchsbeschreibung für einige min bei -70°C oder -80°C gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren werden dann durch Zentrifugation (14000UpM, 30 bis 60 min, 4°C) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 UpM, 5 bis 10 min, 4°C). Nach Abnehmen des Überstandes wird das Pellet getrocknet und in TE-Puffer oder destilliertem Wasser aufgenommen.

### **2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

(Sambrook et al., 1989)

Die Nukleinsäurekonzentration in wässriger Lösung wird im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide. Zur Messung wird jeweils ein Aliquot aus der Probe entnommen, 1:100 in destilliertem Wasser verdünnt und die OD<sub>260</sub> ermittelt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Art der Nukleinsäure wird die Konzentration abgeleitet.

### **2.3 Agarose-Gelelektrophorese**

(Sambrook et al., 1989, modifiziert)

Nukleinsäuremoleküle haben im wässrigen Milieu bei pH 7,0 eine auf die Phosphatgruppen ihres Phosphodiesterückens zurückzuführende negative Nettoladung. Daher wandern sie nach Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zur Anode. In einer Agarose-Gelmatrix

wandern die Moleküle abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell und werden so aufgetrennt. Mittels des interkalierenden Phenylphenanthridiniumfarbstoffs Ethidiumbromid können die Nukleinsäuren durch Rotfluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die zur Herstellung des Gels benötigte Menge Agarose (1,0-1,2%) wird in einem Weithals-Erlenmeyerkolben in einfach konzentriertem TAE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung werden zu je 30 ml Agaroselösung 1 bis 1,5 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben und das Gel zum Aushärten in die Gießvorrichtung mit dem bereits eingesteckten Kamm gegossen. Damit die Proben beim Einpipettieren in die Geltaschen nicht aufschwimmen, werden sie mit 1/10 Volumen eines 10x DNA-Ladepuffers zum Beschweren versetzt. Als DNA-Längenstandards werden die 1Kb DNA-Leiter und die 100bp-DNA-Leiter (GIBCO-BRL) verwendet. Die Elektrophorese erfolgt für 1 bis 2 h bei 60 bis 100 V. Nach dem Lauf werden die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### 2.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose (Genecraft, Münster)

Die Elution von DNA aus einem Agarosegelstück erfolgt mit Hilfe des Glasmilch-basierten, *DNA-Purification-Kits* (Genecraft) nach den Angaben des Herstellers. Das Verfahren beruht auf der Verflüssigung der Agarose mit hochmolarer Natriumiodidlösung bei 55°C und der anschließenden Bindung der nun in Lösung befindlichen DNA an Silikatreste der Glasmilch. Die Menge der jeweiligen isolierten DNA-Fragmente wird durch Auftrag eines Aliquots auf ein 1,2%iges TAE-Minigel abgeschätzt.

### 2.5 RNA-Extraktion aus Geweben

Die in Alufolie gewickelten, tiefgefrorenen (-80°C) Gewebeproben (humane Epididymis) werden gewogen und dann mit dem Hammer grob zerkleinert, wobei sie zwischenzeitlich immer wieder in flüssigem Stickstoff gekühlt werden müssen, um ein Antauen und damit eine mögliche Aktivierung von RNAsen zu vermeiden. Danach werden sie in mit Stickstoff vorgekühlte Teflon-Steckgefäße gefüllt und im Mikro-Dismembrator (B.Braun, Biotech International, Melsungen) bei 1800 UpM zweimal 50 Sekunden pulverisiert. Dieses Pulver wird dann in einem adäquaten Volumen (2 ml/100µg Gewebe) RNA-Clean-Lösung (RNA-Clean System, AGS GmbH, Heidelberg) aufgenommen und unmittelbar gevortext. Das Homogenisat wird auf Eis gestellt, mit Chloroform versetzt (1/10 des vorhandenen

Volumens), kurz kräftig geschüttelt und dann 5 min auf Eis stehengelassen. Anschließend wird eine halbe Stunde bei 4000 UpM zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg). Die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wird vorsichtig abpipettiert, zur Fällung das gleiche Volumen an eiskaltem Isopropanol zugegeben und geschüttelt. Dieser Ansatz wird für 15 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und nochmals bei 4000 UpM 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann in  $\text{H}_2\text{O}$  (PCR-Qualität) aufgenommen. Die erhaltenen RNA-Extrakte werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.6 Einzelstrang cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese ist das Umschreiben der sehr labilen mRNA-Moleküle in deutlich stabilere und damit handhabbarere DNA-Moleküle. Eine solche, aus Gesamt-RNA gewonnene DNA-Mischung bezeichnet man als cDNA (komplementäre, *complementary* DNA). Pro Reaktionsansatz werden 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA-Extrakt und 1  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)-Primer (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Danach wird die Probe 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Pro Ansatz werden 4  $\mu\text{l}$  5 x Erststrang-Puffer (GIBCO BRL), 2  $\mu\text{l}$  0,1M DTT sowie 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix hinzugefügt. Die Proben werden vorsichtig gemischt, 2 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt und anschließend mit je 1  $\mu\text{l}$  SuperScript II Transkriptase (200U/ $\mu\text{l}$ ; GIBCO BRL) versetzt. Nach 1h Inkubation bei  $42^{\circ}$  werden die Reaktionen durch 15 minütige Denaturierung des Enzyms bei  $70^{\circ}\text{C}$  gestoppt und die Ansätze bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; *Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR ermöglicht die gezielte Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Bei den durchgeführten Reaktionen werden durch Reverse Transkription gewonnene cDNA (RT-PCR) oder insert-tragende Plasmid-DNA als Matritze (*Template*) eingesetzt. Die Synthese der für die PCR benötigten, sequenzspezifischen Oligonukleotide (Primer) erfolgte durch GIBCO-BRL oder MWG-BIOTECH. Ein repräsentativer PCR-Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

1  $\mu\text{l}$  DNA-Template (10-100ng)

1  $\mu\text{l}$  Sense-Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )

- 1 µl Antisense-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl 10mM dNTP-Mix
- 5 µl 10 x Biotherm Taq-Puffer
- 0.2 µl Biotherm Taq-Polymerase (10000U/µl)
- 40.8 µl destilliertes Wasser (PCR-Qualität)

Alle Reagenzien werden in einem Reaktionsgefäß gemischt, wobei die Polymerase zuletzt zugegeben wird. Bis zum Start der Reaktion werden die Proben auf Eis gehalten. Um eventuelle Verunreinigungen der Versuchsansätze erkennen zu können, wird parallel jeweils eine Kontrollreaktion ohne Matritze angesetzt. Die PCR erfolgt in einem Thermocycler (Multicycler PTC-200, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf bzw. PCR-Sprint; Hybaid, Heidelberg). Jedes der durchgeführten PCR-Programme beginnt mit einer 5-minütigen Denaturierung bei 95°C. Im Anschluß daran erfolgen 30 bis 35 Reaktionszyklen folgender Art:

- 1 min 95°C (Denaturierung)
- 1 min AT [°C] (primerspezifische Annealingtemperatur)
- 1 min 72°C (≅ Temperaturoptimum der Taq-Polymerase; Verlängerung der Primer durch die Polymerase (Primer-Extension))

Alle PCR-Programme enden mit einem 10 min Schritt bei 72°C und einer abschließenden Kühlung der Proben auf 4°C. Temperatur und Dauer der Annealing-Schritte richten sich nach den verwendeten Primern und der Länge der angestrebten DNA-Amplicons.

### 2.8 Restriktionsverdau von DNA

(Sambrook et al., 1989)

DNA kann durch TypII-Restriktionsendonukleasen an der für jedes Enzym spezifischen Nukleotidsequenz gespalten werden. Pro Restriktionsansatz werden 500ng Plasmid-DNA mit 1/10 Volumen 10-fach konzentriertem entsprechendem Enzympuffer (vom Hersteller mitgeliefert), 1/10 Volumen Enzym (5-11 Enzymeinheiten/ µg Plasmid-DNA) und der entsprechenden Menge destilliertem Wasser in einem Micro-Eppendorfgefäß zusammenpipettiert. Der Ansatz wird gut gemischt und bei 37°C für mindestens 2 bis 3 h inkubiert. Der Verdau wird durch Einfrieren des Ansatzes bei -20°C gestoppt.

## 2.9 Subklonierung in Vektoren

### *Subklonierung von PCR-Amplifikaten in pGEM TEasy*

PCR-Amplifikate die mit Hilfe der Taq-Polymerase gewonnen wurden, besitzen aufgrund der fehlenden *Proofreading*-Aktivität (3'-5'-Exonukleaseaktivität) der Taq-Polymerase am 5'- und am 3'-Ende jeweils ein Adenin bzw. Thymidin als Überhang. Mit Hilfe dieser sogenannten TA-Überhänge lassen sich PCR-Amplifikate leicht in den pGEM T Easy-Vektor (Promega) subklonieren (zur Ligation s. 2.10). Diese Subklonierung ermöglicht eine Sequenzierung der einklonierten Amplifikate mit einem T7- bzw. SP6-Primer.

### *Subklonierung des HE2 $\alpha$ cDNA-Restriktionsfragments in den bakteriellen Expressionsvektor pMal*

pMal-Vektoren besitzen im Polylinker sowohl eine XmnI- als auch eine weiter 3' gelegene HindIII-Klonierungsschnittstelle, in die das zu exprimierende DNA-Fragment inseriert werden kann. Somit muß zunächst ein 5'-stumpfendiges (*blunt end*), 3'-HindIII-Fragment der reifen HE2 $\alpha$ -cDNA-Sequenz hergestellt werden. Das Insert wird durch PCR-Amplifikation aus epididymaler cDNA gewonnen.

5'-Primer pMal-HE2-1: 5'-TCTCAAGCCAGACATGTG-3', 3'-Primer pMal-HE2-2: 5'-TACTAAAGCTTCTAATTCCCAGTGGAAC-3'. Die mittels PCR amplifizierte HE2 $\alpha$ -cDNA wird am 3'-Ende mit HindIII verdaut und das pMal-Plasmid mit XmnI und HindIII linearisiert. Anschließend werden Insert und linearisiertes Plasmid miteinander ligiert (s. 2.10).

### *Subklonierung der HE2 $\beta$ 1- und HE2C-cDNA-Restriktionsfragmente in den pMelBacB-Vektor*

Die HE2 $\beta$ 1- und HE2C-cDNA Fragmente werden ohne den für das intrinsische Signalpeptid kodierenden Sequenzabschnitt in den pMelBacB-Transfervektor (Invitrogen) subkloniert. Dazu wird jeweils durch PCR ein Insert aus epididymaler cDNA amplifiziert, das an den Enden BamHI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen für die Insertion in den Vektor besitzt. Die dabei benutzten Oligonukleotid-Primer hatten die folgende Sequenz: Sense-Oligomer für HE2 $\beta$ 1 und HE2C: 5'-CAACGGATCCAGACATGAGGCAACGATTGCTC-3'; Antisense-Oligomer für HE2 $\beta$ 1: 5'-CAACAAGCTTAGATCCCAGATCTGCCATCC-3'; Antisense-Oligomer für HE2C: 5'-CAACAAGCTTCATCAGTTTTAATGTAAACAGCAG GCGTC-



3'. Nach BamHI-/HindIII-Restriktionsverdau der Inserts und des pMelBacB-Vektors werden die Inserts in die MCS (*Multiple Cloning Site*; Polylinker) des Vektors einligiert (s. 2.10)

### 2.10 Ligation von DNA

(Sambrook et al., 1989, modifiziert)

In einem Volumen von 5 µl Wasser oder TE werden 100 ng XmnI/HindIII linearisierter Vektor (pMal-Plasmid, NEB) und das zu klonierende 5'-stumpfendige, 3'-HindIII-cDNA-Fragment im möglichst gleichen molaren Verhältnis gemischt. Dann werden 2 µl Ligase-Puffer I (5x) zugefügt, 10 min bei 65°C inkubiert und dann 10 min bis auf RT abgekühlt. Schließlich werden 2 µl Ligase-Puffer II (5x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (0,5 – 2 U/µl, GIBCO-BRL) zugesetzt, zunächst 2h bei RT, dann über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.11 Präparation von transformationskompetenten E.coli-Bakterien

Durch Behandlung mit Erdalkalimetall-Chloriden werden die Bakterien in einen sogenannten Kompetenzzustand überführt, der sie zur Aufnahme von Plasmid-DNA befähigt. 100 ml LB-Flüssigmedium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur von TB1- (NEB) oder DH5α-Zellen angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zelldichte wird mittels eines Spektrophotometers verfolgt. Bei Erreichen einer  $OD_{600} = 0,3 - 0,4$  wird die Kultur auf Eis abgekühlt, in zwei Polypropylenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (4000 UpM, 5 min, 4°C) pelletiert. Nach Dekantieren der Überstände werden die beiden Pellets in je 25 ml kaltem TSS resuspendiert. Die Bakterien-TSS-Suspension wird sofort auf 100 µl - Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Eppendorf-Gefäße und Pipettenspitzen vorkühlen!). Die kompetenten Zellen werden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.12 Transformation von kompetenten E.coli-Bakterien

(Sambrook et al., 1989, modifiziert)

Kompetente Bakterien können isolierte DNA wie z.B. Plasmide inkorporieren (Transformation). Aufgrund einer durch das Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz können die erfolgreich transformierten Zellen durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium selektioniert werden.

Zu einem 100µl-Aliquot kompetenter Zellen werden ca. 50ng Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock von 45 – 60 Sekunden in einem 42°C heißen Wasserbad. Anschließend wird für 1 bis 2 min auf Eis abgekühlt und je Ansatz 500 µl LB-Flüssigmedium zupipettiert. Danach werden die Transformationsansätze zur Induktion der Antibiotikaresistenzen für ca. 1 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach werden jeweils 100-300 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Antibiotika-Agarplatte mit einem abgeflamnten Drigalskispatel ausgestrichen. Nach 5-min Antrocknen (wichtig!) werden die Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Je 20 Kolonien werden anschließend auf eine Masterplatte sowie auf eine IPTG/X-Gal-Platte überimpft und ü.N. bei 37°C inkubiert. Weiß gebliebene Klone auf der IPTG/X-Gal-Platte sind mit hoher Wahrscheinlichkeit mit rekombinantem Plasmid transformiert, während blaue Klone oft auf Transformation mit religiertem Vektor zurückgehen. Auch wenn das Plasmid per se für Blau/Weiß-Selektion ausgelegt ist, müssen hierfür E. coli-Stämme verwendet werden, die das lacZΔM15-Allel besitzen.

*Anmerkung zur Vorgehensweise bei pMal-Konstrukten:*

Aufgrund der Stärke des P<sub>tac</sub>-Promotors des pMal-Vektors können transformierte Klone, die bereits Kontakt mit IPTG hatten, mutierte Plasmide enthalten, die entweder einen Teil oder das ganze Fusionsgen verloren haben oder es nicht mehr länger in ausreichendem Maße exprimieren. Dies gilt insbesondere dann, wenn auf dem rekombinanten pMal-Plasmid ein toxisches (z.B. antimikrobielles) Protein kodiert ist. Daher muß ein vorzeitiger Kontakt der transformierten Klone mit IPTG vermieden werden. Zu diesem Zweck wird jeder zu untersuchende Klon zunächst auf eine ampicillinhaltige Masterplatte und erst dann auf eine parallele IPTG/X-gal-Platte geimpft. Weitergearbeitet wird nur mit den Parallelklonen der Masterplatte.

*Anmerkung zu pMelBac-Konstrukten:*

Es ist hier keine Blau/Weiß-Selektion möglich. Alle Klone, auch die positiven, sind blau. (Grund: Selektionierung rekombinanter Baculoviren im Plaque Assay über lacZ-Expression)

### 2.13 Einfrieren erfolgreich transformierter Klone

Um nicht vor jeder Proteinexpression erneut transformieren zu müssen, können erfolgreich transformierte Klone in ampicillinhaltigem Medium angereichert und schließlich als sogenannter Glycerolstock eingefroren werden. Hierzu werden 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl sterilem Glycerol (87%) in einem Kryoröhrchen gemischt und kurz gevortext. Danach wird das Gemisch in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur erneuten Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um eine ausreichende Menge an Bakterien, die ein Plasmid mit Insert tragen, zu erhalten, werden einzelne rekombinante Kolonien von der Agarplatte gepickt und ü.N. bei  $37^{\circ}\text{C}$  in ampicillinhaltigem LB-Medium ( $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Die Bakterien werden pellettiert und in Lösung 1 (RNaseH haltiger Puffer) resuspendiert. Die Suspension wird mit Lösung 2 (SDS, Natronlauge) aufgeschlossen. Nach Neutralisation mit Lösung 3 (essigsaurer Kaliumacetatlösung) wird erneut bei  $4000\text{ x g}$  abzentrifugiert, um das weiße auspräzipitierte Kaliumdodecylsulfat, die bakterielle genomische DNA und die bakteriellen Zelltrümmer weitgehend zu entfernen. Der Überstand wird über die im Kit gelieferten Säulen aufreingt. Hier werden für eine Präparation von kleinen Mengen (1-5 ml) das QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) und für größere Mengen (10-200 ml) das JETSTAR Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Anleitungen des jeweiligen Herstellers. Die gereinigte Plasmid-DNA wird danach in einem adäquaten Volumen gelöst (Endkonzentration ca.  $1\text{ g DNA}/\mu\text{l}$ ) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.15 DNA-Sequenzierung am LI-COR<sup>®</sup>

Zugrundeliegendes Prinzip ist die Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977). Die zu sequenzierende Doppelstrang-DNA wird zunächst durch Hitzedenaturierung in ihre Einzelstränge überführt, die dann einer DNA-Polymerase als Matritze für die Synthese komplementärer DNA-Kopien dienen. Es wird für jede der vier Purin- und Pyrimidinbasen jeweils ein Reaktionsansatz pipettiert, der neben einem Mix der vier Oligonukleotide und dem sequenzspezifischen Oligonukleotidprimer jeweils eines der vier Didesoxynukleotide enthält. Durch Einbau von Didesoxynukleotiden kommt es zum Kettenabbruch, da den

Didesoxynukleotiden die zur Fortsetzung nötige 3'OH-Gruppe fehlt. Auf diese Weise entstehen in den vier Reaktionsansätzen komplementäre DNA-Stränge unterschiedlicher Länge; alle DNA-Fragmente eines Ansatzes enden dabei mit dem gleichen Didesoxynukleotid. Die unterschiedlich langen Fragmente werden in einem Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand eines Laser-Scannings in einem definierten Bereich im unteren Drittel des Gels detektiert. Aus der Abfolge der DNA-Abbruchfragmente in den vier parallelen Spuren wird die Sequenz direkt abgelesen. Die verwendeten Primer müssen mit IRD-800 markiert sein, um das Laser-Scanning zu ermöglichen.

Für die DNA-Sequenzierung am LICOR<sup>®</sup> wird das SequiTherm EXCEL<sup>®</sup> II KIT für 25-41cm Gele (Biozym) verwendet.

Es wird folgender Prämix angesetzt:

7.2 µl 3.5 x SequiTherm EXCEL II-Sequenzier Puffer

2µl (1-2 pmol) IRD-800 gelabelter Primer

100 bis 250 fmol DNA-Template

mit PCR-Wasser auf 16 µl auffüllen

1 µl SequiTherm EXCEL II-Polymerase (5U/µl)

Für jede zu sequenzierende Matrizen-DNA werden vier 0.5 ml Eppendorf-Caps mit G, A, T oder C beschriftet und auf Eis gestellt. Dann wird pro Eppendorf-Cap 2 µl SequiTherm EXCEL II-LC Terminationsmix G, A, T und C in die entsprechend beschrifteten Eppendorf-Caps gegeben und in jedes der Eppendorf-Caps 4 µl des Prämix pipettiert. Um das Template zu denaturieren werden die Proben je 5 Min auf 95°C erhitzt. Danach folgen 30 Zyklen mit den folgenden Parametern: 30 Sekunden 95°C, 15 Sekunden 50°C, 1 Minute 70°C. Nach Beendigung der Zyklen wird die Reaktion durch Zugabe des Ladepuffers gestoppt. Die fertigen Proben werden 3 bis 5 Min auf  $\geq 70^\circ\text{C}$  erwärmt. Pro Spur werden 1,3 µl der Proben auf das LI-COR-Polyacrylamidgel geladen.

### *Vorbereitung der Gelplatten:*

Die Glasplatten werden mit Leitungswasser vorgespült, mit 10%iger DECONEX<sup>®</sup>-Lösung und Bürste gereinigt und mit Leitungswasser nachgespült. Danach wird mit destilliertem Wasser und anschließend mit Ethanol nachgespült. Die Glasplatten werden mit der Gelseite nach oben auf eine Plastikschiene gelegt und mit Ethanol und Kimwipes<sup>®</sup> staubfrei

trockengewischt. Dann werden auf die Gelseite einer Glasplatte die Spacer (41 cm, 0.25 mm) aufgelegt. Anschließend wird die zweite Platte aufgelegt und die Seitenschiene angelegt. Glasplatten und Seitenschiene werden auf der Tischplatte ausgerichtet und die unterste Schraube der Seitenschiene jeweils angezogen. Dann werden die Glasplatten hingelegt und die Schrauben der Seitenschiene von oben nach unten festgezogen. Andruckplatte und Kamm werden bereitgelegt.

Gel:

24 ml SEQUAGEL XR (Monomerlösung),

6 ml SEQUAGEL COMPLETE (Pufferlösung)

3 ml Formamid

300 µl APS

Laufpuffer: 0.8 x TBE.

Zur computergesteuerten Bedienung des LI-CORs vgl. Handbuch des Herstellers.

### 2.16 Heterologe Expression von HE2-Proteinen

Aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen strukturellen Komplexität lassen sich nicht alle Proteine funktionell aktiv in Bakterien überexprimieren. Es ist sogar der Regelfall, daß die transformierten *E. coli*-Bakterien die exprimierten Proteine als unlösliche *Inclusion bodies* produzieren, die erst nach aufwendigem *Refolding* wasserlöslich und idealerweise auch funktionell aktiv werden. Die Löslichkeit eines rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteins ist ein Parameter, der direkt mit der korrekten Faltung vieler heterologer Proteine korreliert. Eine Verbesserung der Löslichkeit rekombinanter Proteine kann durch deren Herstellung als Fusionsprotein erreicht werden. Das pMal-Vektorsystem begünstigt wie kein anderes prokaryotisches Expressionssystem die native Faltung heterologer Proteine, da sein Fusionsdomänenprotein MBP (*Maltose Binding Protein*) wie ein Chaperon auf C-terminal anfusionierte, heterologe Proteine wirkt (Kapust et al., 1999). Außer diesem äußerst positiven Einfluß bietet der MBP-Schwanz des exprimierten Fusionsproteins die Möglichkeit zur nicht-denaturierenden Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine an Amyloseharz. Für die Expression von HE2 $\alpha$  wird das pMal-Vektorsystem gewählt.

Bei den  $\beta$ -Defensin-ähnlichen HE2-Proteinen sind ein korrektes Disulfidverbrückungsmuster und eine korrekte posttranslationale Modifizierung durch proteolytische Prozessierung Voraussetzungen für deren funktionelle Aktivität. Das Risiko einer falschen Faltung konnte

hier also auf keinen Fall eingegangen werden. Für die Expression von HE2 $\beta$ 1 und HE2C wird daher das Baculovirus-Expressionssystem gewählt, das schon bei der Expression anderer Defensine erfolgreich angewandt wird.

### *Heterologe Expression von HE2 $\alpha$ in E.coli*

Zur Expression des HE2-Gens im pMal c2x-Vektor werden jeweils 100  $\mu$ l kompetente ER2508-Zellen (Genotyp: s. Material; Eigenschaften: cytosolisch proteasedefizient, bilden kein endogenes Maltose-bindendes Protein (MBP)) mit 50 ng pMal c2x-Plasmidkonstrukten (auf 50 ng/ $\mu$ l eingestellt) transformiert (s.o.). Am folgenden Nachmittag werden 2-5 ml Rich Medium-Amp-Glu-Medium mit je einer Kolonie der Transformanten (direkt aus 37°C) inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

### Proteinexpression im analytischen Maßstab

80 ml Rich Medium werden mit 0,8 ml einer Übernachtskultur plasmidtragender Zellen bei guter Belüftung und 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 erreicht ist. 1 ml der uninduzierten Kultur werden als Probe entnommen, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 50  $\mu$ l 1x SDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert und bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren. Zur Induktion werden 0,25 ml einer 0,1 M IPTG-Lösung zugefügt und jede Stunde wird eine weitere 1 ml-Probe entnommen. Nach 3 h werden die Zellen bei 4000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Säulen-Puffer resuspendiert. Danach wird die Suspension bei -20°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in kaltem Wasser aufgetaut. Anschließend wird die Suspension in ein Eis-Wasserbad gestellt und in kurzen Abständen von 15 Sekunden ca. 6 min lang sonifiziert. Dann wird die Suspension bei 9000 x g und 4°C 20 min lang abzentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wird abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wird in 5ml Säulen-Puffer resuspendiert. Von Überstand und resuspendiertem Pellet werden je 10  $\mu$ l abgenommen, mit 10  $\mu$ l 2x SDS-PAGE-Puffer verdünnt und bei -20°C eingefroren. Ca. 200  $\mu$ l des Amyloseharzes werden in ein Eppendorfcap gegeben und kurz anzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit 1,5 ml Säulen-Puffer gewaschen. Danach wird das Pellet in 200  $\mu$ l Säulen-Puffer resuspendiert. 50  $\mu$ l dieser Amyloseharzsuspension werden dann mit 50  $\mu$ l des Rohextraktes vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wird das Harz anzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 1 ml Säulen-Puffer

gewaschen. Das Pellet wird in 50 µl 1x SDS-PAGE-Puffer resuspendiert. Alle Proben werden in der Reihenfolge ihrer Gewinnung auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

### Proteinexpression im präparativen Maßstab

Zur Expression größerer Mengen von MBP-HE2-Fusionsprotein werden 10 ml Vorkultur zum Inokulieren einer 1 l Kultur (Rich Medium) verwendet und im Prinzip genauso verfahren wie bei der analytischen Proteinexpression: 3h nach IPTG-Induktion wird die Kultur auf Eiswasser abgekühlt, die Zellen pelletiert (Ausschwingrotor Minifuge, 4000UpM, 5 min, 4°C), in 50 ml Säulen-Puffer resuspendiert und bei -20°C über Nacht eingefroren. Nach Gewinnung des Rohextraktes (vgl. Proteinexpression im analytischen Maßstab) am nächsten Tag wird dieser 1:5 mit Säulen-Puffer verdünnt.

### *Heterologe Expression von HE2C und HE2β1 in Lepidopteren-Zelllinien*

#### Biologie der Baculoviren und Risiko-Abschätzung zur biologischen Sicherheit

Bestimmte komplexgefaltete und posttranslational modifizierte Proteine lassen sich nicht funktionell in E.coli exprimieren. In diesen Fällen bedient man sich eukaryontischer Expressionssysteme wie dem Baculovirus-Expressionssystem, das die heterologe Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen ermöglicht. Im natürlichen Kontext befallen Baculoviren zumeist Insekten. Ihr Name bezieht sich auf die stäbchenförmige Gestalt der Virus-Partikel-Capside. Das Capsid besteht aus einer stäbchenförmigen Proteinhülle, in dessen Inneren die DNA in einer Nukleoproteinstruktur kondensiert ist, die als *Core* bezeichnet wird. Eine doppelsträngige, kovalent geschlossene, ringförmige DNA bildet das Genom eines Baculovirus. Die Länge baculoviraler DNA liegt zwischen 80 und 200 kb (130 kb bei *Autographa californica Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus*; AcMNPV). Die Nukleocapside bilden sich im Kern infizierter Wirtszellen und werden anschließend von einer Membran eingehüllt. Dies geschieht entweder während die Nukleocapside die Plasmamembran durch Knospung verlassen, oder sie umhüllen sich mit Membranbestandteilen aus der inneren Kernmembran. Während der Infektion bilden sich zwei morphologisch und biochemisch distinkte Virus-Formen. Zum einen entstehen im Karyoplasma infizierter Wirtszellen die okkludierten Viren (OV = occluded viruses), membranumhüllte Nukleocapside, die in eine kristalline Proteinmatrix eingebettet sind. Bei

den Polyhedrosis-Viren hat diese Matrix eine polyedrische Struktur. Das am Aufbau dieser Matrix hauptsächlich beteiligte Protein ist das Polyhedrin. Sind mehrere Nukleocapside innerhalb ein und desselben Okklusionskörpers eingebettet, spricht man von einem Multicapsid-Virus. Die polyedrischen Okklusionskörper werden zusätzlich von einer kohlehydratreichen Calyx umschlossen, die zur Stabilität der Okklusionskörper beiträgt. Die zweite Erscheinungsform der Baculoviren sind die geknospten, einzeln freischwimmenden Virionen (BV = budded virions), die ihre Membranhülle während der Abschnürung von der Plasmamembran erhalten, ansonsten aber nicht mit weiteren Molekülen assoziiert sind. Der natürliche Infektionszyklus der Baculoviridae verläuft wie folgt: Insektenlarven verzehren die proteinreichen Okklusionskörper, die aufgrund ihrer Stabilität vom Kadaver eines vormals infizierten Insekts übriggeblieben sind. Im alkalischen Milieu des Mitteldarms löst sich die Polyhedrinmatrix auf und setzt die eingebetteten Virionen frei. Diese dringen zunächst über die Plasmamembran der Microvilli in die Mitteldarm-Epithelzellen ein, welche schließlich von ihrer Basalmembran geknospte Virionen abschnüren. Diese gelangen schließlich an das Hämocoel und werden mit ihm an alle übrigen Gewebe des Insekts verbracht, wo die Zellen schließlich mit der massiven Produktion von Okklusionskörpern beginnen. Nach mehreren Tagen der Infektion verkommt die infizierte Insektenlarve zu einem kutikulären, mit milchiger Flüssigkeit gefülltem Sack, dessen Trockenmasse zu einem Großteil (bis zu 25%) aus Polyhedrin besteht. Nach eventuellem Zerreißen des Sacks werden die Okklusionskörper in der Umgebung verteilt, wo sie erneut von Insektenlarven gefressen werden können. In natura ist kein Wirt bekannt, der keiner Arthropodenspezies angehört. In vitro können jedoch unter bestimmten Bedingungen auch Säugerzellen mit Baculoviren infiziert werden (Condreay et al., 1999; Kost und Condreay, 1999), so daß ein gewisses Restrisiko beim Umgang mit infektiösen Baculovirionen nicht auszuschließen ist. Das für S1-Bedingungen geeignete Baculovirus System arbeitet mit AcMNPV (Autographa californica Multicapsid Nukleärer Polyhedrosis Virus), welches die Lepidopterenart *Trichoplusia ni* infiziert. Da die nackten Virionen an der Luft nicht lebensfähig sind, können sich Polyhedrosis-Viren in der freien Natur nicht ausbreiten, ohne daß es zuvor zur Ausbildung von Okklusionskörpern im Karyoplasma infizierter Wirtszellen gekommen ist. Im rekombinanten Virus ist das Leseraster für Polyhedrin verschoben, so daß diese Viren keine Okklusionskörper bilden, und daher in der Natur im Unterschied zum Wildtyp-Virus nicht infektiös sein dürften. (Abschnitt zur Biologie der Baculoviren aus O'Reilly, Miller, Luckow: *Baculovirus Expression Vectors, a laboratory manual*).



### Kultur von Lepidopterenzelllinien

Für die heterologe Expression von HE2-Varianten in Lepidopterenzelllinien werden Sf9- (*Spodoptera frugiperda*) und High Five-Zellen (*Trichoplusia ni*) verwendet. Die Sf9-Zellen werden in TNM-FH-Medium kultiviert und die High Five-Zellen in ExCell 400<sup>®</sup>-serumfreiem Medium. Die Kultur wird gemäß Anleitung (INVITROGEN) aufrechterhalten. Nach maximal 30 Passagen wird die jeweilige Zellkultur abgebrochen und frische Zellen angezogen. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen im Verhältnis 1:5 verdünnt, um sie ständig in der log-Phase ihrer Wachstumskurve zu halten.

### Primäre Transfektion mit pMelBac-Vektorkonstrukt und linearisierter Baculovirus-DNA

Für jede Transfektion werden Sf9-Zellen aus der log-Phase ( $1.6-2.5 \times 10^6$  Zellen/ml) mit einer Viabilität von >98% verwendet.  $2 \times 10^6$  Sf9-Zellen werden in einer 60 mm Petrischale in TNM-FH-Medium ausgesät und durch seitliches Schütteln gleichmäßig verteilt. Danach bleiben die Zellen 15 min erschütterungsfrei stehen, damit sich ein gleichmäßiger, fest angehefteter Monolayer bilden kann. Diese Sf9-Zellen werden mit den pMelBacB-Insertkonstrukten und Bac-N-Blue-linear DNA kotransfiziert. Dazu wird zunächst der Transfektionsmix hergestellt:

1 ml Grace's Insekten Medium (ohne Zusätze und FCS)

4 µl Rekombinantes pMelBacB-Vektorkonstrukt (1 µg/µl) (säulenbasiert gereinigt)

20 µl Insectin-Plus<sup>™</sup>-Liposomen (vor Benutzung vortexen und immer zuletzt zugeben)

Der Mix wird 10 sek gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation werden die vorbereiteten Sf9-Zellen zweimal mit Grace's Insekten Medium (ohne FCS und Zusätze) gewaschen. Danach wird das Medium erneut von den Zellen abgenommen und der gesamte Transfektionsmix vorsichtig auf den Sf9-Monolayer pipettiert. Die Petrischale wird 4h bei RT unter langsamem Schwenken inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wird 1 ml TNM-FH-Vollmedium zugegeben, die Petrischale zusammen mit einem feuchten Papiertuch in Plastikfolie eingeschweißt und bei 27°C für 72 h inkubiert. Bei erfolgreicher Transfektion finden sich nach 72 h geknospte Virionen im Kulturüberstand. Dieser wird zu diesem Zeitpunkt geerntet und in ein steriles 15 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird mit Aluminiumfolie lichtgeschützt umwickelt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die transfizierten Zellen werden mit 3 ml TNM-FH-Medium

versetzt und weitere 48 h bei 27°C inkubiert. Mit Hilfe eines invertierten Phasenkontrastmikroskops (250-400-fache Vergrößerung) werden diese Zellen dann auf Anzeichen einer viralen Infektion untersucht (vergrößerter Zelldurchmesser, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns, Aussetzen der Zellteilung, Auftreten lichtbrechender Okklusionskörper im Karyoplasma, Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischale, Lyse der Zellen). Sobald anhand dieser Anzeichen festgestellt wird, daß die Transfektion erfolgreich war, wird der Plaque Assay durchgeführt, um die rekombinanten Virionen von den eventuell noch vorhandenen Wildtyp-Virionen abzutrennen.

### Plaque Assay:

Je  $5 \times 10^6$  Sf9-Zellen werden in eine mit TNM-FH vorgefeuchtete 100 mm Petrischale pipettiert und durch Schütteln gleichmäßig verteilt. Dieses Verhältnis von Zellzahl zu Bodenfläche der Petrischale entspricht einer 50%igen Konfluenz. Dadurch ist gewährleistet, daß sich die Zellen noch einmal teilen können, bevor ihre Mitose-Aktivität durch virale Infektion gehemmt wird. Die Zellen werden dann mit  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , und  $10^{-4}$ -Verdünnungen des virionenhaltigen Transfektions-Kulturüberstands für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Pro Verdünnung werden 3 Platten verwendet. Anschließend wird das Medium entfernt und die Zellen werden mit X-Gal-haltiger Baculovirus-Agarose vorsichtig überschichtet. 50 ml von 2.5%iger Baculovirus Agarose werden mit 50 ml TNM-FH-Vollmedium gemischt und bei 47°C im Wasserbad flüssig gehalten. 50 mg X-Gal werden in 1ml DMF (wichtig: hier kein DMSO benutzen !!!) gelöst. Von dieser Stammlösung, die anschließend bei -20°C gelagert wird, werden 300 µl zu den 100 ml 47°C-warmen Agarose/TNM-FH-Gemisch gegeben. Nach Abnehmen des Mediums werden die Zellen mit warmer Baculovirus-Agarose überschichtet. Nach Aushärten der Agarose werden die Petrischalen gemeinsam mit einem feuchten Papiertuch in Plastikfolie eingeschweißt und bei 27°C inkubiert. Nach 5 bis 7 Tagen werden rekombinante Plaques als blaue Punkte im Agar sichtbar (vgl. Ergebnisteil). Diese Plaques werden mit einer 200 µl Pipette ausgestanzt und jeweils in einem Loch einer 12-Loch-Platte mit konfluenten Sf9-Zellen 5 bis 7 Tage inkubiert. Jeder Sf9-Zellmonolayer eines Loches wird dann unter dem invertierten Mikroskop auf Okklusionskörper untersucht. Es wird nur der Kulturüberstand solcher Löcher zur Anzucht des "*High Titer Stocks*" verwendet, in denen nach 7 Tagen eine weitgehende Zellyse eingetreten ist, ohne daß sich auch nur ein einziger Okklusionskörper entdecken läßt. Nach Vermehrung dieser gereinigten, rekombinanten Virionen wird diese Virus-Stammlösung zur Infektion konfluenter Monolayer von High Five-Zellen verwendet, da diese im Regelfall eine stärkere Proteinexpressionsrate

als Sf-Zellen zeigen (*Trichoplusia ni*, der Organismus, aus dem die High-Five-Zellen stammen, ist der natürliche Wirt des Baculovirus AcNPV). Mit Hilfe des Plaque Assays wird auch der Titer des “*High Titer Stocks*” in pfu/ml (pfu=plaque forming units) bestimmt ( $1/\text{Verdünnung} \times \text{Anzahl der Plaques} = \text{Titer (pfu/ml)}$ ). Anhand folgender Formel kann dann das Volumen an Virus-Stammlösung ermittelt werden, das zum Erreichen einer bestimmten MOI (*Multiplicity Of Infection*) nötig ist:

$$\frac{\text{MOI [pfu/Zelle]} \times \text{Anzahl der Zellen}}{\text{Virus-Titer [pfu/ml]}}$$

$$\text{Anzahl der Zellen (Zelldichte (Zellen/ml) \times \text{Volumen (ml)})}$$

Die High-Five-Zellen werden mit einer MOI von 3 pfu/Zelle infiziert, um eine weitgehende posttranslationale, proteolytische Prozessierung der HE2-Varianten zu gewährleisten. Eine stärkere MOI führte zu einer vermehrten Entstehung unvollständig prozessierter Formen.

### 2.17 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Bradford wird wie vom Hersteller (Bio-Rad) beschrieben durchgeführt. Sie beruht auf der Bindung von Coomassie-Blau an Proteine. 800 µl der proteinhaltigen Lösung werden mit 200 µl BioRAD-Protein-Assay-Reagenz (Nr. 500-0006, BioRad) gemischt, 5 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Nullwerte waren zuvor auf den jeweiligen Puffer abgeglichen worden. Die erhaltenen Werte werden mit einer Eichgraden (linearer Bereich: 2-50 µg/ml) verglichen, die mit Eichstandards aus β/γ-Rinderglobulin (Sigma) erstellt worden war.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry wird mit einem käuflichen Kit (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine colorimetrische Methode die auf einer Kombination der Biuret-Reaktion von Peptidbindungen und der Farbreaktion von Folin-Ciocalteu-Reagenz mit Tyrosin und Tryptophanresten im Protein beruht.

### 2.18 Gewinnung aufkonzentrierter Proteinextrakte

#### *Herstellung von Salzwashproteinproben (SW) der Spermienoberfläche:*

50 ml Gesamtejakulat (Mischung verschiedener Spender; Herkunft: Praxis Lornsenstr. Altona) werden bei 2500xg 10 min abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Seminalplasmaüberstandes werden die pelletierten Spermien in 5ml 1xTBS gewaschen und anschließend in 3 ml 0,6 M NaCl-Lösung resuspendiert. Nach 10 min Inkubation der Spermien in 0,6 M NaCl, wird erneut bei 4000 x g 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird zur Acetonfällung verwendet. Zur Anreicherung von HE2-Peptiden wird die Acetonpräzipitation gewählt, denn diese Methode eignet sich zur Ausfällung von kleinen Proteinen und Peptiden. Nebeneffekt der Acetonfällung ist die Entfernung eines Großteils kontaminierender Lipide aus dem Proteinpräzipitat. Der größte Nachteil einer Proteinfällung mit Aceton, die weitgehend irreversible Denaturierung vieler insbesondere höhermolekularer Proteine, hat sich bei der Aufkonzentration von HE2-Peptiden als weiterer Vorteil erwiesen. Die Denaturierung der meisten Proteine geht mit einer massiven Erniedrigung ihrer Wasserlöslichkeit einher. Es ließ sich folglich ein Großteil des gewonnenen Acetonpulvers nicht wieder in Lösung bringen, wodurch eine Anreicherung der nach wie vor löslichen Proteine erreicht wird. Bei der Acetonfällung wird die Proteinlösung auf einmal unter Rühren ohne Kühlung zum 4-fachen Volumen an Aceton gegeben. Dann wird das Reaktionsgefäß über Nacht bei -20°C tiefgekühlt, um eine vollständige Fällung der niedrigmolekularen Peptide zu gewährleisten. Am nächsten Tag werden die gefällten Proteine in der Ultrazentrifuge bei 27000 x g 30 min anzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird der Niederschlag bei RT solange getrocknet, bis ein feinpulveriges Acetonpulver vorlag. Je 200 mg dieses Acetonpulvers werden mit 200 µl 1x PBS (EDTA+ PMSF+ Pepstatin A) 10 min bei RT extrahiert. Nach Abzentrifugation bei 13000 rpm, RT wird der Überstand abgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### *Herstellung von LIS-Extrakt (nach Alexander und Bearwood, 1984):*

Ein Volumen von 50 ml vereinigerter, humaner Ejakulate wird 10 min bei 1000xg zentrifugiert. Das Pellet wird in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschprozeß wird dreimal durchgeführt und das entstandene Pellet anschliessend in 5 ml Extraktionspuffer (0,3M Lithium-3,5-Diiodsalicylat, 50 mM TRIS-HCl, pH 7.4) resuspendiert und 30 min bei

RT stengelassen. Anschließend wird die Probe bei 27000xg 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird ü.N. gegen 50 mM TRIS-HCl, pH 7.4 dialysiert. Das Dialysat wird bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

### *Herstellung von konzentrierten Seminalplasmaproteinproben:*

Das Seminalplasma wird nachdem die Spermien abgetrennt waren ebenfalls 1:4 mit Aceton gefällt und wie beim Salzwash beschrieben aufbereitet. Bei der Fällung von Seminalplasma war es jedoch notwendig, dem Aceton 5% n-Tributylphosphat zuzusetzen, um ein Verklumpen der Seminalplasmaproteine zu einer wachsartigen Masse zu verhindern.

### 2.19 N-Glykosidase F-Verdau (PNGase F-Verdau)

(Deglykosylierung der über Asparagin N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste)

Zunächst wird folgender Denaturierungsmix hergestellt:

16 µl Nebenhodenflüssigkeit aus dem Corpus oder Cauda-Abschnitt

1,3 µl β-Mercaptoethanol

1 µl SDS (10%)

0,3 µl destilliertes Wasser

Unmittelbar vor dem Verdau wird der Denaturierungsmix 2 min auf 95°C erhitzt. Diese Lösung wird dann zu 46 µl des vorgemischten Prämix pipettiert.

Prämix:

80 µl 100 mM Natriumphosphat, pH 8.0

1.3 µl NP-40

1 µl 0.5M EDTA, pH 8.0

53,2 µl Inhibitorlösung (je 5 µg/µl Pepstatin, Antipain und Leupeptin, 10 mM 1,10-Phenanthrolin, 290 µM PMSF)

Zu der Mischung aus 18.6 µl Denaturierungs- und 46 µl Prämix werden dann 0,5 U PNGase F (Flavobacterium meningosepticum, rekombinant aus E. coli, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) zugesetzt und der Verdau 4 h bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wird Proteinlösung unter den gleichen Bedingungen ohne Enzym mitinkubiert. Für Western-Blot-Analysen wird pro Spur ein Viertel der verdauten Menge eingesetzt.

### 2.20 Herstellung von Kryotomschnitten aus Nebenhodengewebe

Humanes Nebenhodengewebe wird mittels eines Einbettmediums (Jung Tissue Freezing Medium, Leica, Hamburg) auf ein Trägertischchen aufgeblickt und auf  $-20^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Danach wird es in das ebenfalls  $-20^{\circ}\text{C}$  kalte Kryotom (Frigo Cut 2800E, Leica, Heidelberg) eingesetzt. Es werden  $8\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Diese werden auf Objektträgern („Super Frost“, Menzel) aufgefangen, in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 1x PBS bis zur Verwendung gelagert.

### 2.21 Immunhistochemische Untersuchung von Kryotomschnitten

Mit der Immunhistochemie lassen sich Peptide bzw. Proteine direkt im Gewebsschnitt nachweisen und sublokalisieren. Die Bindung der Antikörper wird entweder über eine Immunfluoreszenzreaktion mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern oder über Immunoperoxidase-gekoppelte Antikörper sichtbar gemacht.

Zur immunhistochemischen Anfärbung mit Antiseren werden die Kryoschnitte dreimal in 1x PBS gewaschen. Danach wird mit 2%igem Normal Ziegen Serum (Normal Goat Serum, Sigma),  $50\mu\text{l}$  pro Schnitt, 30 Min blockiert. Prä- und Testserum werden in verschiedenen Verdünnungen mit dem Ziegen Serum auf die Schnitte aufgetropft und diese über Nacht im Dunkeln bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Am nächsten Tag wird 3 x 5 Min mit 1x PBS gewaschen. Je nach Art des Nachweises wird dann unterschiedlich weiterverfahren.

#### *Indirekte Immunfluoreszenz-Markierung*

Pro Schnitt werden  $50\mu\text{l}$  Cy2-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG (aus der Ziege) in einer Verdünnung von 1:100 aufgetropft und bei Raumtemperatur 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wird erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen und die Präparate schließlich bei  $4^{\circ}\text{C}$  lichtgeschützt gelagert. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

#### *Indirekte Immunoperoxidase-Markierung*

Der Zweitantikörper ist in diesem Fall ein Konjugat aus einem Anti-Kaninchen-Antikörper und einem Dextran-Polymer, das mit mehreren Molekülen der Meerrettich-Peroxidase (HRP, Horseradish-Peroxidase) gekoppelt ist (Envision, DAKO, Hamburg). Die Schnitte werden mit einem Tropfen dieser Lösung 30 Min lang inkubiert. Danach wird 3 x 5 Min mit 1 x PBS

gewaschen. 1 ml DAB (3,3'-Diamino-benzidin-tetra-hydrochlorid)-Chromogenlösung wird unmittelbar vor Gebrauch mit einem Tropfen 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Je 50 µl werden auf die Präparate aufgetropft nach 30 Sekunden wieder abgenommen. Die Schnitte werden kurz in destilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Anschließend werden sie mit wasserlöslichem Eindeckmedium (Polymount; Dako, Hamburg) und Deckgläschen versehen und luftgetrocknet.

### 2.22 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

#### **SDS-PAGE :**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte modifiziert nach der Methode von Lämmli (1970), wie in Sambrook et al., 1989 beschrieben. (Sambrook et al., 1989). Der *Rainbow Low Molecular Weight Protein Marker* (Amersham Pharmacia Biotech) wurde zur Abschätzung apparanter Molekulargewichte aufgetrennter Proteine herangezogen.

Probenvorbereitung:

Proben in 1x SDS-Gel-Ladepuffer werden unmittelbar vor dem Beladen des Gels 2-3 min bei 97°C inkubiert, bei 13000 rpm kurz anzentrifugiert und parallel mit gleichbehandelten Molekulargewichtsstandards geladen.

Die Elektrophorese der Mini-Gele ( Plattengelmaß: 8 x 8 x 0,1 cm) erfolgte im Fall der SDS-Gele bei 150 V für 1 ½ h gegen die Anode.

#### **TRICIN-PAGE:**

Die herkömmliche SDS-PAGE nach Laemmli ist ungeeignet, um Peptide mit einem Molekulargewicht von <6 KDa aufzutrennen. Deren erfolgreiche Auftrennung kann besser durch das von Schägger und von Jagow (1987) beschriebene TRICIN-PAGE-System erreicht werden. Hierzu werden Mini-Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 16,5% und 6M Harnstoff verwendet. Zur Abschätzung apparanter Molekulargewichte wurde der *Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standard* (BioRad) verwendet.

*Sammelgel:*

1 ml destilliertes Wasser

250 µl Acrylamidlösung mit 2.7% Crosslinker (N,N-Methylenbisacrylamid)

500 µl TRICIN-PAGE-Gelpuffer

15 µl APS (10%)

7 µl TEMED

### *Spacergel:*

1.15 ml destilliertes Wasser  
500 µl Acrylamidlösung mit 2.7% Crosslinker  
500 µl TRICIN-PAGE-Gelpuffer  
15 µl APS (10%)  
7 µl TEMED

### *Trenngel:*

2.16g Harnstoff  
3.3 ml Acrylamidlösung mit 6% Crosslinker  
2 ml TRICIN-PAGE-Gelpuffer  
15 µl APS (10%)  
7 µl TEMED

Das Spacergel kann aufgrund seiner deutlich geringeren Dichte direkt auf das noch flüssige Trenngel geschichtet werden (ca 1cm hoch). Danach wird das Spacergel mit 1 ml Ethanol-Wasser-Gemisch (50% v/v) überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das Ethanolgemisch abgegossen und die Spacergelkante mit destilliertem Wasser gespült. Dann wird das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesteckt. Die pH-Werte der TRICIN-PAGE-Puffer sowie die angelegte Spannung während der Elektrophorese sind kritisch für das Gelingen der TRICIN-PAGE-Trennung. Bei den TRICIN-Gelen wird für 2 ½ bis 3 h eine Spannung von 70 V gegen die Anode angelegt.

### **CAU-PAGE** (Continuous Acid Urea-PAGE)

(nach Panyim und Chalkley, 1969)

Um antimikrobiell aktive Peptide als Bande im Gel nachweisen zu können, wird üblicherweise zur Proteinauftrennung die CAU-PAGE verwendet. Nach Waschen des CAU-PAGE Geles können die antibiotisch aktiven Proteine und Peptide durch den im Anschluß beschriebenen Gel-Overlay Assay im Gel nachgewiesen werden. Für die Versuche wird ein 12%iges CAU-PAGE Gel verwendet:



3.2g Harnstoff  
4.25 ml 30:0.8 Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid  
2.4 ml destilliertes Wasser  
1.33 ml 43% (v/v) Essigsäure  
200 µl APS (10%)  
30 µl TEMED

Alle Zutaten außer TEMED werden miteinander gut gemischt, bis der Harnstoff vollständig gelöst ist. Sobald die Gelapparatur aufgebaut ist, wird das TEMED hinzugegeben und erneut gut gemischt. Um ein korrektes Ausformen der durch den Kamm vorgegebenen Geltaschen zu gewährleisten, wird das frisch eingegossene und mit Kamm versehene Gel mit einer 40 W Birne aus 10 cm Entfernung 10 bis 15 min lang bestrahlt (Beschleunigung der Bildung freier Radikale aus APS; denn TEMED wirkt nur als freie Base katalytisch auf die Radikalbildung; bei niedrigem pH ist TEMED nahezu inaktiv). Vor dem Einsetzen wird der Kamm zudem mit TEMED eingerieben. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird es für 1h bei 150 V gegen die Kathode präelektrophoriert. Der verwendete Laufpuffer ist 5% Essigsäure. Während der Prä-Elektrophorese fällt die Stromstärke von ca 30 auf 8 bis 9 mA ab. Sobald dieser Minimalwert der Stromstärke erreicht ist, wird das Gel abgeschaltet und der Laufpuffer gegen frischen ausgetauscht. Der CAU-PAGE-Ladepuffer für die Proteinproben wird wie folgt hergestellt: 10 ml einer 10 M Harnstofflösung werden frisch angesetzt und mit ca. 0,5 g BIORAD AG501-X6 Mixed Bed Resin etwa 15 min inkubiert um eventuell vorhandene Cyanationen zu entfernen. Anschließend werden je 900 ml der 10 M Harnstofflösung (ohne Mixed Bed Resin beads) mit je 50 µl Eisessig und 50 µl destilliertem Wasser versetzt. Ein Teil davon wird mit einer Spatelspitze des kationischen Farbstoffs Methylgrün angefärbt. Der andere Teil wird mit einer Spatelspitze des anionischen Farbstoffs Xylencyanol versetzt. Diese beiden Ladepuffer werden in Aliquots a 100 µl bei -20°C eingefroren, um die Entstehung von Cyanationen zu verhindern. Die Proteinproben werden 2:1 mit dem Xylencyanol-haltigen Ladepuffer versetzt. Der Methylgrün-haltige Ladepuffer wird 2:1 mit 5% Essigsäure verdünnt und am Rand des Gels als Laufkontrolle geladen. Nach dem Probenauftrag läßt man die Gele für 1 bis 2 h bei 120 V gegen die Kathode laufen. Die Gele können wie SDS-Gele mit Coomassie gefärbt werden. Der bereits bei den TRICIN-Gelen verwendete Polypeptid-Standard wird auch in diesen Gelen mitgeladen, um standardmäßige Bezugspunkte zu schaffen. Die elektrophoretische Mobilität einzelner Peptide und Proteine ist eine Funktion aus Stokes'schem Radius und Ladung des jeweiligen Proteins. Da die CAU-PAGE eine +/-

native Gelelektrophorese darstellt, die ohne SDS auskommt, ist die Ladung einzelner Proteine in diesem Gelsystem viel abhängiger von deren individuellen isoelektrischen Punkten. Eine Abschätzung scheinbarer Molekulargewichte anhand eines Standards ist daher in der CAU-PAGE unmöglich. Nichtsdestotrotz liefert ein Proteinstandard Bezugspunkte für das individuelle Laufverhalten der untersuchten Peptide und Proteine.

*Western-Blot von CAU-PAGE Gelen (modifiziert nach Wang et al., 1997):*

Die CAU-PAGE-Gele werden gegen die Kathode geblottet. Der Blotpuffer besteht aus 10% Methanol und 5% Essigsäure. Mini-Gele werden 25 min bei 130 mA geblottet. Als Blotmembran dient eine methanolaktivierte PVDF-Membran. Die anschließende Detektion erfolgt wie bereits beschrieben.

### 2.23 Revers-Zymogramm

(modifiziert nach Hanspal et al. 1983)

Da kleine Peptide wie HE2 $\alpha$  besser im TRICIN-System aufgetrennt werden können wurde dieses auch für das Revers-Zymogramm benutzt. Im Unterschied zum bereits beschriebenen TRICIN-System enthielt das Trenngel zwischen 0,1 und 0,2% Gelatine. Es wurde wie folgt pipettiert:

2.16g Harnstoff

3.3 ml Acrylamidlösung mit 6% Crosslinker

2 ml TRICIN-PAGE-Gelpuffer

1 ml 2% Gelatine

15  $\mu$ l APS (10%)

7  $\mu$ l TEMED

Die Proben dürfen auf keinen Fall herkömmlich (wie bei Lämmli beschrieben) vorbereitet werden. Stattdessen wurden die Proben in einem wasserbasierten Puffer mit 2,5% SDS, 10% Glycerol und Phenolrot (4mg/ml) aufgenommen und ohne zu kochen direkt auf das Gel aufgeladen.

### *Revers-Zymographie-Ladepuffer (1ml)*

0,025g SDS

~170µl Glycerin (87%)

4mg Phenolrot

mit destilliertem Wasser auf 1 ml auffüllen

Elektrophoriert wurde im Kühlraum wie für das TRICIN-System beschrieben. Nachdem die durch Phenolrot markierte Lauffront das anodische Gelende erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet und das Gel zweimal für 15 min mit Zymographie-Waschpuffer äquilibriert.

### *Zymographie-Waschpuffer:*

50 mM TRIS-HCl, pH 7,6

5 mM CaCl<sub>2</sub>

2,5 % (v/v) Triton-X-100

Danach wird das Gel 3 mal 5 min in Zymographie-Verdaupuffer gespült.

### *Zymographie-Verdaupuffer:*

50 mM TRIS-HCl, pH 7,6

5 mM CaCl<sub>2</sub>

0,02% NaN<sub>3</sub>

Anschließend wird das Gel in 100 ml Trypsinpuffer überführt und für 16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### *Trypsinpuffer (100 ml):*

100 ml Glycin-NaOH, pH 8,3

4 mg Trypsin (10,000 BAEE-units/mg)

Nach der Inkubation wird das Gel kurz in destilliertem Wasser gespült und wie beschrieben mit Coomassie-Blau gefärbt. Es bleiben nur die Proteine als Banden im Gel zurück, die Trypsin-inhibitorische Aktivität zeigen oder per se einer Trypsinolyse widerstehen.

2.24 Bestimmung von Trypsin-inhibitorischer Aktivität mit Hilfe  
des L-BAPNA-Substrates

Um die Trypsin-inhibitorische Aktivität eines Proteins zu demonstrieren muß ein Reverszymogramm-Ergebnis durch einen substratkinetischen Test abgesichert werden. Trypsin spaltet das chemosynthetische Substrat N- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid (L-BAPNA) , wobei N- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin und p-Nitroanilin entstehen. p-Nitroanilin hat sein Absorptionsmaximum bei 405 nm während L-BAPNA in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbiert. Anhand der Absorption bei 405 nm kann im ELISA-Reader die Trypsin-Aktivität in einer wässrigen Probe ermittelt werden.

Folgende Lösungen werden benötigt:

TRIS/DMF-Puffer: 88mM TRIS-HCl, pH 8.2 mit 12% DMF (v/v)

Trypsinlösung: 25 $\mu$ g/ml in 1 mM HCl (bis zur Verwendung auf Eis stehenlassen, um Autolyse zu vermeiden)

30% (v/v) Essigsäure

Zunächst wird eine Eichung anhand einer p-Nitroanilin-Standardkurve vorgenommen:

Probe	p-Nitroanilin [mM] in TRIS/DMF/ 30%(v/v)Essigsäure/ 1mM HCl (15:3:1)
A	0
B	0,05
C	0,10
D	0,15
E	0,20
F	0,25
G	0,30
H	0,40

Für die Substratkinetik wurden folgende Mengen L-BAPNA mit konstanter Trypsinkonzentration (0,1 mg/ml) bei 37°C verdaut.

Probe	l-BAPNA-Substrat [ $\mu\text{M}$ ]
A	50
B	100
C	150
D	200
E	250

Die Substratverdünnungen wurden durch Verdünnung einer L-BAPNA-Stammlösung (5 mM) in TRIS/DMF mit TRIS/DMF-Puffer hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 150  $\mu\text{l}$  je Loch einer 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Pro Loch wurden anschließend je 10  $\mu\text{l}$  der Trypsinlösung zupipettiert und exakt !!! 30 min bei 37°C inkubiert. Nach exakt 30 min wird die Reaktion in den Löchern durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  30% (v/v) Essigsäure pro Loch gestoppt.

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von synHE2 $\alpha$ 1 erfolgte bei konstanter L-BAPNA-Konzentration (200 $\mu\text{M}$ ). Folgende Konzentrationen von HE2-Peptid wurden eingesetzt:

Probe	synHE2 $\alpha$ 1 [ $\mu\text{M}$ ]
A	0
B	10
C	25
D	50
E	100
F	200

Die Messung der Absorption des entstandenen p-Nitroanilids erfolgte bei 405 nm im Wallac-ELISA-Reader.

### 2.25 Gel-Retardation-Assay

(nach Park et al., 1998)

Der Gel-Retardations-Assay ist eine Methode zum Nachweis nukleinsäurebindender Aktivität von Proteinen. In diesem Fall wird keine Bindung an spezifische DNA-Abschnitte gezeigt, sondern das unspezifische Bindevermögen des synthetischen HE2-Peptids an Nukleinsäuren,

wie es durch diesen Assay von Park et al. (1998) für das antibiotische Peptid Buforin II gezeigt wurde. Als unspezifische Nukleinsäure wird ein 500bp-Amplifikat aus der Fucosyltransferase 6 (zur Verfügung gestellt von Dipl. chem O. Nagel) verwendet.

Der Assay wurde wie folgt durchgeführt:

Je 300 ng des 500bp-Amplifikats werden mit steigenden Konzentrationen des linearen, synthetischen HE2 $\alpha$ 2-Peptids oder dem als Negativkontrolle dienenden P1-Peptids in 20  $\mu$ l Bindungspuffer für 1h bei RT inkubiert.

### *Bindungspuffer:*

5% Glycerol

10 mM TRIS-HCL, pH8.0

1mM EDTA

1mM DTT

20 mM KCl

50  $\mu$ g/ml BSA

Anschließend werden je Probe 4  $\mu$ l nativer Ladebuffer zugesetzt und auf ein 4%-iges Polyacrylamidgel geladen.

### *nativer Ladebuffer:*

10% Ficoll 400

10 mM TRIS-HCL, pH 7.5

50 mM EDTA

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

### *natives Polyacrylamidgel:*

1,86 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30: 0.8)

7 ml destilliertes Wasser

1 ml 10x TBE

70  $\mu$ l APS (10%)

20  $\mu$ l TEMED

In 0.5xTBE-Laufpuffer erfolgt die Elektrophorese im Kühlraum (4°C) bei 70 V gegen die Anode. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele in einer UV-durchlässigen Färbeschale in 10 ml destilliertem Wasser mit 1  $\mu$ l Ethidiumbromid-Stammlösung 5 min inkubiert. Die DNA-Banden werden wie bereits beschrieben im Transilluminator mit UV-Licht visualisiert.

### 2.26 Gel Overlay Assay

(modifiziert nach Lehrer et al., 1991; Steinberg und Lehrer, 1997)

*E. coli* DH5 $\alpha$ -Bakterien werden über Nacht für 18 h bei 37°C zur Vorkultur in 3ml LB angezogen. Um eine logarithmisch wachsende Kultur zu erhalten, werden 50  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension in 50 ml frisches Luria-Bertani-Medium überimpft, und für weitere 2,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert und in 10 ml 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 resuspendiert. Anschließend wird die optische Dichte der Suspension bei 620 nm gemessen. Auf Basis der Beziehung  $OD_{620} 0,2 = 5 \times 10^7$  CFU/ml wird ein Volumen mit  $4 \times 10^6$  CFU (CFU, *Colony Forming Unit*) zu 40°C warmen 10 ml 10% LB in 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 mit 1% Agarose (MetaPhor, Biozym, kleine Elektroendosmose (EEO), niedriger SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Gehalt) gegeben und gut gemischt. Mit dem erhaltenen *E. coli*-haltigem Agar werden Platten gegossen. Der bakterienhaltige Agar sollte eine Dicke von 2-3 mm haben. Die peptid- und proteinhaltigen Proben werden mittels einer kontinuierlichen Essigsäure-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (CAU-PAGE) aufgetrennt (Panyim und Chalkley, 1969). Danach wird das Gel in 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 20 min lang gewaschen bis der pH des Gels 7,2 erreicht hatte. Anschließend wird das Gel auf die vorbereitete Agarplatte gelegt und für 3h bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wird das Gel heruntergenommen und der Agar mit 2% Agarose (MetaPhor, Biozym) in LB-Medium überschichtet und über Nacht 16 h inkubiert. Die Banden antimikrobiell aktiver Proteine und Peptide sind als Hemmhöfe im Agar deutlich zu erkennen. Der Triphenylmethanfarbstoff Kristallviolett dient dabei als Positivkontrolle.

### 2.27 Radialdiffusionstest (RDA= Radial Diffusion Assay)

(modifiziert nach Lehrer et al., 1991; Steinberg und Lehrer, 1997)

Der RDA wird ganz ähnlich wie der Gel-Overlay Assay durchgeführt. Es werden jedoch mit einem 1.5 mm Lochseisen Löcher in den bakterienhaltigen Agar gestanzt und die Proben werden direkt dort hineinpipettiert. Nach Abschluß der 3-stündigen Inkubation bei 37°C wird mit 2% Agarose in LB-Medium überschichtet und, wie beim Gel Overlay beschrieben, inkubiert. Der Radialdiffusionstest kommt mit weniger Probe aus als der Gel-Overlay Assay. Manche Autoren behaupten sogar, daß man eine Aktivitätsabschätzung anhand der Größe der Hemmhöfe vornehmen kann. Da jedoch die Größe eines Hemmhofes vor allem eine Funktion der Diffusionsgeschwindigkeit ist, kann man im Fall vieler selbstaggregierender und damit

diffusionsbehinderter antimikrobieller Peptide zu groben Fehleinschätzungen gelangen. Der Radialdiffusionstest ist daher als rein qualitativer Nachweis antimikrobieller Aktivität zu betrachten.

### 2.28 CFU-Assay ( Colony Forming Unit Assay) (nach Harder et al., 2001)

Der CFU-Assay dient der Quantifizierung einer bereits anderweitig festgestellten, antimikrobiellen Aktivität. Der CFU-Assay kann falsch positive Ergebnisse liefern, wenn die untersuchten Proteine Bakterien nur aggregieren aber nicht töten. Daher muß eine im CFU-Assay gemessene antimikrobielle Aktivität auch mit Hilfe eines der beiden anderen Tests verifiziert werden. Die antibakterielle Aktivität wird in Form der minimal inhibitorischen Konzentration (MIC) angegeben. Die Konzentration an antimikrobiellem Wirkstoff, bei der 90% der Bakterien abgetötet werden, bezeichnet man als MIC<sub>90</sub>. E. coli DH5 $\alpha$ -Bakterien werden über Nacht für 18 h bei 37°C zur Vorkultur in 3ml LB angezogen. Um eine logarithmisch wachsende Kultur zu erhalten, werden 50  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension in 50 ml frisches Luria-Bertani-Medium überimpft, und bei 37°C inkubiert bis die OD<sub>620</sub> bei 0,2 lag. Die Bakterien werden dann 1:10<sup>4</sup> mit 10% LB in 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 verdünnt. Je 100  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension werden mit je 11  $\mu$ l HE2 $\alpha$ 2-Peptidlösung definierter Konzentration für 3h bei 37°C inkubiert. Nach 1:10-Verdünnung mit 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 werden je 100  $\mu$ l jeder Probe auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien pro Platte werden gezählt, um die antibiotische Aktivitätskurve zu ermitteln. Die Grenze der Detektierbarkeit in diesem Assay entsprach 10<sup>2</sup> CFU/ml.

### 2.29 Coomassie-Färbung

Das Fixieren und Färben der SDS-Proteingele erfolgte je nach Beladung und Dicke für 1-4 h in 500 ml Färbelösung. Anschließend werden die Gele unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung über 24 h entfärbt. Die gefärbten Gele werden auf Whatman 3 MM platziert und unter Vakuum bei 70°C für 2 h im Gelrockner getrocknet.



### 2.30 Färbung von Western-Blot-PVDF-Membranen mit kolloidalem Silber

(nach Kovarik et al., 1987)

Im Western-Blot entwickelte PVDF-Blot-Membranen werden mit Silbernitrat angefärbt, um die geblotteten Proteine sichtbar zu machen. Dazu werden 1 ml einer Eisen-II-Sulfat-Lösung (1mg/ml) und 1 ml einer Natriumcitratlösung (2mg/ml) miteinander gemischt und auf 10 ml aufgefüllt. Danach werden 20 µl einer Silbernitratlösung (1mg/ml) in die 10 ml hineinpipettiert und sehr schnell gemischt. Die zunächst hellbraune Lösung wird direkt auf die Membran gegossen und 5 bis 10 min gefärbt. Wenn die Protein-Banden auf der PVDF-Membran deutlich sichtbar werden, wird die Reaktion gestoppt, indem die Membran herausgenommen und in eine frische Schale mit destilliertem Wasser überführt wird. Darin wird sie kurz gewaschen und in eine weitere Schale mit frischem destilliertem Wasser überführt. Dann wird das Wasser abgegossen und die gefärbte Membran in der Schale getrocknet. Die Banden dunkeln beim Trocknungsprozeß etwas nach, so daß vorher schwach erkennbare Banden nach der Trocknung deutlich sichtbar sind. Die Waschschriffe mit destilliertem Wasser sind unerlässlich.

### 2.31 Western Blot

(modifiziert nach Szewczyk und Kozloff, 1985)

Für den Transfer von Proteinen aus analytischen Polyacrylamidgelen wird ein Semidry-Verfahren mit einem für stark basische Proteine geeignetem, kontinuierlichem Puffersystem eingesetzt. Auf die Kathodenplatte (16 x 22 cm Edelstahl) werden 3 Lagen puffergetränkter Whatman 3MM-Papier mit einer 10 ml-Pipette aufgewalzt und das Polyacrylamidgel aufgelegt. Anschließend wird ein geeignet großes Stück methanolaktivierter PVDF-Membran vorsichtig auf das Gel gelegt und mit weiteren 3 Lagen getränkten Whatman 3MM-Papiers überschichtet. Die Anodenplatte (16 x 22 cm Titan-Platin-Legierung) wird mit Blot-Puffer angefeuchtet, vorsichtig aufgedrückt und mit einem 500g-Gewicht beschwert. Es wird 1 h bei 110 mA (0,5 mA/cm<sup>2</sup>) geblottet. Zwischendurch wird der Stromfluß kontrolliert. Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Transfers wird die PVDF-Membran 5 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Nach eventuellem Auseinanderschneiden der Membran entlang der Proteinbanden zwecks Inkubation mit verschiedenen Antiseren, wird zweimal in 1x TBS entfärbt. Die Membran wird dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1-2 h in Blocklösung geschwenkt. Anschließend wird die Blocklösung abgegossen und der erste

Antikörper in Antikörperverdünnungspuffer zugegeben. Nach 1-2 h Inkubation wird zur Entfernung nicht gebundener Antikörper 3 x 3 min mit 1xTBST gewaschen. Dann wird der peroxidasegekoppelte Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper zugegeben und für 40 min inkubiert. Zum Abschluß wird 3 x 3 min mit TBST gewaschen und die Membran einmal mit destilliertem Wasser gespült. Danach wird die Membran 1-3 min in 1:10-verdünntem ECL-Medium (Pierce Chemical Company, Rockford, USA) inkubiert, in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette mit Röntgenfilm (Kodak-X-O-MAT AR-5, Eastman-Kodak Company, Rochester, New York, USA) exponiert. Jeweils beginnend mit 1 min werden die Expositionszeiten der jeweiligen Signalstärke angepaßt. Ein paralleler Ansatz, in dem Prä-Immuneserum desselben Spendertieres als Erstantikörper eingesetzt wird, diente als Negativkontrolle.

### *Kompetition:*

Zur Überprüfung der Spezifität einer mit polyklonalem Vollserum detektierten Bande, wird eine Kompetition mit dem korrespondierenden, epitoptragenden Oligopeptid durchgeführt. Die Zugabe des chemosynthetischen Oligopeptids zum polyklonalen Erstantikörper-Serum (20 µg Oligopeptid pro ml Inkubationsansatz) bewirkt eine selektive Absättigung der spezifischen, klonalen Immunglobuline der gegen das Peptidepitop gerichteten Antikörper und verhindert dadurch deren Bindung an entsprechende antigene Determinanten auf geblotteten Proteinen. Das Erstantikörperserum wird ca. 30 min lang mit dem korrespondierenden Oligopeptid inkubiert, bevor es zur Inkubation der Blotmembran benutzt wird.

### 2.32 Immunpräzipitation

1 ml aufkonzentrierter Seminalplasma-Proteinextrakt (vgl.2.19) wird auf pH 7,0 – 7,5 eingestellt, in ein 1,5 ml-Eppendorfcap überführt und im Kühlraum in den Cap-Rotator eingespannt. Dann werden 20 µl Präimmuneserum (P2, Tier 1, 1. IT) zugegeben und 1 h im Kühlraum auf dem rotierenden Rad inkubiert. Dann werden 30 µl 50%ige Protein A-Agarose-Suspension zugegeben (abgeschnittene Spitze benutzen, um Scherkräfte zu vermeiden) und erneut 1 h inkubiert. Danach wird das Cap im Kühlraum bei 7000 rpm 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf-Cap überführt und das Pellet 3x mit RIPA-Puffer gewaschen. Das Pellet wird in 30 µl 2x SDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert

und bis zur Verwendung als Negativ-Kontrolle bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der Überstand wird dann mit  $20\ \mu\text{l}$   $\alpha$ -P2-Serum (T.1,90.IT) bzw.  $70\ \mu\text{l}$  affinitätsgereinigtem  $\alpha$ -P2-Serum versetzt und 1 h auf dem rotierenden Rad inkubiert. Dann werden  $30$  bzw.  $50\ \mu\text{l}$  Protein A-Agarose zugegeben und über Nacht unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wird bei  $7000 \times g$  an zentrifugiert, der Überstand vorsichtshalber aufbewahrt und das Pellet  $3\times$  mit RIPA-Puffer vorsichtig gewaschen (nicht vortexen, nicht repipettieren!). Nach dem letzten Waschschrift wird der RIPA-Puffer so gut wie möglich entfernt und das Pellet in  $30$  bzw.  $50\ \mu\text{l}$   $2\times$  SDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert. Zur Western Blot-Analyse wird je ein gesamtes Immunpräzipitat (d.h.  $30$  bzw.  $50\ \mu\text{l}$ ) pro Sammelgeltasche geladen (Verwendung des  $50\text{-}\mu\text{l}$ -Mini-Gel-Kammes).

### 2.33 Nachweis freier Sulfhydrylgruppen von PVDF-geblotteten Proteinen durch Alkylierung mit Biotin-Maleimid

(nach US-Patent Number: 6,156,529, Date of Patent: Dec. 5, 2000, Willey, K. et al., Method For Specifically Marking A Protein, Assignees: EVOTEC Biosystems AG, IHF Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung GmbH, both Hamburg, Germany)

Maleimide reagieren bei  $\text{pH} < 7.5$  selektiv mit freien Sulfhydrylgruppen in einer nukleophilen Substitutionsreaktion ( $\text{SN}_2$ ) unter Ausbildung eines Thioethers. Zunächst werden die zu untersuchenden Proteine/Peptide wie in Abschnitt 2.28 beschrieben auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Blotmembran wird anschließend ohne vorrausgehendes Blockieren 1h an der Luft getrocknet.  $25\ \text{mg}$  Biotin-Maleimid werden in  $2\ \text{ml}$  DMSO gelöst und anschließend mit  $38\ \text{ml}$  TEG-Puffer gemischt.

*TEG-Puffer für die Maleimid-Alkylierung:*

$10\ \text{mM}$  TRIS-HCL,  $\text{pH}$  6.0

$1\ \text{mM}$  EDTA

$10\%$  Glycerin

Die trockene Blotmembran wird mit dieser Lösung  $20\ \text{min}$  bei RT inkubiert. Anschließend wird der Blot viermal  $5\ \text{min}$  mit TBST gewaschen. Danach wird  $45\ \text{min}$  mit Anti-Biotin-Peroxydasekonjugat (Sigma;  $1:10000$ ) inkubiert. Nach erneutem, viermaligem Waschen mit TBST wird der Blot kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit Pierce

Supersignal Pico Enhanced Chemoluminescence Reagent (Aminophthalsäurehydrazid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1:5 verdünnt) detektiert.

### 2.34 Chromatographische Trennverfahren

#### *Affinitätschromatographie von MBP-Fusionsproteinen an Amyloseharz*

5ml Amyloseharz werden in eine 2,5 x 10 cm Säule gegossen und mit 8 Säulenvolumen Säulen-Puffer gewaschen. Der verdünnte Rohextrakt wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule geladen. Danach wird mit 12 Säulenvolumen Säulen-Puffer gewaschen und anschließend das MBP-Fusionsprotein mit Säulen-Puffer + 10 mM Maltose eluiert. Während der Elution werden Fraktionen á 3 ml aufgefangen und jeweils deren Proteingehalt bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und ggf. im Centriprep-Concentrator (Amicon/Millipore) aufkonzentriert.

#### *Gelfiltrationschromatographie:*

Die Gelfiltrationschromatographie wird mit einer Superose 12 Säule (37 x 1 cm, Amersham-Pharmacia-Biotech) durchgeführt. Das Probenvolumen beträgt jeweils 200 µl. Die gelchromatographischen Trennungen werden mit 120 mM Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8.0 an einer FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0.3 ml/min durchgeführt (FPLC=Fast Protein Liquid Chromatography) und der Verlauf der Chromatographie durch Messung der Absorption der Eluate bei 280 nm verfolgt (Schreibervorschub: 1mm/min). Die Fraktionen werden zur Untersuchung im Western-Blot mit StrataClean-Resin<sup>®</sup> (Stratagene) extrahiert (nach Ziegler et al., 1997). Die vereinigten, HE2-haltigen Eluate werden lyophilisiert, wobei das volatile Ammoniumbicarbonat weitestgehend in die Gasphase sublimiert wird und dadurch bei anschließenden Trennverfahren oder Assays nicht mehr interferiert.

#### *Anionenaustauschchromatographie:*

Für die Anionenaustauschchromatographie wird eine analytische, selbstgefüllte Q-Sepharose Fast Flow Säule (1.5 ml Säulenvolumen, Amersham Pharmacia Biotech) bei einer Fließmittelaufgeschwindigkeit von 1 ml/ min verwendet. Laufmittel A ist 20 mM TRIS-HCl,

pH 8.0, Laufmittel B ist 20 mM TRIS-HCl, pH 8.0 mit 1M NaCl. Das Probenvolumen beträgt 200 µl. Der Gradient läuft 30min isokratisch auf 100%A, läuft dann jeweils in 15 min-Schritten auf 95 %A, 90 %A, 85 %A, 80 %A, 75 %A und 0% A( 100%B). Danach lief der Gradient in 5 min auf die Ausgangssituation 100%A zurück und wird dort 10 min gehalten. Die Absorption der Eluate wird bei 280 nm gemessen und die Eluate werden zur anschließenden Western-Blot-Analyse mit StrataClean-Harz extrahiert.

### *Oasis-Mixed Mode Anion Exchanger*

Die Eluate herkömmlicher Ionentauscher haben alle eine hohe Salzkonzentration, die bei fast allen späteren Reinigungsschritten (außer bei Hydrophober-Interaktions-Chromatographie HIC) stört. Das *Oasis-Mixed-Mode-Anion-Exchanger*-Harz (Waters) ermöglicht die Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie in wässriger Lösung und eine salzfreie Elution gebundener Proteine mit leichtflüchtigen Organika.

Säule: 500mg CC Oasis MAX (Waters)

1. Schritt: Konditionieren der Säule mit 2 ml Methanol
2. Schritt: Äquilibrieren mit 2 ml destilliertem Wasser
3. Schritt: Beladen der Säule mit 15 ml Kulturüberstand infizierter High-Five-Zellen (HE2C)
4. Schritt: Waschen der Säule mit 2 ml 20 mM TRIS-HCl pH 8.0, 5% Methanol
5. Schritt: Elution mit 2 ml Methanol
6. Schritt: Elution mit 2 ml 100 mM Ameisensäure/ Aceton (50% v/v)
7. Schritt: Elution mit 2 ml 100 mM Ameisensäure/ Acetonitril (50% v/v)

Die Eluate und Waschfraktionen werden im Vortex-Evaporator bei 40 °C 30 min abgezogen. Die trockenen Rückstände werden in 50 µl destilliertem Wasser aufgenommen und ein Aliquot von 15 µl pro Tasche des SDS-PAGE-Geles geladen.

### *Herstellung der Affinitätssäulen:*

0.57 g epoxy-aktivierte Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech) werden in 20 ml destilliertem Wasser 20 min lang gequollen. Anschließend wird das gequollene Harz in eine Leersäule (gespülte und nur mit einer Fritte belassene PD-10 Säule, Amersham Pharmacia Biotech) eingefüllt und über der Fritte mit 200 ml destilliertem Wasser ca. 1h lang gewaschen. Anschließend wird das feuchte Harz in 2 ml Kopplungspuffer (200mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

pH 9.5) resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml affinitätsgereinigtem  $\alpha$ -P2-Serum wird die Säule beidseitig verschlossen und bei 40°C für 16 h im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Säule senkrecht in ein Stativ eingespannt und der Durchlauf aufgefangen. Das in der Säule verbliebene Epoxyharz wird zur Absättigung nichtgekoppelter Oxirangruppen mit 5 ml 1M Ethanolaminlösung, pH 8.0 für 16 h bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wird das fertige, gekoppelte Harz erst mit 5 ml 200mM Natriumacetatlösung pH5.9 und 500 mM Natriumchlorid und dann mit 5 ml 200mM TRIS-HCl, pH 8.0 und 500 mM Natriumchlorid gewaschen. Die Kopplungseffizienz wird durch Messung der Proteinkonzentration nach der Kopplungsreaktion (Durchlauf s.o.) bestimmt und beträgt bei den durchgeführten Messungen ca. 80%.

### *Durchführung der Affinitätschromatographie:*

Nach Äquilibrieren der Affinitätssäule mit 10 ml 200mM TRIS.HCl, pH 8.0 , 500 mM NaCl wird die Säule mit 10 ml 1:10 in Laufpuffer (200mM TRIS-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl) verdünntem Seminalplasmakonzentrat (vgl. 2.19) beladen. Der erste Durchlauf wird erneut auf die Säule geladen. Dann wird die Säule mit 100 ml Laufpuffer gewaschen und abschließend mit 5 ml 50 mM Triethylamin, pH 11.5 eluiert. Die Eluate werden vereinigt und in je 15 cm langen und 2.5 cm breiten Dialyseschläuchen (Spectra/Por, Ausschlussgrenze 1 KDa, Serva Feinbiochemika GmbH und Co. KG, Heidelberg, Deutschland) in dreimal je 2 Liter autoklaviertem, destilliertem Wasser über 20 h dialysiert. Die Dialysate werden bei -70°C eingefroren und lyophilisiert. Danach werden sie entweder in 1xSDS-Ladepuffer aufgenommen und im Western-Blot untersucht oder für weitere Reinigungsschritte in destilliertem Wasser gelöst.

### *Reversed Phase-HPLC-Trennungen:*

Die HPLC-Trennungen werden mit einer RP-C4-Säule (Nucleobond 120-5-C4, Macherey und Nagel, Düren) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0.3 ml/min durchgeführt. Laufmittel A: 0.1% TFA in destilliertem Wasser, Laufmittel B: 0.1% TFA in Acetonitril. Der Gradient läuft 2 min isokratisch auf 100% A, steigt in 30 min auf 100% B, läuft dann 5 min isokratisch auf Laufmittel B und läuft schließlich in 5 min auf 100% Laufmittel A zurück. Die Trennung wird durch Messung der Absorption bei 214 nm verfolgt.

### *Heparin-Affinitätschromatographie*

Für die Heparin-Affinitätschromatographie wird eine analytische, selbstgefüllte Affigel-Heparin-Säule (1.5 ml Säulenvolumen, Leersäule: Amersham Pharmacia Biotech; Füllmaterial: Affi-Gel, Biorad) bei einer Fließmittelaufgeschwindigkeit von 1 ml/ min verwendet. Laufmittel A ist 1xPBS, pH 7.4, Laufmittel B war 1xPBS, pH 7.4 mit 1M NaCl. Das Probenvolumen betrug 200 µl. Der Gradient läuft 5 min isokratisch auf 100%A, läuft dann jeweils in 5 min-Schritten auf 95 %A, 90 %A, 70 %A, 50 %A, 20 %A und 0% A (100%B). Danach läuft der Gradient in 5 min auf die Ausgangssituation 100%A zurück und wird dort 10 min gehalten. Die Absorption der Eluate wird bei 280 nm gemessen und die Eluate werden zur anschließenden Western-Blot-Analyse mit StrataClean-Resin extrahiert.

#### 2.35 Gewinnung von Elektrophorese-geeigneten Proteinproben aus stark salzhaltigen, verdünnten Proben (nach Ziegler et al., 1997)

Die Untersuchung stark salzhaltiger, verdünnter Proteinproben, wie z.B. bei der Ionenaustauschchromatographie anfallen, wird normalerweise durch Dialyse und anschließende Gefriertrocknung des Probenmaterials bewerkstelligt. Diese Prozedur geht jedoch mit erheblichen Verlusten einher. Die von Ziegler et al. beschriebene Methode ist erstens verlustärmer und außerdem bedeutend schneller. Ein beliebiges Volumen einer verdünnten Proteinprobe (z.B. eine 3 ml Fraktion des Ionentauschereluates) wird mit 7 µl einer StrataClean<sup>®</sup>-Harz-Aufschlammung (Stratagene) versetzt und 30 min auf dem rotierenden Rad bei RT inkubiert. Danach wird die Probe bei 13000rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das StrataClean<sup>®</sup>-Harz-Pellet wird kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und dann in 1xSDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert. Die Probe wird 2 min bei 97°C gekocht und dann bei 13000rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Tasche des SDS-PAGE oder TRICIN-PAGE-Geles geladen (Achtung: möglichst keine Harzpartikel mitladen).

2.36 Untersuchung der Aggregatbildung von Peptiden durch Crosslinking mit Glutaraldehyd  
(nach Stommel et al., 1999)

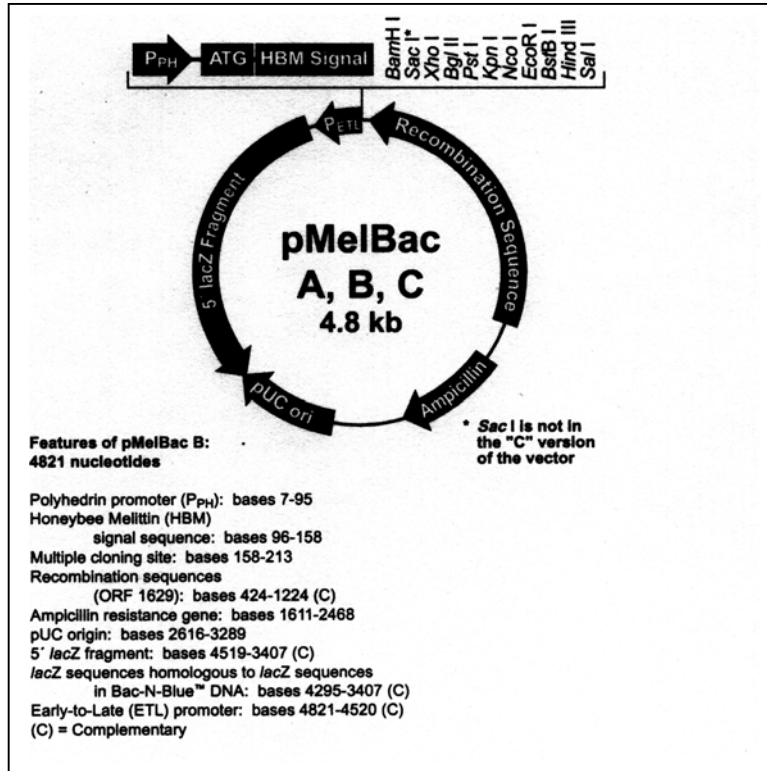
500 µl 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 werden mit 6 µl Peptid (1mg/ml) und 10 µl Glutaraldehyd 20 min bei 37°C inkubiert.

Parallel werden 500 µl 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 6 µl Peptidlösung (1mg/ml) und 20 µl DTT-Lösung (1M) mit 10 µl Glutaraldehyd 20 min bei 37°C inkubiert, um den Einfluss von Disulfidbrückenbildung auf die Aggregation auszuschließen. Die vernetzten Proben werden zur Untersuchung auf Aggregate mittels TRICIN-PAGE aufgetrennt.

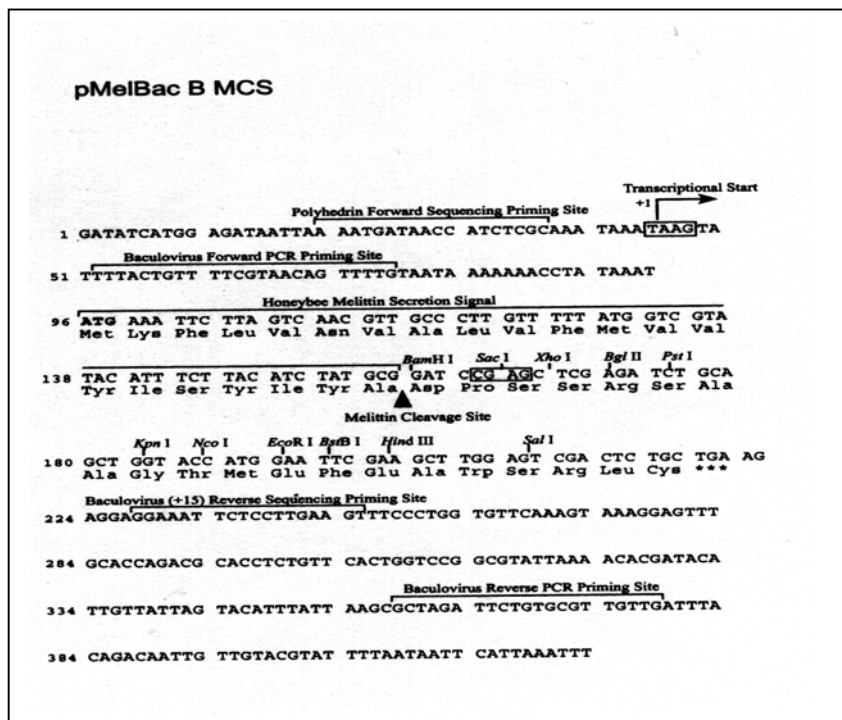


2.37 Übersicht über Vektorkarten und Polylinker der verwendeten Plasmide

pMelBacB-Vektor

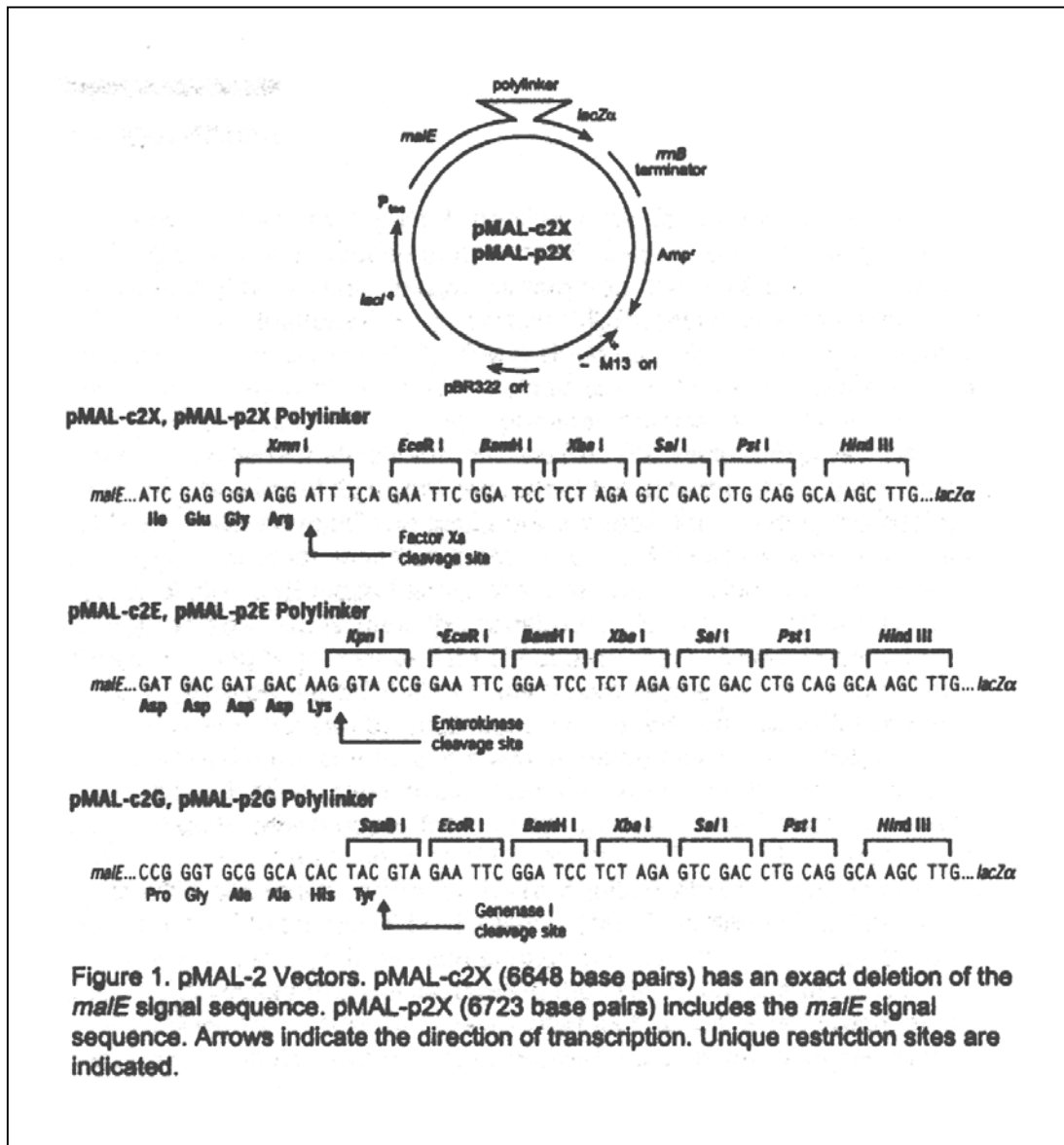


Vektorkarte



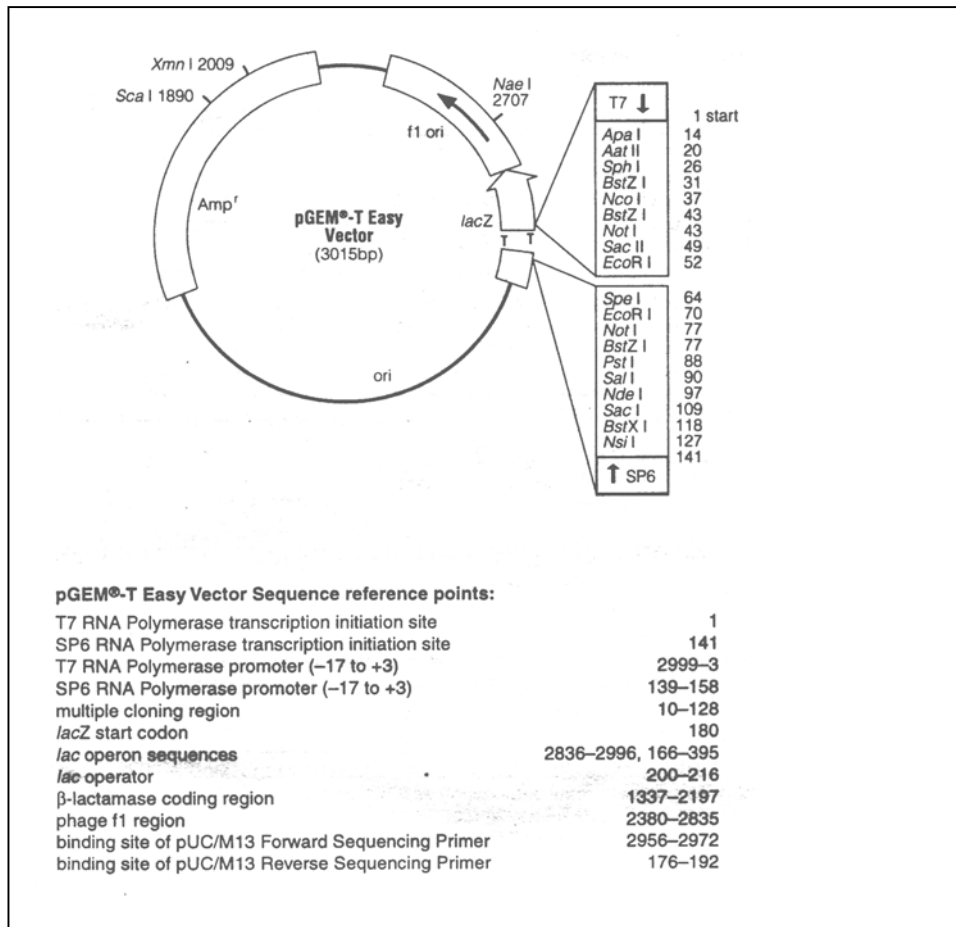
Polylinker

pMal-p2x/pMalc2x-Vektor

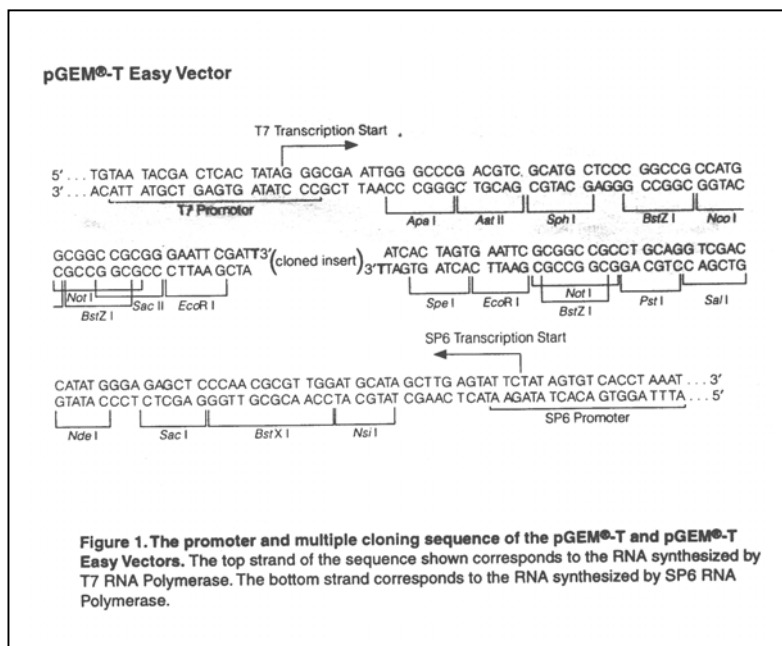


Vektorkarte und Polylinker

### pGEM-TEasy-Vektor



### Vektorkarte

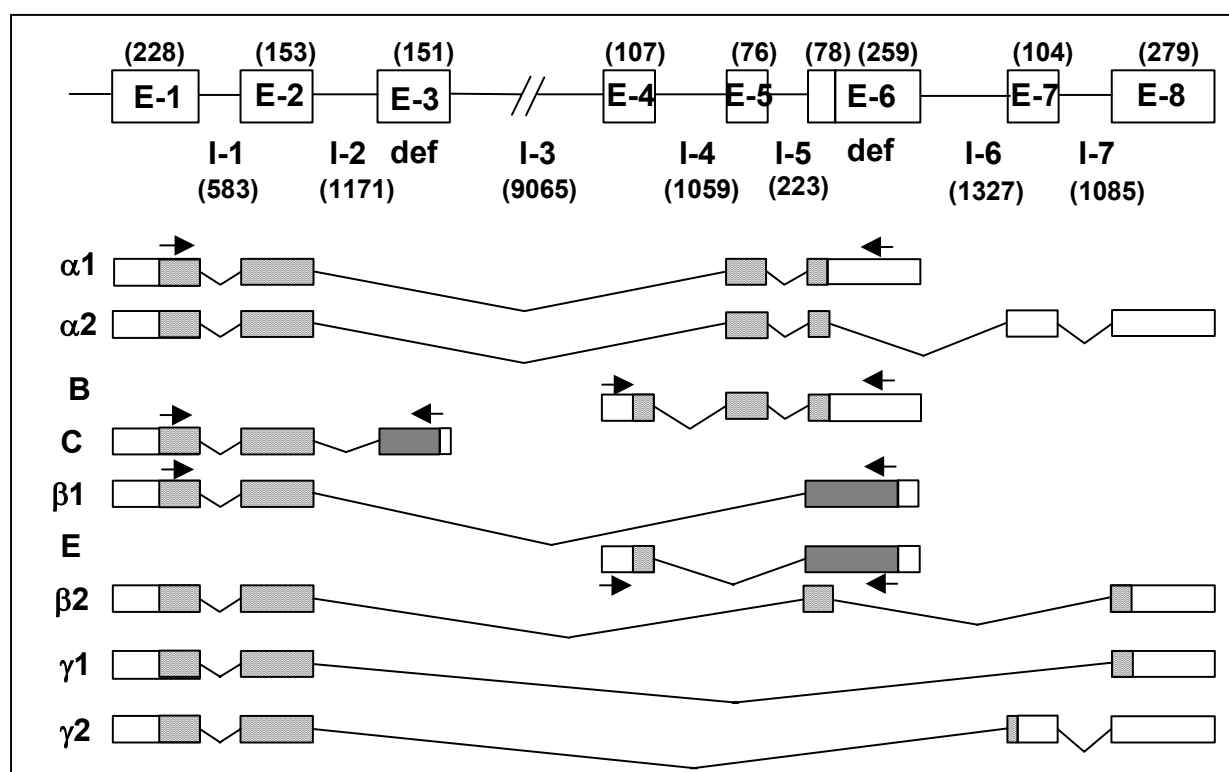


### Polylinker

### III. Ergebnisse:

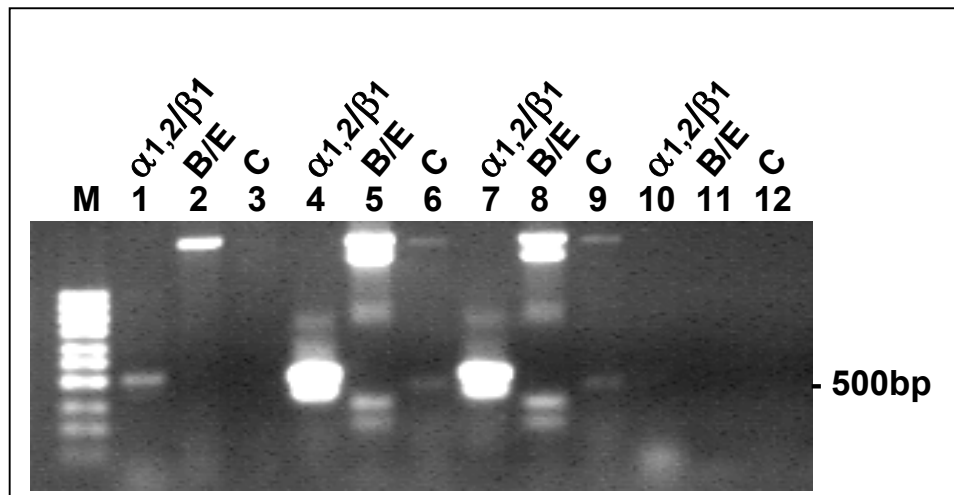
#### III.1 Nachweis alternativer Spleiß-Varianten von HE2 im Nebenhodengewebe durch RT-PCR

Die mRNA-Transkripte für HE2 finden sich vorwiegend im distalen Caput und proximalen Corpus epididymidis. PCR-Experimente mit epididymaler cDNA des Schimpansen (*Pan troglodytes*) (Fröhlich et al., 2000) ließen auf das Vorhandensein mehrerer alternativer HE2-Varianten schließen. Es konnte gezeigt werden, daß sich beim Menschen 5 HE2-Varianten auf mRNA-Ebene detektieren lassen. Hamil et al. (2000) konnten die Existenz dreier weiterer mRNA-Varianten zeigen, so daß beim Menschen auf Nukleotidebene bis jetzt insgesamt 8 HE2-Varianten nachgewiesen werden konnten. Das humane HE2-Gen besitzt 8 Exons (E-1 bis 8) die durch 7 Introns (I-1 bis 7) getrennt sind (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Genomische Struktur des humanen HE2-Lokus mit 8 Exons und zwei Promotorregionen. Die Lage der in Abb. 1 verwendeten Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet (erweiterte Version; modifiziert nach Jia et al., 2001).

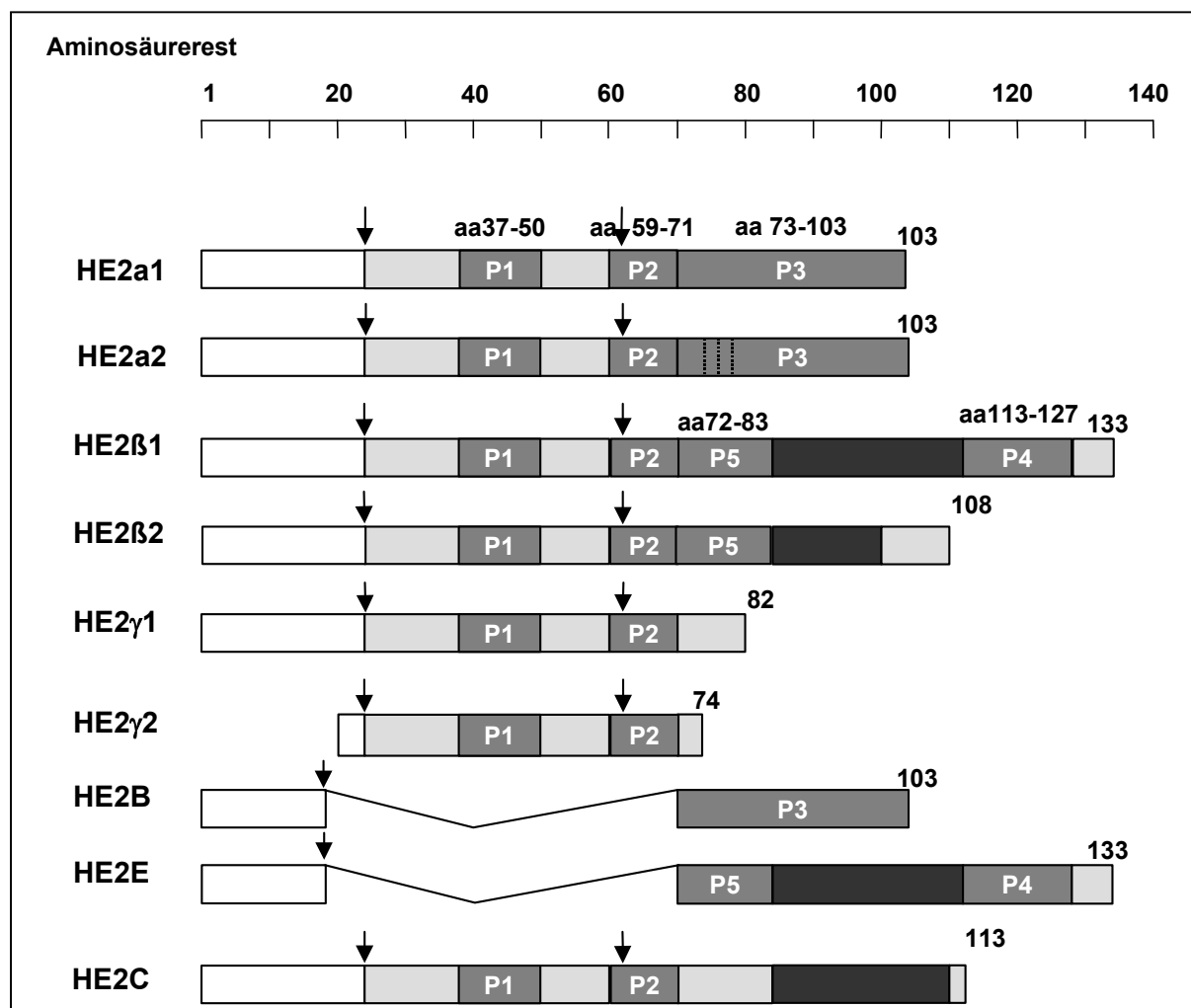
Durch alternatives Spleißen und die Benutzung eines intronischen Promotors in I-3 kann eine Reihe verschiedener HE2-Transkripte generiert werden. Ein Transkriptionsstart an dem in der 5'-UTR vor Exon 1 gelegenen Promotor (im folgenden als proximaler Promotor bezeichnet) liegt der mRNA-Expression von HE2 $\alpha$ 1, HE2 $\alpha$ 2, HE2 $\beta$ 1, HE2 $\beta$ 2, HE2 $\gamma$ 1, HE2 $\gamma$ 2 und HE2C zugrunde. Alle mRNAs dieser HE2-Varianten enthalten die Nukleotidsequenzen von Exon1 und 2. Die Aktivierung des intronischen Promotors generiert die mRNAs von HE2B und HE2E. Durch RT-PCR konnten die drei von Fröhlich et al. (2000) beim Schimpansen identifizierten Spleißvarianten HE2B, HE2C und HE2E auch beim Menschen nachgewiesen werden (Abb. 2). Hierzu wurden die bereits bei Fröhlich et al. (2000) verwendeten Primer eingesetzt. Durch diesen Nachweis der alternativen Schimpansen-HE2s konnte sowohl die Existenz zweier weiterer Exons als auch die Existenz des intronischen Promotors im humanen HE2-Gen bestätigt werden. Die beiden höhermolekularen Banden in Spur 2, 5 und 8 wurden durch Subkolonierung in pGEM TEasy und Sequenzierung als HE2-Nukleotidsequenzen mit zwei Intronbereichen identifiziert (Daten nicht gezeigt). Unter den gewählten PCR-Bedingungen wird die für HE2 $\alpha$  kodierende cDNA am häufigsten amplifiziert (vgl. Abb. 2). Sie ist zudem die einzige der untersuchten HE2-Varianten, die sich bereits aus testikulärem Gewebe amplifizieren läßt (Abb. 2, Spur 1). Die cDNA-Fragmente der übrigen HE2-Varianten sind dagegen im testikulären Gewebe nicht nachweisbar. Mit den primatenspezifischen Primern konnten aus Ratten-Nebenhoden-cDNA keine DNA-Fragmente amplifiziert werden (Abb.2, Spur 10 bis 12).



**Abbildung 2:** Auftrennung der RT-PCR-Amplicons auf einem 1%igen Agarosegel. Die ausgesuchten Primer schließen je zwei Exons ein. Über jeder Spur sind die jeweiligen Amplicons benannt. Spur 2, 5 und 8 zeigen Amplicons, die aus kontaminierender, genomischer DNA stammen und sich durch ihre Länge von den korrekten cDNA-Fragmenten unterscheiden. M = 100 bp-Leiter; Spur 1-3: Amplifikation menschlicher Hoden-cDNA; Spur 4-6: Amplifikation menschlicher Nebenhoden-cDNA (Patient 1); Spur 7-9: Amplifikation humaner epididymaler cDNA (Patient 2); Spur 10-12 Amplifikation von epididymaler Ratten-cDNA.

### III.2 Nachweis von HE2-Antigenen auf Proteinebene

Um die HE2-Varianten auf Proteinebene unterscheiden zu können, wurden polyklonale Antikörper gegen fünf synthetische Oligopeptide (P1-P5) hergestellt. Die Lokalisation der Peptidepitope ist in Abb. 3 gezeigt.

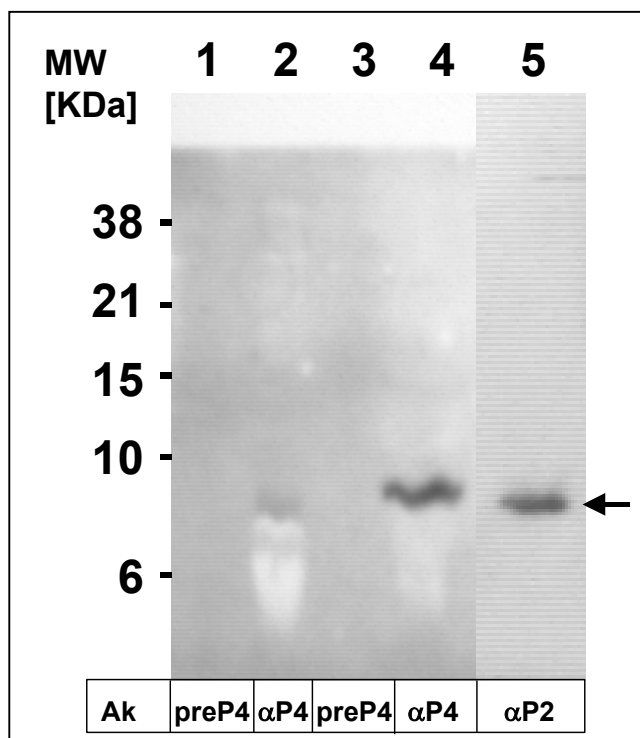


**Abbildung 3:** Lokalisation der Oligopeptidpitope P1 bis P5 innerhalb der putativen HE2-Proteine. β-Defensin-ähnliche Bereiche sind als schwarzer Block gekennzeichnet. ER-dirigierende Signalsequenzen sind weiß unterlegt. Die Pfeile kennzeichnen putative proteolytische Spaltstellen. Die gestrichelten Linien im P3-Abschnitt von HE2α2 geben drei Aminosäureaustausche an (Aminosäuresequenzen s. Abb. 7).

### **III.2.1 Mindestens eines der HE2-Antigene bindet ionisch an die Oberfläche ejakulierter Spermien**

Da Osterhoff et al. 1994 durch immunocytochemische Experimente das Vorkommen von HE2 auf der Spermienoberfläche gezeigt haben, wurde versucht, HE2-Proteine in Spermienmembranpräparationen nachzuweisen. Viele Spermatozoen-assoziierte, epididymale Sekretproteine scheinen über Ionenbindung an deren Oberfläche anzudocken (Tezon et al., 1985). Elektrostatisch gebundene Moleküle lassen sich mit Hilfe von Puffern hoher Ionenstärke von der Spermienmembran abwaschen. Diese Hochsalz-Waschmethode kann genutzt werden, um die ionisch an die Spermienoberfläche gebundenen Proteine selektiv anzureichern (Tezon et al., 1985). Als Hochsalz-Waschpuffer wurde PBS mit 0,6M NaCl verwendet, da eine weitere Erhöhung der Ionenstärke die Effizienz der Waschmethode nicht erhöht (McArdle, 1991). Eine andere Methode zur Gewinnung von Spermienmembranproteinen ist die Extraktion mit Lithium-3,5-Diiodsalizylat (LIS) (Alexander und Bearwood, 1984). Mit polyklonalem Anti- ( $\alpha$ -)P2 und  $\alpha$ -P4-Serum gelang im Salzwasch von pelletierten, humanen Spermien der Nachweis einer prominenten ca. 8 KDa großen Bande. Mit dem  $\alpha$ -P4-Serum ließ sich auch im LIS-Extrakt die 8 KDa-Bande detektieren (Abb. 4). Mindestens eine der HE2-Varianten bindet demnach fest an die Spermienoberfläche, wobei hier offenbar eine vorwiegend ionische Art der Bindung vorliegt.



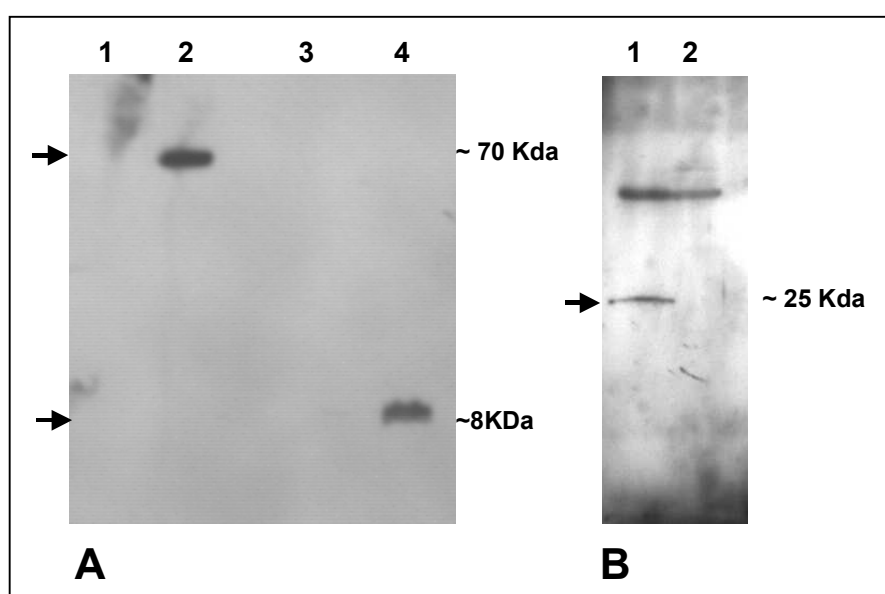


**Abbildung 4:** Western-Blot-Analyse von HE2-Proteinen in Membranpräparationen humaner Spermien. Spur 1 und 2: LIS-Extrakt (10µg Gesamtprotein). Spur 3, 4 und 5: Spermien-Salzwäsche (10µg Gesamtprotein). Detektion: Spur 1 und 3: pre P4, Spur 2 und 4: α-P4: 1:500, Spur 5: α-P2: 1:500; Ak=Antikörper.

### III.2.2 HE2-Proteine lassen sich im menschlichen Seminalplasma nachweisen

Da Salzwäsche- und LIS-Extrakt im Verhältnis zum Seminalplasma der erhaltenen Ejakulate nur in wesentlich geringerer Menge gewonnen werden konnten, wurde versucht, die HE2-Antigene im Seminalplasma zu detektieren. Der Nachweis von HE2-Antigenen im unbehandeltem, mit SDS-Ladepuffer versetztem Seminalplasma war zunächst ohne Erfolg. Erst eine denaturierende Konzentrationsmethode führte schließlich zum Ziel. Nach Acetonfällung und Trocknung der Seminalplasmaproteine, ließ sich ein Großteil des Präzipitats aufgrund der durch Acetonkontakt bedingten Denaturierung nur schwer wieder solvatisieren, wohingegen das kleine HE2 sofort in Lösung ging. Dadurch konnte eine Anreicherung von HE2 in zweifacher Hinsicht erreicht werden: erstens wurden die Proteinbestandteile des Seminalplasmas aus einem großen Volumen Seminalplasma präzipitiert und über den Umweg der Festphase in einem deutlich kleineren Volumen gelöst (vgl. Material und Methoden). Zweitens wurde HE2 gegenüber den nicht mehr solvatisierbaren, irreversibel denaturierten Proteinen auch in Bezug auf die

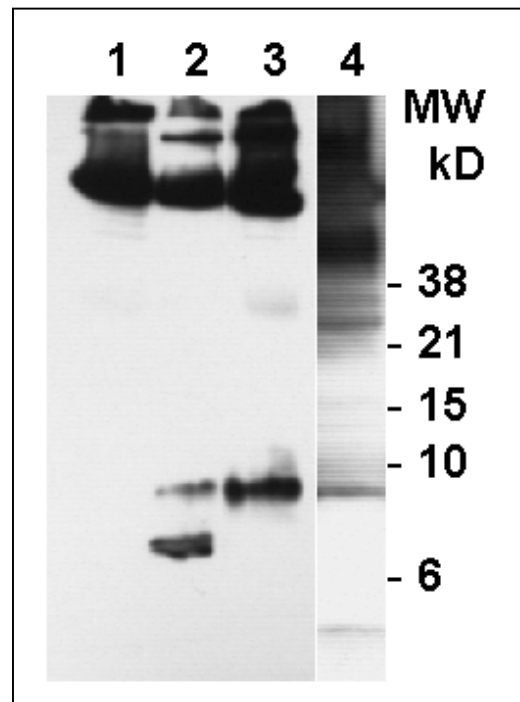
Proteinzusammensetzung der Probe angereichert. Abb. 5A zeigt den Nachweis von HE2 im angereicherten Seminalplasma (Spur 4). Der gegen das P1-Peptidepitop gerichtete Antikörper erkennt ein kreuzreagierendes Antigen mit unerwartet hohem, apparenten Molekulargewicht (Abb. 5A, Spur 2). Da sich in der Nähe des P1-Epitops der HE2-Proteine ein N-Glykosylierungskonsensus befindet, wurde angenommen, daß möglicherweise ein komplexes N-Glykan das P1-Epitop verdeckt. Um dennoch He2-Proteine mit dem P1-Epitop nachweisen zu können, wurde die an Nebenhoden-Sekretproteinen reiche corpus epididymale Flüssigkeit eingesetzt. Ein Aliquot an corpus-epididymaler Flüssigkeit wurde mit N-Glykosidase F deglykosyliert und anschließend mit  $\alpha$ -P1-Serum detektiert (Abb.5B).



**Abbildung 5:** A. Detektion von HE2-Proteinen in menschlichem Seminalplasma. Spur 1: pre P1-Serum, Spur 2 Anti ( $\alpha$ -)P1-Serum, Spur 3: pre-P2-Serum, Spur 4:  $\alpha$ -P2-Serum. Pro Spur wurden je 30  $\mu$ g Gesamtprotein geladen. Alle Seren wurden 1:500 verdünnt. B. Reaktion von Corpus-epididymaler Flüssigkeit mit  $\alpha$ -P1-Serum (1:500). Spur 1: Probe deglykosyliert mit N-Glycosidase F; Spur 2: nicht deglykosyliert. Pro Spur wurden 8 $\mu$ l Corpus-epididymale Flüssigkeit ( $\sim$ 40 $\mu$ g Gesamtprotein) geladen.

*Immunpräzipitation aus aufkonzentriertem Seminalplasma*

Um das nachgewiesene HE2 genauer zu charakterisieren und um möglicherweise weitere Varianten von HE2 aufzufinden, wurde eine Immunpräzipitation mit dem P2-Antikörper durchgeführt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate mit  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -P4 und  $\alpha$ -P5-Antikörpern detektiert. Dabei zeigte sich folgendes Bandenmuster (Abb. 6):



**Abbildung 6:** Western-Blot-Analyse von immunpräzipitierten HE2-Proteinen. Zur Vorreinigung (*preclearing*) wurde das preP2-Serum eingesetzt (Spur1). Zur Fällung wurde der  $\alpha$ -P2-Antikörper verwendet (Spur2 bis 4). Spur 1 und 2 wurden mit  $\alpha$ -P2-Serum, Spur 3 mit  $\alpha$ -P4-Serum und Spur 4 mit  $\alpha$ -P5-Serum entwickelt. Zur Lokalisation der Peptidpitope vgl. Abb. 3. Die in allen Spuren sichtbare Kreuzreaktion im hochmolekularen Bereich geht auf Immunglobulinketten der zur Fällung eingesetzten Kaninchenantikörper zurück

Die polyklonalen Antiseren gegen die Oligopeptide P2, P4 und P5 detektieren jeweils eine Bande im Bereich von ca. 8 KDa apparenten Molekulargewichts. Das Antiserum gegen P2 reagiert außerdem mit zwei weiteren Banden oberhalb von 6 KDa. Der  $\alpha$ -P3-Antikörper konnte im Immunpräzipitat keine Bande detektieren. Auch die  $\alpha$ -P3-Immunfällung und anschließende Detektion mit  $\alpha$ -P3 blieb erfolglos. Der  $\alpha$ -P1-Antikörper konnte das 8 KDa-Protein nicht erkennen, wohl aber ein kreuzreagierendes Antigen von ~70 KDa (vgl. Abb. 5).

Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, daß die 8KDa-Bande vor allem die Variante HE2 $\beta$ 1 repräsentiert, denn diese ist die einzige Form von HE2, die sowohl mit  $\alpha$ -P2- als auch mit  $\alpha$ -P5- und  $\alpha$ -P4-Immunsereum reagiert (vgl. Abb.3). Die durch das  $\alpha$ -P2-Serum detektierten, kleineren HE2-Varianten stellen weder Degradationsprodukte von HE2 $\beta$ 1 noch die trunkierte Form HE2 $\beta$ 2 dar, da diese mit dem  $\alpha$ -P5-Serum reagieren müssten. Es konnte also die Existenz von mindestens drei HE2-Varianten auf Proteinebene gezeigt werden. Die Ergebnisse zur 8KDa-HE2 $\beta$ 1-Bande warfen allerdings zwei Widersprüche auf. Erstens besitzt das HE2 $\beta$ 1 nach Abspaltung seines ER-dirigierenden Signalpeptids ein rechnerisches Molekulargewicht von ca. 12 KDa, obwohl die größte der bisher durch Western-Blot ermittelten Banden nur ein apparentes Molekulargewicht von 8 KDa zeigt. Zweitens war es nicht möglich, das 8 KDa-Protein auch mit  $\alpha$ -P1-Serum nachzuweisen. Daher wurde vermutet, daß sich innerhalb der HE2-Sequenz zwischen dem P1- und dem P2-Epitop eine proteolytische Prozessierungsstelle befinden könnte. Bei der näheren Betrachtung der betreffenden Aminosäuresequenz fiel sofort ein dibasisches Motiv auf, denn diese sind sehr oft Erkennungs- und Spaltstellen für sequenzspezifische Proteasen. Die genauere Analyse des dibasischen Motivs zeigte, daß sich hier eine nicht-klassische Erkennungssequenz für die ubiquitäre Prohormonkonvertase Furin befindet. Im Furin-Konsensus-Motiv besteht eine Redundanz zwischen Position -4 (P -4) und Position -6 (P -6). Während im klassischen Furin-Erkennungsmotiv die Positionen -4, -2 und -1 invariant mit basischen Aminosäuren besetzt sein müssen, kann im nicht-klassischen Erkennungsmotiv die Position -6 anstelle von Position -4 mit einer basischen Aminosäure besetzt sein. Die HE2-Sequenz erfüllt den nicht-klassischen Furin-Konsensus. Um zu bestätigen, daß die 8 KDa-Bande ein durch Furin-Prozessierung entstandenes Produkt darstellt, wurde sie durch Edman-Abbau N-terminal ansequenziert.

### **III.2.3 Der N-Terminus des 8 KDa-HE2-Proteins beginnt mit der Aminosäuresequenz DLLPPRT**

Zur Analyse der aminoterminalen Sequenz der prominenten 8 KDa-Bande wurde diese mit  $\alpha$ -P2-Serum aus epididymaler Flüssigkeit immunpräzipitiert und nach dem TRICIN-PAGE-Lauf auf eine PVDF-Membran geblottet. Die anschließende, aminoterminal Ansequenzierung der auf PVDF geblotteten und ausgeschnittenen Bande wurde durch die TopLab-GmbH (Martinsried) durchgeführt (Edman-Abbau). Es zeigte sich die Sequenz DLLPPRT. D repräsentiert dabei das Aspartat 61 der HE2-Sequenz. Das DLLPPRT-Motiv

kommt in sieben der insgesamt neun HE2-Varianten vor und ist Bestandteil des P2-Epitops (Abb. 7).

```

HE2α1  MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA--
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQVHISHQEARGPSFKICVGFLGPR  WARGCSTGN
                                     +++++

HE2α2  MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA--
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQVHISHREARGPSFRICVDFLGPR  WARGCSTGN
                                     +++++

HE2β1  MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA—
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQGDVPPGIRNTICRMQQGICRLFFCHSGEKKRDIC
        SDPWNRCVSNTDEEGKEKPEMDGRSGI          +++++

HE2β2  MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA—
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQGDVPPGIRNTICRMQQGICRLFFCHSGTGQQHR
        QRCG                                     +++++

HE2γ1  MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA—
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQGTQQHRQRCG
                                     +++++

HE2γ2  MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA—
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQEMK
                                     +++++

HE2C   MRQRLPSVTSLLLVALFPGSSQA-
        RHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRHAVKRDLLPPRTPPYQEPASDLKVVDCRRSEGFCQEYCNYMETQVGYC
        PKKKDACCLH          +++++

HE2B   MKVFFLFAVLFCLVQTNS.....VHISHQEARGPSFKICVGFLGPR  WARGCSTGN

HE2E   MKVFFLFAVLFCLVQTNS.....GDVPLGIRNTICRMQQGICRLFFCHSGEKKRDICS
        DPWNRCVSNTDEEGKEKPEMDGRSGI

```

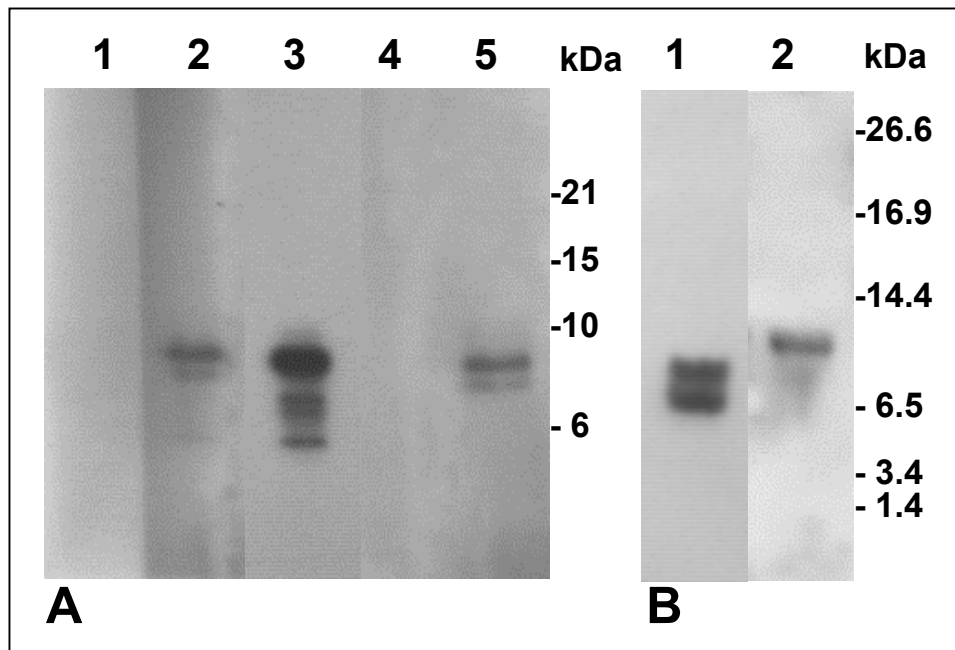
**Abbildung 7:** Lokalisation des DLLPPRT-Motivs innerhalb der HE2-Sequenzen (+++++)

Aminosäureunterschiede zwischen HE2α1 und HE2α2 sind fett gedruckt.

### III.2.4 Nachweis von weiteren HE2-Proteinen in der epididymalen Flüssigkeit

Da das Seminalplasma nur zu etwa 10% aus epididymaler Flüssigkeit besteht (vgl. Einleitung), bestand die Hoffnung, weitere HE2-Proteine in der epididymalen Flüssigkeit aufzufinden. Diese wurde durch Kannulierung und retrograde Perfusion mit PBS aus operiertem Nebenhodengewebe gewonnen (zur Verfügung gestellt von Dr. Ching Hei Yeung, Institut für Reproduktionsmedizin, Westfälische Wilhelms Universität Münster). Neben der

bereits bekannten ~8kDa-Bande ließen sich mehrere apparent kleinere Banden nachweisen (Abb. 8).

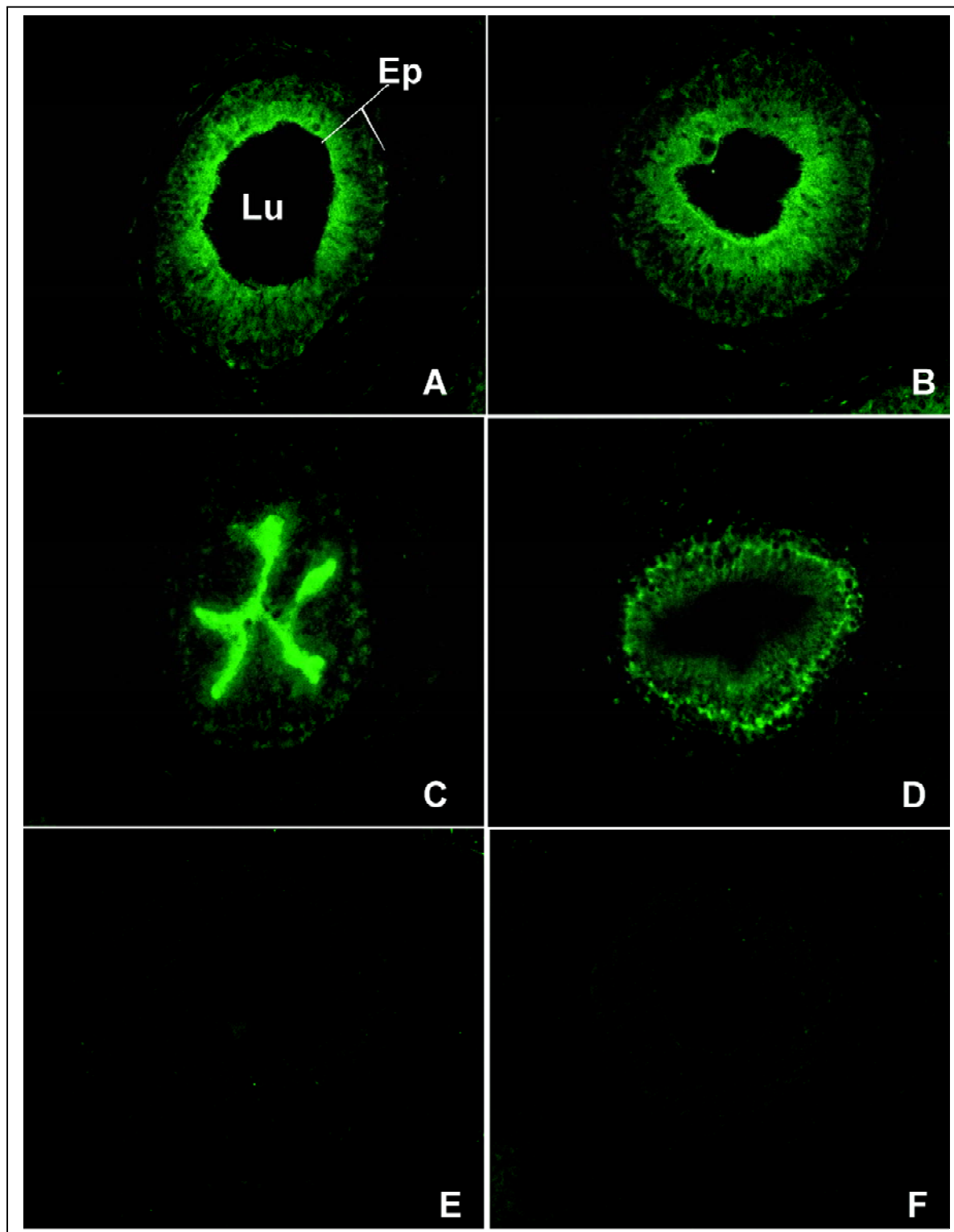


**Abbildung 8:** Western-Blot-Analyse von HE2-Antigenen in der epididymalen Flüssigkeit. A: klassisches 15%-SDS-PAGE-Laemmli-Gel . Spur 1. Konkurrenz der mit  $\alpha$ -P2-Serum detektierten Banden mit 20  $\mu$ g Peptid P2. In Spur 1 und 2 wurden je 4  $\mu$ l corpus-epididymale Flüssigkeit geladen, in Spur 3 dagegen 8  $\mu$ l. Spur 4 und 5: Pro Spur wurden 8  $\mu$ l cauda-epididymale Flüssigkeit geladen. Spur 4 wurde mit pre P4 und Spur 5 mit  $\alpha$ -P4 detektiert. B: TRICIN-PAGE-Gel. In Spur 1 und 2 wurden je 8  $\mu$ l corpus-epididymale Flüssigkeit geladen. Detektion: Spur 1:  $\alpha$ -P3-Serum; Spur 2:  $\alpha$ -P4 Serum. Alle Seren wurden in der Verdünnung 1:500 eingesetzt. (1  $\mu$ l Corpus-epididymale Flüssigkeit enthielt etwa 5  $\mu$ g Gesamtprotein, 1  $\mu$ l cauda-epididymale Flüssigkeit enthielt etwa 7  $\mu$ g Gesamtprotein)

Mit dem  $\alpha$ -P2-Serum lassen sich mindestens vier dezidierte Banden detektieren (Abb. 8a, Spur 3). Die Spezifität der mit  $\alpha$ -P2-Serum detektierbaren Bande wurde durch Konkurrenz des Antiserums mit 20  $\mu$ g/ml P2-Oligopeptid nachgewiesen (Abb. 8a, Spur 1 und 2). Im 15% SDS-PAGE-Gel erkennt der  $\alpha$ -P4-Antikörper eine Doppelbande im 8 kDa-Bereich (Abb.8a, Spur 5). Das  $\alpha$ -P3-Serum detektiert zwei Banden unterhalb von 8 kDa (Abb. 8b, Spur 1). Im Tricin-Gel erkennt der  $\alpha$ -P4-Antikörper im Unterschied zum SDS-PAGE-Gel nur eine einfache Bande bei 8 kDa (Abb. 8b, Spur 2).

### III.3 Einfluß von Anti-Androgenen auf die Expression von HE2-Proteinen im Nebenhodenepithel

Da sich in beiden Promotoren des HE2-Gens putative „ARE-Half-sites“ befinden (*Androgen Responsive Element*, vgl. Einleitung), wurde die Androgenabhängigkeit der HE2-Genexpression auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde Gewebe orchidektomierter Prostatakarzinom-Patienten herangezogen. Während Patient A ohne vorausgehende Langzeit-Antiandrogen-Therapie orchidektomiert wurde, wurde Patient B vor der Operation einer monatelangen Therapie mit Cyproteronacetat (Androcur<sup>®</sup>, SCHERING AG, Berlin) unterzogen. Die mit  $\alpha$ -P3 und  $\alpha$ -P4 reagierenden HE2-Varianten zeigen nach Langzeit-Antiandrogen-Behandlung ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während das P3-Antigen in beiden Geweben im apikalen Saum des Epithels nachgewiesen werden kann (Abb.9 A, C), wird das P4-Antigen im Gewebe des behandelten Patienten nur noch im basalen Epithelabschnitt nachgewiesen (Abb.9, B,D). Die Pre-Seren dienten jeweils als Negativkontrolle (Abb. 9, E,F).



**Abbildung 9:** Immunhistochemische Analyse von HE2-Proteinen im Epithel des proximalen Corpus epididymidis mittels indirekter Cy2-Immunfluoreszenz. A und B: Kryoschnitte durch den Nebenhoden eines unbehandelten Prostata-Karzinompatienten. C und D: Kryoschnitte durch Nebenhodengewebe eines mit Antiandrogenen behandelten Patienten. A und C:  $\alpha$ -P3-Serum 1:200, E: Preimmunserum P3: 1:200; B und D:  $\alpha$ -P4-Serum 1:200, F: Preimmunserum P4 1:200. Ep = Epithel, Lu = Lumen.



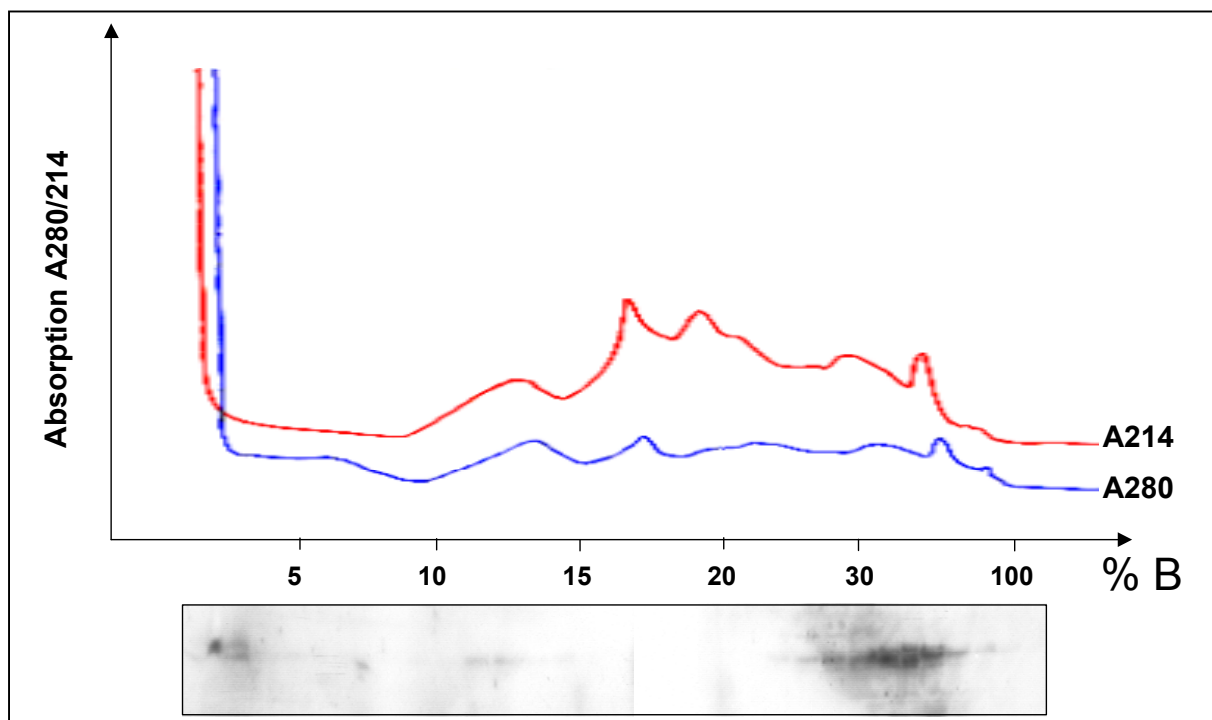
### III.4 Funktionelle Analyse von HE2-Proteinen

#### III.4.1 Anreicherung von HE2-Proteinen aus humanem Seminalplasma

Um die HE2-Proteine funktionell zu charakterisieren, sollten sie zunächst aus Seminalplasma aufgereinigt werden.

##### *Anreicherung am Ionentauscher*

Aufgrund ihrer meist kationischen isoelektrischen Punkte war zu erwarten, daß sich HE2-Proteine am Kationentauscher anreichern lassen. Entsprechende Versuche mit den Kationentauscherharzen Chromabond SA<sup>®</sup> (Macherey und Nagel) und CM-Macroprep<sup>®</sup> (BIORAD) blieben jedoch erfolglos. Bei pH 8.0 konnten HE2-Proteine aus angereichertem Seminalplasma an den Anionentauscher Q-SepharoseFF<sup>®</sup> (Amersham-Pharmacia Biotech) gebunden und mit steigender Ionenstärke wieder eluiert werden (Abb. 10). Die HE2-haltigen Fraktionen waren jedoch derart stark mit Begleitproteinen kontaminiert, daß eine andere Strategie zur Aufreinigung überlegt werden mußte.

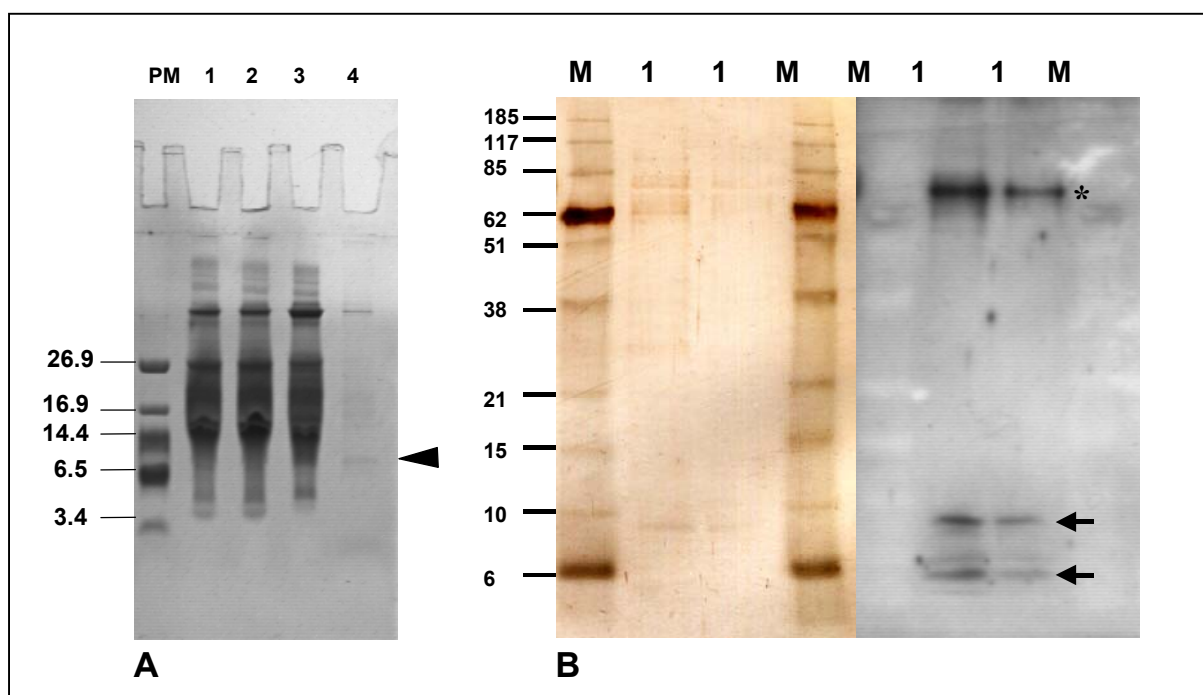


**Abbildung 10:** Q-Sepharose FF-FPLC-Profil von 200 µl aufkonzentriertem Seminalplasma (300µg Gesamtprotein) und korrespondierender Western-Blot (~8 kDa-Bande) Das schwache Signal im Durchlaufpeak deutet auf eine partielle Überladung der Säule hin. HE2-Protein eluiert bei ca. 70% Laufmittel A/ 30% Laufmittel B. Die Beschriftung der Ordinate gibt die

sich im Zeitverlauf ändernden Gradientenverhältnisse an (vgl. hierzu Material und Methoden).

#### *Anreicherung durch Affinitätschromatographie (AC)*

Zu diesem Zweck wurde der gereinigte, monospezifische P2-Antikörper an Epoxy-aktivierte Sepharose 6B gekoppelt (vgl. Material und Methoden). Pro Reinigung wurden 200 ml fünffach verdünntes Seminalplasma auf die Säule geladen. Nach dem Waschen wurden die gebundenen HE2-Proteine mit 50 mM Triethylamin, pH 11,5 eluiert. Es konnte sowohl die ~8 KDa-Bande als auch eine weitere bei < 6KDa aus dem Seminalplasma angereichert werden (Abb. 11).



**Abbildung 11:** TRICINE-PAGE und Western-Blot-Analyse affinitätschromatographisch angereicherter HE2-Proteine. A. Coomassie-gefärbtes TRICIN-Gel. B. Western-Blot und silbergefärbte PVDF-Blotmembran. A: Spur 1: Seminalplasma; Spur 2 Säulendurchlauf; Spur 3: Waschflüssigkeit; Spur 4 : Eluat, PM = Peptid-Marker. B. Die Pfeile zeigen die detektierten HE2-Banden. M = Marker, E = Eluat. Pfeile zeigen auf die angereicherten HE2-Varianten. Die Proben wurden durch Extraktion mit StrataClean<sup>®</sup>-Harz gewonnen.

Neben den erwünschten HE2-Proteinen eluiert auch der kovalent gekoppelte Antikörper von der Säule, dessen schwere Kette im Western-Blot deutlich erkannt wird (\* ,Abb. 11 B). Schon daran war abzusehen, daß die AC-Säulen nur begrenzt wiederverwendbar sein würden, so daß

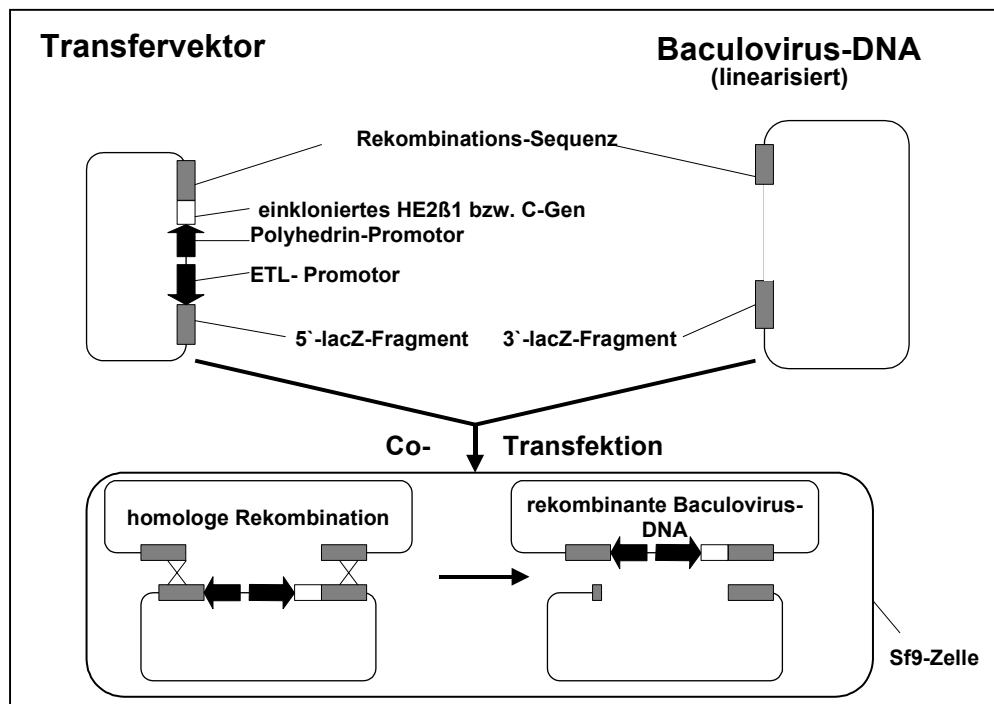
die auf diesem Wege erreichbare Menge an HE2-Proteinen zur Durchführung funktioneller Studien nicht ausreichen würde.

### **III.4.2 Rekombinante Expression von HE2-Proteinen im Baculovirus-Expressionssystem**

Da sich, wie gezeigt, das natürliche HE2 nicht in hinreichend großer Menge aufzureinigen ließ, wurden die HE2-Proteine rekombinant hergestellt. Heterologe Proteine, die sich durch ein komplexes Disulfidbrückenmuster auszeichnen, lassen sich in der Regel nicht funktionell aktiv in *E. coli* exprimieren. Meist werden solche Proteine inkorrekt gefaltet und bilden schwerlösliche *inclusion bodies*. Für die Expression der beiden  $\beta$ -Defensin-ähnlichen HE2-Proteine HE2 $\beta$ 1 und HE2C wurde deshalb das Baculovirus-Expressionssystem ausgewählt, um die korrekte Faltung und Disulfidbrückenbildung innerhalb der  $\beta$ -Defensinmodule zu gewährleisten. (Zur Biologie der Baculoviren und zur Einschätzung der biologischen Sicherheitssituation vgl. (vgl. Anmerkung in Material und Methoden).

#### **III.4.2.1 Subklonierung der HE2 $\beta$ 1 und HE2C cDNA in den pMELBAC B-Vektor**

Auf dem Plasmid befindet sich unmittelbar vor der MCS (*Multiple Cloning Site*) für das zu exprimierende Gen die Nukleotidsequenz des Polyhedrinpromotors, der während der Spätphase der baculoviralen Infektion seine volle Aktivität entfaltet. Benachbart zum Polyhedrinpromotor liegt der ETL (*Early To Late*)-Promotor, der während aller Infektionsphasen aktiv ist und auf dem Plasmid in der gegenläufigen Richtung die Expression des LacZ-Fragments ansteuert. Der Polyhedrin-Promotor des pMelBac-B-Vektors reguliert die Expression heterologer Proteine. Unmittelbar vor der MCS befindet sich jedoch die kodierende Sequenz für das Melittin-ER-Signalpeptid der Honigbiene, welches sich besonders dazu eignet, heterologe Proteine zur Sekretion ins Kulturmedium zu zwingen. Die für das HE2 $\beta$ 1 und HE2C kodierenden cDNAs wurden daher ohne den für ihr intrinsisches Signalpeptid kodierenden Sequenzabschnitt in die MCS des pMelBac-B-Plasmids (Transfektor) subkloniert. Die Promotorregionen sowie die MCS werden von homologen Rekombinationssequenzen flankiert, die sich sowohl auf dem Plasmid als auch auf der linearisierten Baculovirus-DNA befinden (vgl. Transfektor Abb. 12). Der Erfolg der Subklonierung wurde durch analytischen Restriktionsverdau festgestellt. Die dabei ermittelten, positiven Klone wurden zwecks Fehleranalyse am LICOR durchsequenziert.



**Abbildung 12:** Schematischer Ablauf der Co-Transfektion mit linearisierter, baculoviraler DNA

### III.4.2.2 Identifizierung positiver Virionen-Plaques

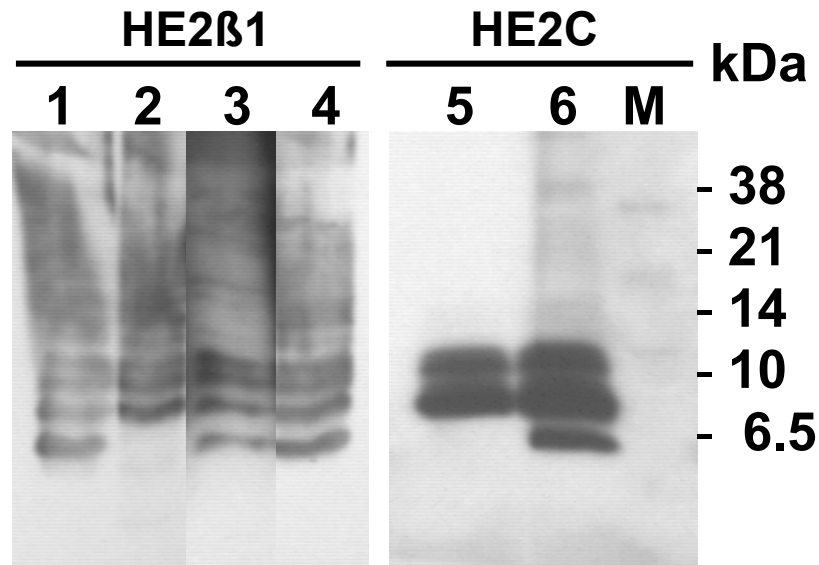
Nach Kontrolle der Sequenz und des korrekten Leserasters der Klone wurden diese zur Co-Transfektion verwendet. Dazu wurden die rekombinanten pMelBac-B-Plasmide mit linearisierter Baculovirus DNA (Bac-N-Blue) und Insectin-Liposomen versetzt und auf Sf-9-Zellen gegeben. Innerhalb der Zelle kommt es zur homologen Rekombination zwischen den bereits erwähnten Sequenzabschnitten auf dem Plasmid und beiden Enden der linearen Baculovirus-DNA (vgl. Abb.12). 72 Stunden nach der Transfektion haben die Sf-9-Zellen eine große Zahl rekombinanter Virionen in das Kulturmedium abgegeben. Zur Durchführung des Plaque-Assays wird eine 1:10000-Verdünnung dieses Virionen-haltigen Kulturmediums auf einen konfluenten Monolayer von Sf-9-Zellen gegeben. Nach einstündiger Expositionszeit wird die Verdünnung abgezogen und der Sf-9-Monolayer mit X-Gal-haltiger Baculovirus-Agarose überschichtet. Fünf bis 7 Tage später lassen sich rekombinante Virionen-Plaques als blaue Punkte im Agar ausmachen (vgl. Abb. 13). Dort, wo rekombinante Baculoviren Sf-9-Zellen infiziert haben, entsteht die Blaufärbung aufgrund der Beta-Galaktosidase-vermittelten Glycosidspaltung des X-Gal-Reagenzes, da die mit rekombinanten Virionen infizierten Zellen über den ETL-Promotor zur Überexpression von Beta-Galaktosidase gezwungen werden.



**Abbildung 13:** Durch X-Gal visualisierte, rekombinante Virionen-Plaques in einem Sf-9-Monolayer

### III.4.2.3 Expression und proteolytische Prozessierung von HE2 $\beta$ 1 und HE2 C

Nach Reinigung und Propagation zum High Titer Stock wurden die rekombinanten Baculoviren zunächst zur Infektion konfluenten Sf-9-Zellen eingesetzt. 72 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen abzentrifugiert und der Kulturüberstand aufkonzentriert. Pro Spur wurden je 20  $\mu$ l des Konzentrates ( $\sim$ 30  $\mu$ g Gesamtprotein) geladen. Jede Spur wurde mit unterschiedlichen Anti-Oligopeptid-Seren detektiert. Im Kulturüberstand HE2 $\beta$ 1-produzierender Zellen konnten insgesamt vier Banden detektiert werden, im Kulturüberstand HE2C-infizierter Zellen dagegen nur drei (vgl. Abb. 14). Dabei zeigte sich, daß das  $\alpha$ P1-Serum die jeweils kleinste der von den übrigen Seren erkannten Banden nicht detektierte. Es war daher zu vermuten, daß diese kleinste Bande durch posttranslationale Prozessierung irgendwo zwischen dem P1 und P2 Oligopeptid epitop (vgl. Abb. 3, Seite 71) entstanden ist. Die N-terminale Ansequenzierung der auf PVDF-Membran geblotteten, kleinsten Bande lieferte die bereits bekannte Sequenz (DLLPPRT). Beide rekombinanten HE2-Proteine (HE2 $\beta$ 1 und HE2C) werden offenbar wie das natürliche, humane HE2 prozessiert.



**Abbildung 14:** Western-Blot von Kulturüberständen infizierter Sf-9-Zellen. Spur 1 bis 4: Kulturüberstand HE2 $\beta$ 1-produzierender Sf-9-Zellen; Spur 5 und 6: Kulturüberstand HE2C-produzierender Sf-9-Zellen. Pro Spur wurden  $\sim 15\mu\text{g}$  Gesamtprotein geladen. Detektion: Spur 1:  $\alpha$ -P2-Serum 1:500, Spur 2:  $\alpha$ -P1-Serum 1:500, Spur 3:  $\alpha$ -P5-Serum 1:500, Spur 4:  $\alpha$ -P4-Serum 1:500; Spur 5:  $\alpha$ -P1-Serum 1:500 Spur 6:  $\alpha$ -P2-Serum 1:500. Zweiter Antikörper: POD- $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper 1:1000.

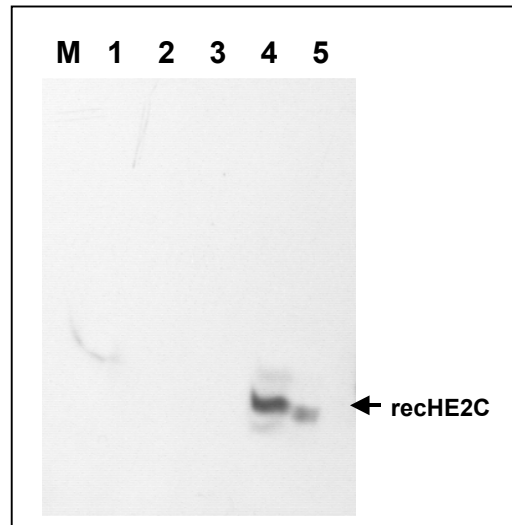
### III.4.3 Dreistufige Aufreinigung von rekombinantem HE2C

Für die Reinigung von HE2C wurde ein dreistufiges Reinigungsschema entwickelt.

#### *Ionenaustauschchromatographie (Oasis-MAX-Mixed Mode Anion exchanger)*

Da unsere polyklonalen Antiseren nur begrenzt zur Verfügung stehen, wurde als erster Schritt der Aufreinigung die Ionenaustauschchromatographie anstelle der Affinitätschromatographie gewählt. Der größte Nachteil der Ionenaustauschchromatographie ist der hohe Salzgehalt der erhaltenen Eluate. Um diesem Problem von vornherein zu begegnen, wurden die von der Firma Waters entwickelten Oasis-Mixed-Mode Säulen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Säulenmaterial, welches sowohl eine selektive Ionenbindung als auch eine hydrophobe Bindung zulässt. Dadurch besteht bei diesem Säulentypus die Möglichkeit, gebundene Proteine nicht mit Salz, sondern mit einer Mischung aus leichtflüchtiger, organischer Säure (z.B. Ameisensäure oder Essigsäure) und organischem Lösungsmittel (z.B. Aceton,

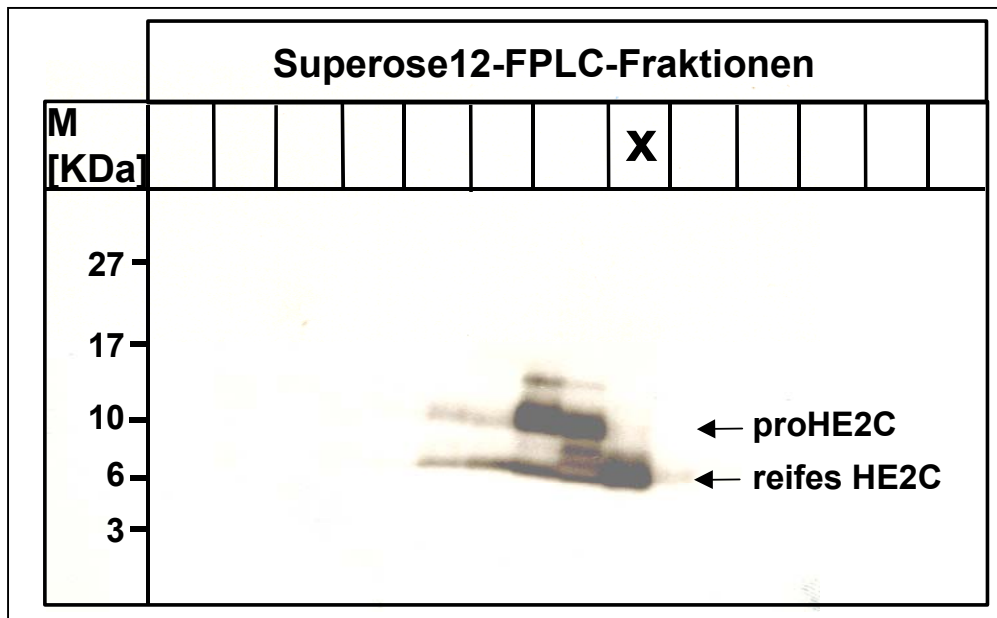
Acetonitril) zu eluieren. Abb. 15 zeigt den Reinigungsverlauf am Oasis-Mixed-Mode-Anionentauscher (Oasis-MAX<sup>®</sup>).



**Abbildung 15:** Reinigungsverlauf von HE2C an der Oasis-MAX<sup>®</sup>-Säule. Gezeigt ist die Western-Blot-Analyse der Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen. M=Markerspur; Spur 1=Durchlauf, Spur 2=Erster Waschgang mit 5 ml 20mM Tris-Hcl pH 8,0, 5% Methanol; Spur 3: Zweiter Waschgang mit 5 ml 100% Methanol; Spur 4: Elution mit 7ml 2% Essigsäure/Aceton (v/v); Spur 5: Elution gebundener Reste mit 5 ml Acetonitril, 100mM Ameisensäure.

*Gelfiltration der HE2C-Ionenaustauscher-Eluate durch Superose12-FPLC*

Die bei der Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Eluate wurden anschließend über Gelfiltration weiter aufgereinigt. Das reife, vollständig prozessierte HE2C eluiert kurz nach den unprozessierten proHE2C-Formen in Fraktion 31 (vgl. Abb. 16).

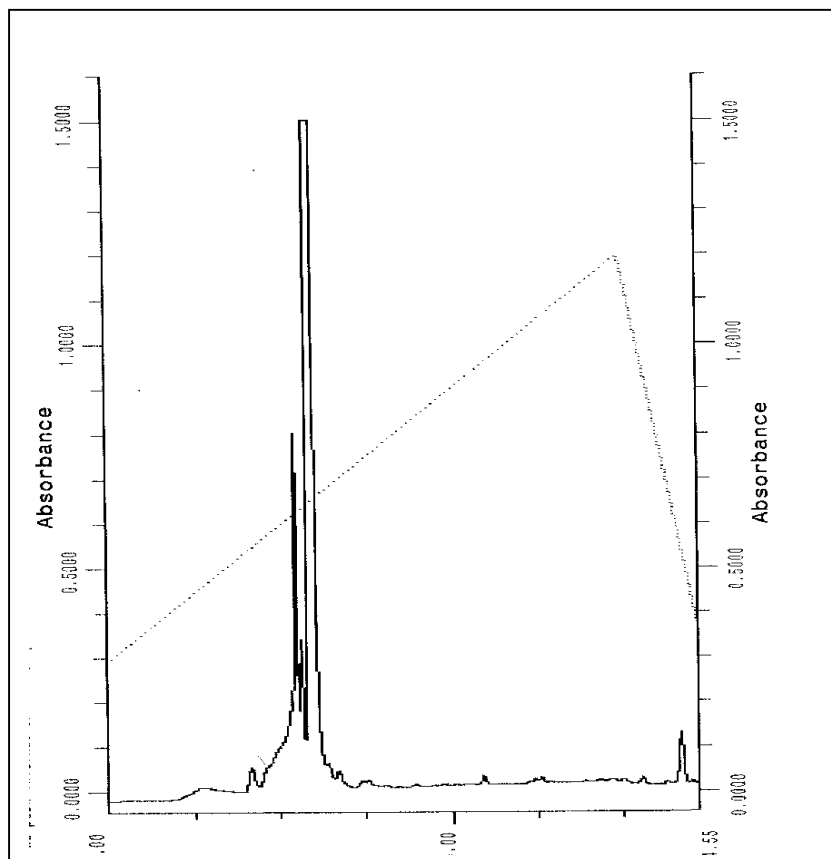


**Abbildung 16:** Western-Blot der Superose12-FPLC-Fractionen von HE2C. A. Coomassie-Blau-gefärbte PVDF-Blotmembran B. Western-Blot mit  $\alpha$ -P2-Serum 1:500. Fraktion 31 (durch x markiert) enthält die vollständig prozessierte HE2C-Form, Fraktion 29 und 30 enthalten die unprozessierte proHE2C-Form.

*Kontrolle der Reinheit der Fraktion 31 durch RP-HPLC*

Die Fraktion 31-Eluate wurden mittels Reversed Phase-HPLC an der C4-Säule auf ihre Reinheit überprüft. Dabei ergab sich folgendes HPLC-Profil (Abb. 17). Der prominenteste Peak in Fraktion 13 entspricht dem reifen HE2C. Der davor eluierende Schulterpeak stammt von einer unbekanntem kontaminierenden Komponente. Allerdings wird der Anstieg der Schulter bereits durch HE2C verursacht. Wie schon bei den vorangegangenen Reinigungsschritten zu beobachten war, neigt HE2C zur starken Bindung an die Säulenmaterialien, so daß neben dem Hauptpeak eine vorausgehende Schmierspür zu sehen ist.





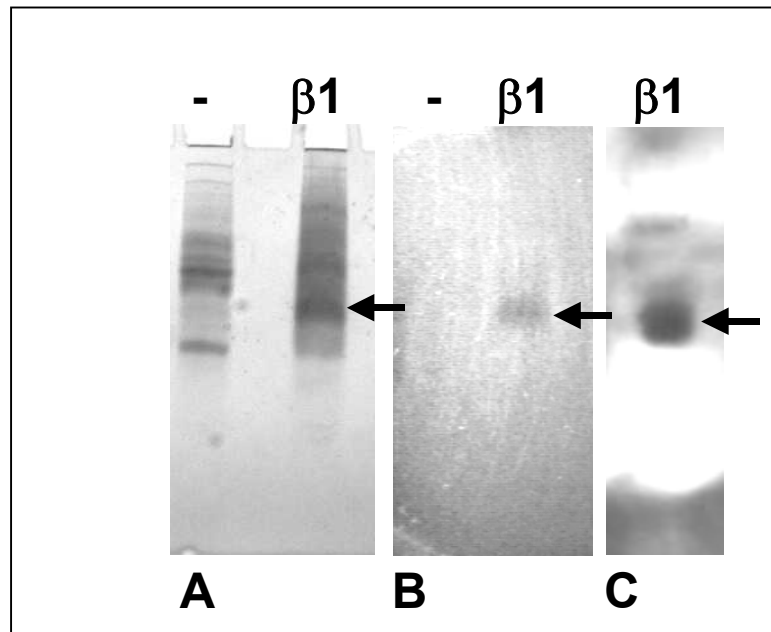
**Abbildung 17:** RP-HPLC-Profil von Fraktion 31. Der Hauptpeak entspricht reifem HE2C.

#### III.4.3.1 Reifes HE2C wirkt nicht antibiotisch gegen *E.coli* DH5 $\alpha$

Die RP-HPLC-Peaks mehrerer Läufe wurden vereinigt und die Proteinmenge durch Bradfordassay ermittelt (s. Material und Methoden). Aliquots von  $\sim 10\mu\text{g}$  HE2C wurden im Radialdiffusionstest eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß Fraktion 31 im Radialdiffusionstest keine antimikrobielle Aktivität gegen *E.coli* DH5 $\alpha$  zeigt.

### III.4.4 Reifes HE2 $\beta$ 1 ist ein antimikrobiell aktives, $\beta$ -Defensin-ähnliches Protein

Am Anionentauscher QAE-Sephadex A25-angereichertes HE2 $\beta$ 1 zeigt im „Gel-Overlay Assay“ antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* DH5 $\alpha$ . Im Western-Blot des für den „Gel Overlay Assay“ (GOA) verwendeten CAU-PAGE-Geles läßt sich auf gleicher Höhe mit der antimikrobiell-aktiven GOA-Bande HE2 $\beta$ 1 detektieren (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Gel-Overlay Assay von HE2 $\beta$ 1 und korrespondierender Western-Blot. A: Coomassie-gefärbtes CAU-PAGE-Gel. B: Gel-Overlay Assay eines zu A parallelen Gels C: Western-Blot; –=Negativkontrolle (QAE-Sephadex-A25-Eluat von Kulturüberstand nicht-infizierter High-Five-Zellen)  $\beta$ 1= HE2 $\beta$ 1-haltige Probe (QAE-Eluat von Kulturüberstand HE2 $\beta$ 1-produzierender High-Five Zellen). Pro Spur wurden  $\sim$ 20 $\mu$ g Gesamtprotein geladen.

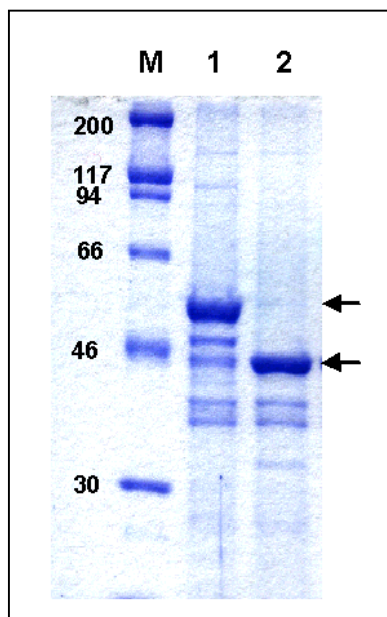
### III.4.5 Expression von proHE2 $\alpha$ als MBP-Fusionsprotein im Cytosol von *E.coli*.

Im Gegensatz zu den  $\beta$ -defensin-ähnlichen HE2-Varianten (HE2 $\beta$ 1 und HE2C) besitzt HE2 $\alpha$  vermutlich nur eine Disulfidbrücke. Deshalb wurde für die Expression von HE2 $\alpha$  das einfachere und mengenmäßig leistungsfähigere *E.coli* Expressionssystem gewählt. Der pMal-Vektor wurde gewählt, weil er heterologe Proteine als Fusionen mit dem Maltose-Bindenden-Protein (MBP) generiert. MBP wirkt chaperonartig auf anfusionierte Proteine (Kapust et al.,

1999) und begünstigt damit deren korrekte Faltung und Löslichkeit. Für eine erfolgreiche Proteinexpression in *E. coli* ist auch die Auswahl des zur Expression verwendeten *E. coli*-Stammes mitbestimmend für den Erfolg. Nach Subklonierung in den pMAL c2x-Vektor wurde zunächst der *E. coli* Stamm TB1 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert. Hierbei wurde lediglich eine 42 KDa-Bande überexprimiert, die dem unfusionierten MBP entspricht. Ein falsches Leseraster war bereits durch Sequenzierung ausgeschlossen worden. Codon-Bias durch das Vorkommen zuvieler „*rare-codons*“ konnte ebenfalls als Ursache ausgeschlossen werden. Da im Western Blot jedoch noch das vollständige MBP-Fusionsprotein detektiert werden konnte, war offensichtlich, daß proteolytische Degradation der Grund für das Fehlen einer induzierten Bande korrekter Größe war. Die Transformation des cytosolisch-proteasedefizienten *E. coli* Stammes ER2508 führte schließlich zum Erfolg .

### **III.4.5.1 proHE2 $\alpha$ läßt sich durch Spaltung mit Faktor Xa-Protease aus MBP-proHE2 $\alpha$ 1 freisetzen**

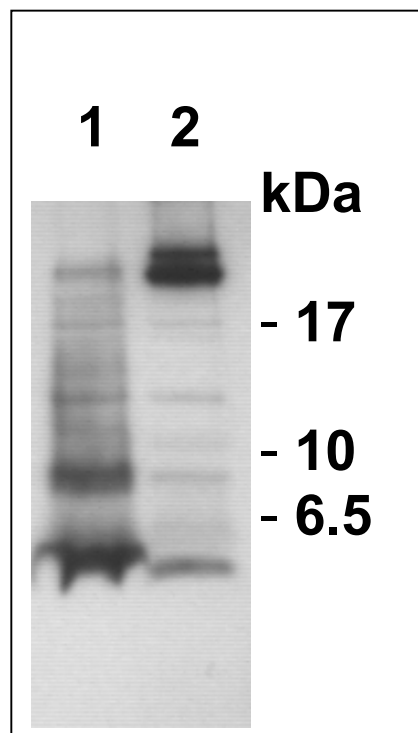
An Amyloseharz gebundenes MBP-proHE2 $\alpha$ 1 kann mit 10 mM Maltose kompetitiv eluiert werden. Dieses rekombinante Fusionsprotein zeigt nach Verdau mit Faktor Xa-Protease eine deutliche Verminderung des scheinbaren Molekulargewichts. Das unverdaute Fusionsprotein läuft im SDS-PAGE Gel bei ~50KDa, während die nach Faktor Xa-Verdau entstandene Bande ein scheinbares MW von 42 KDa zeigt (Abb. 19). Dies entspricht dem Molekulargewicht von unfusioniertem MBP. Faktor Xa-Spaltung resultiert erwartungsgemäß in der erfolgreichen Trennung von MBP und freiem proHE2 $\alpha$ 1.



**Abbildung 19:** Proteolytische Spaltung von rekombinatem MBP-proHE2 $\alpha$ 1 mit Faktor Xa. M = Molekulargewichtsmarker, Spur 1: rec MBP-proHE2 $\alpha$ 1 (~ 10 $\mu$ g); Spur 2: Faktor Xa-verdautes MBP-proHE2 $\alpha$ 1 (~10 $\mu$ g).

#### III.4.5.2 proHE2 $\alpha$ wird in vitro durch Furin gespalten.

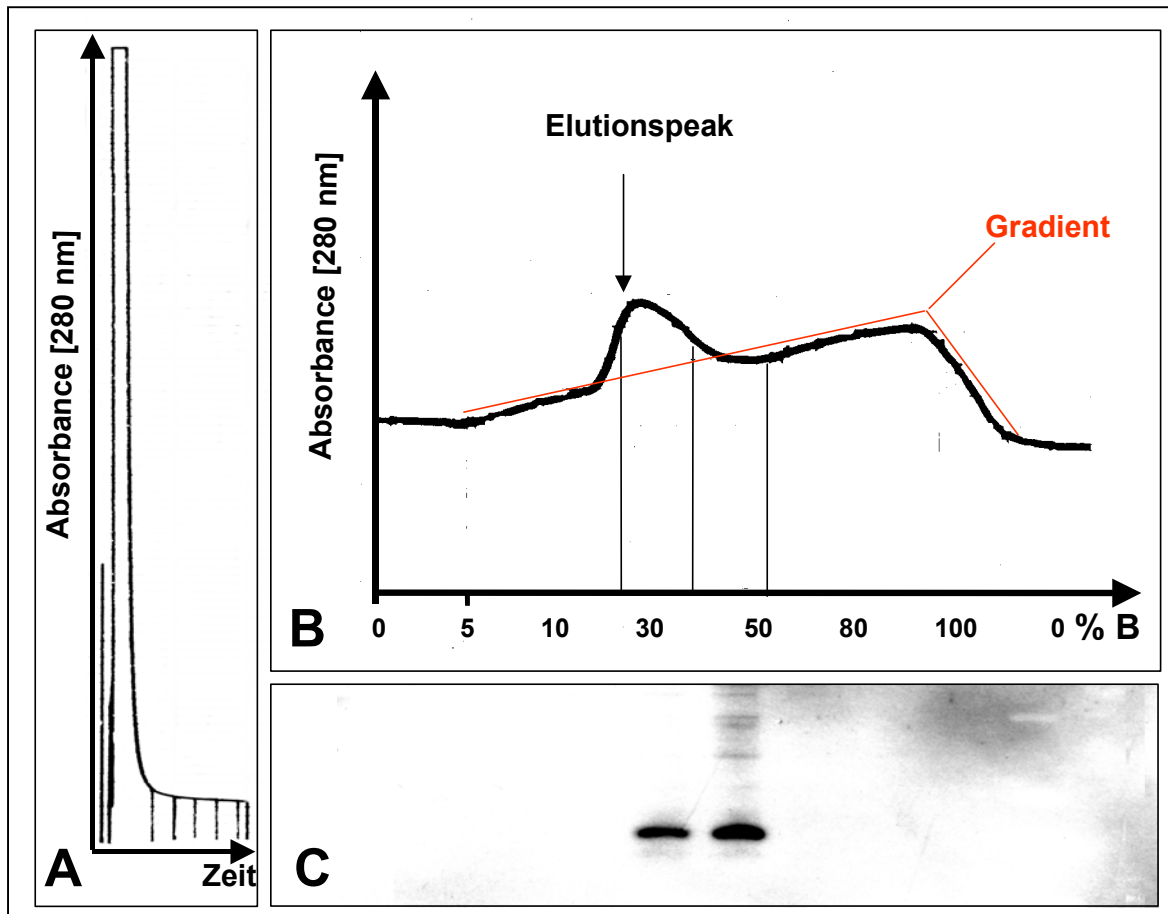
Rekombinant hergestelltes proHE2 $\alpha$ 1 wird in vitro durch Furin gespalten. Dabei fällt auf, daß ein Verdau von MBP-proHE2 $\alpha$ 1 mit Furin allein mengenmäßig weniger reifes HE2 $\alpha$ 1 freisetzt als ein Doppeldau mit Faktor Xa und Furin. Das natürliche proHE2 $\alpha$ 1 scheint ein besseres Furin-Substrat zu sein als das große, rekombinante Fusionsprotein (Abb. 20). Die ubiquitär in allen Geweben verbreitete Prohormonkonvertase Furin kann also auch in vitro eines der Konvertase-Konsensus-tragenden HE2-Proteine prozessieren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist Furin auch in Insektenzellen und in humanen Nebenhoden-Epithelzellen für die Prozessierung von HE2-Proteinen verantwortlich.



**Abbildung 20:** Western-Blot-Analyse von Furin-verdaulichem MBP-proHE2 $\alpha$ 1. Spur 1: Doppeldau mit Faktor Xa und Furin. Spur 2: Furin –Verdau von MBP-proHE2 $\alpha$ 1. Je 10  $\mu$ g MBP-pro HE2 $\alpha$  wurde pro Verdau eingesetzt und geladen. Detektion:  $\alpha$ -P3-Serum 1:500, POD- $\alpha$ -Kaninchenserum 1:1000.

#### III.4.5.3 proHE2 $\alpha$ bindet an Heparin

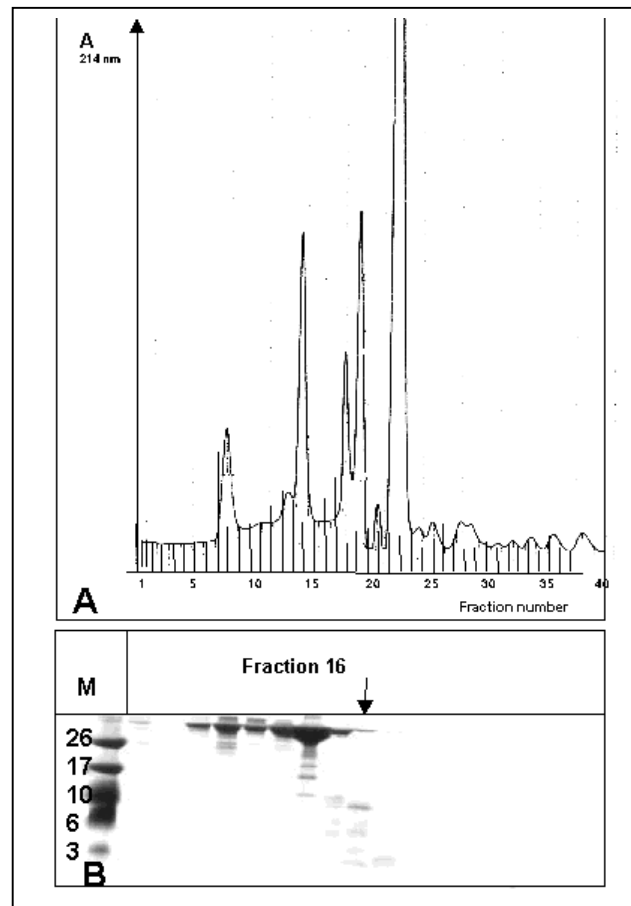
Rekombinantes proHE2 $\alpha$  bindet an Heparin und läßt sich mit steigender Ionenstärke von der Säule eluieren. Jeder Teilstrich der Ordinate von Abb. 21 A entspricht einer Zeitdauer von 3 min. Aus dem Absorptionsspektrum geht hervor, daß die nicht-heparinbindenden Proteine die Säule bereits nach 9 min durchlaufen hatten. Abb. 21B zeigt die graduelle Elution der heparingebundenen Proteine. Auf der Ordinate sind die sich im zeitverlauf ändernden Gradientenverhältnisse angegeben. Der Peak in Abb. 21 B korrespondiert gut mit den in der Western-Blot-Analyse als proHE2 $\alpha$ -positiv identifizierten Fraktionen (Abb. 21C).



**Abbildung 21:** Bindung von rekombinantem proHE2 $\alpha$  an Heparin. A. Elutionsprofil des Säulendurchlaufs der ungebundenen Proteine (u. a. MBP). B. Elutionsprofil von gebundenem proHE2 $\alpha$ . C. Western-Blot der Eluatfraktionen aus B. Pro Säulenlauf wurden  $\sim 50\mu\text{g}$  X-ge-dautes MBP-proHE2 $\alpha$  eingesetzt.

#### III.4.5.4 Trennung von MBP und proHE2 $\alpha$ durch Gelfiltration

Die weitgehende Abtrennung von proHE2 $\alpha$ 1 von abgespaltenem MBP gelang durch Gelfiltration an einer Superose 12-Säule. Die Lyophilisate der Fraktionen eines Säulen-Laufs wurden auf ein Tricin-Gel aufgetragen. Hierbei zeigte sich, daß Fraktion16 die Hauptmenge an proHE2 $\alpha$ 1 enthält, während das MBP hauptsächlich in Fraktion 14 von der Säule eluiert (Abb. 22). Pro-HE2 $\alpha$  verhält sich also in der Gelfiltration erwartungsgemäß.

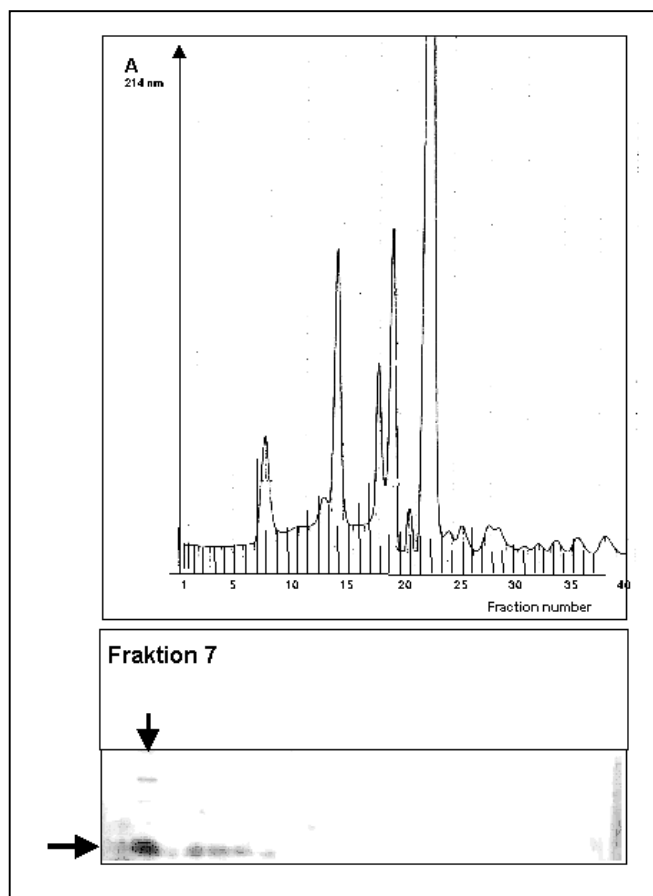


**Abbildung 22:** Gelfiltrationsprofil von Faktor Xa-verdaulichem MBP-proHE2 $\alpha$  (A). Die Tricin-PAGE Analyse (B) zeigt, daß proHE2 $\alpha$  in Fraktion 16 eluiert. Pro Lauf wurden  $\sim 50\mu\text{g}$  Xa-verdautes MBP-proHE2 $\alpha$  eingesetzt.

### III.4.5.5 Reifes HE2 $\alpha$ zeigt *in vitro* eine starke Neigung zur Aggregation

Um das reife HE2 $\alpha$ 1 aufzureinigen, wurde ein Furin- und Faktor Xa-Verdau von MBP-proHE2 $\alpha$ 1 über Superose 12 gelfiltriert. Die Fraktionen wurden lyophilisiert und anschließend auf ein Tricin-Gel aufgetragen. Im Western-Blot zeigt sich allerdings, daß das reife HE2 $\alpha$ 1 noch vor dem MBP-Hauptpeak in Fraktion 14 eluiert (Abb. 23). Dies ist insofern verblüffend, als man erwarten würde, daß ein noch kleineres Protein als proHE2 $\alpha$  entsprechend später von der Gelfiltrationssäule eluieren müßte. Abbildung 23 zeigt jedoch daß bereits Fraktion 7 die Hauptmenge an detektierbarem, reifen HE2 $\alpha$  enthält. Reifes HE2 $\alpha$  aggregiert offenbar unter den nichtdenaturierenden Bedingungen der Gelfiltration mit sich selbst und/oder anderen Proteinen bakterieller Herkunft. Unter den denaturierenden Bedingungen der TRICINE-PAGE werden die Aggregate wieder aufgelöst, so daß das reife

HE2 $\alpha$  als P3-immunreaktive Bande mit korrektem Molekulargewicht im TRICINE-PAGE-Gel auftritt.

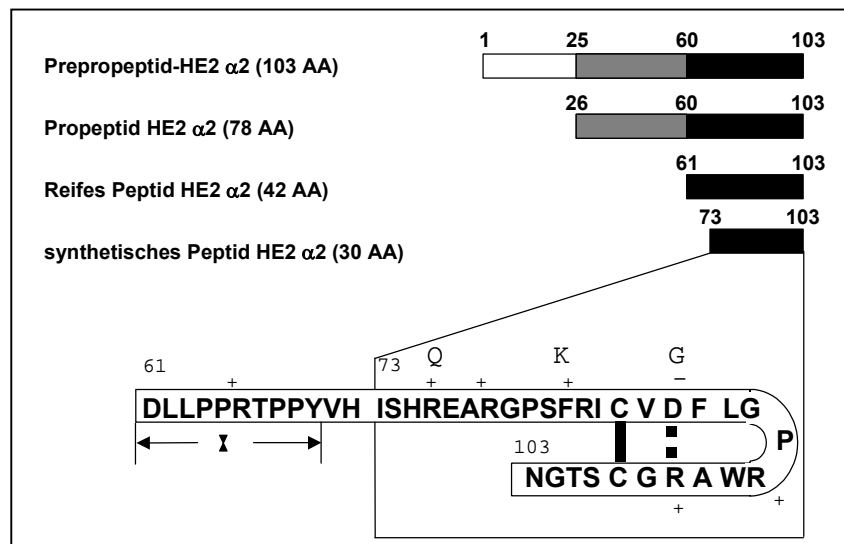


**Abbildung 23:** Gelfiltrationsprofil von Furin- und Faktor Xa-verdaulichem MBP-proHE2 $\alpha$ . Das reife HE2 $\alpha$  eluiert unerwarteterweise bereits in Fraktion 7 von der Säule (s. Pfeil). In den folgenden Fraktionen eluiert immer noch weiteres HE2 $\alpha$ . Pro Lauf wurden  $\sim 50\mu\text{g}$  Xa- /Furin-gedautes MBP-proHE2 $\alpha$  eingesetzt.



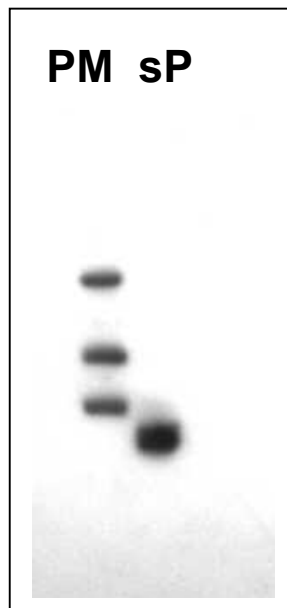
### III.4.3 Untersuchungen mit dem synthetischen HE2 $\alpha$ -Peptid

Für die folgenden Untersuchungen wurde ein synthetisches Peptid verwendet, das den C-Terminus von HE2 $\alpha$ 1 einschließt. Es beginnt mit Isoleucin 73 und endet mit dem C-terminalen Asparagin 103 (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Schematische Übersicht über die Prozessierung von HE2 $\alpha$  und Lokalisation des ausgewählten Peptids innerhalb der HE2 $\alpha$ -Sequenz.

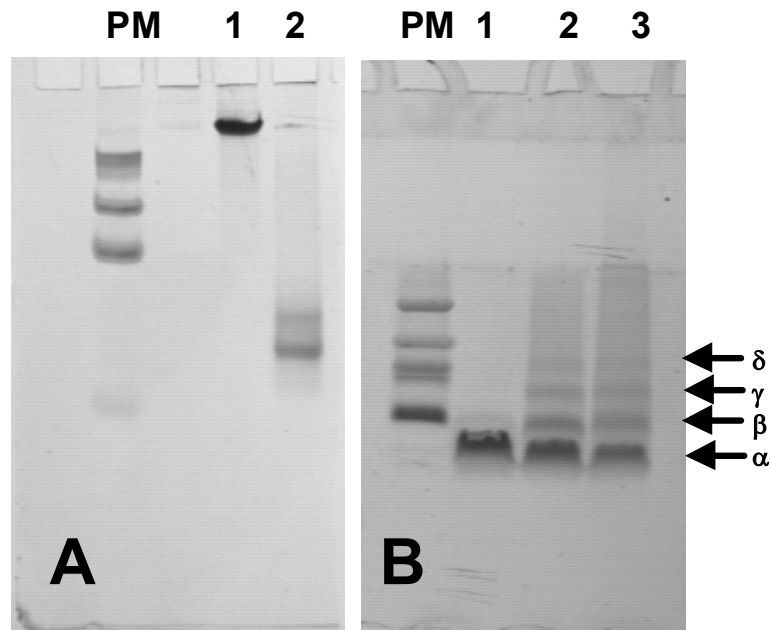
Die Sequenz des ausgewählten Peptids entspricht bis auf die beiden N-terminalen Aminosäuren Valin 71 und Histidin 72 der putativen HE2B-Variante (vgl. Abb.7). Die HE2 $\alpha$ -Varianten sind N-terminal bis zum Aspartat 61 verlängert. Das Peptid wurde wie in Material und Methoden beschrieben an der Festphase synthetisiert und über HPLC gereinigt. Die korrekte Masse des Peptids wurde durch ESI-TOF-Massenspektrometrie überprüft. Um später den Disulfid-Dithiol-Oxidationsstatus des rekombinanten HE2 $\alpha$  untersuchen zu können, wurde mit dem reduzierten Peptid eine von Dr. Kevan Peter Willey und Dr. Heike Obermann-Pless entwickelte Methode zum Nachweis freier Sulfhydrylgruppen (Deutsche Patentschrift DE19709168 C1) ausprobiert. Das mit DTT reduzierte Peptid wurde auf ein TRICIN-Gel geladen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Existenz intakter, freier Sulfhydrylgruppen an den Cysteinen wurde auf der Blotmembran durch Reaktion mit N-Biotin-Maleimid festgestellt (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Detektion freier Sulfhydrylgruppen auf dem reduzierten Peptid und auf Markerproteinen des Peptidmarkers mit Biotin-Maleimid. Detektion: 1. Schritt: Inkubation mit N-Biotin-Maleimid; 2. Schritt:  $\alpha$ -Biotin-Peroxidasekonjugat 1:1000. PM= Peptide Marker, sP= synthetisches HE2 $\alpha$ -Peptid. Geladen wurde 1  $\mu$ l Polypeptide SDS-PAGE Marker (Biorad) und 5  $\mu$ g HE2 $\alpha$ -Peptid.

#### III.4.3.1 Das HE2 $\alpha$ -Peptid multimerisiert in wässriger Lösung

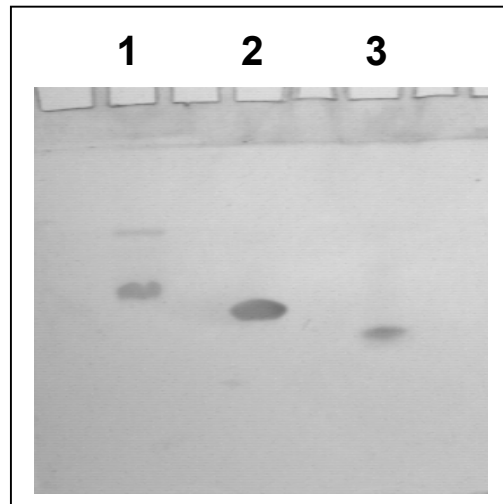
Die große Aggregationsneigung des reifen HE2 $\alpha$  (vgl. III.8.6) kann auch beim Peptid beobachtet werden. Beim Lauf im CAU-PAGE-Gel zeigt das Peptid zwei benachbarte Banden (Abb. 26 A, Spur 2). Die obere Bande stellt ein dezidiertes Aggregat höherer Ordnung dar. Um dieses genauer zu charakterisieren, wurde das Peptid in verdünnte Lösung (80  $\mu$ g/ml) gebracht und sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von DTT (20  $\mu$ l 1M DTT auf 1 ml) mit Glutaraldehyd kovalent vernetzt. Dabei stellte sich heraus, daß das Peptid unabhängig von den Cysteinen in wässriger Lösung tetramerisiert (Abb. 26 B).



**Abbildung 26:** Tetramerisierung des synthetischen HE2 $\alpha$ -Peptids. A. CAU-PAGE-Gel, Spur 1=MBP-proHE2 $\alpha$ , Spur 2: HE2 $\alpha$ -Peptid; B. Tricin-PAGE-Gel. Spur 1: nicht kreuzvernetztes Peptid, Spur 2: mit Glutaraldehyd kreuzvernetztes Peptid, Spur 3: in Gegenwart von DTT mit Glutaraldehyd kreuzvernetztes Peptid. PM = Peptidmarker, Pfeile markieren die Oligomere:  $\alpha$ = Monomer,  $\beta$ = Dimer,  $\gamma$ = Trimer,  $\delta$ = Tetramer.

### III.4.3.2 Untersuchung der Proteinase-inhibitorischen Aktivität des HE2 $\alpha$ -Peptids

Anders als andere Mitglieder der HE2-Familie besitzt das reife HE2 $\alpha$ -Peptid keine Strukturähnlichkeit mit den  $\beta$ -Defensinen. Eine auffällige Eigenschaft des HE2 $\alpha$ -Peptids ist allerdings sein stark basischer isoelektrischer Punkt. Da kleine, stark basische Proteine, u. a. Polyarginine als Serin-Protease-Inhibitoren wirken können (Cameron et al., 2000; Fei et al., 2000), und da ein pflanzliches  $\beta$ -defensin-ähnliches Protein mit Trypsin-Inhibitor-Aktivität beschrieben wurde (Wijaya et al., 2000), wurde untersucht, ob das HE2 $\alpha$ -Peptid die Serin-Protease Trypsin inhibiert. Im Revers-Zymogramm zeigte sich, daß das HE2 $\alpha$ -Peptid als Bande zurückbleibt (Abb. 27), was als erster Hinweis auf eine trypsin-inhibitorische Aktivität von HE2 $\alpha$  interpretiert werden kann.



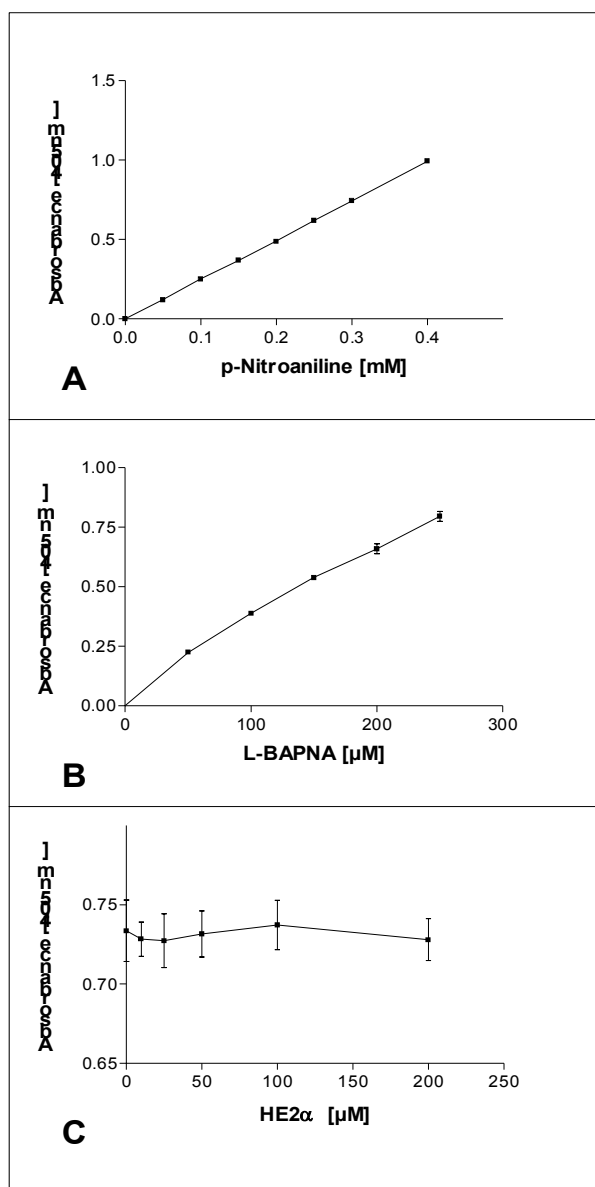
**Abbildung 27:** Revers-Zymogramm von HE2 $\alpha$ -Peptid.

Spur 1: Seminalplasma-Konzentrat (~40 $\mu$ g Gesamtprotein)

Spur 2: Positiv-Kontrolle Aprotinin (~5 $\mu$ g)

Spur 3: HE2 $\alpha$ -Peptid (~2 $\mu$ g)

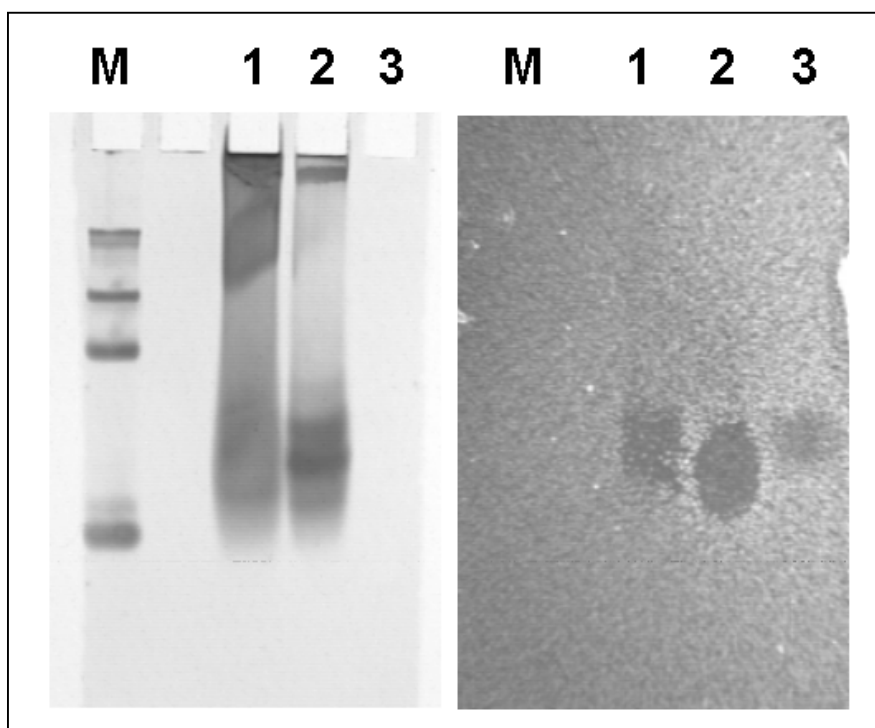
Um die vermutete, proteinaseinhibitorische Aktivität weiter zu untersuchen und um Hinweise auf die Art der Trypsin-Inhibition zu bekommen, wurde eine Enzymkinetik von Trypsin in Gegenwart des HE2 $\alpha$ -Peptids durchgeführt. Das verwendete Trypsinsubstrat war L-BAPNA (L-Benzoylarginin-p-Nitroanilid). Abb. 28 zeigt die Standardkurve der Absorption unterschiedlicher Mengen von p-Nitroanilin bei 405 nm, die Substratsättigungskurve von Trypsin, sowie den Einfluß steigender Mengen von HE2 $\alpha$ -Peptid auf die Trypsinaktivität bei definierter Substratkonzentration. Das HE2 $\alpha$ -Peptid zeigte hierbei keinen signifikanten Einfluß auf die Trypsin-Aktivität. Die Standardabweichung einzelner Meßpunkte wurde jeweils aus 3 parallelen Werten errechnet.



**Abbildung 28:** Einfluß von HE2 $\alpha$ -Peptid auf die Enzymkinetik von Trypsin. A. Absorption des p-Nitroanilin-Standards bei 405 nm, B. Substratsättigungskurve von Trypsin; C. Einfluß von HE2 $\alpha$ -Peptid auf die Trypsin-Aktivität bei einer Substratkonzentration von 200  $\mu$ M L-BAPNA.

### III.4.3.3 Im Gel Overlay Assay zeigt das HE2 $\alpha$ -Peptid antibakterielle Aktivität gegen *E.coli* DH5

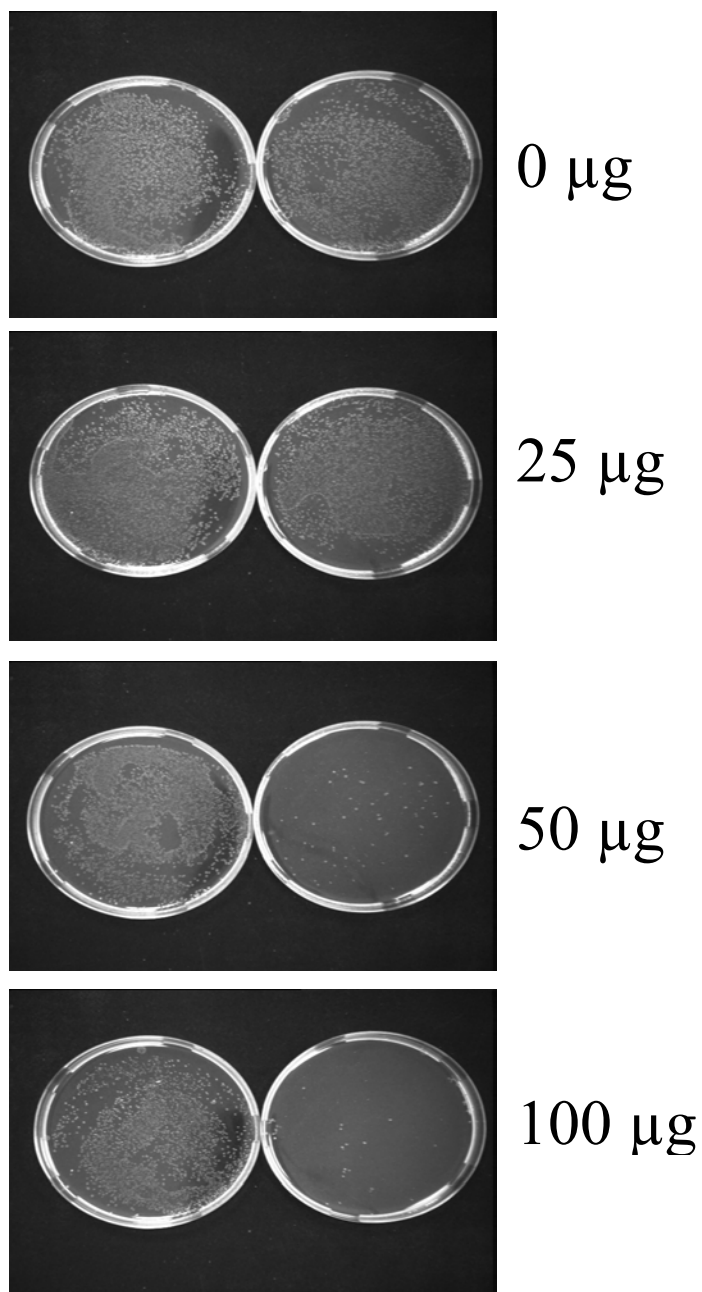
Es wurde mit Hilfe des Gel-Overlay Assays untersucht, ob das HE2 $\alpha$ -Peptid antibiotisch aktiv ist. Neben der reduzierten HE2 $\alpha$ -Form wurde auch die oxidierte Disulfidform des Peptids auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Beide Peptide zeigen im Gel-Overlay-Assay deutliche antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* DH5 $\alpha$  (Abb. 29).



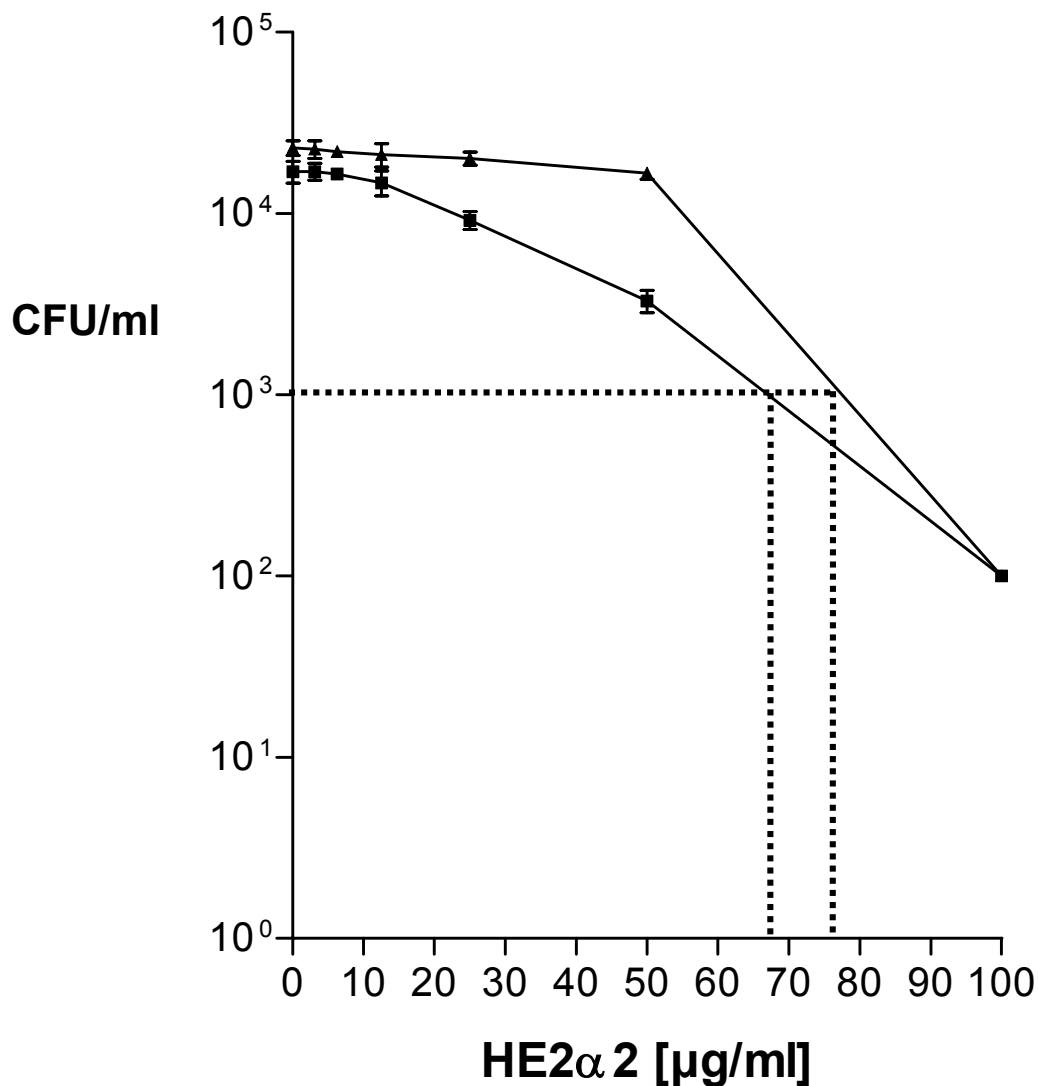
**Abbildung 29:** Gel Overlay Assay der HE2 $\alpha$ -Peptide. Links: CAU-PAGE-Gel, Spur 1: zyklisches Peptid (20 $\mu$ g), Spur 2: lineares Peptid Spur (20 $\mu$ g) 3: Methylviolett (Positivkontrolle) Rechts: Gel-Overlay Assay; Spur 1: zyklisches Peptid (20  $\mu$ g), Spur 2: lineares Peptid (20 $\mu$ g), Spur 3: Methylviolett-Positivkontrolle.

#### III.4.3.4 Bestimmung der Minimal-Inhibitorischen-Konzentration (MIC) durch CFU-Assay

Um die Aktivität des linearen und zyklischen HE2 $\alpha$ -Peptids zu quantifizieren, wurden ihre MIC<sub>90</sub>-Werte mit Hilfe des CFU-Assays (*Colony Forming Unit Assay*) bestimmt. Dabei wird eine Bakteriensuspension mit Peptidverdünnungen zunehmender Konzentration inkubiert. Nach Ausplattieren serieller Verdünnungen jedes Inkubationsansatzes wurden nach 16-stündiger Inkubationszeit die entstandenen Kolonien gezählt. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 x 10<sup>2</sup> CFU/ml (Abb. 30 und 31).



**Abbildung 30:** CFU-Assay mit oxidiertem HE2 $\alpha$ . Platten rechts: zyklisches HE2 $\alpha$ -Peptid in steigender Konzentration; Platten links: Negativkontrolle (entsprechend verdünntes Peptidlösungsmittel (DMSO/0,1%TFA)) (ganz rechts ist die Menge Peptid pro ml Inkubationsansatz angegeben). Die MIC<sub>90</sub> beträgt für das zyklisierte Peptid  $\sim 70\mu\text{g/ml}$  und für das lineare  $\sim 75\mu\text{g/ml}$  (Abb.34). Dies entspricht in beiden Fällen in etwa 20 nmol/ml.



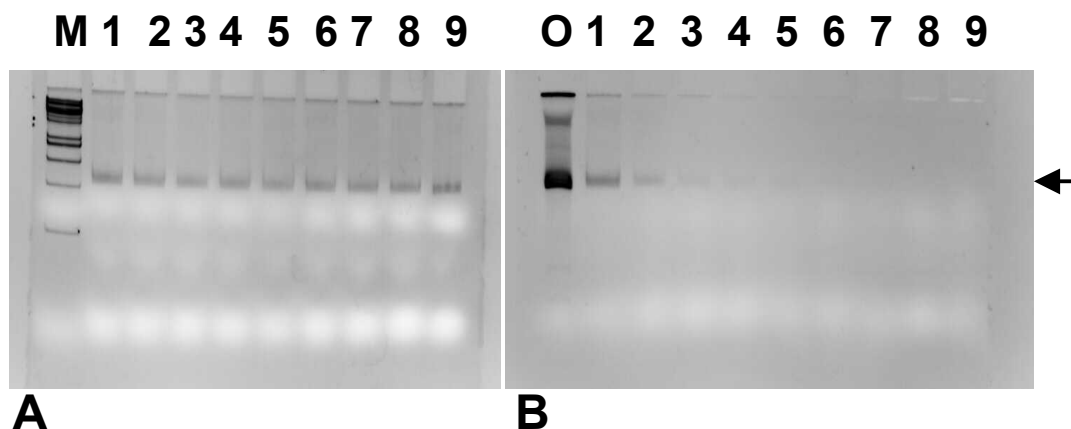
**Abbildung 31:** Graphische Darstellung der CFU-Ergebnisse für das reduzierte (obere Kurve) und oxidierte HE2α-Peptid (untere Kurve). Die Standardabweichung einzelner Meßpunkte wurde aus 3 parallelen Werten errechnet.

#### III.4.3.5 Das HE2α-Peptid bindet an DNA

Obwohl die bakterielle Plasmamembran das primäre Ziel antimikrobieller Peptide ist, wurde für manche antimikrobiellen Peptide beschrieben, daß auch Nukleinsäuren ein weiteres, intrazelluläres Ziel sein können. Daher wurde mit Hilfe eines Gel-Retardation Assays untersucht, ob das HE2α-Peptid an DNA binden kann, wobei ein 500 bp-PCR-Amplifikat aus der Fucosyltransferase 6 cDNA als Sonde eingesetzt wurde. Als Negativkontrolle diente das



P1-Peptid. Während das P1-Peptid kaum an DNA bindet, zeigt das HE2 $\alpha$ -Peptid eine starke Affinität zu DNA (Abb.32).



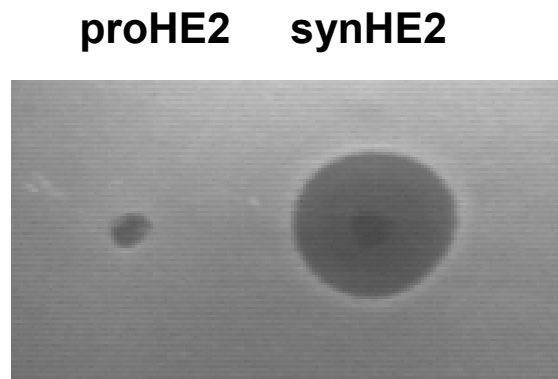
**Abbildung 32:** Gel-Retardation-Assay mit reduziertem HE2 $\alpha$ -Peptid (invertiertes Bild) A. Negativkontrolle mit Peptid P1 B. synthetisches HE2 $\alpha$ -Peptid. M= Marker (1kb-Leiter); O=1 $\mu$ g FUT-6-Amplifikat Spuren 1 bis 9: Inkubationen von 300 ng FUT-6-Amplifikat mit steigenden Peptidkonzentrationen. Der Pfeil markiert die 500bp-Amplifikatbande.

Spur	Peptid-DNA-Verhältnis
1	0 (=0 ng Peptid)
2	2 (=600 ng Peptid)
3	4 (=1200ng Peptid)
4	6 (=1800ng Peptid)
5	8 (=2400ng Peptid)
6	10 (=3 $\mu$ g Peptid)
7	20 (=6 $\mu$ g Peptid)
8	50 (=15 $\mu$ g Peptid)
9	100 (=30 $\mu$ g Peptid)

#### III.4.3.6 proHE2 $\alpha$ ist inaktiv gegen E.coli DH5 $\alpha$

Die in Fraktion 16 der Gelfiltration (vgl. Abb. III.8.4) angereicherte Proform von HE2 $\alpha$  zeigt keine antimikrobielle Aktivität gegen E. coli DH5 $\alpha$ . Abb. 33 zeigt einen Vergleich der

antimikrobiellen Aktivitäten von proHE2 $\alpha$  und dem synthetischen HE2 $\alpha$ -Peptid im Radialdiffusionstest. Für den Radialdiffusionstest wurden 5  $\mu$ g pro HE2 $\alpha$  (d.h. 5 $\mu$ g Gesamtprotein Fraktion 16) und 5  $\mu$ g synthetisches, lineares HE2 $\alpha$ -Peptid geladen.



**Abbildung 33:** Vergleich der antimikrobiellen Aktivität von rekombinantem proHE2 $\alpha$  und synthetischem HE2 $\alpha$ -Peptid durch Radialdiffusionstest.

## IV. Diskussion:

Die Anfang der neunziger Jahre entdeckte HE2-mRNA ist nach HE1 das zweithäufigste der nebenhodenspezifischen Genprodukte (Kirchhoff et al., 1990). Die durch die mRNA-codierten HE2-Proteine scheinen daher für die Physiologie des Nebenhodens von Bedeutung zu sein. Durch die Entdeckung alternativer Spleißvarianten (Fröhlich et al., 2000, Hamil et al., 2001) wurden verwandtschaftliche Beziehungen der HE2-Klonfamilie zu den  $\beta$ -Defensinen offenbar; denn die HE2-Translationsprodukte HE2 $\beta$ 1, HE2E und HE2C beinhalten alle 6 invarianten Cysteine sowie das invariante Glycin des  $\beta$ -Defensin-Konsensus. Da zum einen die posttestikuläre Spermienreifung im Nebenhoden als eine Interaktion bestimmter bisher nicht charakterisierter, epididymaler Sekretproteine mit der Spermienmembran verstanden wird und zum anderen die meisten der bisher beschriebenen  $\beta$ -Defensine membranaktive Peptidantibiotika darstellen, war die Erforschung der HE2-Varianten auf Proteinebene eine höchst interessante Aufgabe.

### IV.1 Organisation des HE2-Genlokus und Regulation der mRNA-Expression

Da die Existenz  $\beta$ -Defensin-ähnlicher HE2-Varianten zunächst nur beim Schimpansen auf Transkriptebene nachgewiesen werden konnte (Fröhlich et al., 2000), mußte zunächst überprüft werden, ob homologe HE2-mRNAs auch beim Menschen vorkommen. Durch RT-PCR mit den von Fröhlich et al. verwendeten Primern konnten entsprechende Amplifikate aus humaner, epididymaler cDNA gewonnen werden. Die amplifizierte Fragmente wurden in pGEM TEasy subkloniert und sequenziert. Dadurch konnte die Existenz dieser alternativen Spleißvarianten beim Menschen bestätigt werden. Ergänzt durch die Ergebnisse von Hamil et al, 2000 und des Humanen Genom Projektes konnte so das Gesamtbild der Exon-Intron-Organisation des HE2-Genlokus (Jia et al., 2001) mit allen Spleißvarianten entwickelt werden. Beim Menschen wurde die HE2 $\alpha$ -cDNA am stärksten amplifiziert, während bei Schimpansen und Makaken die HE2B- und HE2E-cDNAs nach der RT-PCR am stärksten hervortraten. Da in allen Experimenten dieselben Primerpaare verwendet wurden und die Nukleotidsequenzen bei *Pan troglodytes* und *Homo sapiens* nahezu identisch sind, läßt sich aus den unterschiedlichen Amplifikationsmustern auf ein unterschiedliches mRNA-Expressionsmuster schließen. Vor diesem Hintergrund scheint es erklärbar, daß bei der ursprünglichen differentiellen Genexpressionsanalyse beim Menschen nur die HE2 $\alpha$ -mRNA identifiziert wurde. Durch den RT-PCR-Nachweis der alternativen HE2-Varianten konnte

gleichzeitig die Existenz eines weiteren, alternativen intronischen Promotors im HE2-Gen des Menschen belegt werden. Die bioinformatische Analyse beider Promotorregionen deutete in beiden Fällen auf das Vorhandensein putativer „ARE-Halbsites“ (vgl. Einleitung) hin. Dies deutet auf eine mögliche Androgen-abhängige Regulation des HE2-Gens hin. Bei einem Schimpansen- sowie drei Rhesusaffen-Männchen wurde nach Kastration eine Herabregulierung der HE2-mRNA beobachtet (Fröhlich et al., 2000; Hamil et al., 2000). Auch bei der Ratte scheint das bisher identifizierte, HE2-orthologe Gen androgenabhängig reguliert zu sein (Ibrahim et al., 2001).

Auf Proteinebene zeigte sich beim Menschen allerdings ein differenzierteres Bild der Androgen-abhängigen Regulation einzelner HE2-Varianten. Während die beiden P4-Antigene HE2 $\beta$ 1 und HE2E (vgl. Abb. 3, Ergebnisteil) im mit Cyproteronacetat behandelten Patientengewebe nur noch basal detektierbar waren, schien die Antiandrogenbehandlung keinen Einfluß auf die Expression der beiden P3-Antigene HE2 $\alpha$  und HE2B zu haben. Die Erklärungsmöglichkeit, daß nur einer der beiden Promotoren tatsächlich androgenabhängig reguliert ist, und zwar der Promotor, der die Expression eines der beiden P4-Antigene (HE2 $\beta$ 1/HE2E) reguliert, erscheint jedoch unwahrscheinlich, da im Western Blot beide P4-Antigene nebeneinander nachweisbar sind (vgl. Ergebnisteil Abb.8a, Spur 7). Vielmehr ist zu vermuten, daß Androgene auf posttranskriptioneller Ebene in die Regulation der HE2-Expression eingreifen. Die beobachtete, androgenabhängige Expression mancher HE2-Varianten kann durchaus ein Nebeneffekt sein, der im Rahmen einer natürlichen physiologischen Nebenhodensituation bedeutungslos ist. Dies scheint um so mehr der Fall zu sein, wenn man die Regulation anderer Defensine genauer betrachtet. Das Vorkommen von Defensinen ist keineswegs nur auf den Menschen beschränkt. Sie finden sich sowohl bei anderen Wirbeltieren als auch bei Insekten und sogar Pflanzen (Broekaert et al., 1995). Bei manchen Pflanzen stimuliert das Phytohormon Jasmonat die Expression von Defensinen (Manners et al., 1998; Penninckx et al., 1998; Thomma et al., 2001). Neben den Defensinen wurden noch ein weiteres funktionelles Bindeglied zwischen dem pflanzlichen Abwehrsystem und dem humanen Immunsystem beschrieben (Szyperski et al., 1998). Bei Insekten wird die Expression der Defensine über eine Signaltransduktionskaskade aktiviert, die mit der Aktivierung NF $\kappa$ B-verwandter Transkriptionsfaktoren wie *dorsal*, *dif* und *relish* endet (Imler, J.L. und Hoffmann, J.A., 2000). Ihren Ausgangspunkt nimmt die Signaltransduktion entweder durch Bindung von bakteriellem LPS an CD14 oder durch Bindung anderer bakterieller Faktoren an Mitglieder der TLR-Familie (TLR= Toll-Like-Receptors)(Imler und Hoffmann, 2001). Insekten- und Pflanzendefensine zeigen einen etwas anderen Cystein-Konsensus als

die Defensine der Säuger, obwohl sie ihnen in ihrer Aktivität in nichts nachstehen. Das Vorkommen putativer Bindestellen für NF $\kappa$ B in beiden Promotorregionen des HE2-Gens könnte ein Hinweis auf eine eher für Defensine typische Genregulation sein. Leider existieren noch keine Untersuchungen zur Expression der 9 bisher bekannten, humanen TLR-Rezeptoren Nebenhodenepithel.

## **IV.2 Nachweis der HE2-Proteine**

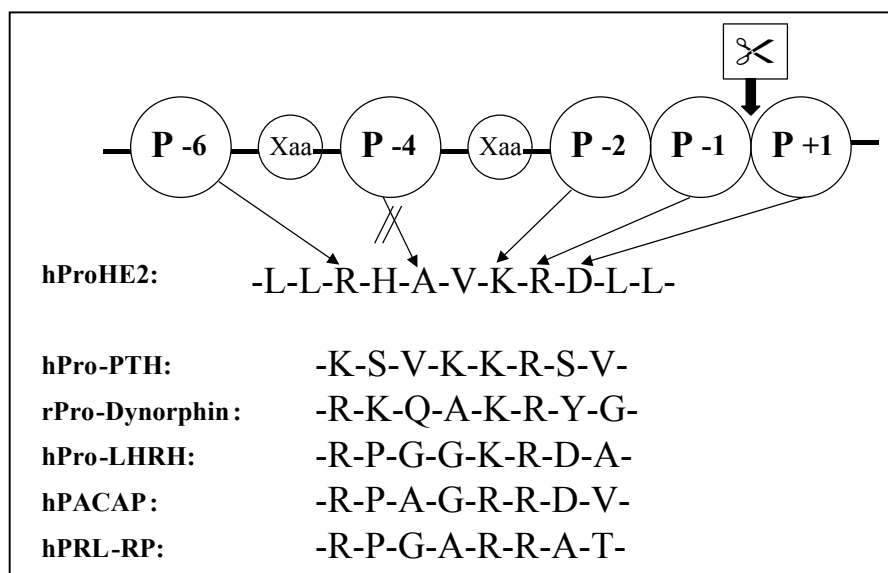
Ob aus der Expressionsstärke einer mRNA auf eine entsprechend starke Expression des korrespondierenden Proteins geschlossen werden kann wird zur Zeit heftig diskutiert (Gygi et al., 1999; Ideker et al., 2001; Jansen et al., 2002). Allerdings soll die mRNA- und Proteinexpression von Sekretproteinen gut korrelieren (Anderson und Seilhamer, 1997). Die detektierbare Proteinmenge hängt jedoch nicht allein von der Expression sondern auch von der individuellen biologischen Halbwertszeit ab. Um einen Überblick über die vom humanen HE2-Gen exprimierten Proteine zu erlangen, war es erst einmal notwendig, festzustellen ob und in welcher Menge die Proteinprodukte der bekannten HE2-mRNAs translatiert werden. Mit Hilfe polyklonaler Antipeptid-Antisera gelang sowohl der immunhistochemische Nachweis als auch die Western-Blot-Detektion verschiedener HE2-Proteine in Nebenhodenepithel und -flüssigkeit sowie auf ejakulierten Spermien. Im Seminalplasma war der Nachweis einer  $\alpha$ -P2 und  $\alpha$ -P4-reaktiven Bande erst nach Anreicherung kleiner, gut löslicher Proteine (vgl. Material und Methoden) möglich. Da die epididymale Flüssigkeit nur ca. 10% des späteren Seminalplasmas ausmacht, läßt sich aus dieser relativen Seltenheit von HE2-Antigenen im Ejakulat auf deren ausschließlich epididymale Herkunft schließen.

### **IV.2.1 Die proteolytische Prozessierung der vom proximalen Promotor kodierten HE2-Proteine**

Die beobachtete 8 KDa-Bande ließ sich nicht mit dem  $\alpha$ -P1-Serum detektieren. Stattdessen zeigte sich mit dem  $\alpha$ -P1-Serum eine Kreuzreaktion mit einer ca. 70 KDa großen Bande. Da das P1-Epitop auf dem HE2-Protein in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem putativen N-Glykosylierungskonsensus liegt, könnte diese P1-antigene Determinante durch eine verhältnismäßig große Glykostruktur verdeckt sein. Nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F wurde jedoch nur eine zusätzliche Bande mit einem scheinbaren MW von 25 KDa detektiert. Daher war davon auszugehen, daß das  $\alpha$ -P1-Serum nur kreuzreagierende

Antigene erkennt. Es muß also einen anderen Grund für das Ausbleiben der P1-Detektion geben. Alle durch den proximalen Promotor angesteuerten HE2-Varianten besitzen ein für Sekretproteine charakteristisches, aminoterminales Signalpeptid mit (putativer) Spaltstelle hinter Alanin 25. Ein an dieser Stelle prozessiertes HE2 $\beta$ 1-Polypeptid hätte allerdings ein rechnerisches Molekulargewicht von ca. 12,1 KDa. Eine 8 KDa-Bande mit diesen Eigenschaften läßt sich dagegen nur durch das Vorhandensein einer weiteren proteolytischen Prozessierungsstelle innerhalb der Aminosäuresequenz erklären. Diese zusätzliche intramolekulare Sollbruchstelle liegt unmittelbar hinter dem dibasischen Motiv Lysin 59 / Arginin 60 (welches bei HE2 $\alpha$ , HE2 $\beta$ 1, HE2 $\gamma$  und HE2C vorkommt; vgl. Abb.8/8 Ergebnisteil); denn dort ist der Aminosäure-Konsensus für die Vorläuferprotein-Abspaltung während des konstitutiven Sekretionsweges erfüllt (Watanabe et al., 1992; Steiner, 1998). Diese Prozessierungsstelle wird vermutlich von Furin, einer Kex2-ähnlichen Protease aus der Subtilisin-Familie, genutzt. Das prozessierte Polypeptid hätte ohne Einbeziehen posttranslationaler Modifikationen ein rechnerisches Molekulargewicht von 8,26 KDa, was nahezu exakt mit dem Molekulargewicht der detektierten Bande übereinstimmt. Nachdem die prominente 8 KDa-Bande aufgrund ihrer Reaktion mit  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -P5 und  $\alpha$ -P4-Serum eindeutig als HE2 $\beta$ 1 charakterisiert werden konnte, wurde deutlich, daß es sich bei der detektierten Bande um ein proteolytisches Spaltprodukt handeln mußte. Die ausbleibende Detektion der Bande mit dem  $\alpha$ -P1-Serum bestärkte ebenfalls diesen Verdacht. Um mit absoluter Sicherheit bestätigen zu können, daß HE2 $\beta$ 1 und alle übrigen durch den proximalen Promotor angesteuerten Varianten am Furin-Konsensus-Motiv hinter Arginin 60 prozessiert werden, wurde eine durch Immunpräzipitation vorgereinigte HE2 $\beta$ 1-Bande aminoterminal ansequenziert. Dadurch konnte exakt diese Prozessierungsstelle im Fall des natürlichen HE2 $\beta$ 1 bestätigt werden. Auch  $\alpha$ -P3-immunpräzipitiertes HE2 $\alpha$  beginnt mit dem DLLPP-Motiv, wodurch gezeigt ist, daß auch hier am Furin-Konsensus gespalten wurde. Rekombinantes HE2 $\alpha$  läßt sich *in vitro* mit Furin verdauen, wobei reifes HE2 $\alpha$  entsteht. Das Vorkommen einer Furin-orthologen, subtilisin-ähnlichen Protease in Insektenzellen (Cieplik et al., 1998, Veenstra, 2000) ließ hoffen, daß bei der rekombinanten Expression in Lepidopterenzellen beide Varianten am Furin-Konsensus prozessiert werden. Bei Infektion von Sf9-Zellen mit einer erhöhten MOI an rekombinanten Baculoviren wurden im Western-Blot der geernteten Kulturüberstände neben der reifen Form mehrere unvollständig prozessierte Formen der jeweiligen HE2-Variante detektiert. Die N-terminale Ansequenzierung der jeweiligen reifen Form lieferte wie erwartet das DLLPP-Motiv. Durch Einsatz einer verminderten MOI konnte für eine weitgehende Vollständigkeit der

proteolytischen Prozessierung gesorgt werden. Diese Ergebnisse belegen, daß die HE2-Proteine auch *in vivo* proteolytisch hinter dem dibasischen Motiv Lysin59/Arginin60 prozessiert werden. Hierdurch wird deutlich, daß hier höchstwahrscheinlich das ubiquitäre Furin die HE2-Prozessierung bewirkt. Eine gewisse Redundanz des Spaltvorgangs durch andere Prohormonkonvertasen kann jedoch nicht restlos ausgeschlossen werden. Obwohl das klassische Furin-Konsensus-Motiv —R—Xaa— (K/R) —R— bei HE2 nicht vorliegt, so ist im Bereich der Spaltstelle um Arginin 60/Aspartat 61 der folgende, nicht klassische Furin-Konsensus —R—Xaa—Xaa—Xaa— (K/R) —R— erfüllt. Mehrere nachweislich durch Furin prozessierte Vorläuferproteine zeigen diesen nicht-klassischen Konsensus (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Alignment der nicht-klassischen Furin-Erkennungsstelle von HE2 mit den nicht-klassischen Furin-Konsensussequenzen anderer Prohormone. Alle HE2-Proteine, die durch den proximalen Promotor reguliert sind, besitzen eine Erkennungsstelle für die Prohormonkonvertase Furin. Die Spaltstelle befindet sich zwischen Position P-1 und P+1.

Es ist aufgrund des Vorliegens eines Furin-Konsensus Motivs mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß auch alle übrigen HE2-Varianten, die das Motiv beinhalten, an dieser Stelle prozessiert werden. Es konnte somit gezeigt werden, daß die Prohormonkonvertase Furin an der proteolytischen Reifung humaner, Defensin-verwandter Proteine beteiligt ist. Das einzige andere bisher bekannte, defensin-verwandte Protein, dessen Reifung ebenfalls durch eine kex-2-ähnliche Endoproteinase bedingt wird, ist das „big-defensin“ aus dem rezenten Fossil

Tachypleus, Ordnung *Xiphosura* (Schwertschwänze) (Kawabata et al., 1997). Dieses hat eine Länge von 79 Aminosäuren, wobei der C-terminale Abschnitt (37 Aminosäuren) in Analogie zu HE2β1 eine Sequenzhomologie zu bovinen β-Defensinen aufweist (BLASTp-Search, Saito et al., 1995, Kawabata et al., 1997). Das reife, prozessierte, carboxyterminale HE2β1-Peptid hat ähnlich wie das „big defensin“ eine für β-Defensine ungewöhnliche Länge von 73 Aminosäuren. Da im Zusammenhang mit Infektion bisher nur bekannt ist, daß Furin an der Prozessierung bakterieller und viraler Virulenzfaktoren durch den Wirt beteiligt ist (Gordon und Leppla, 1994; Klenk und Garten, 1994; Molloy et al., 1999; Jean et al., 2000), erscheint es um so interessanter, daß Furin im Fall von HE2 zur Reifung antimikrobieller Peptide beiträgt. Da Furin somit einen positiven Beitrag zur innate Immunabwehr leistet, erscheint der Einsatz Furin-hemmender Antiinfektiva (Garten et al., 1994; Jean et al., 2000) fragwürdig.

#### **IV.2.2 Die Lokalisation von HE2β1 auf der Oberfläche ejakulierter Spermien**

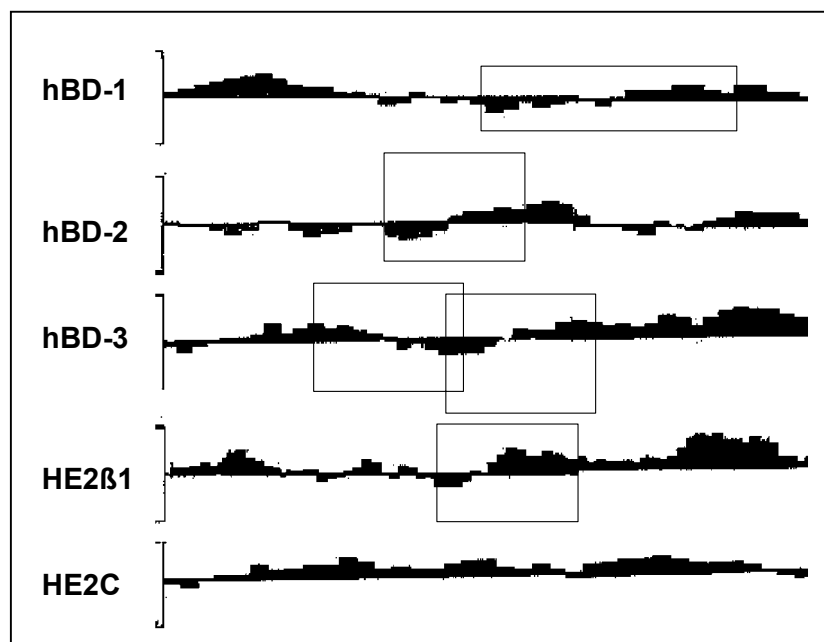
Das α-P2- und das α-P4-Serum reagierten im Western-Blot mit einer ca. 8 KDa großen Bande einer Salzwasch-Proteinprobe. Da diese Proben durch Waschen pelletierter und vorgewaschener Spermien mit einem Puffer hoher Ionenstärke gewonnen wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die im Salzwasch nachweisbaren Proteine in vivo ionisch an die Spermienoberfläche gebunden sind. Das α-P4-Serum konnte die ~8 KDa-Bande auch in einer anderen Spermienmembranpräparation (LIS-Extrakt) nachweisen. Dieses Ergebnis stützt die Beobachtung von Hamil et al.(2000), daß das P4-Epitop postakrosomal auf ejakulierten, humanen Spermien lokalisiert ist. Dieser Befund ist insofern interessant, als defensin-ähnliche Moleküle auch den Zelltod eukaryontischer Zellen herbeiführen können (Lehrer, 1993). Das defensin-ähnliche HE2β1 auf der Spermienoberfläche muß dort also eine andere Funktion haben. Es gibt Hinweise darauf, daß Defensine an der Fibronectin-vermittelten Zell-Adhäsion beteiligt sein könnten (Bdeir et al., 1999). Während der Passage durch den Nebenhoden lagern sich Fibronectinmoleküle an die Spermienoberfläche an (Miranda und Tezon, 1992). Es wird vermutet, daß die Sperm-Oolemma-Adhäsion und Fusion durch Interaktion membranständiger Integrin-Rezeptoren, insbesondere dem Fertilin β mit Disintegrin-ähnlichen Liganden wie Fibronectin vermittelt wird (Bronson und Fusi, 1996). Die post-Defensin-Domäne von HE2β1 enthält ein sogenanntes TDE-Motiv, welches eine disintegrinähnliche Bindung an Integrine vermitteln kann (Myles et al., 1994). Dieses TDE-Motiv befindet sich allerdings carboxyterminal zur eigentlichen β-Defensin-Domäne



und kommt daher beim Ratten-Orthologen bin 1b nicht vor. Die carboxyterminale Verlängerung tritt erst bei Primaten auf.

### IV.3 Funktionelle Charakterisierung der $\beta$ -Defensin-ähnlichen HE2-Varianten

Gereinigtes HE2C besitzt keine Aktivität gegen *E.coli* DH5 $\alpha$ . Für diese Inaktivität von HE2C gibt es zwei denkbare Erklärungen. Nach Bals (2000) ist das Vorhandensein amphipathischer Übergänge innerhalb eines antimikrobiell aktiven, kationischen Peptidmoleküls eine Grundvoraussetzung seiner antimikrobiellen Aktivität. Auch die Aktivität membranaktiver, organisch-chemischer Desinfektionsmittel wie Kristallviolett, Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid geht vermutlich auf das Vorhandensein amphipathischer Übergänge zurück. Reifes HE2 $\beta$ 1 besitzt in Übereinstimmung mit der Bals'schen Hypothese einen amphipathischen Übergang und zeigt eine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*. Das Fehlen amphipathischer Übergänge innerhalb der Aminosäuresequenz von HE2C (vgl. Abbildung 2) könnte daher eine plausible Erklärung für dessen funktionelle Inaktivität sein. Andererseits könnte die Aktivität von HE2C gegen ein ganz anderes Erregerspektrum gerichtet sein; denn viele bakterizide Proteine zeigen eine selektive Erregerspezifität (Cole und Ganz, 2000).



**Abbildung 2:** Amphipathische Übergänge in Kyte-Doolittle-Hydropathieprofilen humaner, aktiver  $\beta$ -Defensine und reifem HE2 $\beta$ 1. Die amphipathischen Übergänge sind durch Rechtecke eingerahmt. Das Hydropathieprofil von HE2C zeigt keine signifikanten amphipathischen Übergänge.

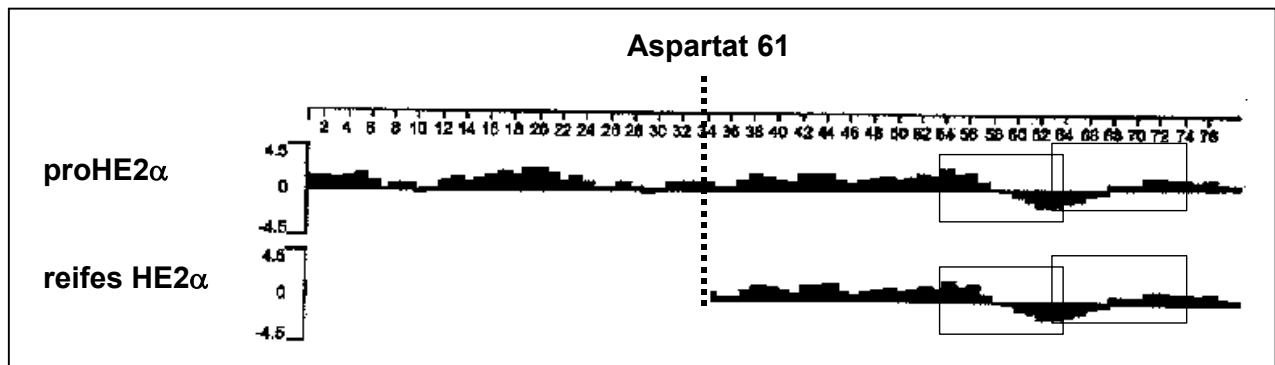
#### IV.4 Strukturelle Charakterisierung von HE2 $\alpha$ (bzw. HE2B)

Im Gegensatz zu den Varianten HE2 $\beta$ 1, HE2E und HE2C zeigt die auf mRNA-Ebene häufigste Variante HE2 $\alpha$  keine Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen. Es sind allerdings auch antimikrobiell aktive Peptide bekannt, die nur zwei Cysteine enthalten (Abbildung 3). Von dieser Gruppe wurde bisher nur das Bactenecin in Blutzellen zweier Säugerspezies (Rind, Schaf) nachgewiesen. Alle übrigen antimikrobiellen Peptide mit zwei Cysteinen kommen in Epithelien von Froscharten der Gattung *Rana* vor (Zasloff, 2002). Es fällt auf, daß die Disulfidbrücke bei allen in Abbildung 3 gezeigten Peptiden epithelialen Ursprungs im C-terminalen Bereich lokalisiert ist. Hierin stimmt auch HE2 $\alpha$  mit dieser Art Peptid überein. Auffällig ist ebenfalls, daß bei allen dieser Peptide, einschließlich HE2 $\alpha$  und Bactenecin1 mindestens zwei kationische Aminosäurereste zwischen den beiden Cysteinen lokalisiert sind.

HE2 $\alpha$ 1	DLLPRTPPYQVHISHQEARGPSFKICVGF <sup>1</sup> LP <sup>2</sup> RWARGCSTGN
Bactenecin 1	RLCRIVVIRVCR
Brevinin 1T	VNPIILGVLPKVCLITK <sup>1</sup> K <sup>2</sup> C
Esculentin 1	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVGKEVGM <sup>1</sup> DVVRTGIDIAGCKIK <sup>2</sup> GEC
Ranalexin	FLGGLIKIVPAMICAVTK <sup>1</sup> K <sup>2</sup> C
Ranateurin1	SMLSVLKNLGKVGLGFVACKINK <sup>1</sup> K <sup>2</sup> QC
Thanatin	GSKKPVIICYNRRTGK <sup>1</sup> C <sup>2</sup> QRM

**Abbildung 3:** Antimikrobielle Peptide mit nur einer Disulfidbrücke  
(nach Zasloff, 2002)

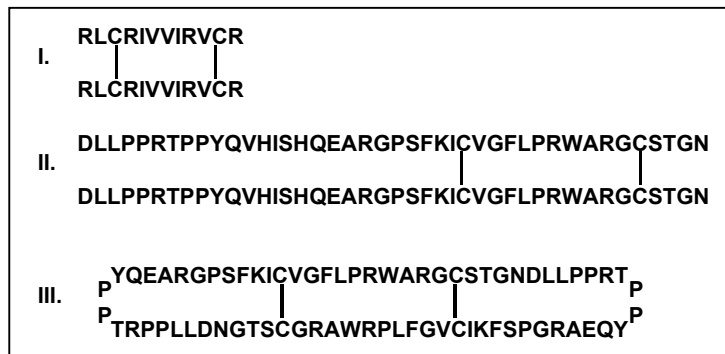
Eine Eigenschaft, die das HE2 $\alpha$ -Peptid (bzw. HE2B-Peptid) mit den meisten antimikrobiellen Peptiden teilt, ist der kation-amphipathische Charakter. Das Hydropathieprofil (Kyte-Doolittle-Plot) von HE2 $\alpha$  (Abbildung 4) zeigt zwei kation-amphipatische Übergänge innerhalb der Sequenz des reifen Peptids.



**Abbildung 4:** Hydropathieprofile von proHE2 $\alpha$  und reifem HE2 $\alpha$

Die ungefüllten Rechtecke umschließen amphipathische Übergänge. Hydrophobe Bereiche liegen unterhalb der Basislinie, hydrophile darüber. Aspartat 61 kennzeichnet den Beginn des Furin-prozessierten, reifen Peptids.

Mit Hilfe des  $\alpha$ -P3-Serums konnte das HE2 $\alpha$ /HE2B-Antigen in der epididymalen Flüssigkeit und im Nebenhodenepithel nachgewiesen werden. Nach Spaltung am Furin-Konsensus-Motiv hat das HE2 $\alpha$ 1 ein rechnerisches Molekulargewicht von 4619.30 Da. Eine Bande entsprechenden apparenten Molekulargewichts läßt sich im Western-Blot von Furin-verdaulichem MBP-proHE2 $\alpha$ 1 detektieren. Das natürliche HE2 $\alpha$  aus der humanen, epididymalen Flüssigkeit zeigt dagegen ein scheinbares MW von  $\sim$ 8 KDa. Hierfür lassen sich mehrere Erklärungen anführen. Für das Bactenecin 1, das mit HE2 $\alpha$  das Vorkommen zweier Cysteine gemeinsam hat, konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen gezeigt werden, daß es in natura als kovalentes Dimer (Abbildung 5) mit zwei intermolekularen Cysteinen vorliegt (Storici et al., 1996). Wäre dies auch bei HE2 $\alpha$  der Fall, so wäre dessen scheinbares MW von  $\sim$ 8 KDa damit erklärt. Da aber die epididymale Flüssigkeit für den Western-Blot in Gegenwart starker Reduktionsmittel ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Dithiothreitol) durch SDS-PAGE aufgetrennt wurde, müßte dann angenommen werden, daß die intermolekularen Disulfidbrücken des postulierten HE2 $\alpha$ -Dimers durch die Konformation geschützt sind und deshalb nicht reduziert werden können. Eine andere Erklärung wäre die, daß das natürliche HE2 $\alpha$  an einer ringförmigen Peptidstruktur ähnlich der der  $\theta$ -Defensine beteiligt ist. Diese entstehen durch Ligation zweier trunkierter  $\alpha$ -Defensine (Tang et al., 1999). Der bisher ungeklärte Mechanismus der  $\theta$ -Defensin-Entstehung ähnelt vermutlich der Intein-vermittelten Protein-Ligation (Perler et al., 1997, Shao und Kent, 1997; Evans und Xu, 1999; Xu und Evans, 2001.).



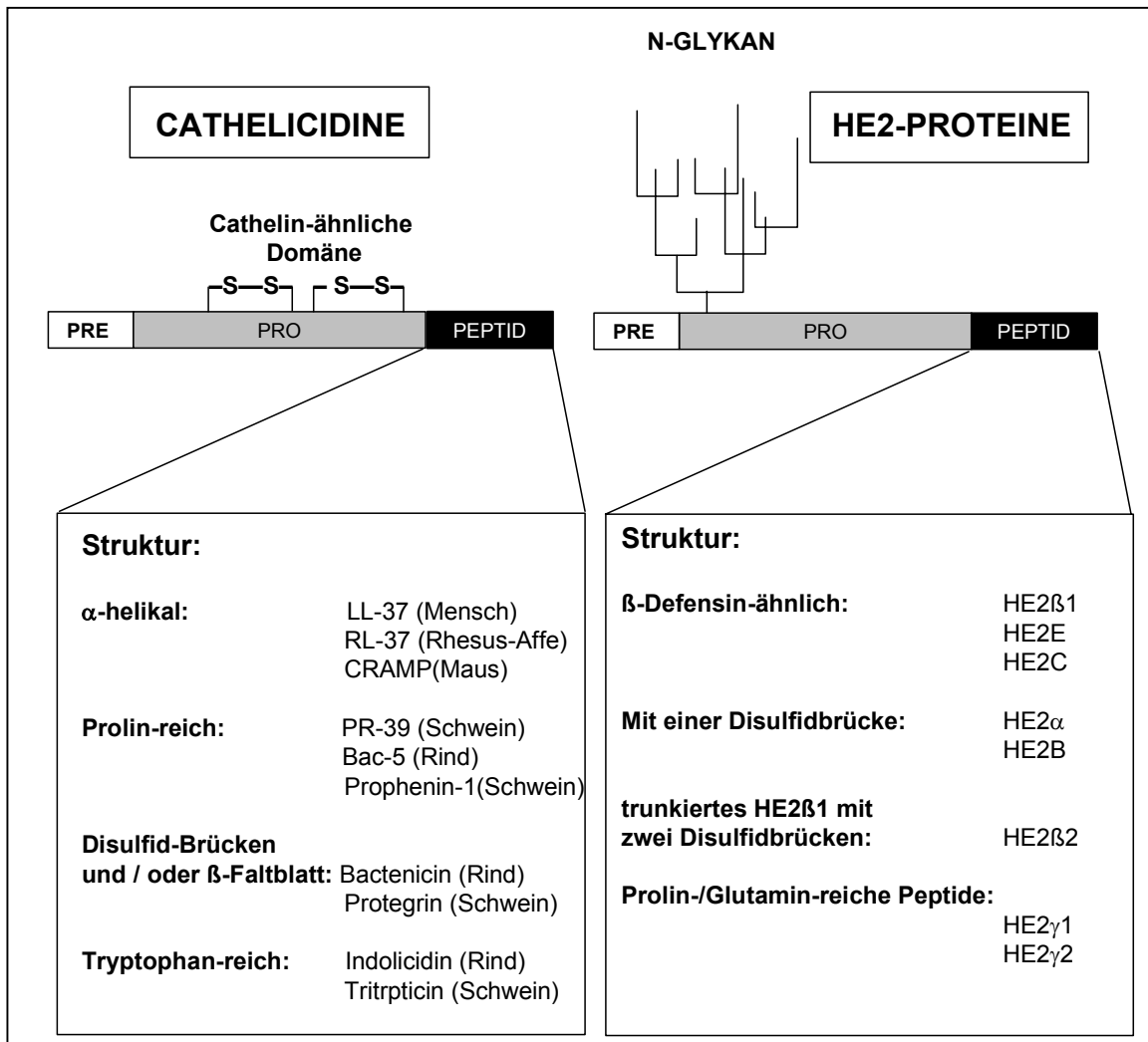
**Abbildung 5:** Mögliche Strukturen von HE2 $\alpha$ , die sein aberrantes Laufverhalten in natura erklären. I. kovalente Dimer-Struktur von Bactenecin 1, II. putative kovalente Dimer-Struktur von HE2 $\alpha$ 1, II. putative, homodimere Ringstruktur von HE2 $\alpha$ 1.

Wie aus den Gelfiltrationsexperimenten hervorgeht, neigt reifes HE2 $\alpha$  im Gegensatz zu seiner Pro-Form stark zur Selbstaggregation. Diese Eigenschaft kann auch anhand des synthetischen Peptids nachvollzogen werden. Bei der Auftrennung durch CAU-PAGE bandiert das Peptid in zwei Formen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität. Bei der oberen der beiden Banden handelt es sich um ein distinktes Aggregat, dessen Natur durch Crosslinking-Versuche mit Glutaraldehyd aufgeklärt wurde. Sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von DTT aggregierte das lineare HE2-Peptid in verdünnter Lösung zu Tetrameren. Inwieweit dieses Phänomen wirkliche physiologische Relevanz besitzt kann zwar nicht ohne weiteres geklärt werden. Die Bildung distinkter, multimerer Aggregate wurde jedoch bereits im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus membranaktiver Peptide diskutiert (Hoover et al., 2000).

#### IV.5 Analogie der HE2-Proteinfamilie zur Cathelicidinfamilie antimikrobieller Peptide

Interessanterweise entstammt das einzige beim Säuger vorkommende antimikrobielle Peptid mit zwei Cysteinen (Bactenecin 1) der Cathelicidin-Familie (s. Einleitung). Eine auffallende Eigenheit der Cathelicidine wird auch von den Mitgliedern der HE2-Familie geteilt; die vom proximalen Promotor angesteuerten HE2-Varianten besitzen nämlich wie die Cathelicidine (Zanetti et al., 2000, Lehrer und Ganz, 2002) ein allen gemeinsames, identisches Propeptid, von welchem sie während der Reifung proteolytisch abgespalten werden. In Analogie zu den Cathelicidinen zeigt auch die HE2-Familie eine strukturelle Heterogenität der carboxyterminalen, antimikrobiellen Domäne (Abbildung 3). Bei den Cathelicidin-Genen wird aufgrund dieser strukturellen Heterogenität auf deren schnelle evolutive Divergenz

geschlossen (Zanetti et al., 2000). Peptide der angeborenen Immunabwehr müssen sich im Verlauf der Evolution sehr schnell verändern, um adäquat auf die verschiedenen und unterschiedlich schnell evolvierenden, pathogenen Mikroorganismen reagieren zu können. Fröhlich et al. (2001) postuliert in diesem Zusammenhang, daß die nicht defensin-ähnlichen HE2-Varianten aus ancestralen  $\beta$ -Defensin-Genen hervorgegangen sind. Für diese Hypothese spricht, daß bisher nur für das  $\beta$ -defensin-ähnliche HE2E ein Nager-Homologes (bin 1b) identifiziert werden konnte (Li et al., 2001). Das Propeptid wird bei den Cathelicidinen als Cathelin-ähnliche Domäne bezeichnet, und zeigt sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Cystatin-Superfamilie der Cystein-Proteinase-Inhibitoren (Storici et al., 1996). Auch das Propeptid der HE2-Peptide hat sehr wahrscheinlich eine eigene funktionelle Bedeutung, die allerdings bisher noch ungeklärt ist. Das Propeptid der HE2-Peptide trägt möglicherweise ein komplexes N-Glykan, welches einen Oligosaccharid-Liganden für Oberflächenstrukturen pathogener Organismen darstellt. Das HE2-Propeptid könnte dadurch eine Agglutination der Erreger in Lösung vermitteln, noch bevor diese an Oligosaccharidstrukturen auf der Epitheloberfläche andocken können. Eine solche *masking and decoy*-Funktion wird für manche Glykanstrukturen postuliert (Varki, 1993). Nach der proteolytischen Prozessierung verbleibt an allen carboxyterminalen HE2-Varianten ein prolinreicher N-Terminus. Dieses gemeinsame Motiv (DLLPPRTPPYQ) der natürlichen, reifen HE2-Peptide (außer HE2B und HE2E) könnte erheblich zu deren antimikrobieller Aktivität beitragen; denn Prolin ist überdurchschnittlich stark am Aufbau membranpenetrierender Peptide beteiligt (Agerberth et al., 1996; Vunnam et al., 1997; Dathe et al., 1998; Snook et al., 1998, Suh et al., 1999; Jacob et al., 1999). Im Fall des antimikrobiellen Peptids Buforin II ist ein Prolin-Rest sogar die Ursache der Membran-Translokation (Park et al., 2000; Kobayashi et al., 2000). Da das Nager-Homologe bin1b eher der HE2E-Variante entspricht, kann davon ausgegangen werden, daß sich die Varianten mit dem prolinreichen N-Terminus erst in jüngerer Zeit evolviert haben. Sofern man unterstellt, daß sich die neu evolvierten HE2-Varianten aufgrund eines Selektionsvorteils im Genom einiger Primaten manifestiert haben, kann angenommen werden, daß sie gegenüber den ursprünglichen Varianten verbesserte funktionelle Eigenschaften haben.



**Abbildung 3:** Ähnlichkeit der Cathelicidin- und HE2-Vorläuferproteine. Das gemeinsame Propeptid der HE2-Proteine besitzt einen N-Glykosylierungskonsensus, der vermutlich ein komplexes Glykan trägt. Man beachte die in beiden Fällen auftretende, strukturelle Heterogenität der carboxyterminalen, antimikrobiellen Domäne.

#### IV.6 Funktionelle Charakterisierung von HE2α (bzw. HE2B)

Da vom Bactenecin 1 bekannt war, daß das über eine intramolekulare Disulfidbrücke zyklisierte Molekül im Vergleich mit dem linearen Peptid eine gesteigerte Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien besitzt, wurden sowohl das lineare, als auch das zyklische HE2α-Peptid auf ihre antimikrobielle Aktivität in vitro getestet. Im Gel overlay Assay reagierten beide Peptide stark antibiotisch gegen *E. coli* DH5α. Das zyklische Peptid war im quantitativen CFU-Assay nur geringfügig stärker aktiv als das lineare. Die Minimal-Inhibitorische Konzentration (MIC) beider Peptide lag in etwa bei 70 µg/ml was im typischen

Aktivitätsbereich antimikrobieller Peptide liegt ( $MIC = 0.1-100 \mu\text{g/ml}$ ). Es muß hierbei jedoch berücksichtigt werden, daß die MIC-Werte für HE2 $\alpha$  mit dem synthetischen Peptid gewonnen wurden. Das natürliche Peptid ist möglicherweise deutlich aktiver. Im Unterschied zum reifen Peptid zeigt proHE2 $\alpha$  keine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*. Von den  $\alpha$ -Defensinen ist bereits bekannt, daß ihre Aktivität intramolekular durch das Propeptid gehemmt wird (Valore et al., 1996). In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, daß das Propeptid inhibierend wirkt, indem es aufgrund seiner anionischen Ladung die kationische Ladung des reifen Peptids ausgleicht und damit dessen elektrostatische Anlagerung an anionische, bakterielle Membranlipide verhindert (Michaelson et al., 1992; Valore et al., 1996). Aus Abbildung 4 geht hervor, daß das HE2-Propeptid einen ausschließlich polaren Charakter hat. Da es jedoch eine kationische Ladung besitzt, kann die für die  $\alpha$ -Defensine entwickelte Hypothese hier nicht zur Erklärung herangezogen werden. Vielmehr scheint die Ursache für die Inaktivität von proHE2 $\alpha$  das zu Ungunsten des hydrophoben Abschnitts verschobene Hydrophilizitäts-/Hydrophobizitäts-Verhältnis zu sein. Interessanterweise bindet allerdings bereits proHE2 $\alpha$  an Heparin. Da durch Zugabe von Heparin *in vitro* die Defensin-vermittelte Zytolyse gehemmt werden kann (Lichtenstein et al., 1986), kann davon ausgegangen werden, daß auch das *in vitro* eingesetzte proHE2 $\alpha$  bereits an Membranen bindet, sie jedoch nicht lysiert. Auch andere membranbindende Proteine binden an Heparin (Calvete et al., 1997), was offenbar nicht allein auf der Kationentauscheraktivität von Heparin beruht. Da von mehreren antibiotischen Peptiden bekannt war, daß sie nicht nur mit der Membran, sondern auch mit Nukleinsäuren wechselwirken (Gera und Lichtenstein, 1991; Park et al., 1998; Sharma und Khuller, 2001), wurde diese Eigenschaft auch beim HE2 $\alpha$ -Peptid untersucht. Im Gel-Retardation-Assay zeigte das Peptid eine ähnlich starke Bindung an DNA wie das Buforin II (Park et al., 1998). Aufgrund des Vorhandenseins eines prolinreichen N-Terminus und der starken Affinität zu DNA ist es durchaus möglich, daß natürliches HE2 $\alpha$  einem ähnlichen Wirkmechanismus wie Buforin II folgt.

### IV.7 Mögliche alternative Funktionen der HE2-Peptide

Die Defensine fungieren nicht nur als antimikrobielle Peptide, sondern zeigen eine Vielfalt anderer Funktionen. Interessanterweise wurden kleine kationische Proteine und Peptide als starke Serinproteinase-Inhibitoren beschrieben (Cameron et al., 2000; Fei et al., 2000). Auch das stark basische HE2 $\alpha$ -Peptid könnte demnach als Proteaseinhibitor fungieren. Im Revers-Zymogramm bleibt das HE2 $\alpha$ -Peptid trotz 16-stündiger Verdauung mit der Serin-Protease

Trypsin als deutliche Bande im Gel zurück. Von parallel geladenem Seminalplasma-Konzentrat blieben dagegen nur zwei Banden übrig, von denen die untere vermutlich auf SLPI/HUSI I zurückgeht. Die enzymkinetische Untersuchung der scheinbaren Proteaseinhibitorischen Aktivität des HE2 $\alpha$ -Peptids mit Hilfe des BAPNA-Substrates zeigte jedoch, daß das Peptid keine inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin besitzt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß HE2 $\alpha$  andere Serin-Proteasen hemmt. Spermiengebundene Proteaseinhibitoren könnten eine Schutzfunktion gegenüber den Proteasen des Prostatasekretes übernehmen. Möglicherweise hat auch das nachweislich spermiengebundene HE2 $\beta$ 1 eine Proteaseinhibitor-Funktion. Die chemotaktische und corticostatische Aktivität der HE2-Peptide wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, obwohl bekannt ist, daß zumindest manche  $\alpha$ -Defensine corticostatische Aktivität besitzen (Palfree et al., 1993, Cervini et al., 1995). Viele, aber nicht alle Corticostatine kompetieren mit ACTH (Adrenocorticotropisches Hormon; Corticotropin) um die Besetzung des Corticotropin-Rezeptors und inhibieren dadurch u.a. die ACTH-induzierte Produktion des Glukocorticoids Corticosteron. ACTH ist ein proteolytisches Spaltprodukt, daß neben  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Endorphinen, Melanotropin und Lipotropin aus dem Vorläuferprotein Proopiomelanocortin entsteht. Die mRNA für das ACTH-Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) ist interessanterweise ein prominentes Genprodukt des Caput epididymidis (Kirchhoff, 1999). Obwohl das POMC-Gen in Organen des männlichen Reproduktionstraktes sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene exprimiert wird (Tsong et al., 1982, Fabbri et al., 1986, Ivell, 1994), ist über die genaue Funktion der opioiden Peptide in anderen Geweben außerhalb des Gehirns wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Produkte des POMC-Gens an der Stressantwort beteiligt sind und cytokinähnliche und immunmodulatorische Eigenschaften haben (Heijnen et al., 1987, Heijnen et al., 1991). ACTH, dessen bekannteste Funktion die Stimulation der Synthese und Sekretion von Corticosteroiden in der Nebennierenrinde ist, verstärkt in vielen Geweben u.a. das mitogen-induzierte Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, was zu einer verstärkten Antikörperproduktion führt (Alvarez-Mon et al., 1985). Im Fall einer Verletzung der Blut-Epididymis-Barriere und der damit verbundenen Exposition von Spermatozoen-Antigenen wäre eine zusätzliche B-Zell-Aktivierung durch ACTH besonders unvorteilhaft. Ein natürlicher Antagonist für ACTH wie z.B. ein corticostatisches Defensin könnte hier eine nicht unbedeutende Schutzfunktion besitzen. Vor diesem Hintergrund scheint eine Untersuchung der corticostatischen, ACTH-modulierenden Aktivität von HE2-Peptiden lohnenswert.



#### IV.8 Schlußbetrachtung

Abschließend läßt sich festhalten, daß in dieser Arbeit die antimikrobielle Aktivität der Produkte eines der häufigeren Gene des humanen Nebenhodens gezeigt werden konnte. Aufgrund der in der Einleitung beschriebenen immunologischen Situation des Nebenhodens, muß von dem dortigen Vorhandensein einer sehr wirksamen angeborenen Immunabwehr ausgegangen werden. Hinzu kommt, daß viele dem HE2-verwandte Defensine als stärkste antibiotische Agenzien aus menschlichen Probenmaterialien isoliert wurden (Harder et al., 1997, Harder et al., 2001), wobei z.T. sogar deren Bindung an bakterielle Membranen als erster Schritt der Aufreinigung eingesetzt wurde (Harder et al., 1997). Vor diesem Hintergrund scheint es nicht unwahrscheinlich zu sein, daß die Mitglieder der Defensin-verwandten, im Nebenhoden hoch exprimierten HE2-Familie funktionell an der antimikrobiellen Abwehr im männlichen Reproduktionstrakt beteiligt sind. Vor kurzem wurde bei Primaten das  $\theta$ -Defensin-verwandte Retrocyclin entdeckt, welches Wirtszellen vor dem Eindringen des HIV-Virus schützt (Cole et al., 2002). Damit konnte gezeigt werden, daß sich die Aktivität eines antimikrobiellen Peptids aus der Defensin-Familie auch gegen humanpathogene Viren richtet. Sawicki und Mystkowska diskutierten bereits 1999 den Einsatz antimikrobieller Peptide als männliche *Barrier*-Kontrazeptiva. Das Cathelicidin CAP-37 hemmt in vitro die Spermienmotilität (D'Cruz et al., 1995). Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob sich die antimikrobiellen Peptide der HE2-Familie tatsächlich als antimikrobielle und antivirale Therapeutika im Rahmen der männlichen Kontrazeption eignen.

## V. Zusammenfassung

Der männliche Genitaltrakt ist aufgrund seiner immunologischen Isolation eine "Achillesverse" des Immunsystems. Der Nebenhoden hat aufgrund dieses Selektionsdruckes im Laufe der Evolution autonome Mechanismen der angeborenen Immunabwehr entwickelt. Damit der Nebenhoden seiner Aufgabe als Organ der posttestikulären Spermienreifung gerecht werden kann, muß jedoch sichergestellt sein, daß die empfindlichen Spermatozoen durch die aggressiven Mediatoren der angeborenen Immunabwehr nicht nachhaltig geschädigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität der nebenhodenspezifischen HE2-Genprodukte untersucht. Das HE2-Gen befindet sich in direkter Nachbarschaft zum Defensin-Gen-Cluster auf dem kurzen p-Arm von Chromosom 8. Drei der insgesamt 9 HE2-Genprodukte weisen Homologie zu den  $\beta$ -Defensinen auf, denn sie besitzen alle sechs invarianten Cystein-Reste sowie den invarianten Glycin-Rest des  $\beta$ -Defensin-Konsensusmotivs. Alle bisher identifizierten, humanen  $\beta$ -Defensine sind antimikrobielle Peptide der angeborenen Immunabwehr. Manche Defensine sind sogar durch Bindung von LPS oder anderen bakteriellen Faktoren an CD14 oder TLR-Rezeptoren induzierbar. Daher konnte spekuliert werden, daß sowohl die  $\beta$ -Defensin-ähnlichen als auch die nicht-Defensin-ähnlichen HE2-Peptide antimikrobielle Aktivität besitzen. Verschiedene polyklonale Anti-Oligopeptid-Antiseren wurden eingesetzt, um HE2-Peptide im Nebenhodengewebe, in der epididymalen Flüssigkeit und im Ejakulat nachzuweisen. Mit Hilfe von Immunhistochemie, Western-Blot und Immunpräzipitation sowie durch N-terminale Peptidsequenzierung konnten mehrere 4 bis 8 KDa große HE2-Peptide nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß alle durch den proximalen Promotor regulierten HE2-Proteine durch die Prohormon-Konvertase Furin proteolytisch prozessiert werden. Durch diese Furin-Spaltung hinter Arginin 60 resultieren die reifen C-terminalen Peptide. Vergleichende immunhistochemische Studien mit Nebenhodengewebe Cyproteronacetat-(Androcur<sup>®</sup>)-behandelter und unbehandelter Prostatakarzinompatienten zeigten, daß HE2 $\beta$ 1 bzw. HE2E androgenabhängig reguliert sind, während HE2 $\alpha$  bzw. HE2B nicht durch Androgen reguliert zu sein scheinen. Der Nachweis von HE2 $\beta$ 1 in einer hochmolaren Salzwash-Präparation von der Oberfläche ejakulierter Spermatozoen deutete auf eine ionische Anlagerung von HE2 $\beta$ 1 an die Spermienmembran hin. Außerdem konnte hierdurch die Beobachtung von Hamil et al. (2000) unterstützt werden, die das entsprechende Antigen in der postakrosomalen Region des Spermischwanzes nachweisen konnten. Da zumindest das antimikrobiell aktive HE2 $\beta$ 1-Peptid ionisch an die

Spermienoberfläche gebunden ist, ohne daß die Spermien geschädigt werden, kann neben der antimikrobiellen Aktivität eine weitere Funktion der HE2-Peptide im Rahmen der posttestikulären Spermienreifung nicht ausgeschlossen werden. Auch die auf Proteinebene gezeigte, androgen-abhängige Regulation von HE2 $\beta$ 1 läßt dies vermuten. Trotz seiner ungewöhnlichen C-terminalen Verlängerung zeigte HE2 $\beta$ 1 antimikrobielle, membranzerstörende Aktivität gegen *E. coli* während das reife  $\beta$ -Defensin-ähnliche HE2C inaktiv war. Die Hydropathieanalyse ergab, daß HE2C im Unterschied zu allen anderen, aktiven humanen  $\beta$ -Defensinen keine amphipathischen Übergänge aufweist. Amphipathische Übergänge wurden bereits als Voraussetzung für die membranzerstörende Aktivität kationischer, antimikrobieller Peptide diskutiert (Bals, 2000). Ein synthetisches Peptid, das den C-Termini der nicht-Defensin-ähnlichen HE2 $\alpha$ - und HE2B-Varianten entspricht, tötete *E. coli* in einer Dosis-abhängigen Weise. Ein partiell zyklisiertes, Disulfid-verbrücktes, synthetisches Peptid mit derselben Primärsequenz war ebenfalls aktiv. Die Minimal Inhibitorische Konzentration (MIC) beider Peptide lag bei  $\sim 70 \mu\text{g/ml}$  ( $\sim 20 \text{ nmol/ml}$ ). Die typischen MIC's antimikrobieller Peptide liegen zwischen  $0.1$  und  $100 \mu\text{g/ml}$ . Reifes HE2 $\alpha$  zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu epithelialen, antimikrobiellen Peptiden aus Frosch-Spezies der Gattung *Rana*, obwohl es im Unterschied zu diesen einen gemeinsamen genomischen Ursprung mit  $\beta$ -Defensinen hat. Ähnlich wie das aus der Froschhaut isolierte Buforin II bindet HE2 $\alpha$  auch an Heparin und DNA, was auf die Nukleinsäuren als weiteres Angriffsziel der antimikrobiellen Aktivität von HE2 $\alpha$  hinweist. In Analogie zu den  $\alpha$ -Defensinen ist das durch Abspaltung des ER-Signalpeptids hinter Alanin 25 resultierende proHE2 $\alpha$  inaktiv. Die Hydropathieanalyse zeigt die Existenz zweier amphipathischer Übergänge in der Primärsequenz des reifen HE2 $\alpha$  während die Propeptid-Domäne ausschließlich kationischen Charakter hat. Daher wurde postuliert, daß die Inaktivität von proHE2 $\alpha$  auf eine ungünstige Verschiebung des Hydrophilizitäts-/Hydrophobizitäts-Verhältnisses innerhalb der Primärsequenz zurückgeht, wodurch das proHE2 $\alpha$  am Membraneintritt gehindert wird. Das in dieser Arbeit untersuchte HE2-Gen kodiert für mehrere neuartige Peptide, von denen zumindest einige an der angeborenen Immunabwehr beteiligt sind. Es ist zu diesem Zeitpunkt jedoch schwer abzuschätzen, ob sich einige der HE2-Peptide als mögliche Antiinfektiva eignen.

## V. Summary

Due to its isolation from acquired immunity the male genital tract is an “Achilles’ heel” of the immunesystem. As a consequence of this evolutionary selection pressure, the epididymis has developed autonomous mechanisms of innate immunity. The epididymis has to fulfil its role as the organ of post-testicular sperm maturation and ensure that the spermatozoa are unaffected by the defence-mechanisms during their passage through the epididymal duct.

This thesis examines the antimicrobial activity of several products encoded by the epididymis-specific HE2-Gene. The HE2-Gene is located on Chromosome 8 p23 in close proximity to the human defensin gene cluster. Three of the nine encoded HE2-products share the six invariant cystein-residues and the invariant glycine-residue of the  $\beta$ -defensin consensus. The human  $\beta$ -defensins are antimicrobial peptides of innate immunity, inducible by LPS or other bacterial factors via the CD14- or Toll-Like-Receptors (TLR). Therefore, it was tempting to speculate that the defensin-like HE2-peptides, as well as those non-defensin like may exhibit antimicrobial activity. Different polyclonal antipeptide antisera were employed to detect various HE2-derived peptides in human epididymal tissue, flushed epididymal fluid and ejaculate. Immunohistochemistry, Western Blot Analysis and immunoprecipitation combined with N-terminal peptide sequencing revealed the occurrence of multiple 4 to 8 KDa HE2-peptides. It could be shown that all HE2-proteins that are regulated by the proximal promoter are proteolytically processed by the prohormone-convertase furin. The resulting C-terminal peptides are generated by this furin-cleavage behind the residue arginin 60. Comparative immunohistochemical studies involving epididymal tissues from individuals, either treated with cyproteronacetate (Androcur<sup>®</sup>) or untreated controls, revealed an androgen- dependent regulation of HE2 $\beta$ 1 (and HE2E respectively) while HE2 $\alpha$  (and HE2B respectively) did not seem to be regulated by androgen. The detection of HE2 $\beta$ 1 in a high ionic strength salt wash-preparation from ejaculated human spermatozoa suggested an ionic bonding mechanism and, additionally, supported the result of Hamil et al.(2000) who detected the antigen in the postacrosomal region of the sperm tail. Since at least the antimicrobially active peptide HE2 $\beta$ 1 is ionically bound to the sperm surface without harming the spermatozoa, other possible functions of the HE2-peptides concerning post-testicular sperm maturation could not be excluded. The androgen-dependently regulated expression of HE2 $\beta$ 1 at the protein level also supports this hypothesis. Despite its unusual C-terminal elongation the mature  $\beta$ -defensin-like peptide HE2 $\beta$ 1 exhibited antimicrobial, membrane-disruptive activity against E.coli, while the mature  $\beta$ -defensin-like HE2C-peptide

did not. Hydropathy-analysis revealed that HE2C lacked amphipathic transitions that are present in all other human  $\beta$ -defensins and have been discussed as a major requirement for their membrane-disruptive activity (Bals, 2000). A synthetic peptide resembling the mature non-defensin-like variants, HE2 $\alpha$  and HE2B, killed *E.coli* in a dose-dependent manner. A partially cyclized, disulfide-bonded, synthetic HE2 $\alpha$ -peptide was also active. The minimal inhibitory concentration (MIC) of both synthetic peptides was  $\sim 70 \mu\text{g/ml}$  ( $\sim 20 \text{ nmol/ml}$ ). The typical MIC-range of antimicrobial peptides is 0.1 to 100  $\mu\text{g/ml}$ . The mature HE2 $\alpha$ -peptide shows structural similarity to some epithelial antimicrobial peptides from *Rana*-species, although its genetic origin is with the  $\beta$ -defensin-like peptides. Like Buforin II from frog skin, mature HE2 $\alpha$  binds to heparin and DNA, implying that an antimicrobial attack of HE2 $\alpha$  may be also directed against nucleic acids. In analogy to the  $\alpha$ -defensins, the longer pro-HE2 $\alpha$  was inactive. Hydropathy-analysis showed two amphipathic transitions in the amino-acid-sequence of mature HE2 $\alpha$ , whereas the propeptide was exclusively cationic. The inactivity of proHE2 $\alpha$  is presumed to be due to an unfavorable shift in the hydrophilicity/hydrophobicity-relationships within the primary amino-acid-sequence that prevents membrane entry of the uncleaved proHE2 $\alpha$ . In summary, the HE2-gene, investigated in this thesis, encodes several novel peptides, some of which exert a role in innate host defence. It is proposed that some of these HE2-peptides may be worthy candidates for clinically useful antiinfective agents.

## Abkürzungen

$\alpha$ -	anti-
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut(em)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA (copy oder complementary DNA)
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAU-PAGE	<i>Continuous Acid Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
CFU-Assay	<i>Colony Forming Unit Assay</i>
Da	Dalton
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded )
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EcoRI	Typ II-Restriktionsendonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-dinatriumsalz
ESI-TOF	Electrospray Ionization-Time Of Flight
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
GOA	<i>Gel Overlay Assay</i>

h	Stunde(n)
HE	humanes Epididymisprodukt
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HindIII	Typ II-Restriktionsendonuklease
IEF	isoelektrische Fokussierung
pI	isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IT	Immunisierungstag
kb	Kilobasen(paare)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L-BAPNA	N- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanine</i> (aus <i>Limulus</i> )
M	molar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight
MBP	Maltose-Bindendes-Protein (aus <i>E.coli</i> )
mg	Milligramm
min	Minuten
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> (Erklärung siehe Material und Methoden)
MW	Molekulargewicht
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	Millimolar
$\mu$ m	Mikrometer
min.	Minute
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino-)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-(messenger) Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
ng	Nanogramm
NGS	normales Ziegen Serum (normal goat serum)

nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NRS	normales Kaninchenserum (normal rabbit serum)
nt	Nukleotid(e)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu-Polymerase	<i>Pseudomonas furiosus</i> – Polymerase
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RDA	<i>Radial Diffusion Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
rpm	Umdrehungen pro min.
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig (single stranded)
T	Thymin
T.	Tier
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
TGN	Trans Golgi Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (Enzymeinheit)



ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
unv.	unverdünnt
UV	ultraviolett
V	Volt
Vh	Voltstunden
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
w/v	Gewicht pro Volumen
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
XhoI	Typ II-Restriktionsendonuklease
XmnI	Typ II-Restriktionsendonuklease
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

**Literaturverzeichnis:**

Agerberth, B., H. Gunne, J. Odeberg, P. Kogner, H. G. Boman, and G. H. Gudmundsson. 1996. PR-39, a proline-rich peptide antibiotic from pig, and FALL-39, a tentative human counterpart. *Vet Immunol Immunopathol.* 54(1-4):127-131.

Alexander, N. J., and D. Bearwood. 1984. An immunosorption assay for antibodies to spermatozoa: comparison with agglutination and immobilization tests. *Fertil Steril.* 41(2):270-276.

Alvarez-Mon, M., J. H. Kehrl, and A. S. Fauci. 1985. A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte functions. *J Immunol.* 135(6):3823-3826.

Anderson, L., and J. Seilhamer. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis.* 18(3-4):533-537.

Bals, R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 1(3):141-150.

Bardin, C. W. 1996. The anabolic action of testosterone. *N Engl J Med.* 335(1):52-3.

Bdeir, K., W. Cane, G. Canziani, I. Chaiken, J. Weisel, M. L. Koschinsky, R. M. Lawn, P. G. Bannerman, B. S. Sachais, A. Kuo, M. A. Hancock, J. Tomaszewski, P. N. Raghunath, T. Ganz, A. A. Higazi, and D. B. Cines. 1999. Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. *Blood.* 94(6):2007-2019.

Bedford, J.M. (1975) 14. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In D.W. Hamilton and R.O. Greep (eds.): *Handbook of Physiology, section 7: Endocrinology.* Washington, D.C.: American physiological Society, pp.303-317.

Benoit, J. (1926) *Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères.* *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 5, 175-412.

Bhakdi, S., and J. Trantum-Jensen. 1991. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol Today.* 12(9):318-20; discussion 321.

Blaquier, J. A., M. S. Cameo, P. S. Cuasnicu, M. F. Gonzalez Echeverria, L. Pineiro, and J. G. Tezon. 1988. The role of epididymal factors in human sperm fertilizing ability. *Ann N Y Acad Sci.* 541:292-296.

Boman, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 13:61-92.

Boman, H. G. 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev.* 173:5-16.

Broekaert, W. F., F. R. Terras, B. P. Cammue, and R. W. Osborn. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108(4):1353-1358.

Brogden, K. A., M. R. Ackermann, P. B. McCray, Jr., and K. M. Huttner. 1999. Differences in the concentrations of small, anionic, antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid

and in respiratory epithelia of patients with and without cystic fibrosis. *Infect Immun.* 67(8):4256-4259.

Bronson, R. A., and F. M. Fusi. 1996. Integrins and human reproduction. *Mol Hum Reprod.* 2(3):153-168.

Brooks, D. E. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci.* 36(3):205-221.

Brooks, D. E. 1981. Secretion of proteins and glycoproteins by the rat epididymis: regional differences, androgen-dependence, and effects of protease inhibitors, procaine, and tunicamycin. *Biol Reprod.* 25(5):1099-1117.

Brooks, D. E., and S. J. Higgins. 1980. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J Reprod Fertil.* 59(2):363-375.

Brooks, D. E., A. R. Means, E. J. Wright, S. P. Singh, and K. K. Tiver. 1986a. Molecular cloning of the cDNA for two major androgen-dependent secretory proteins of 18.5 kilodaltons synthesized by the rat epididymis. *J Biol Chem.* 261(11):4956-4961.

Brooks, D. E., A. R. Means, E. J. Wright, S. P. Singh, and K. K. Tiver. 1986b. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur J Biochem.* 161(1):13-18.

Brooks, D. E., and K. Tiver. 1983. Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 69(2):651-657.

Byskov and Høyer (1988) Embryology of mammalian gonads and ducts. In E. Knobil and J. Neill (eds.): *The Physiology of Reproduction*. New York. Raven Press. Pp. 265-302.

Calvete, J. J., M. Raida, M. Gentzel, C. Urbanke, L. Sanz, and E. Topfer-Petersen. 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):201-206.

Cameo, M. S., and J. A. Blaquier. 1976. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocrinol.* 69(1):47-55.

Cameron, A., J. Appel, R. A. Houghten, and I. Lindberg. 2000. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem.* 275(47):36741-36749.

Cervini, L. A., W. R. Gray, R. Kaiser, J. Dykert, R. Chan, S. Solomon, C. L. Rivier, and J. E. Rivier. 1995. Rat corticostatin R4: synthesis, disulfide bridge assignment, and in vivo activity. *Peptides.* 16(5):837-842.

Chowdhury, N. A., M. Kamada, M. Takikawa, H. Mori, H. Gima, and T. Aono. 1996. Complement-inhibiting activity of human seminal plasma and semen quality. *Arch Androl.* 36(2):109-118.

- Cieplik, M., H. D. Klenk, and W. Garten. 1998. Identification and characterization of *spodoptera frugiperda* furin: a thermostable subtilisin-like endopeptidase. *Biol Chem.* 379(12):1433-1440.
- Clermont, Y. and Flanery, J. (1970) Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biol. Reprod.* 3: 280-292.
- Coffman, M. A., J. H. Pinter, and F. W. Goetz. 2000. Trout ovulatory proteins: site of synthesis, regulation, and possible biological function. *Biol Reprod.* 62(4):928-38.
- Cole, A. M., and T. Ganz. 2000. Human antimicrobial peptides: analysis and application. *Biotechniques.* 29(4):822-6, 828, 830-831.
- Cole, A. M., T. Hong, L. M. Boo, T. Nguyen, C. Zhao, G. Bristol, J. A. Zack, A. J. Waring, O. O. Yang, and R. I. Lehrer. 2002. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(4):1813-1818.
- Condreay, J. P., S. M. Witherspoon, W. C. Clay, and T. A. Kost. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(1):127-132.
- Cooper, T. G., and M. C. Orgebin-Crist. 1975. The effect of epididymal and testicular fluids on the fertilising capacity of testicular and epididymal spermatozoa. *Andrologia.* 7(2):85-93.
- Cooper, T.G., (1986) *The epididymis, sperm maturation and fertilization.* Berlin: Springer Verlag.
- Cooper, T. G., G. M. Waites, and E. Nieschlag. 1986. The epididymis and male fertility. A symposium report. *Int J Androl.* 9(2):81-90.
- Cornwall, G.A., Orgebin-Crist, M.C., Hann, S.R. (1992) The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 1992, 1653-1664.
- Cuasnicu, P. S., F. Gonzalez Echeverria, A. D. Piazza, M. S. Cameo, and J. A. Blaquier. 1984. Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil.* 72(2):467-471.
- Cyr, D. G., L. Hermo, N. Egenberger, C. Mertineit, J. M. Trasler, and D. W. Laird. 1999. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology.* 140(8):3815-3825.
- Dacheux, J. L., M. Paquignon, and Y. Combarnous. 1983. Head-to-head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence for an epididymal antagglutinin. *J Reprod Fertil.* 67(1):181-189.
- Dacheux, J. L., and J. K. Voglmayr. 1983. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol Reprod.* 29(4):1033-1346.

- Dathe, M., C. Kaduk, E. Tachikawa, M. F. Melzig, H. Wenschuh, and M. Bienert. 1998. Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1370(1):175-183.
- D'Cruz, O. J., H. A. Pereira, and G. G. Haas, Jr. 1995. Sperm immobilizing activity of a synthetic bioactive peptide 20-44 of 37-kDa cationic antimicrobial protein (CAP37) of human neutrophils. *J Androl*. 16(5):432-440.
- Diekman, A. B., E. J. Norton, K. L. Klotz, V. A. Westbrook, H. Shibahara, S. Naaby-Hansen, C. J. Flickinger, and J. C. Herr. 1999. N-linked glycan of a sperm CD52 glycoform associated with human infertility. *Faseb J*. 13(11):1303-1313.
- Diekman, A. B., E. J. Norton, V. A. Westbrook, K. L. Klotz, S. Naaby-Hansen, and J. C. Herr. 2000. Anti-sperm antibodies from infertile patients and their cognate sperm antigens: a review. Identity between SAGA-1, the H6-3C4 antigen, and CD52. *Am J Reprod Immunol*. 43(3):134-143.
- Drotman, D. P. 1983. Physicians should report cases of acquired immune deficiency syndrome. *Arch Intern Med*. 143(12):2247.
- Esser, A. F. 1991. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol Today*. 12(9):316-318; discussion 321.
- Evans, T. C., Jr., and M. Q. Xu. 1999. Intein-mediated protein ligation: harnessing nature's escape artists. *Biopolymers*. 51(5):333-342.
- Fabbri, A., F. Fraioli, and A. Isidori. 1986. Opioid peptides in the testis and the male genital tract: presence and possible function. *J Endocrinol Invest*. 9(6):521-528.
- Fei, H., Y. Li, L. X. Wang, M. J. Luo, M. H. Ling, and C. W. Chi. 2000. Nonhistone protein purified from porcine kidney acts as a suicide substrate inhibitor on furin-like enzyme. *Acta Pharmacol Sin*. 21(3):265-270.
- Frohlich, O., C. Po, T. Murphy, and L. G. Young. 2000. Multiple promoter and splicing mRNA variants of the epididymis-specific gene EP2. *J Androl*. 21(3):421-430.
- Frohlich, O., C. Po, and L. G. Young. 2001. Organization of the human gene encoding the epididymis-specific EP2 protein variants and its relationship to defensin genes. *Biol Reprod*. 64(4):1072-1079.
- Garcia, J. R., A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, and W. G. Forssmann. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J*. 15(10):1819-1821.
- Garten, W., S. Hallenberger, D. Ortmann, W. Schafer, M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, and H. D. Klenk. 1994. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie*. 76(3-4):217-225.

- Gera, J. F., and A. Lichtenstein. 1991. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cell Immunol.* 138(1):108-120.
- Glover, T. D., and L. Nicander. 1971. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 13:Suppl 13:39-50.
- Gordon, V. M., and S. H. Leppla. 1994. Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infect Immun.* 62(2):333-340.
- Gunaydin, G., C. Ozyurt, I. Kocak, Z. Badak, and F. Girgin. 1995. Anti-bacterial activity of the fluid contents of spermatoceles and epididymal cysts. *Br J Urol.* 75(1):68-70.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 19(3):1720-1730.
- Hamil, K. G., P. Sivashanmugam, R. T. Richardson, G. Grossman, S. M. Ruben, J. L. Mohler, P. Petrusz, M. G. O'Rand, F. S. French, and S. H. Hall. 2000. HE2beta and HE2gamma, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in the human. *Endocrinology.* 141(3):1245-1253.
- Hanspal, J. S., G. R. Bushell, and P. Ghosh. 1983. Detection of protease inhibitors using substrate-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 132(2):288-293.
- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 276(8):5707-5713.
- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 387(6636):861.
- Hayashi, M., S. Fujimoto, H. Takano, T. Ushiki, K. Abe, H. Ishikura, M. C. Yoshida, C. Kirchhoff, T. Ishibashi, and M. Kasahara. 1996. Characterization of a human glycoprotein with a potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEGL1). *Genomics.* 32(3):367-374.
- Heijnen, C. J., A. Kavelaars, and R. E. Ballieux. 1991. Beta-endorphin: cytokine and neuropeptide. *Immunol Rev.* 119:41-63.
- Heijnen, C. J., J. Zijlstra, A. Kavelaars, G. Croiset, and R. E. Ballieux. 1987. Modulation of the immune response by POMC-derived peptides. I. Influence on proliferation of human lymphocytes. *Brain Behav Immun.* 1(4):284-291.
- Hochgrebe, T. T., D. Humphreys, M. R. Wilson, and S. B. Easterbrook-Smith. 1999. A reexamination of the role of clusterin as a complement regulator. *Exp Cell Res.* 249(1):13-21.
- Hoover, D. M., K. R. Rajashankar, R. Blumenthal, A. Puri, J. J. Oppenheim, O. Chertov, and J. Lubkowski. 2000. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem.* 275(42):32911-32918.

- Holstein, A.-F. (1969) Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen. Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie. 20: 1-91.
- Hristova, K., M. E. Selsted, and S. H. White. 1997. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J Biol Chem.* 272(39):24224-24233.
- Ibrahim, N. M., M. H. Troedsson, D. N. Foster, K. J. Loseth, J. A. Farris, O. Blaschuk, and B. G. Crabo. 1999. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. *J Androl.* 20(2):230-240.
- Ibrahim, N. M., L. G. Young, and O. Frohlich. 2001. Epididymal specificity and androgen regulation of rat EP2. *Biol Reprod.* 65(2):575-580.
- Ideker, T., V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold, and L. Hood. 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science.* 292(5518):929-934.
- Imler, J. L., and J. A. Hoffmann. 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol.* 3(1):16-22.
- Imler, J. L., and J. A. Hoffmann. 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* 11(7):304-311.
- Ivell, R. 1994. The proopiomelanocortin gene is expressed as both full-length and 5'truncated transcripts in rodent Leydig cells. *Reprod Fertil Dev.* 6(6):791-794.
- Ivell, R., I. Pera, K. Ellerbrock, A. Beiglbock, K. Gebhardt, C. Osterhoff, and C. Kirchhoff. 1998. The dog as a model system to study epididymal gene expression. *J Reprod Fertil Suppl.* 53:33-45.
- Jacob, J., H. Duclouhier, and D. S. Cafiso. 1999. The role of proline and glycine in determining the backbone flexibility of a channel-forming peptide. *Biophys J.* 76(3):1367-1376.
- Jansen, R. C., J. P. Nap, and L. Mlynarova. 2002. Errors in genomics and proteomics. *Nat Biotechnol.* 20(1):19.
- Jean, F., L. Thomas, S. S. Molloy, G. Liu, M. A. Jarvis, J. A. Nelson, and G. Thomas. 2000. A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6):2864-2869.
- Jia, H. P., B. C. Schutte, A. Schudy, R. Linzmeier, J. M. Guthmiller, G. K. Johnson, B. F. Tack, J. P. Mitros, A. Rosenthal, T. Ganz, and P. B. McCray, Jr. 2001. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* 263(1-2):211-218.
- Jones, R. 1989. Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxf Rev Reprod Biol.* 11:285-337.
- Jones, R.E. (1997) *Human Reproductive Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press

- Kaiser, V., and G. Diamond. 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol.* 68(6):779-84.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 1999, 8: 1668-1674.
- Kawabata, S., T. Saito, K. Saeki, N. Okino, A. Mizutani, Y. Toh, and S. Iwanaga. 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and subcellular localization of horseshoe crab big defensin. *Biol Chem.* 378(3-4):289-292.
- Kirchhoff, C. 1996. CD52 is the 'major maturation-associated' sperm membrane antigen. *Mol Hum Reprod.* 2(1):9-17.
- Kirchhoff, C. 1999. Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol.* 188:133-202.
- Kirchhoff, C. 1994. A major messenger ribonucleic acid of the rodent epididymis encodes a small glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte surface antigen. *Biol Reprod.* 50(4):896-902.
- Kirchhoff, C., I. Habben, R. Ivell, and N. Krull. 1991. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod.* 45(2):350-357.
- Kirchhoff, C., C. Osterhoff, I. Habben, R. Ivell, and C. Kirchhoff. 1990. Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis. *Int J Androl.* 13(2):155-167.
- Kirchhoff, C., C. Osterhoff, and L. Young. 1996. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol Reprod.* 54(4):847-856.
- Kirchhoff, C., I. Pera, W. Rust, and R. Ivell. 1994. Major human epididymis-specific gene product, HE3, is the first representative of a novel gene family. *Mol Reprod Dev.* 37(2):130-137.
- Klenk, H. D., and W. Garten. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 2(2):39-43.
- Klinefelter, G. R., and D. W. Hamilton. 1985. Synthesis and secretion of proteins by perfused caput epididymal tubules, and association of secreted proteins with spermatozoa. *Biol Reprod.* 33(4):1017-1027.
- Kobayashi, S., K. Takeshima, C. B. Park, S. C. Kim, and K. Matsuzaki. 2000. Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. *Biochemistry.* 39(29):8648-8654.
- Kost, T. A., and J. P. Condreay. 1999. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol.* 10(5):428-433.
- Kovarik, A., K. Hlubinova, A. Vrbenska, and J. Prachar. 1987. An improved colloidal silver staining method of protein blots on nitrocellulose membranes. *Folia Biol.* 33(4):253-257.



- Krull, N., R. Ivell, C. Osterhoff, and C. Kirchhoff. 1993. Region-specific variation of gene expression in the human epididymis as revealed by in situ hybridization with tissue-specific cDNAs. *Mol Reprod Dev.* 34(1):16-24.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259):680-685.
- Lehrer, R. I., and T. Ganz. 2002. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol.* 9(1):18-22.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, and T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol.* 11:105-128.
- Lehrer, R. I., M. Rosenman, S. S. Harwig, R. Jackson, and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods.* 137(2):167-173.
- Levy, S., and B. Robaire. 1999. Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biol Reprod.* 60(6):1392-1401.
- Li, P., H. C. Chan, B. He, S. C. So, Y. W. Chung, Q. Shang, Y. D. Zhang, and Y. L. Zhang. 2001. An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science.* 291(5509):1783-1785.
- Lichtenstein, A., T. Ganz, M. E. Selsted, and R. I. Lehrer. 1986. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood.* 68(6):1407-1410.
- Lindsey, S., and M. F. Wilkinson. 1996. Homeobox genes and male reproductive development. *J Assist Reprod Genet.* 13(2):182-192.
- Malm, J., O. Sorensen, T. Persson, M. Frohm-Nilsson, B. Johansson, A. Bjartell, H. Lilja, M. Stahle-Backdahl, N. Borregaard, and A. Egesten. 2000. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun.* 68(7):4297-4302.
- Mann, T., and C. Lutwak-Mann. 1976. Evaluation of the functional state of male accessory glands by the analysis of seminal plasma. *Andrologia.* 8(3):237-242.
- Manners, J. M., I. A. Penninckx, K. Vermaere, K. Kazan, R. L. Brown, A. Morgan, D. J. Maclean, M. D. Curtis, B. P. Cammue, and W. F. Broekaert. 1998. The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol.* 38(6):1071-1080.
- McArdle, W.L. (1991) Regulation of epididymal cell function in vitro and characterization of in vivo sperm binding proteins of likely epididymal origin, PhD-thesis.IHF and Hatfield Polytechnic College, Hatfield, England
- McDonald, J. F., and G. L. Nelsestuen. 1997. Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization. *Biochemistry.* 36(24):7464-7473.

- Michaelson, D., J. Rayner, M. Couto, and T. Ganz. 1992. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J Leukoc Biol.* 51(6):634-639.
- Miranda, P. V., and J. G. Tezon. 1992. Characterization of fibronectin as a marker for human epididymal sperm maturation. *Mol Reprod Dev.* 33(4):443-50.
- Molloy, S. S., E. D. Anderson, F. Jean, and G. Thomas. 1999. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9(1):28-35.
- Moore, H. D., T. D. Hartman, and J. P. Pryor. 1983. Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int J Androl.* 6(4):310-318.
- Moore, H. D., and T. D. Hartman. 1986. In-vitro development of the fertilizing ability of hamster epididymal spermatozoa after co-culture with epithelium from the proximal cauda epididymidis. *J Reprod Fertil.* 78(2):347-352.
- Moore, H. D., T. D. Hartman, and C. A. Smith. 1986. In-vitro culture of hamster epididymal epithelium and induction of sperm motility. *J Reprod Fertil.* 78(2):327-336.
- Myles, D. G., L. H. Kimmel, C. P. Blobel, J. M. White, and P. Primakoff. 1994. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(10):4195-4198.
- Naureckiene, S., D. E. Sleat, H. Lackland, A. Fensom, M. T. Vanier, R. Wattiaux, M. Jadot, and P. Lobel. 2000. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science.* 290(5500):2298-2301.
- Newcomer, M. E. 1995. Retinoid-binding proteins: structural determinants important for function. *Faseb J.* 9(2):229-239.
- Nonaka, M. I., G. Wang, T. Mori, H. Okada, and M. Nonaka. 2001. Novel androgen-dependent promoters direct expression of the C4b-binding protein alpha-chain gene in epididymis. *J Immunol.* 166(7):4570-4577.
- Oefelein, M., D. Grapey, T. Schaeffer, C. Chin-Chance, and W. Bushman. 1996. Pax-2: a developmental gene constitutively expressed in the mouse epididymis and ductus deferens. *J Urol.* 156(3):1204-1207.
- Oppenheim, F. G., T. Xu, F. M. McMillian, S. M. Levitz, R. D. Diamond, G. D. Offner, and R. F. Troxler. 1988. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 263(16):7472-7477.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. 1992. *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual.* W.H. Freeman and Company, N.Y.

- Orgebin-Crist, M. C., and N. Jahad. 1978. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology*. 103(1):46-53.
- Osterhoff, C., C. Kirchhoff, N. Krull, and R. Ivell. 1994. Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically expressed in the proximal epididymis. *Biol Reprod*. 50(3):516-525.
- Palfree, R. G., L. C. Sadro, and S. Solomon. 1993. The gene encoding the human corticostatin HP-4 precursor contains a recent 86-base duplication and is located on chromosome 8. *Mol Endocrinol*. 7(2):199-205.
- Panyim, S., and R. Chalkley. 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch Biochem Biophys*. 130(1):337-346.
- Park, C. B., H. S. Kim, and S. C. Kim. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 244(1):253-257.
- Park, C. B., K. S. Yi, K. Matsuzaki, M. S. Kim, and S. C. Kim. 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(15):8245-8250.
- Penninckx, I. A., B. P. Thomma, A. Buchala, J. P. Metraux, and W. F. Broekaert. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10(12):2103-2113.
- Perler, F. B., M. Q. Xu, and H. Paulus. 1997a. Protein splicing and autoproteolysis mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*. 1(3):292-299.
- Perler, F. B., G. J. Olsen, and E. Adam. 1997b. Compilation and analysis of intein sequences. *Nucleic Acids Res*. 25(6):1087-1093.
- Podlasek, C. A., R. M. Seo, J. Q. Clemens, L. Ma, R. L. Maas, and W. Bushman. 1999. *Hoxa-10* deficient male mice exhibit abnormal development of the accessory sex organs. *Dev Dyn*. 214(1):1-12.
- Pollänen, P., and T. G. Cooper. 1994. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J Reprod Immunol*. 26(3):167-216.
- Quayle, A. J., E. M. Porter, A. A. Nussbaum, Y. M. Wang, C. Brabec, K. P. Yip, and S. C. Mok. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*. 152(5):1247-1258.
- Robaire, B., Hermo, L. (1988) Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In E. Knobil and J. Neill (eds.): *The Physiology of Reproduction*. New York. Raven Press. Pp. 999-1080.
- Robaire, B., Syntin, P., Jarvis, K. (2000): The Coming of Age of the Epididymis. In: Jegou, B., Pineau, C., Saez, J. (eds.) *Testis, Epididymis and Technologies in the Year 2000*.

Ernst Schering Research Foundation workshop Supplement 6, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Saalmann, A., S. Munz, K. Ellerbrock, R. Ivell, and C. Kirchhoff. 2001. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Mol Reprod Dev.* 58(1):88-100.

Saito, T., S. Kawabata, T. Shigenaga, Y. Takayenoki, J. Cho, H. Nakajima, M. Hirata, and S. Iwanaga. 1995. A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *J Biochem (Tokyo).* 117(5):1131-1137.

Saling, P. M. 1982. Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse-spermatozoa by lanthanum. *Biol Reprod.* 26(3):429-436.

Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-5467.

Sawicki, W., and E. T. Mystkowska. 1999. Contraceptive potential of peptide antibiotics. *Lancet.* 353(9151):464-465.

Schägger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166(2):368-379.

Schröder, J. M. 1999. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci.* 56(1-2):32-46.

Schröter, S., P. Derr, H. S. Conradt, M. Nimtz, G. Hale, and C. Kirchhoff. 1999. Male-specific modification of human CD52. *J Biol Chem.* 274(42):29862-73.

Serre, V., and B. Robaire. 1999. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod.* 61(3):705-714.

Shao, Y., and S. B. Kent. 1997. Protein splicing: occurrence, mechanisms and related phenomena. *Chem Biol.* 4(3):187-194.

Sharma, S., and G. Khuller. 2001. DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action of human neutrophil peptide-I against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Curr Microbiol.* 43(1):74-76.

Snook, C. F., G. A. Woolley, G. Oliva, V. Pattabhi, S. F. Wood, T. L. Blundell, and B. A. Wallace. 1998. The structure and function of antiameobin I, a proline-rich membrane-active polypeptide. *Structure.* 6(6):783-792.

- Sonnenberg-Riethmacher, E., B. Walter, D. Riethmacher, S. Godecke, and C. Birchmeier. 1996. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes Dev.* 10(10):1184-1193.
- Steinberg, D. A., and R. I. Lehrer. 1997. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the one-size-fits-all theory. *Methods Mol Biol.* 78:169-186.
- Steiner, D. F. 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol.* 2(1):31-39.
- Stommel, J. M., N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, and G. M. Wahl. 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J.* 18(6):1660-1672.
- Storici, P., A. Tossi, B. Lenarcic, and D. Romeo. 1996. Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides. *Eur J Biochem.* 238(3):769-776.
- Suh, J. Y., Y. T. Lee, C. B. Park, K. H. Lee, S. C. Kim, and B. S. Choi. 1999. Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin. *Eur J Biochem.* 266(2):665-674.
- Sutton, K. A., S. Maiti, W. A. Tribley, J. S. Lindsey, M. L. Meistrich, C. D. Bucana, B. M. Sanborn, D. R. Joseph, M. D. Griswold, G. A. Cornwall, and M. F. Wilkinson. 1998. Androgen regulation of the Pem homeodomain gene in mice and rat Sertoli and epididymal cells. *J Androl.* 19(1):21-30.
- Szewczyk, B., and L. M. Kozloff. 1985. A method for the efficient blotting of strongly basic proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. *Anal Biochem.* 150(2):403-407.
- Szyperski, T., C. Fernandez, C. Mumenthaler, and K. Wuthrich. 1998. Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(5):2262-6.
- Tang, Y. Q., J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Ouellette, and M. E. Selsted. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science.* 286(5439):498-502.
- Tarter, T. H., and N. J. Alexander. 1984. Complement-inhibiting activity of seminal plasma. *Am J Reprod Immunol.* 6(1):28-32.
- Tezon, J. G., E. Ramella, M. S. Cameo, M. H. Vazquez, and J. A. Blaquier. 1985. Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol Reprod.* 32(3):591-597.
- Thomma, B. P., I. A. Penninckx, W. F. Broekaert, and B. P. Cammue. 2001. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunol.* 13(1):63-68.

- Tsong, S. D., D. Phillips, N. Halmi, A. S. Liotta, A. Margioris, C. W. Bardin, and D. T. Krieger. 1982. ACTH and beta-endorphin-related peptides are present in multiple sites in the reproductive tract of the male rat. *Endocrinology*. 110(6):2204-2206.
- Tung, P. S., and I. B. Fritz. 1978. Specific surface antigens on rat pachytene spermatocytes and successive classes of germinal cells. *Dev Biol*. 64(2):297-315.
- Tytler, E. M., G. M. Anantharamaiah, D. E. Walker, V. K. Mishra, M. N. Palgunachari, and J. P. Segrest. 1995. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry*. 34(13):4393-4401.
- Valore, E. V., E. Martin, S. S. Harwig, and T. Ganz. 1996. Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propeptide. *J Clin Invest*. 97(7):1624-1629.
- Valore, E. V., C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*. 101(8):1633-1642.
- Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 3 (2): 97-130.
- Veenstra, J. A. 2000. Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Arch Insect Biochem Physiol*. 43(2):49-63.
- Verhoeven, G. 1992. Androgens and the testis. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 54(4):299-326.
- Viger, R. S., and B. Robaire. 1991. Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis. *Endocrinology*. 128(5):2407-2414.
- Vitale, R., D. W. Fawcett, and M. Dym. 1973. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec*. 176(3):331-344.
- Vunnam, S., P. Juvvadi, and R. B. Merrifield. 1997. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine. *J Pept Res*. 49(1):59-66.
- Waites, G.M.H. (1989) The research strategy of the WHO task force on methods for the regulation of male fertility. In: *perspectives in Andrology*. 503-516. (M. Serio ed.), Plenum Press, NY.
- Wang, M. S., J. S. Pang, and M. E. Selsted. 1997. Semidry electroblotting of peptides and proteins from acid-urea polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 253(2):225-230.
- Watanabe, T., T. Nakagawa, J. Ikemizu, M. Nagahama, K. Murakami, and K. Nakayama. 1992. Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. 267(12):8270-8274.
- Wijaya, R., Neumann, G.M., Condron, R., Hughes, A.B., Polya, G.M. 2000. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transport protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science* 159 (2): 243-255.

- Wilson, E. M., and F. S. French. 1976. Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. *J Biol Chem.* 251(18):5620-5629.
- Wong, P. Y., and C. H. Yeung. 1978. Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymidis. *J Physiol.* 275:13-26.
- Wong, Y. C., P. Y. Wong, and C. H. Yeung. 1978. Ultrastructural correlation of water reabsorption in isolated rat cauda epididymidis. *Experientia.* 34(4):485-487.
- Xu, M. Q., and T. C. Evans, Jr. 2001. Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. *Methods.* 24(3):257-277.
- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In „The Physiology of Reproduction“ ( E. Knobil and J.D. Neill, eds.) pp. 189-317. Raven Press, New York.
- Yeung, C. H., T. G. Cooper, M. Bergmann, and H. Schulze. 1991. Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *Am J Anat.* 191(3):261-279.
- Yeung, C. H., D. Nashan, C. Sorg, F. Oberpenning, H. Schulze, E. Nieschlag, and T. G. Cooper. 1994. Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol Reprod.* 50(4):917-926.
- Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374(1):1-5.
- Zanetti, M., R. Gennaro, M. Scocchi, and B. Skerlavaj. 2000. Structure and biology of cathelicidins. *Adv Exp Med Biol.* 479:203-218.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415(6870):389-395.
- Zhao, G. Q., L. Liaw, and B. L. Hogan. 1998. Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis. *Development.* 125(6):1103-1112.
- Ziegler, J., T. Vogt, O. Miersch, and D. Strack. 1997. Concentration of dilute protein solutions prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 250(2):257-26

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter:

von Horsten, H.H., Derr, P., Kirchhoff, C. (2002): Novel antimicrobial peptide of human epididymal duct origin. Biol. Reprod. in press

Posterpräsentationen:

3rd Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides, Harbortown Ventura, California

Patente:

Verwendung von HE2 $\alpha$ -Polypeptiden als antimikrobieller Wirkstoff (eingereicht beim Deutschen Patentamt)



## Lebenslauf

- Persönliche Angaben:** Hans Henning von Horsten  
Meißnerstr. 2A  
20259 Hamburg
- Geburtstag und –ort:** 13. Januar 1973 in Marne
- Familienstand:** verheiratet (26.11.1999)
- Schulbildung:** 1979-1983 Dörfergemeinschaftsschule Marne  
1983-1992 Gymnasium Marne  
Mai 1992 Abschluß:  
Abitur mit den Leistungskursen Chemie und Biologie
- Militärische Ausbildung/ Grundwehrdienst:**  
Juli 1992-September 1992 8.Sanitätsbataillon 1, Hildesheim  
Oktober 1992-Juli 1993 1- Feldjägerbataillon 610, Heide
- Hochschulausbildung:** Oktober 1993-1999: Studium des Höheren Lehramts an  
Gymnasien mit der Fächerkombination Chemie und Biologie an  
der Christian Albrechts Universität (CAU) zu Kiel;  
1997: Werkstudent bei der DyStar-Textilfarben GmbH  
1998: Staatsexamensarbeit am Institut für Biochemie der CAU  
mit dem Thema:  
Etablierung eines Testsystems zur Ermittlung von löslichem CD30 in  
Körperflüssigkeiten  
Abschluß: 1. Staatsexamen (mit Auszeichnung bestanden)  
mit den Fächern Chemie, Biologie, Pädagogik (Schwerpunkt Didaktik der  
Biologie) und Logik.  
Ab April 1999: Promotion am Institut für Hormon- und  
Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg mit dem  
Dissertationsthema:  
HE2, ein humanes Spermienoberflächenantigen epididymaler  
Herkunft.  
April 1999-April 2001. Promotionsstipendiat der *Ernst-Schering Research  
Foundation*.  
ab April 2001. wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungsprojekt *Ki 317/8  
Molekulare Mechanismen der epithelialen Abwehr* am Institut für Hormon-  
und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg

## Danksagung

Diese Arbeit wurde von April 1999 bis April 2002 am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg angefertigt. Herrn Prof. Dr. Freimut Leidenberger danke ich für die Aufnahme in sein Institut und für die exzellenten Arbeitsbedingungen. Frau PD Dr. Christiane Kirchhoff danke ich für die interessante Themenstellung und für ihre eigene Begeisterung für die Forschung, die mich auch bei Rückschlägen immer wieder motiviert hat. Außerdem danke ich ihr für ihre Unterstützung und für viele wertvolle Literaturhinweise und fachliche Diskussionen. Herrn Prof Dr. Richard Ivell danke ich für sein Engagement bei der theoretischen Doktorandenausbildung sowie für viele gute Tips und Denkanstöße. Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie bei allen übrigen Mitarbeiter(innen) des IHF bedanke ich mich für die freundliche Atmosphäre und für die persönlichen und fachlichen Gespräche. Dr. Jürgen Harder, Prof. Dr. Jens Michael Schröder danke ich für die Durchführung der Massenbestimmung von zyklischem HE2 $\alpha$ -Peptid durch ESI-MS. Bei Caroline bedanke ich mich besonders für die Einarbeitung in molekularbiologische Techniken und für viele sehr hilfreiche Tips und anregende Gespräche. Petra danke ich besonders für die Einführung in FPLC- und HPLC-Techniken und Rasoul für seine Ratschläge bezüglich baculoviraler Expression. Bei Ralph bedanke ich mich für die kritische Begutachtung meiner Ergebnisse sowie für fachliche Tips und Anregungen. Dorthe danke ich für die Einführung in Graph-Pad Prism, Roger für viele wertvolle Tips zu Proteinmethoden und Olaf für die Unterstützung bei chemischen Fragestellungen und für die Bereitstellung des Fucosyltransferase 6-Amplifikats. Den beiden Bibliothekaren Petra und Christoph danke ich für ihr großes Engagement bei der Beschaffung selbst der schwerst aufzufindenden, wissenschaftlichen Literatur. Jan Pless danke ich für die Unterstützung bei Computerproblemen. Ich danke auch Norbert und Renate für die Ermöglichung des reibungslosen Ablaufs des Laborbetriebs. Dr. Kevan Willey danke ich für die Korrektur der englischsprachigen Zusammenfassung und für einige gute Literaturstücke mit denen er mich versorgt hat. Bei der Ernst Schering Research Foundation und der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die erhaltene Förderung. Meiner Chemielehrerin Frau Krause danke ich dafür, daß sie durch ihren tollen Unterricht mein Interesse an den Naturwissenschaften geweckt hat. Auch mein Cousin Karsten hat mich für die Chemie begeistert. Bei meinen Eltern und meiner Tante Telse bedanke ich mich dafür, daß sie mich immer unterstützt und gefördert haben. Zum Schluß bedanke ich mich bei meiner Frau Ana, die mich die ganze Zeit über verständnisvoll unterstützt hat.

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen übernommene Textstellen habe ich als solche kenntlich gemacht und die Inanspruchnahme fremder Hilfen habe ich namentlich aufgeführt.

Die Dissertation wurde nicht an anderer Stelle eingereicht.

Hamburg, den.....

.....