

## 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.