

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der  
Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor:  
Professor Dr. med. Aumüller

---

**Nachweis und Charakterisierung von Transglutaminase  
im menschlichen Ejakulat**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich der Medizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Joseph G. Erkel**

aus Fort Sill, Oklahoma  
U.S.A.

Marburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
07.12.2000. Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Professor Dr. med. R. Arnold

Referent: Professor Dr. rer. nat. J. Seitz

Correferent: Professor Dr. W. Krause

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Definition des Enzyms Transglutaminase, Substrate	1
<b>1.2. Isoenzymformen der TGase</b>	<b>3</b>
1.2.1. Gerinnungsfaktor XIIIa (Plasma-TGase)	3
1.2.2. Keratinozyten-TGase (TG <sub>K</sub> und TG <sub>X</sub> ) und epitheliale TGase (TG <sub>E</sub> )	5
1.2.3. Haarfollikel-TGase	8
1.2.4. Zytoplasmatische und membranständige Gewebe - TGase (TG <sub>C</sub> )	10
1.2.5. Sekretorische TGase in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen	13
1.2.5.1. Koagulationsdrüse und dorsale Prostata von Nagern	14
1.2.5.2. TGase in den menschlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen und im Seminalplasma	16
<b>1.3. Funktionen der seminalen Transglutaminasen</b>	<b>18</b>
1.3.1. Samenkoagulation bei Nagern	18
1.3.2. Samenkoagulation beim Menschen	20
1.3.3. Modifikation von Spermien durch Transglutaminasen, Immunsuppression	21
<b>1.4. Ziele der eigenen Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Herkunft der menschlichen Proben</b>	<b>24</b>
2.2.1. Menschliche Ejakulatproben	24
2.2.2. Gewebeproben von menschlicher Prostata und Bläschendrüse, sowie Bläschendrüsensekret	25
<b>2.3. Versuchstiere</b>	<b>25</b>
2.3.1. Kaninchen zur Antikörperherstellung	25
2.3.2. Ratten zur Gewinnung von Koagulationsdrüsensekret	25
<b>2.4. Herkunft des Antikörpers gegen die sekretorische Ratten-TGase</b>	<b>25</b>
<b>2.5. Biochemische Methoden</b>	<b>26</b>
2.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.5.2. Identifizierung der Proteine	26
2.5.2.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese(SDS-PAGE)	26
2.5.2.1.1. Mini-SDS-PAGE	27

	Seite
2.5.2.1.2. SDS-PAGE mit großen Gelen	28
2.5.2.2. Anfärben der Gele nach SDS-PAGE	30
2.5.2.3. Western-Blot im Semi-dry-Verfahren	31
2.5.3. Messung der Transglutaminase-Enzymaktivität	33
2.5.4. Isolierung von Transglutaminase aus akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Seminalplasma	35
2.5.4.1. Extraktion der TGase aus der Ratten-Koagulationsdrüse	35
2.5.4.2. Extraktion aus menschlichem Prostatagewebe	35
2.5.4.3. Gewinnung von Sekret der menschlichen Bläschendrüse	35
2.5.4.4. Extraktion aus menschlicher Bläschendrüse	35
2.5.4.5. Aufarbeitung von menschlichem Ejakulat	35
<b>2.6. Reinigung der Transglutaminasen</b>	<b>37</b>
2.6.1. Konzentrierung der Extrakte durch Ammoniumsulfatfällung	37
2.6.2. Dialyse der TGase-haltigen Fraktionen	37
2.6.3. Präparatives Fokussgel	37
<b>2.7. Herstellung von Kaninchen-Antikörpern gegen seminale TGase</b>	<b>39</b>
<b>2.8. Immunhistologische Untersuchungen</b>	<b>40</b>
2.8.1. Immunkomplexfärbung von ejakulierten Spermien	40
2.8.2. Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten	41
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Versuche zum Nachweis von sekretorischer Transglutaminase (TGase) in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und im Seminalplasma des Mannes</b>	<b>43</b>
<b>3.2. Bestimmung der optimalen SDS-PAGE-Gelkonzentration für die Auftrennung der Seminalplasmaproteine</b>	<b>44</b>
<b>3.3. Auswertung der Western Blot-Analyse aller Seminalplasmaproben</b>	<b>47</b>
<b>3.4. Reinigung der löslichen seminalen Transglutaminase</b>	<b>49</b>
3.4.1. Ammoniumsulfatfällung	49
3.4.2. Präparative Isoelektrische Fokussierung	52
<b>3.5. Herstellung von Antikörpern gegen HT, HTa und HTb</b>	<b>53</b>
<b>3.6. Optimierung der Enzymaktivitätsmessung für die seminale TGase</b>	<b>55</b>

	Seite	
3.7.	Verteilung der TGase-Enzymaktivität in einer frischen Ejakulatprobe	60
3.8.	Extraktion der an menschliche Spermien gebundenen Transglutaminase	61
3.9.	TGase-Enzymaktivität in einer Ejakulatprobe mit Azoospermie	64
3.10.	Lokalisation der TGase in menschlichen Ejakulatproben	64
3.11.	Isolierung der partikulären TGase von menschlichen Spermien durch präparative SDS-PAGE	66
3.12.	Herstellung eines Antikörpers (Anti-HST-1) gegen partikuläre TGase aus menschlichen Spermien	67
3.13.	Syntheseort der seminalen TGase	68
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>74</b>
4.1.	Transglutaminasen im menschlichen männlichen Genitaltrakt	74
4.2.	Humane seminale Transglutaminase: Verwandschaft zur Isoform in der Koagulationsdrüse der Ratte	75
4.3.	Untersuchungen zur Isolierung der Seminalplasma-TGase	76
4.4.	Optimierung der Aktivitätsmessung für seminale TGase	79
4.5.	Lokalisation der TGase in menschlichem Ejakulat	81
4.6.	Extraktion der im Spermienpellet gebundenen Transglutaminase	81
4.7.	Untersuchung von Ejakulat mit Azoospermie	82
4.8.	Syntheseort der seminalen TGase	83
4.9.	Folgerungen	85
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>
	<b>Anhang</b>	
	Curriculum vitae	103
	Akademische Lehrer	104
	Danksagung	105

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA:	Acryl-Amid
AK:	Antikörper
APS:	Ammoniumpersulfat
AS:	Ammoniumsulfat
BD:	Bläschendrüse
BDS:	Bläschendrüsensekret (des Menschen)
CG:	Koagulationsdrüse der Ratte (coagulating gland)
CGS:	Koagulationsdrüsensekret der Ratte
CE:	cornified cell envelope
cpm:	counts per minute (Impulse pro Minute)
Cys:	Cystein
DAB:	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DKFZ:	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
DNA:	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DP1:	65 kDa-TGase aus der dorsalen Ratten-Prostata und Koagulationsdrüse
DP2:	115 kDa-TGase aus der dorsalen Ratten-Prostata
dpm:	decay per minute (Zerfälle pro Minute)
DTE:	Dithioerythritol
DTT:	Dithiotreitol
EC:	<b>Enzyme Commission(-System) der Internationalen Union für Biochemie</b>
EDTA:	ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
EGF:	Epidermal growth factor (epidermale Wachstumsfaktor)
EGTA:	Eythlene-glycol-bis(2-aminomethylether)-N,N'-tetra-acetic acid
ER:	endoplasmatisches Retikulum
Glu:	Glutamin
G-Protein:	Guanin-Nucleotide-bindendes Protein der Zelle
GTP:	Guanosin-5'-triphosphat
h:	hour(s), Stunde(n)
HEPES:	4,(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HPLC:	Hochleistungs- (bzw. Hochdruck-) Flüssigkeits-Chromatographie
HSA:	Human-Serumalbumin
HST :	Human Seminal Transglutaminase (partikuläre)
hTG <sub>P</sub> :	TGase4, "human prostate-specific" Transglutaminase (sekretorische Prostata-TGase)
kDa:	Kilodalton
KSCN:	Kalium-Thiocyanat
Lys	Lysin
MÄ:	Mercaptoäthanol

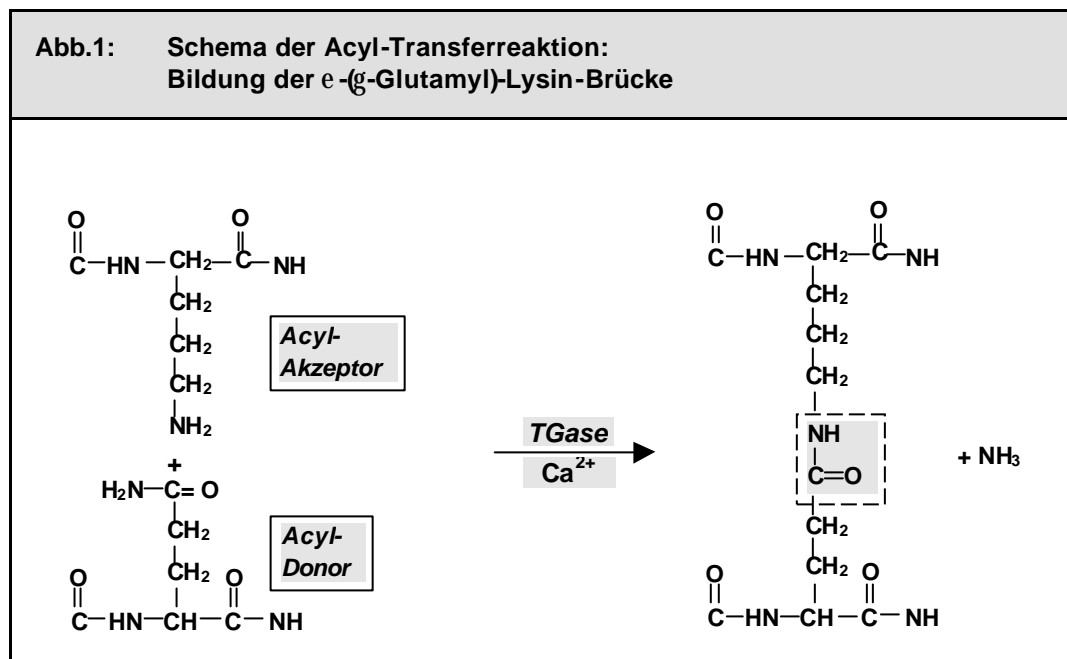
min:	Minute(n)
mRNA:	messenger ribonucleic acid (messenger-Ribonucleinsäure)
PAP:	Peroxidase-anti-peroxidase
PBS:	phosphate-buffered saline
pI:	Isoelektrischer Punkt
PID:	Protein-Identifikation(s-Nummer)
PR:	Prostatagewebe
PSA:	Prostate Specific Antigen (Prostata-spezifisches Antigen)
SDS:	Sodium-Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE:	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacryl-Amid-Gel Elektrophoresis
sec:	Sekunde(n)
S-Eich:	Sigma Eichproteine
SP:	Seminalplasma
STM:	Sucrose/Tris HCl / MgCl <sub>2</sub>
SVS II:	Seminal Vesicle Secretory Protein II
SVS:	Seminal Vesicle Secretory (Protein)
TCA:	trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TEMED:	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TGase:	Transglutaminase
TG <sub>C</sub> :	TGase3, "tissue-type" (Gewebe-) oder "cellular" (zytoplasmatische) Transglutaminase
TG <sub>E</sub> :	TGase2, epidermale Transglutaminase
TG <sub>K</sub> :	TGase1, Keratinozyten-Transglutaminase
TG <sub>X</sub> :	TGase5, epidermale Form
TGF:	Transforming growth factor
TRIS:	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U:	Units (Einheiten)
upm:	Umdrehungen pro Minute
w/v:	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Definition des Enzyms Transglutaminase, Substrate

Die Bezeichnung "Transglutaminase" (Abkürzung "TGase"; Amin- $\gamma$ -Glutamyl-Transferase, EC 2.3.2.13) wird für eine Gruppe von Enzymen verwendet, die bei höheren Organismen sowohl intra- als auch extrazellulär, z.B. in Sekreten, vorkommen (FOLK<sup>1</sup>, 1980).

Transglutaminasen katalysieren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Transferreaktionen von Acyl-Donoren auf Acyl-Akzeptoren. Acyl-Donoren sind  $\gamma$ -Carboxyamidgruppen peptidgebundener Glutaminreste (Glu). Acyl-Akzeptoren sind primäre Aminogruppen von Polyaminen, z.B. die  $\epsilon$ -Aminogruppe von proteingebundenen Lysinresten (Lys). Unter Freisetzung von Ammoniak wird eine  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Brücke gebildet (GREENBERG *et al.*, 1991; LORAND und CONRAD, 1984) (s. Abb.1: modifiziertes Reaktionsschema nach LOEWY, 1968).



1991 gelang der Arbeitsgruppe von GERARD QUASH in Frankreich (EL ALAOUI *et al.*, 1991) die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers (MAb 81D1c2), der den in situ Nachweis der in Abb. 1 erkennbaren  $\text{N}\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptide ermöglicht. Damit konnte gezeigt werden, dass die durch die TGase quervernetzten Polypeptide sowohl bei den Drüsenepithelzellen der menschlichen Brustdrüse (ROCH *et al.*, 1991), als auch in Kulturzellen eines menschlichen Larynxcarcinoms (HEp2-Zellen), wie auch in kultivierten embryonalen Hühnerzellen (EL ALAOUI *et al.*, 1991) vor allem im Zellkern nachzuweisen sind. Nach Hydrolyse der Reaktionsprodukte werden die Glu-Lys-Isopeptide seit kurzem auch durch HPLC-Analyse nachgewiesen (MILLER und JOHNSON, 1999).



Durch die kovalente Verknüpfung von Polypeptidketten können TGasen aber auch biologisch relevante Filamentstrukturen (*CHUNG und FOLK, 1972*) und membrangebundene Rezeptorproteine (*GRASSO et al., 1987*) stabilisieren. Die quervernetzten Proteine weisen eine bessere Resistenz gegenüber dem Angriff von Proteasen auf. Damit wird die Stabilität des jeweiligen Gewebes gegenüber chemischen, enzymatischen und mechanischen Einflüssen erhöht (*GREENBERG et al., 1991*).

### **Aktivitätstests für TGasen**

In einem Übersichtsartikel beschrieben *WILHELM et al. (1996)* zusammen mit den Verfahren zur Reinigung von TGasen auch die üblichen Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität. Substrate zur Quantifizierung der Transglutinasen können neben Oligo- und Polypeptiden auch die Diamine Putrescin (1,4-Diaminobutan) und Cadaverin (1,4-Diaminopentan) sowie die Polyamine Spermin und Spermidin sein (*FOLK<sup>2</sup> et al., 1980; GORMAN und FOLK, 1980*).

Als Substrate für *in vitro* Enzymtests werden besonders markiertes Putrescin bzw. Cadaverin verwendet (*BUXMAN und WUEPPER, 1976; LORAND et al., 1979; DIAS, 1985*). Vor allem mit Dansylcadaverin wurden Nachweismethoden für Transglutinasen mit hoher Empfindlichkeit entwickelt (*SEIVING et al., 1991*). Die Arbeitsgruppe von *KVEDAR et al. (1992)* stellte einen monoklonalen Antikörper gegen Dansylcadaverin her, mit dem an Polypeptide gebundenes Dansylcadaverin auch in geringen Mengen nachgewiesen werden kann. *FINK et al. (1992)* beschrieben eine Methode (Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Fluorometrie), bei der das synthetische Peptid Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminylglycin mit Monodansylcadaverin verknüpft wird.

Die TGase-Reaktion wird häufig durch Zugabe von Ammoniumsulfat gestoppt. Diesen Effekt setzten z.B. auch *TAKAGI et al. (1986)* ein, um die Reaktionszeit für ihre Fluoreszenzmessungen zu standardisieren.

Erst kürzlich wurde ein Chemilumineszenz-Test für TGasen etabliert, bei dem zunächst das Substrat N-aminobutyl-N-Ethylisoluminol an N,N'-Dimethylcasein gekoppelt wird. Anschließend wird das Protein-Amin-Konjugat mit Kaliumhexazyanoferat und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert, wobei L-Carnosin als Verstärker dient, und somit zur erhöhten Abgabe von Licht anregt (*ACHYUTHAN, 1999*).

Die TGase selbst kann sich durch Autokatalyse relativ leicht quervernetzen – so besitzt z.B. die sekretorische Isoform in ihrer Primärsequenz 38 Glutamin- und 42 Lysinreste. Bei ihrer Isolierung muss deshalb eine irreversible Präzipitation durch Zugabe von reversibel wirksamen Inhibitoren (s.u.) verhindert werden.

Alle TGasen besitzen auf ihrer Primärstruktur zwei Sequenzabschnitte, die für ihre enzymatische Aktivität unabdingbar sind:

1. **Eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen:** für eine Basisaktivierung müssen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Bereich von 0,1 – 1mM vorhanden sein (*FÉSUS und LAKI, 1977*). Um eine optimale Aktivität zu erreichen, werden bei den meisten TGasen zusätzlich zwischen 3 und 7 mM des Kations benötigt.

2. **Einen essentiellen Cys-Rest** (z.B. Cys-255 bei der sekretorischen TGase), dessen kovalente Alkylierung mit Jodacetamid oder Jodacetat zur irreversiblen Hemmung führt. Ein Protein (Bande 4.2) in der Membran von Erythrozyten zeigt hohe Sequenzhomologie mit den meisten TGasen, besitzt aber keine quervernetzende Aktivität, da in seiner Primärsequenz der Cys-Rest im aktiven Zentrum durch Alanin ersetzt wird (*SUNG et al., 1990; IDEGUCHI et al., 1990; KORSGREN et al., 1990*).

## 1.2. Isoenzymformen der TGase

Als Isoenzyme werden verschiedene Formen eines Enzyms bezeichnet, die zwar dieselbe biochemische Reaktion katalysieren, sich in bestimmten molekularen Parametern (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, Aminosäuresequenz, spezifische Aktivität) jedoch unterscheiden. Auch bei den humanen TGasen sind verschiedene Formen bekannt (*FOLK<sup>1</sup>, 1980; GRUNDMANN et al., 1986; GREENBERG, 1991; LICHTI, 1991; RICE et al., 1992; PELUSO et al., 1994; FRIEDRICHS et al., 1995; WILHELM et al., 1996; AESCHLIMANN et al., 1998; DUBBINK et al., 1996 und 1999*): der **Gerinnungsfaktor XIII** (Thrombozyten- bzw. Plasma-TGase), 2 epidermale Formen (**TG<sub>E</sub>**; TGase3 und **TG<sub>X</sub>**; TGase5), Keratinozyten-TGase (**TG<sub>K</sub>**; TGase1), Haarfollikel-TGase, Gewebe-TGase (zytoplasmatische und membranständige TGase, tissue type; **TG<sub>C</sub>**; TGase2) und sekretorische Prostata-TGase (**TG<sub>P</sub>**; TGase4).

### 1.2.1. Gerinnungsfaktor XIII (Plasma-TGase)

Die bekannteste und am meisten untersuchte Isoform der Transglutaminase ist der Faktor XIII des Blutgerinnungssystems. Bereits 1958 hatten *LORAND und JACOBSEN* (zitiert bei *HOMANN et al., 1984*) ein Globulin isoliert, welches die Autoren "Fibrinstabilisierender Faktor" nannten. Seit 1963 hat sich die Bezeichnung Faktor XIII durchgesetzt (*RASCHE, 1975*).

Faktor XIII kann in Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen, im Blutplasma (am Ende des Gerinnungsprozesses), und in verschiedenen anderen Geweben wie z.B. der Plazenta nachgewiesen werden (*RASCHE 1975; MUSZBEK et al., 1996*). Einen umfangreichen und detaillierten Überblick über den aktuellen Kenntnisstand zum Faktor XIII gaben *MUSZBEK et al. (1996)*. Der inaktive Plasma-Faktor XIII besteht aus den beiden Untereinheiten A und B, die wiederum ein Heterotetramer (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) bilden. Man hat auch die kodierenden Gene sowohl für die Untereinheit a auf dem Chromosom 6 (p24-25) (*WEISBERG et al., 1987*) als auch für b auf dem Chromosom 1 (q31-32.1) (*NONAKA et al., 1993*) lokalisiert. Inzwischen wurden zunächst die DNA-Sequenz und daraus

abgeleitet die primäre Proteinsequenz der beiden Untereinheiten a (*GRUNDMANN et al., 1986; ICHINOSE et al., 1986*) und b (*GRUNDMANN et al., 1990; BOTTENUS et al., 1990*) bestimmt. Anschließend wurde auch die dreidimensionale Struktur des Faktors XIIIa geklärt (*YEE et al., 1996*), der als Homodimer (A<sub>2</sub>) von den Thrombozyten abgegeben wird. Vorstufenzellen im Knochenmark wie Megakaryozyten, Monozyten und Makrophagen exprimieren und synthetisieren hauptsächlich die Untereinheit a des Faktors XIII, darüber hinaus ist eine Bildung in Hepatozyten, die um die Zentralvenen liegen, bekannt (*ADANY, 1996; ADANY und ANTAL, 1996*). Die Untereinheit b des Plasma-Faktors XIII wird dagegen nur in der Leber hergestellt.

Durch Aggregation der Untereinheiten im Plasma entsteht der Faktor XIII (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). Er ist eine Prothrombinglutaminase, d.h. eine inaktive Vorstufe (Zymogen), welche erst im letzten Schritt der Blutgerinnungskaskade aktiviert wird. Dabei spielt das Substrat Fibrin eine wichtige regulatorische Rolle (*HORNYAK und SHAFER, 1992*). Der entscheidende Schritt in der Aktivierung ist die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Abspaltung eines N-terminalen Peptides von 37 Aminosäuren durch die Protease Thrombin. Dies führt zur Dissoziation der Untereinheiten a und b, und damit wird das vorher verdeckte enzymatische Zentrum der Untereinheit a freigelegt. Die nun als Faktor XIIIa bezeichnete TGase verknüpft bisher nur durch Wasserstoffbrücken aneinandergelagerte Fibrinketten durch kovalente Quervernetzung. Die dreidimensionale Polymerisation des Fibrins stabilisiert das Blutgerinnsel und macht es dadurch widerstandsfähig gegen fibrinolytisches Plasmin (*RASCHE, 1975; JACKSON und NEMERSON, 1980*). Durch eine kovalente Einbindung von  $\alpha$ -2-Antiplasmin, dem potentesten physiologischen Inhibitor von Plasmin, wird dieser Proteasenschutz verstärkt.

Schon seit den sechziger Jahren ist der Zusammenhang zwischen kongenitalem Mangel an Faktor-XIII und dem Auftreten zahlreicher schwerer Erkrankungen bekannt. In der Folgezeit wurde umfangreich über die Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen geforscht, die in Zusammenhang mit Faktor-XIII-Mangel stehen. Dabei sind sowohl angeborene und als auch erworbene Störungen bekannt. Den erworbenen Krankheiten können eine defekte Synthese, aber auch gesteigerter Verbrauch oder Hemmung des Faktor XIII zugrunde liegen (*DUCKERT et al., 1960; FISHER et al., 1966; RASCHE, 1975; KRICHEN, 1985; NUSSBAUM und MORSE, 1964; BOARD et al., 1993*). Weibliche Patienten mit Faktor XIII-Mangel können Schwangerschaften nicht bis zum Ende austragen, d.h. sie erleiden wiederholte Aborte. Teilweise kann dieser Mangel durch Substitution mit gereinigtem oder rekombinantem Faktor XIIIa ausgeglichen werden (*FISHER et al., 1966; EGBRING et al., 1996*).

Bei kongenitalem Mangel an Plasmafaktor XIII wurde immunhistochemisch gezeigt, dass in Makrophagen entsprechender Patienten die Untereinheit a fehlt. Auch die Aktivität der TGase in diesen Makrophagen liegt unter der Nachweisgrenze des Dansylcadaverin-Tests (*MUSZBEK et al., 1988*).

Ein weiterer klinisch relevanter Test zur Messung der Faktor XIII-Aktivität stellt die Verknüpfung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Putrescin mit Casein dar (EGBRING *et al.*, 1973). Es sind aber auch kommerziell erhältliche einfache Tests entwickelt worden, mit denen der Faktor XIII quantitativ bestimmt werden kann, diese Tests werden vor allem im klinischen Alltag eingesetzt (KRICHEN, 1985).

Als weiteres Substrat des Plasmafaktors XIIIa ist Fibronectin bekannt, das durch die TGase-Aktivität mit Fibrin, aber auch mit Kollagen Typ I und III, quervernetzt werden kann (KESKI-OJA *et al.*, 1976; MOSHER *et al.*, 1980) – ein Vorgang, der ebenfalls für der Wundheilung essentiell ist. Dabei wird eine Matrix gebildet, die die Einwanderung und Anheftung von proliferierenden Endothelzellen ermöglicht (PAYE<sup>1</sup> und LAPIERE, 1986; PAYE<sup>2</sup> und LAPIERE, 1986). Faktor XIII hat auch eine regulierende Funktion auf die Vermehrung und Migration von Epithelzellen (PAYE<sup>1</sup> und LAPIERE, 1986). Des Weiteren wurde eine chemotaktische und mitogene Wirkung auf benachbarte Bindegewebszellen beschrieben. So moduliert der Gerinnungsfaktor z.B. die Biosyntheseleistung von Fibroblasten und stellt die kontraktile Fähigkeit von bestimmten Zellen wieder her. Setzt man einer Kultur von Zellen, die die Fähigkeit verloren haben, an Kollagen des Typs I zu binden, Fibronectin hinzu, so können sie zunächst wieder an Polymere von Kollagen I binden, jedoch nicht an dessen Monomere. Fügt man nun außerdem Faktor XIII hinzu, so wird auch die Bindungsfähigkeit an die Monomere wiederhergestellt. Dies beleuchtet die wichtige Rolle des Faktors XIII bei der Zelladhäsion (PAYE<sup>2</sup> und LAPIERE, 1986).

Faktor-XIII in der Plazenta besteht aus zwei glykosylierten Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 83 kDa (TAKAHASHI *et al.*, 1986). Sie sind wahrscheinlich identisch mit der Untereinheit a des Plasmafaktors XIII und können ebenfalls durch Thrombin und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden. Die Wirkung des plazentaren Faktors XIIIa auf Fibronectin, Laminin und Typ IV Kollagen ist auch bei der Implantation der Blastozyste in die Uterusschleimhaut von großer Bedeutung (ASAHINA *et al.*, 1990). Am 10. Tag nach der Einnistung werden Fibronectin, das vor allem von Trophoblastenriesenzellen gebildet wird, Fibrin und Kollagen aus dem Uterusstroma (HÜNTEMANN, 1987) durch die Aktivität der TGase, die auch mehr und mehr vom Embryo gebildet wird, zu einem Koagulum verknüpft, das die Implantationsstelle verschließt (MACCIONI und ARECHAGA, 1986).

### **1.2.2. Keratinozyten-TGase (TG<sub>K</sub> und TG<sub>X</sub>) und epitheliale TGase (TG<sub>E</sub>)**

Transglutaminasen wurden in der Hornhaut von Mensch, Rind, Mäusen und der Ratte nachgewiesen. Ihre wichtigsten physiologischen Substrate sind Loricrin, Elafin, Filaggrin, Involucrin, sowie Intermediärfilamente aus Keratin (HOHL *et al.*, 1991; RICE *et al.*, 1992; Melino *et al.*, 1998), die nach ihrer Quervernetzung zu stabilen Bündeln, den "Cornified cell envelope" (CE), eine 15nm dicke Zone aus unlöslichem Protein bilden.

TG<sub>K</sub> ist am Nterminalen Ende mit Myristoyl- und Palmitoylresten substituiert und über diese Acylgruppen an der inneren Plasmamembran der Keratinozyten fixiert. Das Protein

wird zunächst als Zymogen (Vorform) mit 106 kDa und relativ geringer enzymatischer Aktivität gebildet. Nach der proteolytischen Aktivierung (Untereinheiten von 67, 33 und 10 kDa) steigt die Aktivität der weiterhin membranassoziierten TGase auf das 200fache an. Das 67 kDa-Fragment enthält dabei das katalytische Zentrum (*KIM et al., 1995; STEINERT et al., 1996*). TG<sub>K</sub> ist in der gesamten Epidermis einschließlich der Basalzellschicht zu finden, besonders ausgeprägt ist die Expression jedoch im Stratum granulosum unterhalb des Stratum corneum.

Eine cDNA für eine weitere humane Keratinozyten-TGase (TG<sub>X</sub>) wurde erst vor kurzem von *AESCHLIMANN und Mitarbeitern (1998)* isoliert. Sie kodiert ein Protein von 720 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 81 kDa entspricht. Auch im Zytosol der Zellen des Stratum granulosum wurde eine TGase-Isoform identifiziert: die epidermale TGase (TG<sub>E</sub>). Ihre Aktivität ist deutlich geringer als die der TG<sub>K</sub>. Beim Meerschweinchen wird eine größere Zymogenform ebenfalls proteolytisch in eine 50 kDa (enthält das katalytische Zentrum) und eine Cterminale 27 kDa-Untereinheit gespalten (*KIM et al., 1990*). Man nimmt heute an, dass TG<sub>E</sub> zunächst homologe Proteinketten (z.B. aus Loricrinmolekülen) vernetzt und diese dann durch TG<sub>K</sub> über weitere Glu- und Lys-Brücken mit anderen vorvernetzten Proteinen (Elafin, Filaggrin etc.) zum CE verbindet. Die Basalzellen exprimieren außerdem auch eine Gewebs-TGase (TG<sub>C</sub>) (siehe 1.2.4) mit noch unbekannter Funktion.

Beim enzymhistochemischen Nachweis der Haut-TGase werden Kryostatschnitte von Epidermis in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> mit Dansylcadaverin inkubiert. Katalysiert durch die Transglutaminase-Aktivität wird das fluoreszierende Amin an Glutaminreste z.B. in den Keratinmolekülen verknüpft, die dann im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden können (*BUXMAN und WUEPPER, 1978*).

*BUXMAN und WUEPPER* identifizierten 1975 eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transglutaminase in Rinderepidermis mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (wahrscheinlich TG<sub>E</sub>) und stellten gegen diese Form Antikörper her. Durch Immunhistologie wiesen sie die Transglutaminase im Zytoplasma der Zellen der Stratum basale und granulosum der Epidermis nach. Sie schlossen daraus, dass das Enzym epidermale Proteine während der letzten Stadien der Keratinisierung quervernetzt. Im folgenden Jahr wies die Arbeitsgruppe *BUXMAN und WUEPPER (1976)* nach, dass das Enzym *in vitro* auch Fibrin quervernetzen und stabilisieren kann, sich jedoch biochemisch und immunologisch von Faktor XIII unterscheidet. 1980 identifizierten *BUXMAN et al.* ein Substrat mit 36 kDa, das *in vitro* durch epidermale TGase in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> quervernetzt wird. In Gegenwart von Putrescin oder EDTA wird diese Polymerisation vollständig unterdrückt. Bei immunhistochemischen Untersuchungen von *PARENTEAU et al. (1986)* mit einem Antikörper gegen Keratinozyten-TGase wurde die Isoform zunächst im verhornten Epithel der Haut und im unverhornten Epithel der Mundhöhle, des Ösophagus, der Trachea sowie der Vagina bevorzugt im Stratum granulosum nachgewiesen. Darüber hinaus

reagierten aber auch Epithelzellen im Endometrium, in den Hauptausführungsgängen des Pankreas und der Brustdrüse (kurz vor und nach der Geburt eines Kindes) sowie Primärkulturzellen aus dem Übergangsepithel der Harnblase, den Bläschendrüsen (beide nur *in vitro*) und dem Trachealepithel (*in vivo* und *in vitro*). *MARTINET et al. (1988)* fanden zwei Formen der Transglutaminase mit Molekulargewichten von etwa 50 kDa und 90 kDa in der Haut von neugeborenen Mäusen. Eine Transglutaminase-Isoform mit einem Molekulargewicht von 92 kDa wurde im Trachealepithel von Kaninchen (*JETTEN und SHIRLEY, 1986*) und in kultivierten menschlichen Keratinozyten (*SCHROEDER et al., 1992*) nachgewiesen.

"Epidermal growth factor" (EGF) ist als potentes Mitogen für Keratinozyten bekannt. *MONZON et al. (1996)* zeigten, dass in Gegenwart dieses Wachstumsfaktors die Aktivität einer membran-assoziierten Keratinozyten-TGase in einem Plattenepithel-Karzinom erheblich gehemmt wurde. Möglicherweise schränkt EGF dadurch auch die Differenzierung der Krebszellen ein. Im Vergleich dazu führt die Zugabe von EGF in Ratten-Hepatozyten zu einer erhöhten Aktivität einer Gewebe-TGase (siehe 1.2.4.) und übt gleichzeitig einen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen aus (*KATOH et al., 1996*). *JETTEN et al. (1986)* wiesen nach, dass auch der "transforming growth factor beta" (TGF  $\beta$ ) die Aktivität der Transglutaminase in Tracheaepithelzellen erhöht. Dadurch werden u.a. auch Membranbestandteile von benachbarten Zellen quervernetzt, d.h. die Adhäsion der Zellen miteinander verstärkt.

Eine Untersuchung von *HINES und ALLEN-HOFFMANN (1996)* ergab, dass dagegen der "keratinocyte growth factor" eine verminderte Ausbildung von Quervernetzungen und eine verminderte Aktivität der membrangebundenen TGase der Haut bewirkt. Auch Retinoide sind dafür bekannt, den mRNA-Spiegel wie auch die Aktivität der TG<sub>E</sub> in reifen epidermalen Zellen zu hemmen (*JETTEN und SHIRLEY, 1986*, *RUBIN und RICE, 1986*; *FLOYD und JETTEN, 1989*). *LICHTI et al. (1985)* konnten jedoch zeigen, dass in der Epidermis von neugeborenen Mäusen Retinoide die Expression einer Transglutaminase induzieren, die sich biochemisch von der normalen epidermalen TGase unterscheidet. Eine genaue Zuordnung zu einer der bekannten Isoformen gelang zwar nicht, die Autoren vermuten aber, dass es sich wahrscheinlich um eine Form der membrangebundenen Gewebe-TGase handelt.

In der Haut von Patienten, die an bestimmten Hautkrankheiten leiden, lassen sich u.a. auch Enkephaline nachweisen. *NISSEN und KRAGBALLE (1997)* untersuchten den Effekt dieser Neuropeptide auf die epidermale TGase während der Differenzierung und Proliferation von kultivierten menschlichen Keratinozyten. Sie leiteten aus ihren Ergebnissen ab, dass die Enkephaline offensichtlich auch eine Rolle bei der *in vitro*-Differenzierung von Keratinozyten spielen.

*KVEDAR et al. (1992)* nutzten ihre oben beschriebene Methode, den Nachweis von inkorporiertem Dansylcadaverin mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers

gegen das Fluorochrom noch sensitiver zu machen, um die Transglutaminaseaktivität in epidermalem Gewebe zu lokalisieren. Sie konnten damit belegen, dass das Enzym in der Peripherie der Zellen im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum der Epidermis zu finden ist. *JOHNSON et al. (1992)* etablierten eine Methode zur Kultivierung von menschlichen Keratinozyten. Sie nutzten - ebenso wie zahlreiche andere Autoren (*BERNERD und ASSELINEAU, 1997; GIBBS<sup>1</sup> et al., 1997; GIBBS<sup>2</sup> et al., 1997; MICHEL et al., 1997; ORIDATE et al., 1996; SATO<sup>1</sup> et al., 1996; SATO<sup>2</sup> et al., 1996; SERMADIRAS et al., 1997; STANWELL et al., 1996; van der VLEUTEN<sup>1</sup>, 1996; van der VLEUTEN<sup>2</sup>, 1996; van der VLEUTEN<sup>3</sup>, 1996; Van RUISSEN, 1996*) - die Bestimmung der TGase-Aktivität, um das Wachstumsverhalten und die Differenzierung ihrer Kulturzellen zu beurteilen.

Die Rolle epidermaler Transglutaminasen bei der Heilung von Hautverletzungen untersuchten *BOWNESS et al. (1992)*. Sie wiesen nach, dass in regenerierenden Hautzellen der Gehalt an TG<sub>E</sub> und ihre proteinvernetzende Aktivität in den ersten drei Tagen nach Verletzung signifikant höher ist als in nicht alterierter Haut. *RAGHUNATH et al. (1996)* bestimmten die TGase-Aktivität in Biopsien von transplantierte Haut, welche Kindern, die bei einem Unfall schwere Brandverletzungen erlitten hatten, zwischen 5 Tagen und 17 Monaten nach Hauttransplantationen entnommen worden waren. Sie konnten nachweisen, dass TGase-Aktivität im Verlauf der Heilung im Bereich der Epidermis, des dermalen Bindegewebes und der Basalmembranzone (dermo-epidermale Hautschichten) zunahm. Die Transaminierung der Basalmembran war nach 4-5 Monaten beendet.

### **1.2.3. Haarfollikel-TGase**

Haarfollikel-Transglutaminase kann in der inneren Haarwurzelscheide nachgewiesen werden. Sie vernetzt Keratin zu sehr stabilen Bündeln (*CHUNG und FOLK, 1972*). Durch Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass diese Keratinisierung hauptsächlich in der Huxley-Scheide erfolgt. Dabei fand man keine immunologische Kreuzreaktivität mit der epidermalen TGase (TG<sub>E</sub>) (*BUXMAN und WUEPPER, 1978*).

*MARTINET et al. (1988)* untersuchten Extrakte von Haarfollikeln neugeborener Mäuse und wiesen zwei Transglutaminaseformen nach, die beide ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa hatten. Die beiden Formen konnten durch Ionenaustauschchromatographie getrennt werden. Dabei ergaben sich Hinweise, dass eine TGase identisch mit der Haut-Isoform war, während die andere offensichtlich eine eigenständige, haarfollikelspezifische Form darstellt, die in den Epithelzellen nicht nachzuweisen ist. *CHUNG et al. (1988)* bestätigten im gleichen Jahr die Existenz einer spezifischen Haarfollikel-TGase mit einem Molekulargewicht von 50 kDa.

*HARDING und ROGERS* hatten 1972 berichtet, die Transglutaminase in den Haarfollikeln sei unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Nachdem *KUMAZAWA et al. (1997)* durch Gelfiltration zwei verschiedene Transglutaminasen aus Haarfollikeln von Schafen isolieren konnten, erwiesen sich jedoch beide als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.

In einer immunhistochemischen Untersuchung wiesen *TAMADA et al. (1995)* die menschliche TGase in den einzelnen Schichten des Haarfollikels nach. Sie interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, dass das Vorkommen des Enzyms eng mit der terminalen Keratinisierung des Haarfollikels assoziiert ist. Dieser Prozess wurde von *TARCSA et al. (1997)* noch detaillierter *in vitro* untersucht. Sie postulierten, dass Trichohyalin, ein Strukturprotein, das in der inneren Wurzelscheide des Haarbalges und in geringerem Maße von anderen spezialisierten Epithelien gebildet wird, zunächst durch eine Peptidyl-Arginin-Deiminase denaturiert wird. Trichohyalin würde dadurch so verändert, dass es durch die Transglutaminase zu einer rigiden Struktur modifiziert werden könnte. Das vernetzte Trichohyalin dient dann wahrscheinlich als Keratin-Matrixprotein und/oder wird zu einem Bestandteil der Zellmembran. *ROGERS et al. (1997)* isolierten erstmals die genannte Peptidyl-Arginin-Deiminase aus den Haarfollikeln von adulten Schafen und unterstützten damit das oben beschriebene Modell.

Die Veränderungen in den Haarfollikeln beim Übergang aus der Wachstumsphase in die Involutionsphase sind weitgehend unbekannt. Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen u.a. Transglutaminase, Keratin, Trichohyalin und Desmoglein fanden *COMMO und BERNARD (1997)*, dass sich die Differenzierung bei menschlichen Haarfollikeln vor allem in der inneren Haarwurzelscheide abspielt.

*HANSEN et al. (1997)* untersuchten die Rolle des Rezeptors für den "epithelial growth factor" in Haarfollikeln von Mäusen, die eine angeborene Störung bei der Bildung dieses Rezeptors hatten. Sie bewerteten die Haarfollikelreifung über den Nachweis von Transglutaminase und Keratin und fanden, dass der Rezeptormangel zu einer signifikant verminderten Differenzierung der Haarfollikel führt.

Bei verschiedenen Haaranomalien zeigten die Haare eine erhöhte Fragilität. Biochemische Ursachen dafür waren lange Zeit nicht bekannt. *RICE et al. (1996)* vermuteten als erste, dass eine defekte Quervernetzung der relevanten Proteine in den Haarscheidenzellen vorliegen könnte. Da dabei eine Transglutaminase beteiligt sein könnte, wurden die Haare von Patienten mit autosomal rezessiver, lamellärer Ichthyosis speziell auf die Aktivität dieses Enzyms hin untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Transglutaminase eine besondere Rolle bei der Reifung der Cuticula hat, für die Stabilisierung der Zellgrenzen des Kortex jedoch nicht unbedingt notwendig ist. Die Autoren wiesen außerdem defekte Querverbindungen in Cuticula-Zellen auch bei Trichothiodystrophie und Monilethrix nach.



Einen umfangreichen Überblick über die Keratinisierung der Haare bei Gesunden und Kranken veröffentlichten *JONES und STEINERT (1996)*. Sie beschrieben dabei auch Untersuchungen zu DNA- und Gensequenzen, die epidermales Keratin oder Transglutaminase kodieren. Dabei zeigte sich, dass bestimmte Mutationen zur Entstehung von Krankheiten führen, die zur Gruppe der Ichtyosen gehören. Weiterhin ergaben sich Hinweise, dass auch im Fall von Monilethrix Mutationen der entsprechenden Gene beteiligt sein könnten.

#### **1.2.4. Zytoplasmatische und membranständige Gewebe - TGase (TG<sub>C</sub>)**

Zytoplasmatische und membranständige Gewebe-Transglutaminasen sind biochemisch und immunhistochemisch in nahezu allen Organen nachzuweisen (*THOMAZY und FÉSUS, 1989; KNIGHT<sup>1</sup> et al., 1990; KNIGHT<sup>2</sup> et al., 1990*). Alle Gewebe-TGasen besitzen zwei verschiedene enzymatische Aktivitäten: einmal die normale Fähigkeit zur Quervernetzung, andererseits eine Mg<sup>2+</sup>-abhängige GTPase-Aktivität (*LEE et al., 1989; LAI et al., 1996 & 1998*). Für diese beiden Funktionen liegen auch zwei unabhängige aktive Zentren auf dem TG<sub>C</sub>-Molekül vor (*LEE et al., 1993*). Das Zentrum für die Bindung eines einzelnen GTP-Moleküls liegt im Bereich der N-terminalen Aminosäuren 1-185, eine Deletion der C-terminalen 149 Aminosäuren in der normalen TG<sub>C</sub>-Sequenz führt zu einer deutlichen Erhöhung der GTP-Hydrolyseaktivität auf den 34fachen Wert des intakten Enzyms (*SINGH et al., 1995; LAI et al., 1996*).

Unter den normalen physiologischen Konzentrationen an GTP (millimolar) ist die TG<sub>C</sub> in ihrer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Quervernetzungs-Aktivität gehemmt (*BERGAMINI, 1988*). Hier ist die gewebständige TGase als G<sub>αh</sub> Untereinheit Teil eines membranständigen G-Proteins, das eine wesentliche Rolle bei der Auslösung einer intrazellulären Signaltransduktion über Phospholipase C und Phosphoinositol spielt (*IM et al., 1997*). Steigt als deren Folge jedoch auch die zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (normal: 10<sup>-7</sup> M) durch Freisetzung des Kations aus intrazellulären Speichern bei gleichzeitigem Absinken der GTP-Menge an, so wird die TGase-Aktivität dominant. Das Enzym kann nun intrazelluläre und nach seinem Export (über einen völlig unbekanntem Mechanismus) auch extrazelluläre Proteine verknüpfen. Eine derartige Funktionsumschaltung könnte durchaus auch zu Beginn einer Apoptose (s.u.) eintreten.

Bisher am besten wurde die Gewebe-TGase aus der Meerschweinchenleber charakterisiert (*CONNELLAN et al., 1971; BIRCKBICHLER et al., 1976; SLIFE et al., 1986*). Sie liegt überwiegend gelöst im Zytoplasma und nur zu einem kleinen Teil (etwa 17%) an die Plasmamembran gebunden (*SLIFE et al., 1985*) vor.

*SLIFE et al. (1987)* untersuchten die TGasen in Rattenhepatozyten. Sie fanden ebenfalls eine gelöste Enzymform sowie ein peripheres Membranprotein. Inkubation von Hepatozytenmembranen in 0,1 mM Tris-Puffer bei 4°C führte zu zeit- und temperaturabhängiger Abnahme der TGase-Aktivität. Nach 5 Stunden betrug sie nur

noch 50% des Ausgangswertes. Zusatz von 50 mM Dithiothreitol (DTT) und  $\text{Ca}^{2+}$  verhinderte diesen Aktivitätsverlust. Eine Aufbewahrung bei 37°C resultierte in einer deutlich schnelleren Aktivitätsabnahme, die durch die Zugabe von DTT und  $\text{Ca}^{2+}$  nur geringfügig, durch Addition von 50% Glycerol jedoch vollständig verhindert werden konnte.

Weitere Versuche der o.g. Autoren ergaben, dass die Membran-TGase nach längerer Aufbewahrung in Tris-Puffer, dem DTT,  $\text{Ca}^{2+}$  und Glycerol bei 37 °C zugesetzt worden waren, immer mehr solubilisiert wurde. Zeitabhängig konnten so etwa 50-90% der TGase-Aktivität in eine gelöste Form überführt werden. Eine Entfernung des Glycerols durch anschließende Dialyse führte nur in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einem Aktivitätsverlust. Die Autoren schlossen, dass die membranständige TGase nicht in die Plasmamembran integriert, sondern als eigentlich lösliches Protein *in vitro* überwiegend an die Membran assoziiert ist. Es liegt somit nahe, dass es sich bei der membranständigen und der zytoplasmatischen TGase um dasselbe Protein handelt, das jedoch je nachdem, welche äußere Bedingung vorliegt, seine Lokalisation zu ändern vermag. Die Verlagerung ins Zytoplasma könnte auch in Zusammenhang stehen mit der oben beschriebenen Funktionsumschaltung von der GTPase zur TGase.

Auch *KNIGHT<sup>2</sup> und Mitarbeiter (1990)* identifizierten in der Rattenleber eine lösliche und eine membrangebundene Form. Die durch SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte betragen für beide Formen etwa 87 kDa. Immunhistochemische Untersuchungen wiesen auch hier auf eine enge immunologische Verwandtschaft der beiden Formen hin.

Eine weitere Studie zur intrazellulären Verteilung der TGase in Rattenleber führten *REMYNGTON und RUSSEL (1982)* durch. Sie fanden nach Zellfraktionierung, dass die TGase-Aktivität sowohl im Zytoplasma als auch der Kernfraktion lokalisiert werden konnte. Dabei war in den Kernen die höchste spezifische Aktivität nachzuweisen. Dies bestätigt die im Abschnitt 1.1 beschriebene, nukleäre Lokalisation von TGase-Substraten (*EL ALAOUI et al., 1991; ROCH et al., 1991; BALLESTAR et al., 1996; LESORT et al., 1998; PIREDDA et al., 1999*). Die Autoren schließen daraus, dass die von ihnen in der Leber nachgewiesene TGase eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und bei Differenzierungsprozessen spielen könnte.

In Erythrozyten ist eine TGase vorhanden, die große molekulare Ähnlichkeit mit dem Enzym im Leberzytoplasma hat. *BRENNER und WOLD (1978)* isolierten diese TGase aus menschlichen Erythrozyten und bestimmten ihr Molekulargewicht durch Gelfiltration bzw. SDS-PAGE mit 82 kDa  $\pm$  5 kDa. Der Wert wurde zunächst durch *LEE et al. (1986)* nach SDS-PAGE bestätigt. *SIGNORINI et al. (1989)* fanden dagegen eine etwas größere Molekularmasse von etwa 92 kDa.

*FÉSUS und ARATO (1986)* und *THOMAZY und FÉSUS (1989)* stellten einen monospezifischen Kaninchen-Antikörper gegen menschliche Erythrozyten-TGase her.

Sie wiesen damit immunologisch kreuzreaktive Antigene in T- und B-Lymphozyten, malignen lymphoiden Zellen, Monozyten, Endothelien und glatten Muskelzellen nach. Sie fanden außerdem, dass manche Gewebe (Mesangiumzellen, renomedulläre Interstitiumzellen, subkapsuläre Zellen des Thymus und perikryptale Fibroblasten des Kolons) permanent Gewebe-TGase produzieren, während in anderen Geweben (z.B. im Epithel der weiblichen Brust) die Gewebe-TGase-Produktion entweder durch externe Stimuli induziert werden kann oder nur zu einer definierten Zeit während der Gewebedifferenzierung auftritt (z.B. bei der Entwicklung von Nephronen in der Niere oder von Enterozyten im Dünndarm).

Bei der Maus erhöht sich die spezifische Aktivität der Gewebe-TGase während der Reifung gesunder Gehirnzellen um das zwei- bis dreifache (MACCIONI und SEEDS, 1986).

ZHANG *et al.* (1998) untersuchten die Aktivität und den Gehalt von Transglutaminase in menschlichen Neuroblastomzellen und fanden dabei heraus, dass GTP und  $\text{Ca}^{2+}$  regulierend auf die jeweilige Aktivität (s.o.) wirken. Außerdem sollen Retinoide signifikant die Menge und die *in vitro*-, nicht jedoch die *in vivo*-Aktivität dieser TGase erhöhen. Während der Differenzierung der neuronalen Zellen stieg die Aktivität sogar bis auf das Zehnfache des Ausgangswertes an.

Auch im Pankreashomogenat wurde eine Gewebe-TGase nachgewiesen (GOMIS *et al.*, 1986). *In vivo* induzierte ein erhöhter Glucosespiegel einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was wie oben schon beschrieben auch zu einer deutlichen Steigerung der Quervernetzungs-Aktivität führte.

Für die gewebständige TGase im Trachealepithel des Kaninchens wurde ein Molekulargewicht von etwa 92 kDa bestimmt (JETTEN und SHIRLEY, 1986). Eines ihrer wichtigsten Substrate ist der Proteinase-Inhibitor Elafin, der spezifisch Elastase und Proteinase 3 hemmt (NARA *et al.*, 1994). Ein wichtiges Prosegment in Elafin, als "Cementoin" bezeichnet, hat hohe Sequenzhomologie zur repetitiven Sequenz in SVS II, dem wichtigsten Substrat der sekretorischen TGase in der Ratten-Koagulationsdrüse (siehe Abschnitt 1.3.1.). Cementoin-Elafin kann durch TGase an Proteine der Extrazellulärmatrix wie Laminin vernetzt werden und schützt diese dann vor proteolytischer Verdauung. Neben der Trachea ist der Inhibitor auch in der Haut und in geringerer Menge im Magen und im Dünndarm nachzuweisen.

In der Rattenlunge wurde ebenfalls eine gewebständige TGase nachgewiesen. Sie ist dort hauptsächlich partikulär (an Organellmembranen gebunden) und kann in Gegenwart von Sulfhydryl-Reagentien aktiviert und extrahiert werden (COCUZZI und CHUNG, 1986).

1991 beschrieben *SEITZ*<sup>2</sup> und Mitarbeiter die Isolierung einer Gewebe-TGase aus dem Rattenhoden. Das GTP-bindende Protein hat ein Molekulargewicht von 82 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 5,25. Nach Herstellung eines polyklonalen AK konnte das Protein durch Immunhistochemie spezifisch in den Peritubulärzellen nachgewiesen werden.

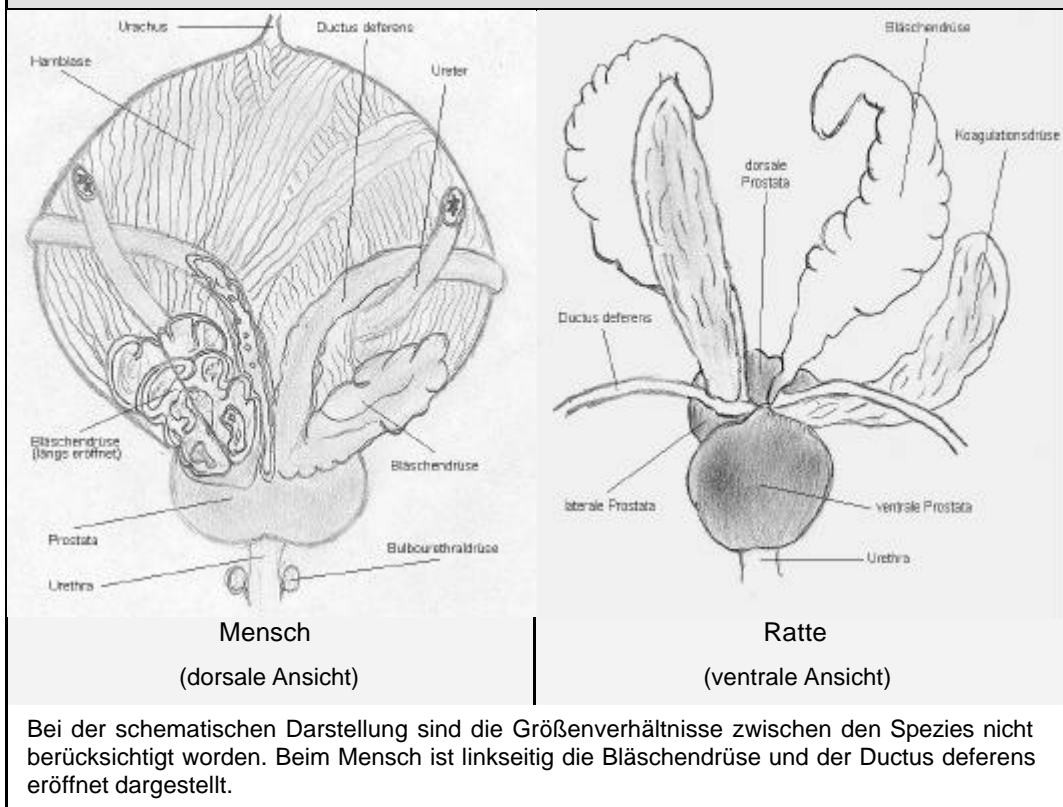
Zahlreiche Veröffentlichungen in den letzten Jahren sprechen dafür, dass die TG<sub>C</sub> sehr vielfältige physiologische Aufgaben übernimmt. Intrazellulär ist dies vor allem die Beteiligung als G-Protein an der intrazellulären Signaltransduktion (s.o.). Seit einigen Jahren ist auch bekannt, dass die Gewebe-TGase mit Einsetzen des programmierten Zelltodes (Apoptose) stark hochreguliert wird (gesteigerte Expression und Aktivität) und dann Zellkomponenten vor allem mit dem Aktinzytoskelett quervernetzt (*FÉSUS et al., 1987; FÉSUS et al., 1991; CUMMINGS, 1996*). Dies soll ein Verlust an diesen Komponenten vor der Phagozytose der sterbenden Zellen verhindern. Die strukturelle Integrität der umgebenden Zellen wird somit garantiert, aggressive Reaktionen wie Entzündungen unterbleiben (*PIREDDA et al., 1997*).

Einige Daten sprechen dafür, dass die TG<sub>C</sub> während der Bildung sehr vieler Gewebe und Organe die Quervernetzung von Komponenten der extrazellulären Matrix (*THOMAZY und FÉSUS, 1989; AESCHLIMANN et al., 1995*) sowie die feste Adhäsion von Zellen an diese fördert (*GRINNEL et al., 1980*). Dies ist angesichts der Tatsache, dass es sich eigentlich um ein intrazelluläres Protein handelt, doch sehr erstaunlich - man muss deshalb auch einen Export der TG<sub>C</sub> postulieren, dessen genauer Mechanismus jedoch noch völlig unbekannt ist. Als Substrate wurden dabei u.a. Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen II, V und XI, Osteonectin und Osteopontin identifiziert. Andere Gewebe-TGasen sollen Einfluss auf die Regeneration von Zellen, die Reparatur von geschädigten Gewebeteilen (*UPCHURCH et al., 1991*) sowie auf das Wachstum von Zellen (*KOJIMA et al., 1993*) haben. So wurde z.B. ein Einfluss auf die Wundheilung (*UPCHURCH et al., 1991; RAGUNATH et al., 1996*) sowie auf axonales Wachstum und Regeneration (*EITAN und SCHWARTZ, 1993; EITAN et al., 1994*) beschrieben. Auch bei pathologischen Prozessen wie der Bildung des Katarakts (*LORAND und KONRAD, 1984*), von Fibrosen in Leber (*MIRZA et al., 1997*) und Niere (*JOHNSON et al., 1997*), Zöliakie (*DIETERICH et al., 1997*) und neurodegenerativen Prozessen (z.B. Alzheimer Krankheit und Chorea Huntington) (*COOPER et al., 1999*) soll die TG<sub>C</sub> beteiligt sein.

### **1.2.5. Sekretorische TGasen in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen**

Historisch gesehen wurde das erste Protein mit TGase-Aktivität in der Prostata von männlichen Nagern entdeckt. *CAMUS und CLAY* beschrieben bereits 1896, dass ein Protein im Sekret der anterioren Prostata (besser: Koagulationsdrüse) das Sekret der Nagerbläschendrüsen koaguliert. Sie nannten es deshalb Vesiculase (s. Abb. 2).

**Abb. 2: Vergleichende Anatomie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen von Mensch und Ratte**



### 1.2.5.1. Koagulationsdrüse und dorsale Prostata von Nagern

1974 schilderten *WING und Mitarbeiter* in einem Abstract ihre Versuche zur Isolierung der sekretorischen TGase aus der Meerschweinchen-Koagulationsdrüse. *WING* (1977) charakterisierte die Isoform sehr ausführlich im Rahmen seiner Dissertation „Guinea Pig Coagulating Gland Transamidase“ an der Northwestern University (Evanston, Illinois); ein Exemplar seiner Schrift wurde unserer Arbeitsgruppe von seinem Betreuer, Prof. Lorand, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Enzym hat nativ ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Es besteht aus zwei identischen Untereinheiten von  $70 \pm 10$  kDa, besitzt ein schwach saures pH-Optimum von 6,4 und kann im Gegensatz zur Gewebe- und zur Faktor XIII-Isoform durch kleine organische Substanzen wie z.B. Benzamidin in seiner Aktivität gesteigert werden.

Die TGase im Sekret der Ratten-Koagulationsdrüse wurde zum ersten Mal von *WILSON et al. (1979)* und *WILLIAMS-ASHMAN et al. (1980)* angereichert und als Enzym charakterisiert, das die Koagulation von Bläschendrüseneinheiten katalysiert (s.u.).

*SEITZ et al. (1990, 1991<sup>1</sup>, 1991<sup>2</sup>)* reinigten die sekretorische TGase aus dem Sekret der Ratten-Koagulationsdrüse (RCG-TGase) zur vollständigen Homogenität. Das Molekulargewicht beträgt nach SDS-PAGE bzw. Gelfiltration 65 kDa, der isoelektrische Punkt liegt bei 8,7. Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass zwei identische

Untereinheiten *in vivo* ein Dimer bilden können (WILSON und FRENCH, 1980). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzymaktivität ist im Gegensatz zu der Gewebe-TGase nicht durch GTP hemmbar (SEITZ *et al.*, 1991<sup>2</sup>). Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation ergaben, dass die sekretorische TGase glycosyliert und außerdem am C-terminalen Ende mit einem GPI-Anker substituiert ist (SEITZ *et al.*, 1991<sup>2</sup>). Dies wurde 1996 durch ESPOSITO und Mitarbeiter bestätigt: Sie verifizierten nicht nur den Lipidanker, sondern auch die Modifikation der Aminosäuren Asn-408 und Asn-488 mit Mannosyl-reichen Glycanresten. Außerdem zeigten dieselben Autoren, dass die sekretorische TGase *in vitro* durch SDS oder Phosphatidic Acids stark aktiviert wird, nicht dagegen durch positiv geladene oder neutrale Detergentien (ESPOSITO *et al.*, 1999).

Durch Immunisierung von Kaninchen mit dem gereinigten Antigen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein polyklonaler Antikörper hergestellt. Er wies eine eindeutige Kreuzreaktivität mit der TGase aus der dorsalen Prostata (DP1-Protein) auf, die wiederum 1992 von HO *et al.* kloniert und sequenziert wurde. HO zeigte, dass die Isoform spezifisch in der dorsalen Prostata und androgenabhängig exprimiert wird, nicht dagegen in der ventralen Prostata oder anderen Organen der Ratte. Ein Screening mit dem Antikörper bestätigte dies insofern, dass keine immunologische Verwandtschaft mit der Gewebe-TGase, der Erythrozyten-TGase oder dem Faktor XIII nachzuweisen war. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die Primärsequenz der sekretorischen TGase relativ große Unterschiede zu der der anderen Isoformen aufweist (HO *et al.*, 1992). Nur zwischen dem Enzym der Koagulationsdrüse und DP1 besteht eine Sequenzhomologie von mindestens 85% (ESPOSITO *et al.*, 1996). In der Immunoprintanalyse reagierte neben DP1 noch eine weitere Isoform aus den Schwann-Zellen von peripheren Nerven (z.B. des N. ischiadicus) sehr stark mit dem Antikörper gegen die sekretorische TGase. Nach Extraktion zeigte sich, dass auch das Enzym in den Gliazellen nicht durch GTP gehemmt werden kann. (S. Hüntemann, persönliche Mitteilung). Eine immunologische Kreuzreaktivität besteht auch mit einer TGase, die von stimulierten Makrophagen sezerniert wird (AUMÜLLER *et al.*, 1987; GALDIERO *et al.*, 1989).

### **Apokrine Sekretion der TGase**

Ein wichtiger Befund bei der genauen Analyse der mRNA-Sequenz war jedoch, dass die mRNA der Koagulationsdrüsen-TGase der Ratte keine Kodierung für ein N-terminales Signalpeptid besitzt. Hinzu kommt, dass ihre N-terminale Aminosäure blockiert, d.h. wahrscheinlich acyliert ist. Somit kann das an den Ribosomen neu synthetisierte Protein nicht in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert werden. Dem sekretorischen Enzym ist folglich schon zu Beginn der Weg in die klassische merokrine Exportroute über ER, Golgi-Apparat und Sekretgranula versperrt. SEITZ *et al.* (1990) sowie GROOS *et al.* (1999) konnten in immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass die Koagulationsdrüsen-TGase intrazellulär ausschließlich im zytoplasmatischen Kompartiment vorliegt und zum Export in Protrusionen (Aposomen) transloziert wird, die

sich von der apikalen Zellmembran abschnüren. Sie wird also nach dem apokrinen Modus sezerniert - ein Mechanismus, der bisher nur für die Milchdrüse, verschiedene Duftdrüsen in der Haut (SCHIEFFERDECKER, 1917; KUROSUMI *et al.*, 1984), die Zeruminaldrüsen im Ohr (TESTA-RIVA und PUXEDDU, 1980) sowie den Plexus choroideus (GUDEMAN *et al.*, 1989) bekannt war.

Es hatte zwar schon früher Hinweise darauf gegeben, dass die Koagulationsdrüse und die dorsale Prostata Sekretfaktoren über apokrine Blebs abgeben können, die im übrigen keine Zellorganellen enthalten (AUMÜLLER und ADLER, 1979; HAWKINS und GEUZE, 1977; CHOW und PANG, 1989). Die TGase war aber das erste Protein, für das der alternative Exportweg eindeutig belegt werden konnte. 1994 bestätigten dann STEINHOFF und Mitarbeiter durch Immunogoldfärbung und morphometrische Auswertung auch auf ultrastruktureller Ebene, dass die sekretorische TGase aus dem zytoplasmatischen Kompartiment direkt in die Aposomen transloziert wird, wobei der Endomembranraum (ER, Golgi-Apparat und Sekretgranula) vollständig ausgespart bleibt. Außerdem zeigten sie, dass die Bildung der Blasen streng androgenabhängig ist. Androgenentzug (z.B. durch Kastration) und/oder Substitution mit Estradiol führten bei drastisch reduzierter TGase-Expression zum vollständigen Verlust der apokrinen Blasen. Nach etwas mehr als einer Woche wiesen die androgendefizienten Zellen darüber hinaus eindeutige Zeichen von Apoptose auf.

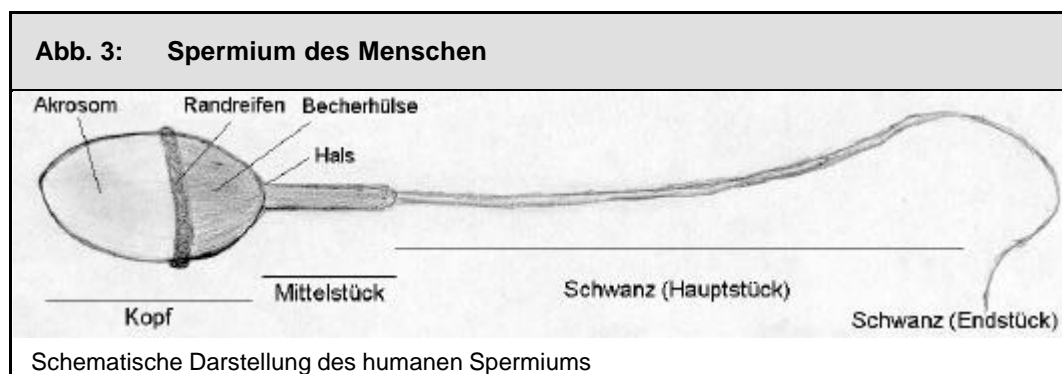
#### **1.2.5.2. TGasen in den menschlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen und im Seminalplasma**

Im Jahr 1980 extrahierten BURES und Mitarbeiter eine Transglutaminase aus der menschlichen Adenokarzinom-Zelllinie DU145 mit Hilfe von Triton X-100. Sie zeigten, dass das Enzym nicht als Zymogen existiert und ein apparentes Molekulargewicht von etwa  $72 \pm 4$  kDa besitzt.

PORTA *et al.* (1986) wiesen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transglutaminase mit etwa 40 kDa im menschlichen Seminalplasma nach. Ejakulatproben verschiedener Spender zeigten große Variationen in der Enzymaktivität. Wurden dagegen verschiedene Ejakulatproben eines einzelnen Spender miteinander verglichen, so schwankten die Werte um weniger als 30 %. Die Autoren fanden die TGase-Aktivität sowohl frei im Seminalplasma als auch gebunden an die Spermien vor. Außerdem beobachteten sie, dass die Messwerte deutlich niedriger lagen, wenn Spermien und Plasma erst längere Zeit nach der Ejakulation getrennt worden waren. Dabei nahm die Aktivität der gebundenen TGase (50% Reduktion nach 2 h und 90% nach 4 h) deutlich schneller ab als die der freien Form (20% nach 1 h und 50% nach 6 h). Die Autoren postulierten, dass die seminale Transglutaminase eine wichtige Rolle bei der Herabsetzung der Spermienantigenität und bei der weiteren Reifung zu einer differenzierten, motilen und fertilen Keimzelle spielen müsse (siehe auch 1.3.3). Dies sollte ähnlich wie bei der Ratte (PAONESSA *et al.*, 1984) durch kovalente Bindung der Polyamine Spermin und Spermidin an Membranproteine der

Samenzellen erfolgen. Sie konnten aber nicht genau definieren, in welchem posttestikulären Organ die von ihnen identifizierte TGase gebildet wird.

*ABLIN und WHYARD (1991)* wiesen immunhistochemisch nach, dass im Bereich des Halses und des proximalen Schwanzes von normalen menschlichen Spermien Transglutaminase gebunden ist (s. Abb. 3). Das an die Spermien gebundene Enzym reagierte sowohl mit Antikörpern gegen menschliche Seminalplasma-TGase als auch mit einem Antiserum gegen Gewebe-TGase aus Rattenleber. Dagegen war keine Kreuzreaktivität mit Faktor XIII vorhanden. Die seminale TGase wurde deshalb der Gruppe der Gewebe-ständigen Formen zugeordnet.



In einer 1997 erschienenen Arbeit charakterisierten die gleichen Autoren (*WHYARD und ABLIN*) die seminale Transglutaminase auch molekular genauer. Sie bestimmten nach SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 83 kDa. Nach Herstellung eines polyklonalen Antikörpers ergab die Immunfluoreszenzfärbung von Schnitten menschlicher Prostata eine Reaktion sowohl in epithelialen als auch in stromalen Kompartimenten. Dabei reagierte auch das Drüsenepithel und das luminalen Sekret. Aus der Arbeit geht jedoch nicht hervor, ob der verwendete Antikörper auch mit humaner Gewebe-TGase aus Leber oder Erythrozyten reagiert. Außerdem wurde auch nicht untersucht, ob die von ihnen nachgewiesene TGase-Aktivität durch für die Gewebe-TGase spezifische Hemmstoffe wie z.B. GTP gehemmt werden kann.

*FRIEDRICHS und Mitarbeiter* hatten schon 1995 gezeigt, dass ein spezifischer Antikörper gegen die menschliche Erythrozyten-Gewebe-TGase sowohl mit Basalzellen im Drüsenepithel als auch mit stromalen Komponenten (Fibroblasten, Endothelzellen) der normalen Prostata reagiert. Bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) wurden weitere, nicht genau zu differenzierende Stromazellen gefärbt. In dedifferenzierten Karzinomen (PCa) wie auch in den meisten untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien (z.B. LNCaP) war weder Immunreaktivität noch enzymatische Aktivität nachzuweisen. Einzige Ausnahme waren die PC-3-Zellen, in denen eine hohe TGase-Aktivität wie auch eine starke Immunreaktivität belegt werden konnte.

1994 wurde zum ersten Mal von *GRANT et al.* die Primärsequenz einer cDNA publiziert, die für eine TGase in der menschlichen Prostata kodiert. Die daraus abgeleitete



Peptidsequenz ist zu 51% identisch mit der aus der Rattenprostata. 1996 screenen *DUBBINK et al.* eine cDNA-Bibliothek der menschlichen Prostata mit einer Sonde, die der Sequenz des aktiven Zentrums der Gewebe-TGase entsprach. Sie klonierten und charakterisierten die cDNA einer gewebespezifischen Prostata-TGase (hTG<sub>P</sub>), deren Expression durch Androgene reguliert wird. Sie kodiert für ein Protein mit 684 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 77 kDa. Nach *in-vitro*-Transkription und Translation erhielten sie ein Protein, dessen Molekulargewicht von 77 kDa durch SDS-PAGE bestätigt werden konnte. Das für die menschliche Prostata-TGase kodierende Gen (*TGM4*) mit 35 kb Länge und 13 Exons und 12 Introns (*DUBBINK et al., 1998*) wurde auf dem Chromosom 3 lokalisiert. Nach Sequenzvergleich mit dem Programm GAP (GCG-Rechner, DKFZ Heidelberg) hat die Isoform 56% Ähnlichkeit und 34,7% Identität mit der menschlichen Gewebe-Form.

Bei der Northern blot-Analyse wurde eine homologe mRNA auch in der vor kurzem erst etablierten humanen PCa-Zelllinie PC346C entdeckt, nicht dagegen in den bekannteren Linien LNCaP und PC-3 (*DUBBINK et al., 1996*).

### **1.3. Funktionen der seminalen Transglutaminasen**

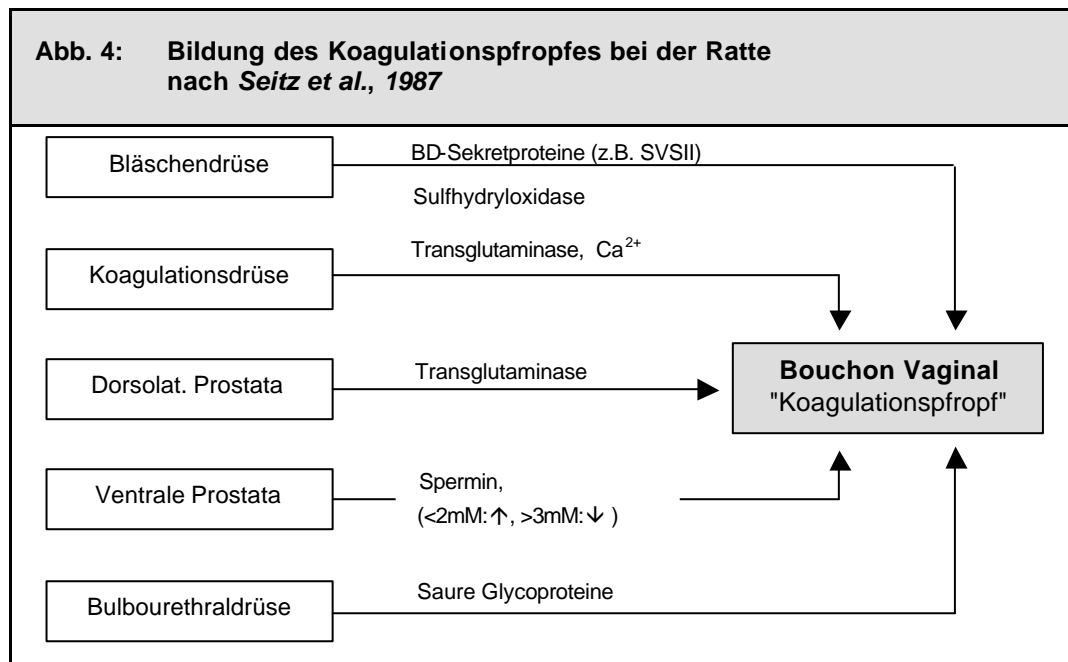
#### **1.3.1. Samenkoagulation bei Nagern**

Das Ejakulat von Ratten und Meerschweinchen wird nach dem Koitus durch einen intravaginalen Koagulationsprozess zu einem stabilen Gel, das für viele Stunden oder sogar Tage dort verbleibt. Die meisten Spermien sind fest in diesem Koagulat (Bouchon vaginal, Koagulationspfropf, Kopulationspfropf) eingeschlossen, nur wenige liegen außerhalb und sind frei beweglich (*GOTTERER et al., 1955; NOTIDES und WILLIAMS-ASHMAN, 1967*).

Koagulationsdrüse und dorsolaterale Prostata dieser Nager produzieren und sezernieren dazu die oben beschriebene TGase, die wiederum durch die Bläschendrüse sezernierte Proteine (SVS) miteinander quervernetzt. Auch die anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen steuern Faktoren bei, die die Bildung des Kopulationspfropfs unterstützen (siehe Abb. 4). So wird z.B. für die Polyamine Spermin und Spermidin, die von der ventralen Prostata sezerniert werden, eine regulierende Funktion bei der Samenkoagulation vermutet (*ROMIJN, 1990*).

Die biologische Funktion des Pfropfes besteht zunächst darin, dass die in ihm fixierten Spermien eine weitere Ausreifung und Aktivierung durch Sekretfaktoren aus den verschiedenen Drüsen durchmachen können. Gleichzeitig wird auch ein Auslaufen des Samens aus der Vagina nahezu unmöglich gemacht. Weiterhin stellt das stabile Polymer einen Schutz gegen das saure Vaginalmilieu sowie die darin vorhandenen Abwehrsysteme (Antikörper, Makrophagen etc.) dar. Schließlich bildet der Pfropf eine biomechanische Sperre ("chemischer Keuschheitsgürtel") gegen eine weitere

Befruchtung durch ein konkurrierendes Männchen (*WILLIAMS-ASHMAN et al., 1972*; *WILLIAMS-ASHMAN et al., 1977*; *WILLIAMS-ASHMAN und CANNELLAKIS, 1979*; *WILLIAMS-ASHMAN et al., 1980*; *WILLIAMS-ASHMAN, 1984*).



Der Kopulationspfropf kann auch artifiziell durch Mischung der isolierten, relevanten Faktoren erzeugt werden. *ZANEVELD et al. (1974)* wiesen durch Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop nach, dass sich ein derartiger *in vitro* gebildeter Pfropf nur wenig von dem natürlichen unterscheidet.

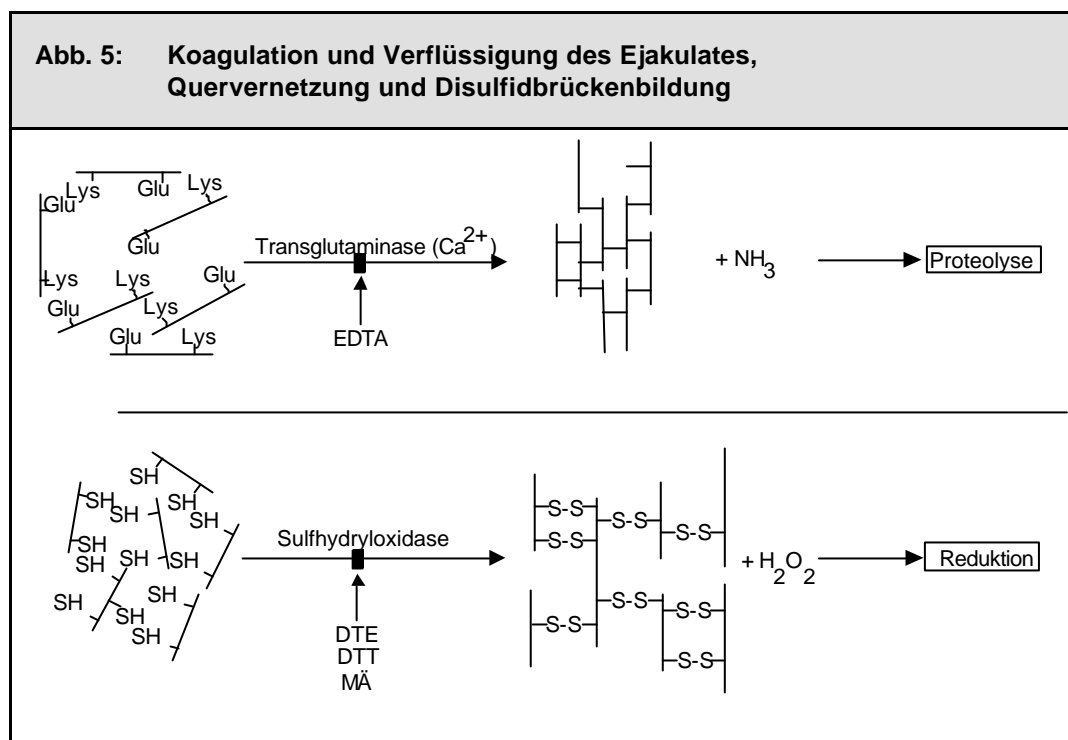
Aus dem Sekret der Rattenbläschendrüse wurden mehrere Proteine isoliert (Seminal Vesicle Secretory Proteins, SVS), die für die Bildung des Koagulationspfropfes essentiell sind (*SHIVAJI et al., 1990*). Das wichtigste Monomerprotein und damit Substrat der seminalen TGase ist dabei das SVS II, ein androgenabhängig gebildetes Glycoprotein (*WILLIAMS-ASHMAN et al., 1980*; *AUMÜLLER und SEITZ, 1986*; *WAGNER und KISTLER, 1987*; *AUMÜLLER und SEITZ, 1990*). Es hat nach SDS-PAGE ein Molekulargewicht von ca. 48 kDa und einen sehr basischen pI von 10,5. *SEITZ et al.* konnten 1992 zeigen, dass das Protein *in vitro* an Actin bindet und die Aggregation von monomerem G-Actin zu polymerem F-Actin fördert. Es ist somit ein sogenanntes Capping-Protein. Ein erstaunlicher Befund war außerdem, dass SVS II mit Antikörpern gegen N-terminale Sequenzabschnitte von Actin kreuzreagiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in seiner Primärstruktur (*HARRIS et al., 1990*) in einer Sequenz von 14 Aminosäuren, die in leichter Variation insgesamt 13 mal in der SVS-II-Struktur vorkommen, ein Epitop enthalten ist, das eine hohe Homologie zu den Aminosäuren 14-20 in Actin aufweist. SVS II ist ein nahezu ideales TGase-Substrat, da die Glu- und Lys-Reste seiner Primärstruktur bei antiparalleler Lage der Proteinketten wie Zähne eines Reißverschlusses zueinander passen.

Die Verflüssigung des Samenkoagels erfolgt bei der Ratte und dem Meerschweinchen erst nach zwei Tagen (SEITZ *et al.*, 1987). Man vermutet, dass im Ejakulat und auch im Vaginalmilieu enthaltene Proteasen dafür verantwortlich sind.

Bei der Maus werden vor allem die beiden Bläschendrüsene Proteine Semenoclotin (38 kDa) und ein 95 kDa-Protein durch die entsprechende TGase zur Bildung des Kopulationspfropfs quervernetzt (LUNDWALL *et al.*, 1997). Semenoclotin hat große molekulare Verwandtschaft zu menschlichem Semenogelin und zu Ratten-SVS II: wie letzteres ist es ein sehr gutes TGase-Substrat, bei neutralem pH-Wert ist es stark geladen und es hat einen basischen pI von 10,68 (LUNDWALL, 1996).

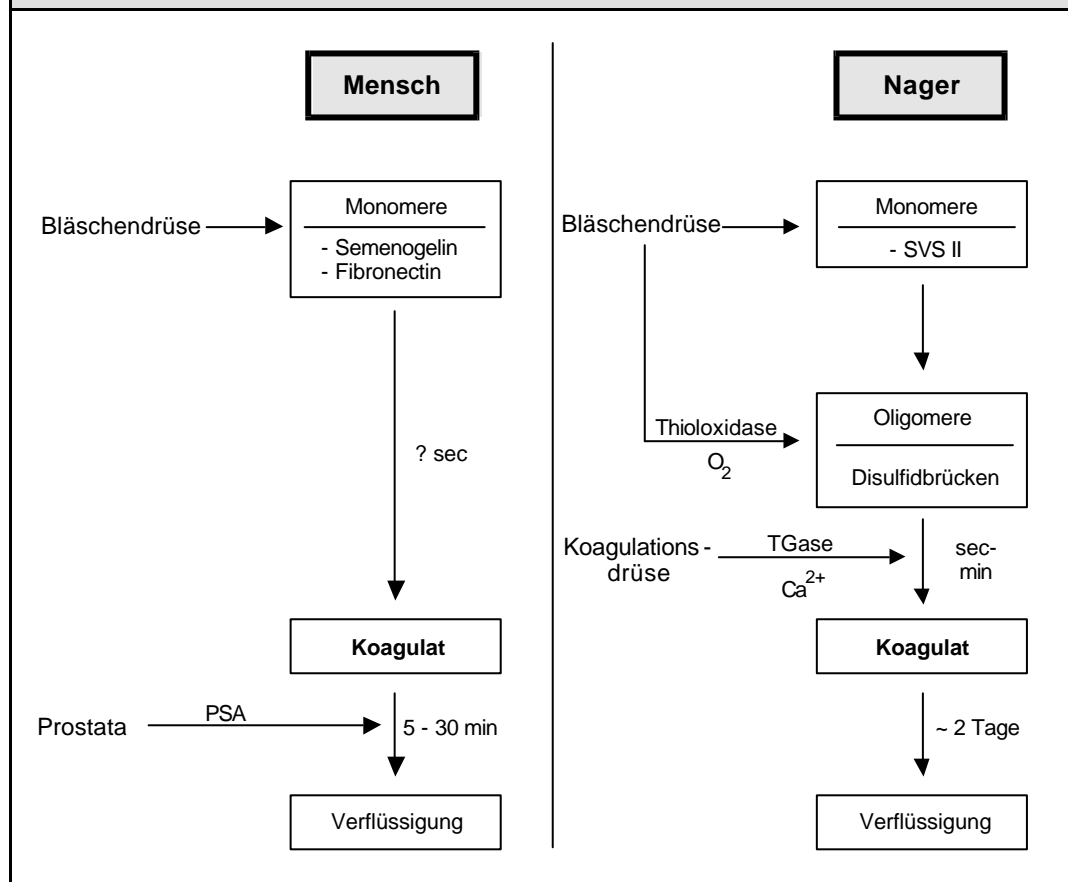
### 1.3.2. Samenkoagulation beim Menschen

Beim Menschen bleibt das Koagulum nur wenige Minuten stabil. Einige der darin enthaltenen Proteine sind, wie CHAISTITVANICH und BOONSAENG (1983) nachgewiesen haben, durch Disulfidbrücken verknüpft. Sie vermuten, dass eine enzymatische Reduktion dieser Brücken die Verflüssigung des Koagels (Liquefifikation) einleitet, die dann durch Hydrolyse der Proteine mit Hilfe einer Serinprotease aus dem Prostatasekret (Prostata-spezifisches Antigen, PSA) innerhalb weniger Minuten abgeschlossen wird (siehe Abb. 5).



Eine ausführliche Schilderung von Koagulation und Liquefifikation des menschlichen Samens ist bei SHIVAJI *et al.* (1990) nachzulesen. Vor kurzem konnten PETER und Mitarbeiter (1998) zeigen, dass die *in vivo*-Bildung des menschlichen Samenkoagulats hauptsächlich auf einer Interaktion der beiden Bläschendrüsene Proteine Semenogelin I und II sowohl über nicht kovalente als auch über Disulfidbrücken beruht (siehe Abb. 6).

**Abb. 6: Koagulation und Verflüssigung des Ejakulates, Ablauf bei Mensch und Nager**



Auch Fibronectin soll in das Gel integriert sein (LILJA *et al.*, 1987). Im Gegensatz zur Koagulation bei der Ratte (siehe 1.3.1.) findet jedoch keine durch TGase katalysierte kovalente Quervernetzung der genannten Proteine statt. Dies ist um so erstaunlicher, da man (1) im Seminalplasma eindeutig TGase nachweisen kann (s.o.) und (2) beide Semenogeline *in vitro* z.B. durch zugesetzten Faktor XIIIa zu homologen oder heterologen Polymeren vernetzt werden können. Interessant ist dabei auch, dass die artifiziell erzeugten, hochmolekularen Semenogelin-Komplexe durch PSA nicht mehr hydrolysierbar sind.

### 1.3.3. Modifikation von Spermien durch Transglutaminasen, Immunsuppression

Während der Passage der Spermien durch den Nebenhoden wird deren Oberfläche durch epididymale Sekretfaktoren modifiziert, so dass es zur endgültigen Aktivierung der Samenzellen kommt (ACOTT und HOSKIN, 1981; RIFKIN und OLSON, 1985; AUMÜLLER *et al.*, 1988).

AUMÜLLER *et al.* (1989) isolierten Gewebe und Spermatozoen aus dem Kopf und Schwanz des Nebenhodens der Ratte und testeten sie auf das Vorkommen von TGase-Aktivität. Nach Homogenisierung und Zentrifugation konnten sie im Überstand, der aus

dem Gewebehomogenat des Nebenhodenkopfs gewonnen wurde, eine hohe TGase-Aktivität nachweisen, die TGase lag also dort in freier Form vor. In der löslichen Fraktion aus dem Nebenhodenschwanz war dagegen nur geringe TGase-Aktivität vorhanden. Das Enzym konnte nur unter Verwendung starker Detergentien von der Spermienoberfläche gelöst werden, es war im distalen Nebenhoden also partikulär, d.h. fest an Membranen gebunden. Die Autoren vermuteten, dass die Bindung der Transglutaminase an die Oberfläche der Rattenspermien während der Passage durch den Nebenhoden einen wesentlichen Einfluss auf die Spermienreifung nimmt.

Im Anschluss an die Passage der Spermatozoen durch den Nebenhoden hat die seminale TGase wahrscheinlich zwei Funktionen zu erfüllen: (1) die Motilität der Samenzellen zu beeinflussen und (2) Antigene auf der Oberfläche der Spermien so zu modifizieren, dass die Abwehrzellen im weiblichen Genitaltrakt sie nicht mehr als fremd erkennen. Dies schützt zunächst die Samenzellen vor einem direkten Angriff dieser Abwehrzellen, andererseits wird aber auch das weibliche Immunsystem davon abgehalten, nach dem Koitus eine Sensitivität gegenüber den Spermienantigenen zu entwickeln. Zum ersten Punkt gibt es nur wenige Hinweise aus der Literatur. *LAMIRANDE und GAGNON (1989)* konnten z.B. zeigen, dass bestimmte TGase-Substrate wie Putrescin, Dansylcadaverin, Spermin etc. oder der TGase-Hemmstoff Cystamin die Motilität von demembranierten Säugerspermien hemmen. Dies lässt zumindest den indirekten Schluss zu, dass die spermiengebundene TGase wichtig für die Motilität der Keimzellen ist.

Im Gegensatz dazu gibt es zahlreiche Fakten, die auf eine immunsuppressive Wirkung der seminalen bzw. spermiengebundenen TGase hinweisen. Bei der Ratte soll sie zunächst das Bläschendrüsensprotein SVS-IV, für das *in vitro* eine immunsuppressive, anti-inflammatorische und anti-thrombotische Wirkung belegt wurde (*METAFORA et al., 1989; PORTA et al., 1993*), entweder mit Spermidin verknüpfen oder zu höhermolekularen Oligomeren quervernetzen. Die Derivate von SVS-IV sollen dann kovalent an die Oberfläche von ejakulierten Spermien gebunden werden und diese dann vor einer Attacke von Makrophagen und Lymphozyten im weiblichen Genitaltrakt schützen (*GALDIERO et al., 1989; PELUSO et al., 1994*). Beim Kaninchen soll dagegen das steroidbindende Protein Uteroglobulin, das von den Bläschendrüsens sezerniert wird, durch eine von der Prostata sezernierte TGase kovalent an Oberflächenproteine von Spermien aus dem Nebenhoden geknüpft werden und damit deren Antigenität stark herabsetzen (*MUKHERJEE et al., 1983; MANJUNATH et al., 1984*).

Auch beim Menschen werden inzwischen im Analogieschluss entsprechende immunsuppressive Wirkungen der seminalen oder spermiengebundenen TGase postuliert (*JAMES und HARGREAVE, 1984*). *ABLIN et al. (ABLIN, 1985; ABLIN et al., 1985)* weisen diesen hemmenden Effekt auf die Immunabwehr sogar insofern aus, dass sie vermuten, dass Seminalplasmafaktoren, insbesondere die TGase und Spermidin, Co-

Faktoren für die Ausprägung von Immundefizienzkrankheiten wie AIDS sein könnten. Diese Hypothese wurde auch von L. Montagnier (Unité d'Oncologie Virale, Institut Pasteur, Paris, Frankreich) anlässlich seiner Behring Lecture in Marburg geäußert.

#### **1.4. Ziele der eigenen Arbeit**

In den vorangehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass im Samen von Säugetieren verschiedene Isoenzyme der Transglutaminase mit unterschiedlicher Funktion nachzuweisen sind. Dabei ist jedoch besonders interessant, dass die Enzymformen der humanen seminalen TGase nur sehr unzureichend charakterisiert sind. Es ist weder bekannt, welche der akzessorischen Drüsen sie in das Ejakulat abgibt, noch wie sie sich dann z.T. wieder an die Oberfläche der Samenzellen zu binden vermag. Ungeklärt ist auch, ob diejenigen Isoformen, die offensichtlich enger mit der Gewebe-TGase verwandt sind, wirklich exportiert werden oder ob sie aus untergehenden Drüsenzellen stammen, deren Inhalt dann als Kontamination in das Seminalplasma gelangt.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher folgende :

1. Zunächst soll untersucht werden, ob sich durch SDS-PAGE und anschließende Immunoprintanalyse in Organen oder Sekreten des männlichen Genitaltrakts (Prostata, Bläschendrüse und deren Sekrete, Ejakulat von gesunden und infertilen Patienten) eine TGase nachweisen lässt, die molekulare und immunologische Verwandtschaft mit der Isoform in der Koagulationsdrüse der Ratte besitzt.
2. Der Nachweis für die Enzymaktivität im Samen soll standardisiert und zur Quantifizierung des Proteins in den verschiedenen Ejakulatproben und Fraktionen eingesetzt werden. Dabei muss auch geprüft werden, ob längeres Einfrieren von Seminalplasmaproben zu einen Aktivitätsverlust führt.
3. Beim Nachweis einer entsprechenden TGase-Aktivität ist beabsichtigt, diese aus optimalen Proben unter Anwendung verschiedener Reinigungstechniken isoliert.
4. Die gereinigte TGase soll dann molekular (pI, Molekulargewicht) und nach Herstellung eines polyklonalen Antikörpers immunologisch bzw. immunhistologisch genauer charakterisiert werden.
5. Der genaue Bildungsort der seminalen TGase soll identifiziert werden. Es gilt außerdem zu prüfen, ob die seminale TGase frei gelöst und/oder an die Spermien gebunden vorliegt. Im letzteren Fall muss die genaue Lokalisation an der Spermienoberfläche bestimmt und danach eine optimale Solubilisierung durch Verwendung verschiedener Extraktionstechniken erreicht werden.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien**

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Grad p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Behringwerke, Marburg

Biochrom AG, Berlin

DAKO, Hamburg

MERCK, Darmstadt

Pharmacia/LKB, Freiburg

Riedel de Haen, Seelze

Roth, Karlsruhe

SERVA, Heidelberg

Sigma, München

Radioaktiv markiertes  $^{14}\text{C}$ -Putrescin wurde von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) geliefert.

Plastikverbrauchsmaterial wurde von den Firmen Greiner (Nürtingen), Becton Dickinson (Heidelberg), Schleicher und Schüll (Dassel) sowie Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

### **2.2. Herkunft der menschlichen Proben**

#### **2.2.1. Menschliche Ejakulatproben**

Die Ejakulatproben wurden von der Abteilung Andrologie (Leiter: Prof. Dr. med. Krause) im Medizinischen Zentrum für Hautkrankheiten (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Proben stammen von Männern zwischen 17 und 57 Jahren und waren im Rahmen der Abklärung von Fertilitätsstörungen bei bestehendem Kinderwunsch gewonnen worden.

Nach Einhaltung einer Karenzzeit von etwa 5 Tagen gaben die Probanden das Ejakulat direkt in eine Petrischale mittels Masturbation ab. Direkt nach Verflüssigung des Ejakulats wurde vom Personal des andrologischen Labors ein Spermogramm (*SCHIRREN, 1971; KATZ und DAVIS, 1987; KRAUSE und ROTHAUGE, 1991*) angefertigt.

Für die eigenen Untersuchungen standen sowohl längere Zeit eingefrorene Ejakulatproben als auch frische Ejakulate zur Verfügung.

Die frischen Proben wurden direkt nach der Liquefifikation in Reagenzgläser gegeben und in einem Eisbad bis zur weiteren Verwendung gekühlt.

## **2.2.2. Gewebeproben von menschlicher Prostata und Bläschendrüse, sowie Bläschendrüsensekret**

Ein Teil der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben menschlichen Gewebes wurde vom Institut für Pathologie der Philipps-Universität, Marburg, (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. C. Thomas) zur Verfügung gestellt. Sie waren in beiden Fällen im Rahmen von Obduktionen gewonnen worden, bei denen die Todesursache festgestellt worden war.

Probe 1: 46-jähriger Mann, verstorben an Myokardinfarkt: ca. 48 Std. post mortem Entnahme vom Prostata, Bläschendrüse und Bläschendrüsensekret

Probe 2: 58-jähriger Mann, verstorben an eitriger Peritonitis: ca. 7 Stunden post mortem Entnahme vom Prostata, Bläschendrüse und Bläschendrüsensekret

Ein weiterer Teil der menschlichen Proben wurde von der Klinik für Urologie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. L. Hertle) im Rahmen von radikalen Zystektomien mit pelviner Lymphadenektomien bei Harnblasenkarzinom entnommen und zur Verfügung gestellt.

Probe 3: 66-jähriger Mann, unmittelbar postoperative Entnahme von beiden Bläschendrüsen (jeweils fixiert in Formaldehyd 3,5 % bzw. Bouin-Lsg.). Die Drüsen wurden vor dem Fixieren vorsichtig mit ca. 3 ml des jeweiligen Fixans per Spritze mit Nr.1-Kanüle am Ductus ejaculatorius durchgespült.

## **2.3. Versuchstiere**

### **2.3.1. Kaninchen zur Antikörperherstellung**

Adulte Kaninchen wurden zur Herstellung von Antikörpern benutzt. Sie waren von den Behringwerken, Marburg, kostenlos zur Verfügung gestellt worden. Die Kaninchen wurden während der Antikörperproduktion in der Versuchstieranlage des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität, Marburg gehalten.

### **2.3.2. Ratten zur Gewinnung von Koagulationsdrüsensekret**

Gesunde, geschlechtsreife, männliche Wistar-Ratten (250-300g schwer) wurden von der Firma Ivanovas (Kisslegg/Allgäu) bezogen.

## **2.4. Herkunft des Antikörpers gegen die sekretorische Ratten-TGase**

Der polyklonale Kaninchenantikörper gegen sekretorische TGase aus der Ratten-Koagulationsdrüse (AUMÜLLER *et al.*, 1987; SEITZ *et al.*, 1990) wurde von Prof. Dr. Seitz (Institut für Anatomie und Zellbiologie) zur Verfügung gestellt.



## 2.5. Biochemische Methoden

### 2.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach einer Modifikation des Bradford-Tests (*BRADFORD, 1976; REISNER et al., 1975; SEDMAK et al., 1977*) ermittelt. Als Farbstoff wurde Coomassie-Blau G-250 (Serva) eingesetzt. Die Standardkurve wurde mit Ovalbumin erstellt.

Das Prinzip des Proteintests besteht darin, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Blau G-250, das in saurer Lösung bei 465nm (grün-braun) liegt, nach der Bindung an Proteine nach 595nm (blau) verschiebt.

#### **Zusammensetzung des Testreagenz**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250  
50 ml 95% Äthanol  
100 ml 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
ad Aqua bidest. 1 Liter, anschließend filtrieren

#### **Durchführung**

- 1 ml Testreagenz wurde in ein Eppendorfggefäß pipettiert.
- 20 µl der zu messenden Proteinprobe wurden zugesetzt und gut durchmischt (Leerwert: 20 µl Puffer).
- Nach 30 min wurde die Extinktion bei 595nm gegen den Leerwert gemessen. Dazu wurde ein Spektrophotometer Modell 24 (Beckman) verwendet.

#### **Auswertung**

Die Proteinkonzentration wurde anhand der Ovalbumin-Eichkurve berechnet, die nach jedem frischen Ansetzen der Reagenslösung neu erstellt wurde.

### 2.5.2. Identifizierung der Proteine

#### 2.5.2.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen wurde mit geringen Modifikationen nach der Methode von *LAEMMLI (1970)* und *ANDERSON und PETERSON (1981)* durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene SDS-PAGE-Systeme eingesetzt:

- große Flachbett-Gele
  - für Molekulargewichtsbestimmungen mit guter Auflösung
  - präparativ zur Isolierung der Antigene für die Herstellung von Antikörpern
- Mini-Flachbett-Gele
  - für die schnelle, analytische Trennung von Proteinen.

### 2.5.2.1.1. Mini-SDS-PAGE

Die analytische Separation der Proteine wurde in einer Mini-PROTEAN II-Elektrophoresekammer der Fa. BioRad (München) durchgeführt.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurden Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen Gradienten hergestellt, die anschließend mit einem Sammelgel überschichtet wurden.

#### Pufferlösungen für Mini-Flachbett-Gele:

##### Probenpuffer

4,0 ml Aqua bidest.  
1,0 ml 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8  
0,8 ml Glycerol  
1,6 ml SDS-Lösung  
64 mg DTE  
0,2 ml 0,05 % (w/v) Bromphenolblau  
Endvolumen 8 ml

Verwendung: 1 Teil Probe + 1 Teil Probenpuffer, 15 min bei 95° kochen

##### Elektrophoresepuffer

3 g TRIS  
14,4 g Glycin  
1 g SDS  
ad 1 Liter mit Aqua bidest.

#### Gellösungen für:

- **Trenngele (1mm dick, 6 x 10 cm)**

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

18,15 g TRIS in 80 ml Aqua bidest. lösen  
mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen  
ad 100 ml mit Aqua bidest.

##### 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8

6,0 g TRIS in 60 ml Aqua bidest. lösen  
mit 1 N HCl auf pH 6,8 einstellen  
ad 100 ml mit Aqua bidest.

##### Acrylamid-Stammlösung

29,2 % Acrylamid  
0,8 % Bis-Acrylamid  
oder Rotiphorese Gel 30 Firma Roth

##### 10 % (w/v) SDS-Stammlösung

10 g SDS werden in 100 ml Aqua bidest. gelöst

##### 10 % ( w/v)Ammoniumpersulfat

10 mg Ammoniumpersulfat in  
100 µl Aqua bidest. lösen (täglich frisch ansetzen)

- **Sammelgele:**

3,05 ml Aqua bidest.  
1,25 ml TRIS-HCl, pH 6,8  
0,65 ml Acrylamidlösung  
0,05 ml 10 % SDS-Lösung

Starten der Polymerisation durch Zugabe von 25 µl APS und 5 µl TEMED

### Herstellung der Trenngele:

Die o.g. Lösungen wurden entsprechend Tab. 1 gemischt:

Tab. 1: Zusammensetzung von Trenngelen für Mini-SDS-PAGE (jeweils 10 ml)						
Lösung	Acrylamidkonzentration des Trenngels					
	5 %	7,5 %	10 %	12 %	15 %	20 %
Aqua bidest.	5,7 ml	4,85ml	4,0ml	3,35ml	2,35ml	0,65ml
0,5 M Tris-Puffer pH 8,8	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
10 % SDS-Lösung	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
AA-Lösung	1,65ml	2,5ml	3,35ml	4,0ml	5,0ml	6,7ml

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 10 µl APS und 1 µl TEMED gestartet. Nach Auftragen der Proben betrug die Laufzeit ca. 45 min bei konstant 200 V.

### 2.5.2.1.2. SDS-PAGE mit großen Gelen

#### Puffer für die Elektrophorese mit großen SDS-PAGE-Gelen

##### Elektrophoresepuffer

6,06 g TRIS  
28,83 g Glycin  
2,0 g SDS  
ad 2 Liter mit Aqua bidest.

##### Probenpuffer

0,454 g TRIS  
1,2 g SDS  
7,56 g Glycerin  
1,6 g DTE  
0,4 ml Bromphenolblau (2 mg / ml Aqua bidest.)  
Zusammensetzung: 2 Teile Probe + 1 Teil Probenpuffer, 15 min bei 95° kochen

#### Lösungen für die Sammelgele

##### Sammelgel-Acrylamidlösung

29,1 g Acrylamid  
0,9 g Bis-Acrylamid  
ad 200 ml Aqua bidest.  
Nach dem Lösen 5g Amberlite zusetzen und 15 min rühren, anschließend filtrieren.

##### Sammelgelpuffer

3,03 g TRIS-HCL  
0,2 g SDS  
in 70 ml Aqua bidest. lösen  
mit 1 N HCl auf pH 6,9 einstellen  
ad 100 ml Aqua bidest.

##### APS (Ammoniumpersulfat) für Sammelgel

100 mg APS in 10 ml H<sub>2</sub>O lösen

#### Herstellung der Sammelgele durch Mischen von:

3,75 ml Sammelgelpuffer  
2,55 ml AA-Lsg  
0,825 ml Aqua bidest.  
0,375 ml APS - Lösung  
0,004 ml TEMED

## Lösungen für große Trenngele

### Trenngel-Acrylamidlösung

36,36 g Acrylamid  
1,14 g Bis-Acrylamid  
47,6 g Glycerin  
in 80 ml Aqua bidest. einlösen  
mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen  
ad 100 ml mit Aqua bidest.

Nach dem Lösen 5g Amberlite zusetzen und 15 min rühren, anschließend filtrieren  
(nicht nötig bei Verwendung von Rotiphorese Gel 30)

### Trenngelpuffer

13,63 g TRIS-HCL  
0,3 g SDS  
ad 100 ml mit Aqua bidest., pH 8.8

### APS für Trenngel

13,5 mg APS in 15 ml Trenngelpuffer lösen

## Herstellung der großen Trenngele (1mm dick, 16x16 cm):

Tab. 2: Mischungen für große Trenngele (jeweils 15 ml)						
Lösung	Acrylamidkonzentration des Trenngels					
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	20 %
Aqua bidest.	8 ml	7 ml	6 ml	5 ml	4 ml	2 ml
AA-Lösung	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 5 µl APS und 15 µl TEMED gestartet.

Bei den großen Gelen wurden folgende Laufbedingungen gewählt:

- Temperatur: 4°C
- Kurze Laufzeit, ca. 4-6 Std.:
  - Sammeln bei: 65 mA, 80 V, 20 W
  - Trennen bei: 75 mA, 500 - 600 V, 20 W
- Lange Laufzeit, ca. 16 Std.:
  - Sammeln bei: 65 mA, 80 V, 20 W
  - Trennen bei: 75 mA, 90 - 100 V, 20 W

Zur Bestimmung des Molekulargewichts unbekannter Proteine wurden Referenzproben mit Proteinen bekannten Molekulargewichts oder vorgefärbte Proteinmarker ("prestained molecular weight standards") der Fa. Sigma (München) eingesetzt.

### Verwendete Eichproteingemische:

#### **Eichproteine:** selbst hergestellte Mischung

96 kDa Phosphorylase b  
80 kDa Transferrin  
67 kDa Human-Serum-Albumin  
45 kDa Ovalbumin  
25 kDa Chymotrypsinogen  
14 kDa Lysozym

#### **Sigma-Eichproteine** (vorgefärbt)

180 kDa α 2 - Macroglobulin  
116 kDa β - Galactosidase  
84 kDa Fructose-6-Phosphate Kinase  
58 kDa α - Pyruvate Kinase  
48,5 kDa Fumarase  
36,5 kDa Lactate Dehydrogenase  
26,6 kDa Triosephosphate Isomerase

Nach Ende der Elektrophorese wurden die Proteine entweder fixiert und gefärbt (s. 2.5.2.2.), oder auf Nitrozellulose übertragen (s. 2.5.2.3.) oder zur Herstellung von Antikörpern ausgeschnitten (s. 2.7).

### 2.5.2.2. Anfärben der Gele nach SDS-PAGE

Es wurden zwei verschiedene Färbelösungen verwendet: für die SDS-PAGE die Coomassie-Blau-Färbung nach *SEDMARK und GROSSBERG (1977)* und die Crocein-Scarlet-Färbung nach *CROWLE und CLINE (1977)*, mit der glycosylierte Proteine noch besser dargestellt werden können und die sich besonders auch für IEF-Gele (analytische Isoelektrische Fokussierung) eignet.

#### Lösungen für die Coomassie-Blau-Färbung

##### Färbelösung

1,13 g Coomassie-Blau G-250 (Serva Blau G)  
227 ml Methanol  
227ml Aqua bidest.  
46 ml Eisessig  
Lösung vor Gebrauch filtrieren

##### Entfärbelösung

50 ml Methanol  
75 ml Essigsäure  
ad 1 Liter mit Aqua bidest.

**Durchführung:** Die Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese 10-15 min in 12,5% Trichloressigsäure (TCA) fixiert und anschließend 30-60 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nicht an die Proteine gebundener Farbstoff wurde mit Hilfe der Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechsel entfernt.

#### Lösungen für die Crocein-Scarlet-Färbung

##### Färbelösung

5 g  $\text{CuSO}_4$   
0,5 g Coomassie R 250  
0,5 g Crocein-Scarlet  
250 ml Isopropanol  
100 ml Essigsäure  
650 ml Aqua bidest.

##### Entfärbelösung I

120 ml Isopropanol  
100 ml Essigsäure  
780 ml Aqua bidest.  
5 g  $\text{CuSO}_4$

##### Entfärbelösung II

Wie Entfärbelösung I, aber ohne  $\text{CuSO}_4$

**Durchführung:** Die Gele wurden etwa 30 min bei 50°C in einem temperierten Schüttelwasserbad gefärbt. Anschließend wurde der unspezifisch gebundene Farbstoff durch Inkubation in den Entfärbem I und II (jeweils ca. 30 Minuten bei 50°C) entfernt. Die Gele wurden danach in Entfärbelösung II aufbewahrt.

### 2.5.2.3. Western Blot im Semi-dry-Verfahren

Falls geeignete Antikörper zur Verfügung stehen, können diese auch zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine nach ihrer Auftrennung durch Gelelektrophorese verwendet werden. Eine direkte Bindung der Antikörper an SDS-beladene Proteine, die in einer Polyacrylamidgelmatrix eingeschlossen sind, ist nicht möglich. Man transferiert die Polypeptide deshalb entweder im Abklatschverfahren oder aber – mit deutlich höherer Effizienz - elektrophoretisch auf eine dünne Kunststoffmembran, die z.B. aus Nitrozellulose oder Teflon besteht. Dieses Verfahren wurde 1979 von *TOWBIN et al.* optimiert und als Western Blot bezeichnet. Wichtig ist dabei auch, dass der verwendete Transferpuffer 20% Methanol enthält, einerseits das SDS zum Teil von den Proteinen ablöst (gleichzeitig teilweise Renaturierung!), andererseits verhindert, dass das Gel selbst während der Elektrophorese schrumpft. Es kann deshalb zur Ermittlung der Übertragungseffizienz mit Coomassie-Blau gefärbt und mit der fertig entwickelten Western Blot-Membran (s.u.) verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transfer der denaturierten Proteine nach SDS-PAGE mit Hilfe einer Horizontal-Blot-Kammer, die mit Graphitelektroden (Fa. Chemie+Werkstoff Technik, Idstein) bestückt war, im sogenannten Semi-dry-Verfahren durchgeführt. Als Trägerfolien wurden Nitrocellulosemembranen der Firma Schleicher & Schüll (Dassel, Porengröße 0,45 µm) verwendet.

#### Lösungen

##### **Anodenpuffer**

18,17 g TRIS  
100 ml Methanol  
ad 500 ml mit Aqua bidest.

##### **Transferpuffer**

1,82 g TRIS  
100 ml Methanol  
auf 500 ml mit Aqua bidest.

##### **Kathodenpuffer**

1,51 g TRIS  
2,62 g Amino-n-Caprinsäure  
100 ml Methanol  
auf 500 ml mit Aqua bidest.

##### **Ponceau S-Färbelösung**

2 g Ponceau S (Serva) in 3 % (w/v) TCA lösen

#### **Durchführung des Proteintransfers auf Nitrocellulose**

Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese 2min in eiskaltem Kathodenpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulosemembran wurde der Gelgröße entsprechend zugeschnitten und 2min in Transferpuffer inkubiert. 20 x 20 cm große Stücke Filterpapier wurden mit den entsprechenden Elektroden- bzw. Transferpuffern getränkt und mit dem Gel und der Transfermembran folgendermaßen in die Blot-Kammer geschichtet:

<b>(+) Anode</b>
3 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer
2 Lagen Filterpapier, getränkt in Transferpuffer
Trägermembran
SDS-Polyacrylamid-Gel
3 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer
<b>Kathode (-)</b>

Der Transfer erfolgte innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur und konstant 250 mA. Zur Kontrolle der Übertragungseffizienz wurden die Membran mit Ponceau S und das Gel mit Coomassie-Blau angefärbt.

### **Ponceau-Färbung**

Die Trägermembran wurde für 1 - 2 min in der Ponceau S-Lösung unter Schwenken inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Spülen in Aqua bidest. entfernt. Die übertragenen Proteine wurden als rote Banden sichtbar, ihre Position wurde zusammen mit der der Eichproteine mit Hilfe eines Bleistifts markiert. Dies war erforderlich, da die Rotfärbung nur temporär ist und im Verlauf der weiteren Immunoprintanalyse (s.u.) wieder verschwindet.

### **Lösungen für die Immunoprintanalyse:**

**PBS** (phosphate-buffered saline, 0,154 M NaCl)  
 8,2 g NaCl (140 mMol)  
 0,2 g KCl (27 mMol)  
 0,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (3 mMol)  
 1 g Dinatriumhydrogenphosphat (7 mMol)  
 ad 1 Liter Aqua bidest. (pH auf 7,4 einstellen)

**Absättigungspuffer** (0,01 M TRIS/HCl pH 7,5; 0,9% (w/v) NaCl; 5% (w/v) Magermilchpulver)  
 1,21 g TRIS/HCl  
 9,0 g NaCl  
 50 g Magermilchpulver  
 ad 1 Liter Aqua bidest.

**Waschpuffer** (0,05 M TRIS / HCL pH 7,5; 0,25 M NaCl; 3 mM EDTA)  
 6,06 g TRIS / HCl, pH 7,5  
 14,6 g NaCl  
 1,1 g EDTA  
 ad 1 Liter Aqua bidest., dann Zugabe von 0,5 g TWEEN 20

**1. Antikörper: Kaninchenserum**  
 Spezifität: siehe jeweiliges Experiment  
 Verdünnung: 1:50 bis 1:2000

**2. Antikörper: Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein (IgG-Fraktion) - (DAKO)**  
 1:100 in Absättigungspuffer verdünnt

**PAP (Peroxidase-Kaninchen Antiperoxidase)-Komplex (DAKO)**  
 1:200 in Absättigungspuffer verdünnt

**Natriumacetatpuffer (6)**  
 50 mM Natrium-Acetat, pH 6,0

**Chlor-Naphthol-Reagenz** (in dunkler Flasche ansetzen)  
30 mg 4-Chlor-1-Naphthol in 10 ml Methanol lösen  
Mischen mit 50 ml PBS-Puffer  
direkt vor der Nachweisreaktion 20 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusetzen

**DAB-Reagenz** (in dunkler Flasche ansetzen)  
35 mg DAB lösen in 100 ml Na-Acetatpuffer  
direkt vor der Nachweisreaktion 50 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusetzen

#### **Durchführung der Immunfärbung:**

Die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine wurden nach folgendem Schema mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert:

- Absättigen der freien Bindungsstellen auf der Trägermatrix durch Inkubation für 3 x 20 min bei 37°C in Absättigungspuffer
- 60 min Inkubieren bei Raumtemperatur mit dem Primär-Antikörper
- 3 x 10 min Spülen bei 37°C in Waschpuffer
- 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper
- 3 x 10 min Spülen bei 37°C in Waschpuffer
- Inkubieren für 5 min bei Raumtemperatur mit dem PAP-Komplex
- 3 x 10 min Spülen bei 37°C in Waschpuffer
- Anfärbung der gebundenen Peroxidase:  
wenige Minuten in Chlor-Naphthol-Reagenz [ergibt schwarze Banden]  
oder in DAB-Reagenz [ergibt braune Banden]
- wenige Minuten in Waschpuffer spülen
- Membran zwischen 2 Filterpapieren trocknen
- Die getrockneten Membranen wurden zur Dokumentation photographiert

### **2.5.3. Messung der Transglutaminase-Enzymaktivität**

Zur Messung der Transglutaminase-Enzymaktivität im menschlichen Ejakulat wurde eine Quantifizierungsmethode für den Faktor-XIII im Blut (*EGBRING et al., 1973*) modifiziert und standardisiert. Dabei wird der Einbau von <sup>14</sup>C-markiertem Putrescin in dimethyliertes Casein bestimmt.

#### **Lösungen (werden alle bei 4°C aufbewahrt)**

**Testpuffer** (50 mM HEPES / NaOH pH 8,5, 5mM DTE)  
11,92 g HEPES  
0,77g DTE  
in 800 ml Aqua bidest. lösen  
mit 1 NaOH auf pH 8,5 einstellen  
ad 1 Liter Aqua bidest.

**Casein-Lösung** (1 % N, N'-Dimethylcasein)  
2,5 mg Dimethylcasein in 250 ml Testpuffer (A)

**CaCl<sub>2</sub>-Lösung** (50 mM CaCl<sub>2</sub>)  
1,84 g CaCl<sub>2</sub> in 250 ml Testpuffer



**<sup>14</sup>C-Putrescin**

57,8 nmol pro ml Testpuffer

**Stopplösung**

10 % TCA in Aqua bidest.

**Waschlösungen**

5 % TCA in Aqua bidest.

**Äthanol-Lösung**

96 % Äthanol

**Durchführung der TGase-Enzymaktivitätsmessung**

Jeweils 300 µl Casein-Lösung, 150 µl CaCl<sub>2</sub>, 150 µl Testpuffer und 150 µl <sup>14</sup>C-Putrescin-Lösung wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und dann bei ca. 4°C im Eisbad temperiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl der zu messenden TGase-Probe (für den Nullwert: 100 µl Testpuffer) gestartet. Die Reaktionsgemische wurden dann in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und für insgesamt 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 850 µl eiskaltem 10% TCA gestoppt und die Proben 30 min in das Eisbad gestellt, um Proteine und Polypeptide auszufällen. Danach wurde 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden nach Dekantieren des Überstandes mit Hilfe eines elektrischen Rührstabes in der Waschlösung (5% TCA) resuspendiert und erneut für 30 min in das Eisbad gestellt. Zentrifugation und Resuspension wurden ein zweites Mal durchgeführt. Anschließend wurden die Pellets nach erneutem Zentrifugieren mit Äthanollösung gewaschen, 30 min in das Eisbad gestellt und nach dem Dekantieren des Überstandes in 500 µl 0,1 N NaOH gelöst.

Nach dem Überführen in Szintillationsgefäße und Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint 2200) erfolgte die Messung der proteingebundenen Radioaktivität (CPM) in einem TRI-CARB 460C Liquid Scintillation System Counter (Packard). Die Ausgabe der Messwerte erfolgte zunächst in cpm (counts per minute). Unter Verwendung eines internen Standards, der den Quench-Effekt berücksichtigte, wurde eine Umrechnung in dpm (decay per minute) vorgenommen.

**Berechnung der spezifischen Enzymaktivität**

Die spezifische Enzymaktivität (nU/ml) einer TGase-Probe wurde durch Teilen der präzipitierten Casein-gebundenen Radioaktivität durch die Proteinkonzentration der Probe (mg/ml) nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{dpm} \times (1000 / \text{eingesetzte } \mu\text{l} / \text{Probe}) \times (\text{Liter/Verdünnung der Probe})}{30 \text{ min} \times (\text{spez. Radioaktivität der } ^{14}\text{C-Putrescin-Charge in dpm/pmol})}$$

## **2.5.4. Isolierung von Transglutaminase aus akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Seminalplasma**

### **2.5.4.1. Extraktion der TGase aus der Ratten-Koagulationsdrüse**

Als Referenz für die Reinigung von menschlicher Transglutaminase wurde eine Isoform der TGase aus der Ratten-Koagulationsdrüse nach der Methode von *SEITZ et al. (1991<sup>1</sup>)* extrahiert.

#### **Extraktionspuffer (154 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA)**

0,45 g NaCl  
36,7 mg CaCl<sub>2</sub>  
1,9 mg EGTA  
Aqua bidest ad 50 ml.

#### **Durchführung**

Zunächst wurden adulte 250-300 g große männliche Wistar Ratten nach Äthernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Koagulationsdrüsen (siehe Abb. 2) wurden entnommen und mit einem Skalpell zerkleinert. Zum Herauslösen des Koagulationsdrüsensekrets wurde das Gewebe in einem Eisbad in Extraktionspuffer unter Rühren für 15 min inkubiert. Die verbleibenden größeren Gewebestücke wurden mittels Filtration durch eine vierfach gefaltete Gaze abgetrennt. Das Filtrat wurde anschließend mit einem Elvehjem-Potter homogenisiert, danach wurde bei 15000 g für 20 min zentrifugiert. Die TGase war im Überstand nachzuweisen.

### **2.5.4.2. Extraktion aus menschlichem Prostatagewebe**

Bei zwei Obduktionen wurde menschliches Prostata-Gewebe entnommen (siehe 2.2.2.) und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebestücke wurden anschließend mit einem Elvehjem-Potter in Aqua bidest. homogenisiert. Anschließend wurde 15 min bei 20.000 g zentrifugiert. Überstand und das Pellet wurden getrennt weiter verwendet.

### **2.5.4.3. Gewinnung von Sekret der menschlichen Bläschendrüse**

Die Bläschendrüsen wurden ebenfalls bei den Obduktionen (s. 2.2.2.) bzw. intraoperativ entnommen. Das intraluminale Sekret wurde mit einer Kanüle aspiriert und zur weiteren Nutzung in einem Eisbad bei 4°C aufbewahrt.

### **2.5.4.4. Extraktion aus menschlicher Bläschendrüse**

Anschließend wurde das Bläschendrüsen-Gewebe selbst analog zur menschlichen Prostata aufgearbeitet (siehe 2.5.4.2).

### **2.5.4.5. Aufarbeitung von menschlichem Ejakulat**

#### **Frisches menschliches Ejakulat**

Direkt nach der physiologischen Verflüssigung (Liquefifikation) wurden die Ejakulatproben

bei 4°C in ein Reagenzglas überführt und im Eisbad bzw. im Kühlraum bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Trennung von Seminalplasma und Samenzellen wurden die Proben bei 5000 upm in einer Minifuge (Heraeus Christ) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in Extraktionspuffer (ca. 70% des Ausgangsvolumens) suspendiert und dann für 24 Stunden im Kühlraum mit Hilfe eines Schüttelgeräts (Reax 2000, Heidolph) extrahiert. Anschließend wurde erneut bei 5000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung abgetrennt.

### **Puffer- und Extraktionslösungen**

**PBS** (phosphate-buffered saline, 0,154 M NaCl)

8,2 g NaCl (140 mMol)  
0,2 g KCl (27 mMol)  
0,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (3 mMol)  
1 g Dinatriumhydrogenphosphat (7 mMol)  
ad 1 Liter Aqua bidest. (pH auf 7,4 einstellen)

**Extraktionspuffer: HEPES/DTE**

11,92 g HEPES (50mM)  
0,77 g DTE (5mM)  
ad 1 Liter Aqua bidest.

**Extraktionspuffer: HEPES/DTE/NaCl**

11,92 g HEPES (50mM)  
0,77 g DTE (5mM)  
9 g NaCl (0,154 M)  
ad 1 Liter Aqua bidest.

**Extraktionspuffer: HEPES/DTE/Triton**

11,92 g HEPES (50mM)  
0,77 g DTE (5mM)  
1 g 0,1 % Triton X 100  
ad 1 Liter Aqua bidest.

**Extraktionspuffer: PBS/NaCl** (PBS + 0,846 M NaCl = 1 Mol NaCl)

49,44 g NaCl (0,846 M)  
ad 1 Liter PBS

**Extraktionspuffer: PBS/Triton** (PBS / 0,1% Triton X 100)

1 g Triton X 100  
ad 1 Liter PBS

**Extraktionspuffer: STM/KSCN/DTE** (0,25 M STM / 20mM DTE / 50 mM KSCN)

21,39 g Sucrose (0,25M)  
0,15 g Tris-HCl (5mM)  
0,25 g MgCl<sub>2</sub> (0,5mM)  
  
1,22 g KSCN (50 mM)  
0,77 g DTE (20mM)  
in 200 ml Aqua bidest. lösen  
pH auf 7,5 einstellen  
ad 250 ml Aqua bidest.

### **Eingefrorene menschliche Ejakulatproben**

Bei -18°C aufbewahrte Ejakulatproben wurden aufgetaut und bei konstanter Temperatur von 4°C weiterverarbeitet. Sie wurden dazu bei 5000 upm in einer Heraeus Christ Minifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren von dem Pellet getrennt.

## **2.6. Reinigung der Transglutaminasen**

### **2.6.1. Konzentrierung der Extrakte durch Ammoniumsulfatfällung**

Die Proteine im Seminalplasma bzw. in den Extrakten wurden durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat (*COOPER<sup>1</sup>, 1981*) ausgefällt. Dazu wurden mehrere Seminalplasmaproben gepoolt und mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine 20%ige Sättigung erreicht war. Die Proben wurden jeweils etwa 2 Std. gerührt, um einen ersten Teil der Proteine zu präzipitieren und danach 30 min bei 12000 g zentrifugiert (Heraeus Christ-Zentrifuge). Der Überstand wurde abpipettiert und erneut mit Ammoniumsulfat bis zur 30%igen Sättigung versetzt. Nach 2 Stunden wurde wieder zentrifugiert und der Überstand bis 50% gesättigt. Nach erneuter Zentrifugation wurden Niederschlag und Überstand separiert. Die jeweiligen Pellets wurden in möglichst kleinen Mengen Aqua bidest. solubilisiert.

In einer zweiten Serie wurden die Fällungsbedingungen für die TGase durch Wahl von engeren Stufen (35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% und 75%) optimiert.

### **2.6.2. Dialyse der TGase-haltigen Fraktionen**

Zur Entfernung der Salze (nach der Ammoniumsulfatfällung) bzw. der Ampholyte (nach präparativer Isoelektrischer Fokussierung; s.u.) aus den Proteinfractionen wurde 3 Std. bei 4°C gegen 1 Liter Aqua bidest. dialysiert (*COOPER<sup>2</sup>, 1981*). Dazu wurden Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet, die zuvor zweimal in 5mM EDTA (1,86 g/l) in Aqua bidest. gekocht worden waren, um sie von Kontaminationen wie Schwermetallen, Proteasen und Nucleasen zu befreien. Unmittelbar vor der Dialyse wurden die Schläuche noch einmal in Aqua bidest. gekocht.

### **2.6.3. Präparatives Fokusgel**

Da die präparative isoelektrische Fokussierung (*COOPER<sup>3</sup>, 1981; OHLENSCHLÄGER et al., 1980; AUMÜLLER et al., 1981; SEITZ et al., 1980, 1981, 1985*) sich schon bei der Reinigung der TGase aus Ratten-Koagulationsdrüse bewährt hatte (*SEITZ et al., 1991<sup>1,2</sup>*), wurde sie auch zur Isolierung der menschlichen seminalen TGase verwendet.

#### **Vorbereitung der Gelmatrix und isoelektrische Fokussierung**

Um Verunreinigungen aus der kommerziellen Sepharose G-75-Matrix zu entfernen, wurde sie zunächst mit Aqua bidest. gewaschen. Das sedimentierte Gel wurde mit Äthanol aufgenommen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

### **Granuliertes Gelbett**

5 g Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia)  
suspendiert in 100 ml Aqua bidest.

### **Ampholyt-Gemisch im Gel (pH 4-10)**

3,5 ml pH 4-9 T Servalyte (SERVA)  
1,0 ml pH 9-11 Ampholyte (Pharmacia/LKB)  
0,5 ml pH 7-9 Ampholyte (Pharmacia/LKB)

### **verdünnte Ampholyt-Lösung für die Filterstreifen an den beiden Elektroden**

350 µl pH 4-9 T Servalyte (SERVA)  
100 µl pH 9-11 Ampholyte (Pharmacia/LKB)  
50 µl pH 7-9 Ampholyte (Pharmacia/LKB)  
ad 10 ml Aqua bidest.

Für die präparative Fokussierung wurde gereinigtes Sephadex G75 3 Std. bei 95°C in Aqua bidest. vorgequollen und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Gelsuspension wurden dann unter vorsichtigem Rühren Ampholyte (pH Gradient 4-10) zugefügt, und anschließend 6 Std. evakuiert, um störende Gasbläschen zu entfernen. In einer Flachbettkammer wurden an der Anoden- und Kathodenseite jeweils drei Schichten Filterpapierstreifen gelegt, die zuvor in verdünnter Ampholyt-Lösung getränkt worden waren. Die ampholythaltige Gelsuspension wurde zwischen die Elektrodenstreifen in den Geltrog gegossen und unter Luftströmung auf 70-73% ihres Ausgangsgewichts getrocknet.

Ein Teil des Gels wurde in der Nähe der Anode mit einem passenden Rahmen ausgestanzt und nach Überführung in ein Becherglas mit der zu trennenden TGase-Probe (maximal 3 ml) gemischt. Das probenhaltige Gelgemisch wurde nun in die ausgestanzte Stelle zurückgegossen. Der flache Geltrog wurde auf die Kühlplatte gesetzt, die zuvor mit einer dünnen Schicht 0,1% Triton X-100 zur besseren Kälteübertragung benetzt worden war. Auf die Filterstreifen der Anoden-Seite wurde ein in 1 M Phosphorsäure getränkter Streifen Filterpapier gelegt, auf die der Kathoden-Seite einer, der in 1 M NaOH getränkt wurde. Die Fokussierung selbst erfolgte mit Hilfe eines 2117-501 Multiphor "Flat-Bed Electrofocusing"-Apparats (Pharmacia-LKB). Die Starteinstellungen des Powergeräts betragen 1500V, 16 mA und 14W. Nach 16 Std. bei 4°C war die Isoelektrische Fokussierung beendet.

### **Nachweis der getrennten Proteine auf einem Papierabklatsch**

Ein ca. ½ cm breiter trockener Filtrierpapierstreifen wurde nach Ende der Fokussierung zwischen Kathode und Anode auf das präparative Fokusgel gelegt, um einen Abdruck der aufgetrennten Proteine zu erhalten. Das Filterpapier wurde anschließend mit Serva Blau G angefärbt (Färbung s. 2.5.2.2).

### **Elution der Proteine nach präparativer Fokussierung**

Nach der Lokalisation der Proteine auf dem Filterpapierstreifen wurde das Gelbett mit Hilfe eines Gitterrahmens aus Edelstahl in 30 Fraktionen getrennt. Der pH jeder Fraktion wurde mit einem pH-Meter bestimmt, das mit einer Oberflächenglaselektrode ausgerüstet

war. Anschließend wurde jede Gelfraktion in eine kleine Leersäule gepackt und 3 mal bei 4°C zunächst mit jeweils 1 ml Aqua bidest. und dann mit der gleichen Menge STM/KSCN/DTE-Lösung (s. 2.5.4.5) eluiert. Die Fraktionen wurden schließlich durch Dialyse (s.o.) von den Ampholyten befreit.

### **Gefriertrocknung und Analyse der Proben**

Die Gefriertrocknung wurde verwendet, um die relativ stark verdünnten Proteinfractionen wieder zu konzentrieren. Nach etwa 2 ½ Stunden Laufzeit in einem SpeedVac Lyophilisationsgerät gelang es, die einzelnen Proben auf ca.  $\frac{1}{3}$  des Ausgangsvolumens zu konzentrieren. Der Proteingehalt der Proben wurde bestimmt und ihre Proteinzusammensetzung durch SDS-PAGE überprüft. Durch Western Blot-Analyse wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an seminaler TGase getestet. Dabei wurde der Antikörper gegen die sekretorische Ratten-TGase verwendet, der mit der menschlichen Isoform kreuzreagiert (siehe Kapitel 3.3).

## **2.7. Herstellung von Kaninchen-Antikörpern gegen seminale TGase**

Bei der Western Blot-Analyse konnten in den IEF-Fractionen drei Proteinbanden identifiziert werden, die mit dem Antikörper gegen die sekretorische Ratten-TGase reagierten: HT (73 kDa), HTa (34 kDa) und HTb (26 kDa). Alle drei Banden wurden Kaninchen zur Produktion von polyklonalen Antikörpern injiziert. Hierzu wurde die entsprechende Bande nach SDS-PAGE aus dem Gel herausgeschnitten und als Antigen für die Herstellung von Antikörpern verwendet. Je präparatives SDS-PAGE-Gel wurde jeweils 1,5 mg eines Proteingemisches, das ein durch verschiedene Methoden angereichertes TGase-Antigen enthielt, eingesetzt. Jedem der 3 Kaninchen wurde vor der ersten Immunisierung eine Blutprobe entnommen, aus der das jeweilige "Präimmunserum" durch Zentrifugation bei 3000g gewonnen wurde. Das Serum wurde bei -80°C eingefroren. Zwei weitere Kaninchen wurden nach dem selben Verfahren zur Gewinnung von Anti-HST-1- und Anti-HST-2-Ak eingesetzt.

Zur **1. Immunisierung** wurden je 0,5 mg Antigen (TGase in SDS-PAGE-Gel) in 0,5 ml PBS-Puffer mit 0,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans zu einer stabilen Emulsion gemischt, die dem entsprechenden Kaninchen subkutan injiziert wurde.

Die **2. Immunisierung** erfolgte 14 Tage später (mit 0,5 mg Antigen in 0,5 ml PBS-Puffer und 0,5 ml inkomplettem Freund'schem Adjuvans).

Die **3. Immunisierung** erfolgte 14 Tage nach der zweiten Injektion, ihre Zusammensetzung war mit dieser identisch.

Zwei Wochen nach der 3. Injektion wurde dem Kaninchen Blut abgenommen und das Serum durch Zentrifugation gewonnen.

## 2.8. Immunhistologische Untersuchungen

### 2.8.1 Immunkomplexfärbung von ejakulierten Spermien

#### Lösungen für die Fixierung der Proben:

**Immunfixans: 0,1% Glutaraldehyd**

**1% Formaldehyd/PBS**

2,5 ml 37%iges Formaldehyd  
ad 100 ml PBS

#### Lösungen für die Immunkomplexfärbung

**PBS-Puffer:**

9,55 g/l PBS auf pH 7,4 einstellen

**PBS/TWEEN 20-Puffer:**

9,55 g/l PBS-Pulver  
500 µl TWEEN 20  
auf pH 7,4 einstellen)

**PBS/NaN<sub>3</sub>-Puffer:**

9,55 g PBS-Pulver  
0,01 % NaN<sub>3</sub>  
auf pH 7,4 einstellen

**80%ige Glycerinlösung**

80%ige Glycerin in PBS-Puffer pH 7,4

**Chromalaun-Gelatine-Lösung**

1 g Gelatine  
0,1 g Kaliumchromat(III)sulfat  
in 200 ml Aqua bidest. lösen

**Immunreagenzien**

Der Peroxidase-anti-Peroxidase-Nachweis erfolgte mit Schwein-anti-Kaninchen-IgG als Brückenantikörper und Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex der Fa. Dakopatts, Hamburg, Verdünnung 1:100 in PBS pH 7,2 (ohne NaN<sub>3</sub>).

Abblocken der endogenen Peroxidasen erfolgte durch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS (DAB-Ansatz: 10 mg DAB auf 20 ml/PBS ohne NaN<sub>3</sub> + 10 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

#### Beschichtung der Objektträger:

Fabrikneue Objektträger wurden ohne weitere Vorbehandlung mit einem Chromalaun-Gelatine-getränkten Fließpapier bestrichen und anschließend mit einem trockenen Fließpapier abgewischt. Die Objektträger konnten unmittelbar danach eingesetzt werden (PAPPAS, 1971).

#### Immunhistologische Färbung:

Eine Ejakulatprobe wurde bei 10.000 g zentrifugiert. Das Samenpellet wurde anschließend in 1% Formaldehyd/PBS zur Fixierung der Zellen suspendiert. Ein Tropfen der Suspension wurde auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht. Nach dem Antrocknen wurde mit Immunfixans nachfixiert.

Die Objektträger wurden 5 min in PBS/TWEEN 20-Puffer gewaschen. In einer feuchten Kammer wurde der jeweilige Primär-Antikörper aufgetropft. Nach 60 min wurde zweimal für je 5 min in PBS/TWEEN 20-Puffer gespült. Anschließend wurden PAP-markierte Schweine-IgG gegen Kaninchen-IgG (1:50 mit PBS-Puffer (ohne NaN<sub>3</sub>) verdünnt) aufgetropft und 25 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und die Präparate erneut zweimal 5 min im PBS/TWEEN 20-Puffer gespült. Zur Kontrolle wurde statt mit dem Erst-Antikörper mit PBS-Puffer inkubiert, der Rest der Inkubation war identisch.

Sofort nach Ende der Waschschritte wurden die Objektträger mit einem kleinen Tropfen 80%igem Glycerin beschichtet und mit einem Deckglas zugedeckt. Die Präparate wurden bis zur Durchsicht in einer lichtdichten Präparatemappe im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Auswertung der PAP-Färbung erfolgte an einem Mikroskop (Axiomat NDC, Quecksilber Höchstdruckbrenner 100 W/2, Carl Zeiss, Oberkochen). Zur fotografischen Dokumentation wurde ein Schwarzweißfilm mit 27 DIN (Ilford HP5) verwendet.

## **2.8.2. Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten**

### **Fixierung, Einbettung und Vorbereitung der Schnitte:**

Ein Teil des menschlichen Probenmaterials (Prostata und Bläschendrüse) wurde mit Bouin-Lösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. An einem Reichert-Schlittenmikrotom wurden 4-10µm dicke Schnitte hergestellt und auf Chromalaun-Gelatine-beschichtete Objektträger gebracht. Die Schnitte wurden entparaffiniert (Xylol - Isopropanol - Äthanol 96-50%). Nach kurzem Waschen in Aqua bidest. wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation in 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (45 min) blockiert.

### **Immunhistologische Färbung:**

Der immunhistologische Nachweis der TGase in den menschlichen Gewebeschnitten erfolgte unter Anwendung eines kommerziellen Streptavidin-Biotin-Kits der Firma DAKO (Hamburg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

### **Verwendete Antikörper:**

- Anti-TGase aus Ratten-Koagulationsdrüse (Kaninchen), zur Verfügung gestellt von Professor Seitz (*SEITZ et al., 1990*)
- Anti-HT (Kaninchen)
- Anti-HTa (Kaninchen)
- Anti-HTb (Kaninchen)
- Anti-HST-1 (Kaninchen)
- Anti-HST-2 (Kaninchen)
- Anti-HSA (monoklonaler Antikörper gegen Human-Serum-Albumin (Firma: Sigma, München): Clone HSA-11 (Isotyp IgG2a), Prod. Nr. A6684

Die unspezifischen Bindungsstellen wurden (je 5 min) mit dem DAKO-Blocking-Reagenz abgesättigt. Nach erneutem Spülen in PBS wurden die Schnitte über Nacht mit den o.g. Antikörpern bei 4°C inkubiert, negative Kontrollen wurde mit Präimmunserum bzw. mit PBS durchgeführt. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch 3x Spülen in



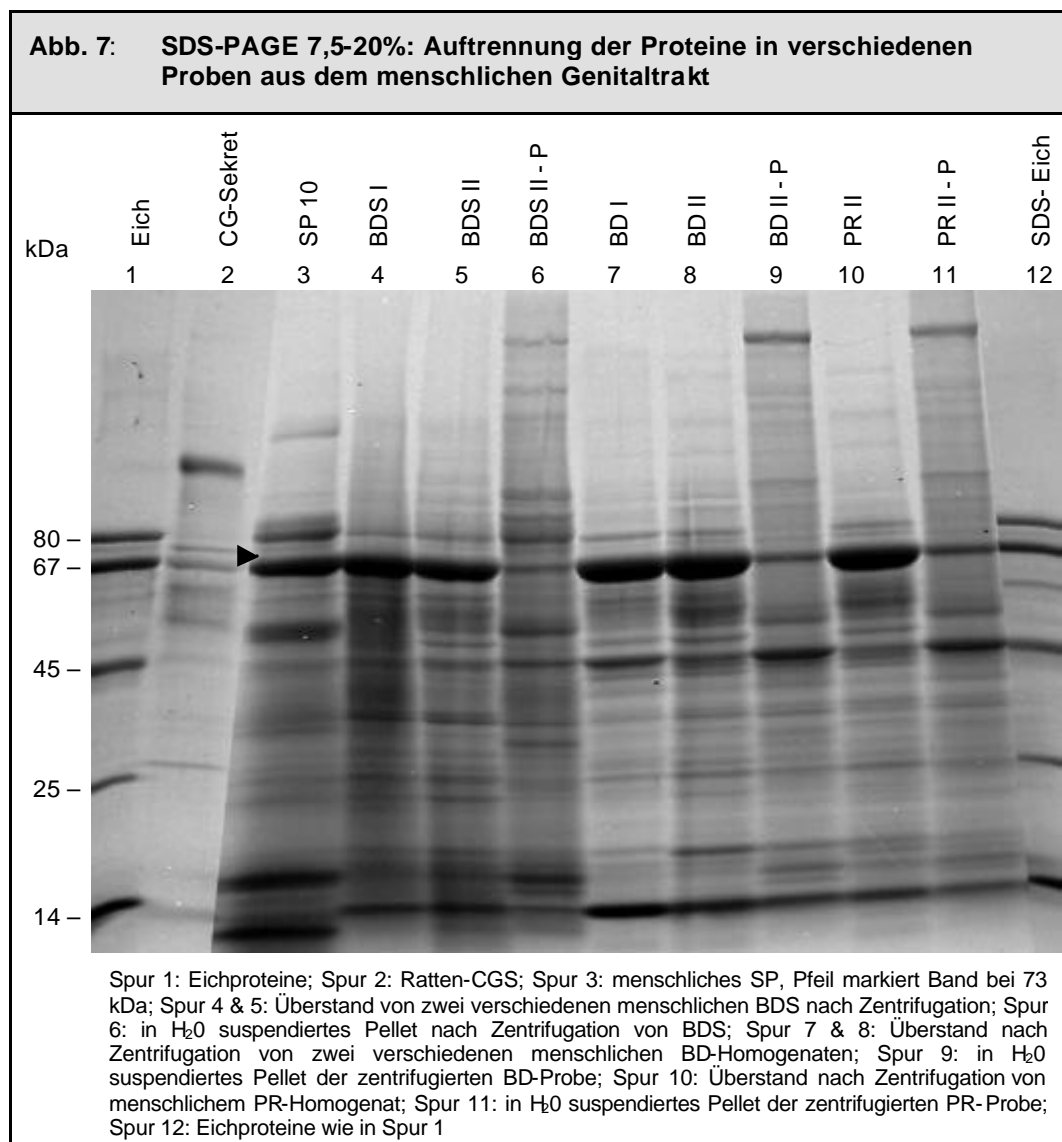
PBS wurde 30 min mit dem biotinylierten Link-Antikörper überschichtet. Auch dieser wurde anschließend durch Waschen mit PBS entfernt. Es folgte eine Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Streptavidin und schließlich der Nachweis der gebundenen Peroxidase mit DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (siehe Kap. 2.5.2.3). Zur Dokumentation auf einem Schwarzweißfilm erwies es sich außerdem als günstig, dem Peroxidase-Substrat eine Spatelspitze Ammoniumnickelsulfat zuzusetzen. Die Farbe des DAB-Niederschlags änderte sich damit von rot-braun nach schwarz. Nach ca. 5 Minuten wurde die Färbereaktion durch 3x Spülen der Schnitte in PBS und 2x in Aqua bidest beendet. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach Auftropfen von Corbit-Balsam mit einem Deckglas beschichtet.

### 3. ERGEBNISSE

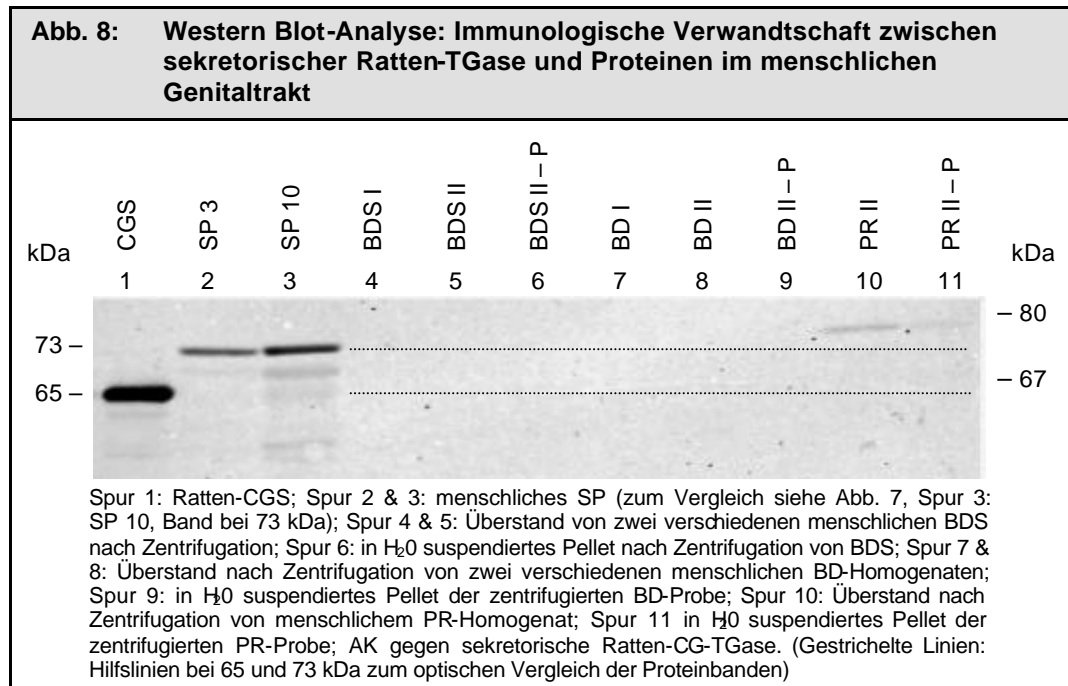
#### 3.1. Versuche zum Nachweis von sekretorischer Transglutaminase (TGase) in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und im Seminalplasma des Mannes

Als erstes sollte untersucht werden, ob sich im Genitaltrakt des Mannes eine Transglutaminase nachweisen lässt, die eine Kreuzreaktivität mit dem polyklonalen Antikörper gegen TGase aus dem Sekret der Ratten-Koagulationsdrüse (CGS) aufweist. Dazu wurden Extrakte aus dem Prostatagewebe (PR), der Bläschendrüse (BD), von deren Sekret (BDS), sowie Proben von menschlichem Seminalplasma (SP) getestet. Die optimale Quelle sollte dann für die spätere Aufreinigung der menschlichen Isoform verwendet werden.

Die Proteine in den genannten Proben wurden zunächst durch SDS-PAGE (7,5-20% Acrylamid) aufgetrennt und anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen (siehe Abb. 7).



Lediglich in den beiden Proben von menschlichem Seminalplasma SP3 und SP10 konnte eine deutliche kreuzreaktive Bande mit 73 kDa nachgewiesen werden (siehe Abb. 8). In den Gewebeextrakten der Prostata war eine sehr schwache Bande geringfügig oberhalb von 73 kDa (bei ca. 77 kDa) zu erkennen. In den Proben aus der Bläschendrüse konnte kein Protein gefunden werden, das mit dem Antikörper gegen die Ratten-TGase reagierte.



#### Zusammenfassung:

- ◆ In einigen Proben von menschlichem Seminalplasma wurde ein 73 kDa-Protein identifiziert, das eine starke Kreuzreaktion mit dem Antikörper gegen die sekretorische TGase aus der Ratten-CG besitzt. Diese Seminalplasmaproben sind somit ein geeignetes Ausgangsmaterial zur Isolierung der menschlichen sekretorischen TGase.
- ◆ In der Prostata ist lediglich eine schwache Kreuzreaktion oberhalb von 73 kDa bei ca. 77 kDa zu erkennen.

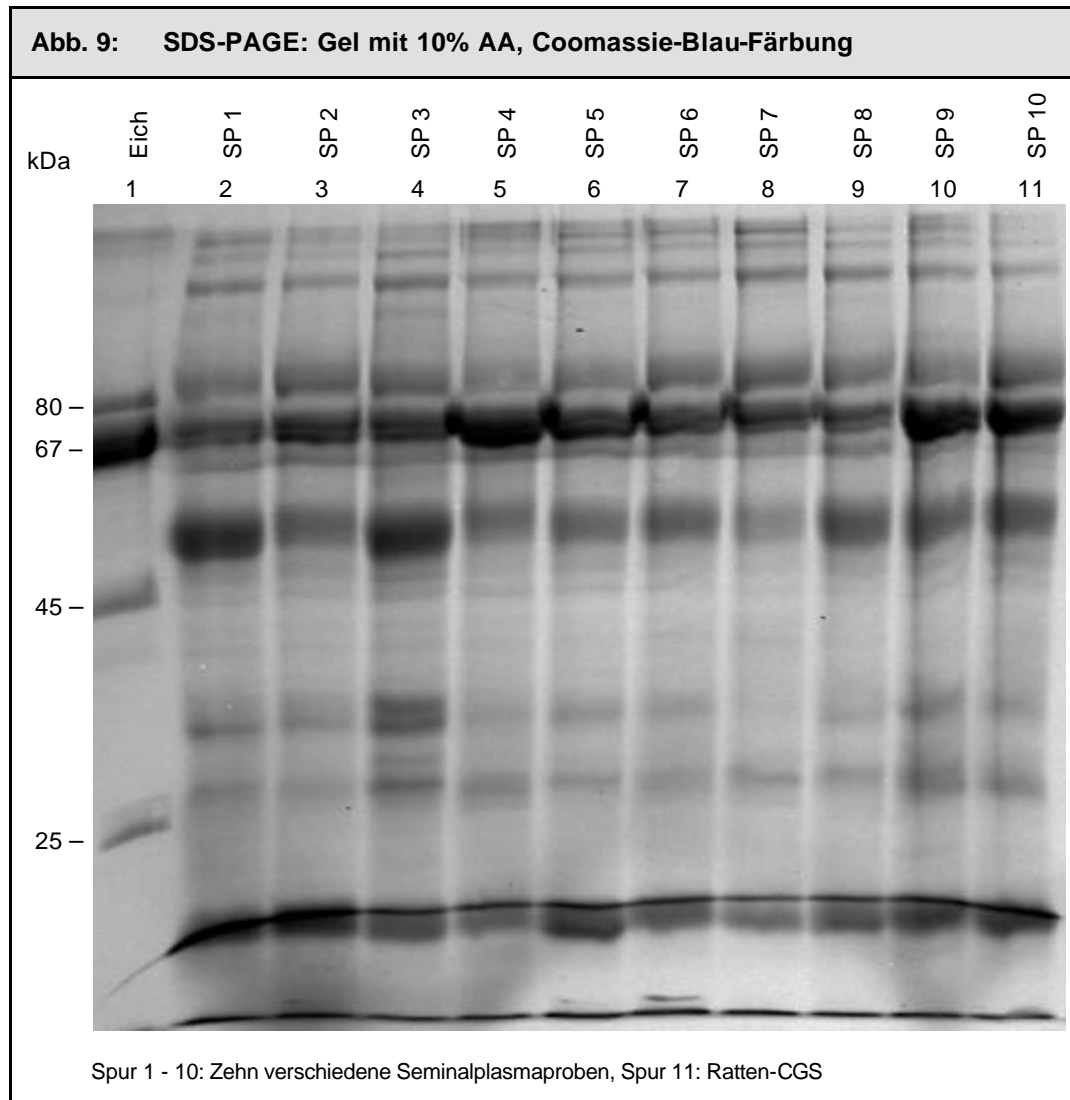
### 3.2. Bestimmung der optimalen SDS-PAGE-Gelkonzentration für die Auftrennung der Seminalplasmaproteine

Es wurden 143 verschiedene Ejakulatproben (teils eingefroren, teils frisch) von Patienten im Alter von 17 bis 57 Jahren (Durchschnittsalter: 31,8 Jahre) getestet. Sowohl gesamtes Seminalplasma als auch mit Triton X100 extrahierte Spermienpellets wurden verwendet (s. 2.5.4.5). Die Proteinkonzentration der Ejakulatproben wurde mit dem modifizierten Bradford-Test bestimmt (s. 2.5.1.). Der Proteingehalt des vorhandenen Seminalplasmas betrug zwischen 3,8 - 44,8 mg/dl, im Durchschnitt 18,7 mg/dl. Das Ejakulatvolumen lag zwischen 1 - 10 ml, im Durchschnitt 3,9 ml. Die Spermatozoenzahlen bewegten sich zwischen 0 - 129 Mill./ml. Es stand also genügend Material für die beabsichtigten Untersuchungen zur Verfügung.

Es wurden zunächst unterschiedliche SDS-PAGE-Gelkonzentration mit dem Ziel getestet, eine optimale Trennung der Proteine im Bereich von 60-90 kDa zu erreichen, in dem die seminale TGase zu erwarten war.

**SDS-PAGE: Gel mit 10% Acrylamid (AA)**

Zehn tiefgefrorene Ejakulatproben wurden wie unter 2.5.4.5 beschrieben vorbereitet und in einem 10%igen Acrylamidgel (s.u. 2.5.2.1.) aufgetrennt. Nach Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau waren über 26 verschiedene Banden (s. Abb. 9) zu erkennen.

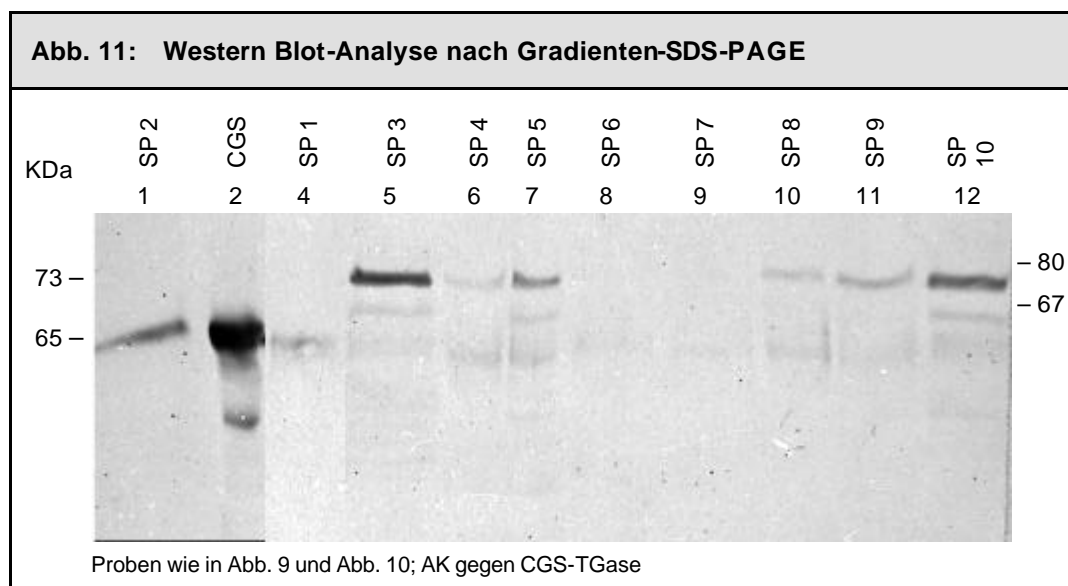
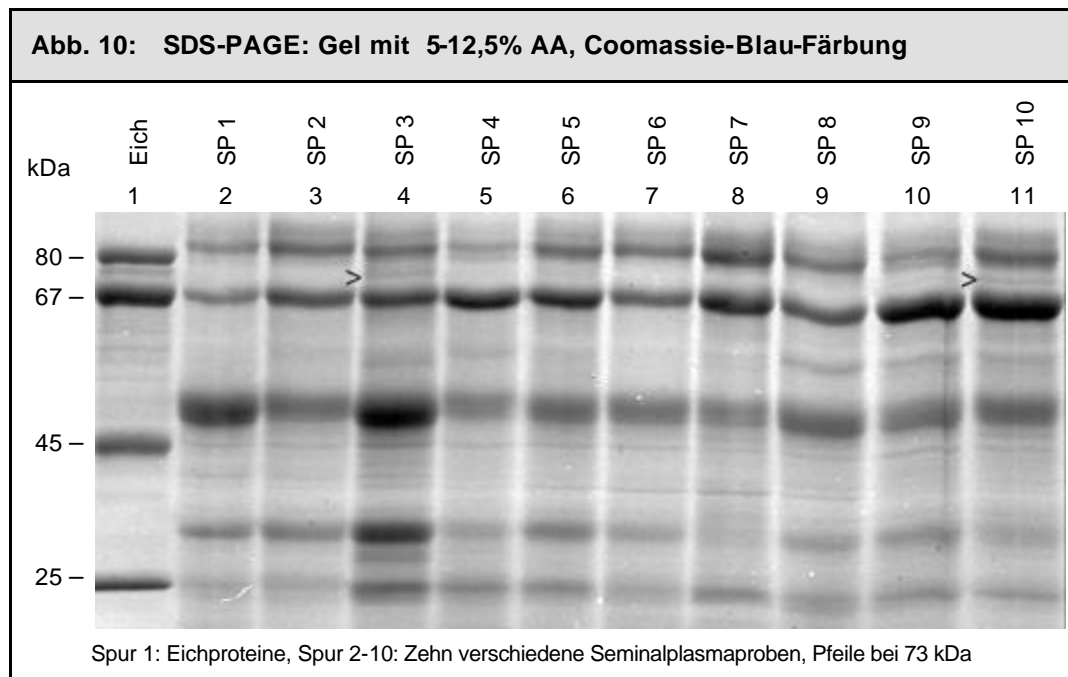


Die Separation in dem interessanten Molekulargewichtsbereich war jedoch sehr unbefriedigend: die Banden gingen teilweise ineinander über und ließen sich somit nicht eindeutig voneinander abgrenzen.

**SDS-PAGE: Gradientengel mit 5-12% Acrylamid (AA)**

Das Gradientengel (5-12% AA) ergab eine deutlich bessere Auftrennung der Proteine (Abb. 10, gleiche Proben wie in Abb. 9), besonders auch im Bereich zwischen 67 und 80 kDa. Mit denselben Proben wurde nach entsprechender Elektrophorese eine Western Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen die TGase aus der Koagulationsdrüse

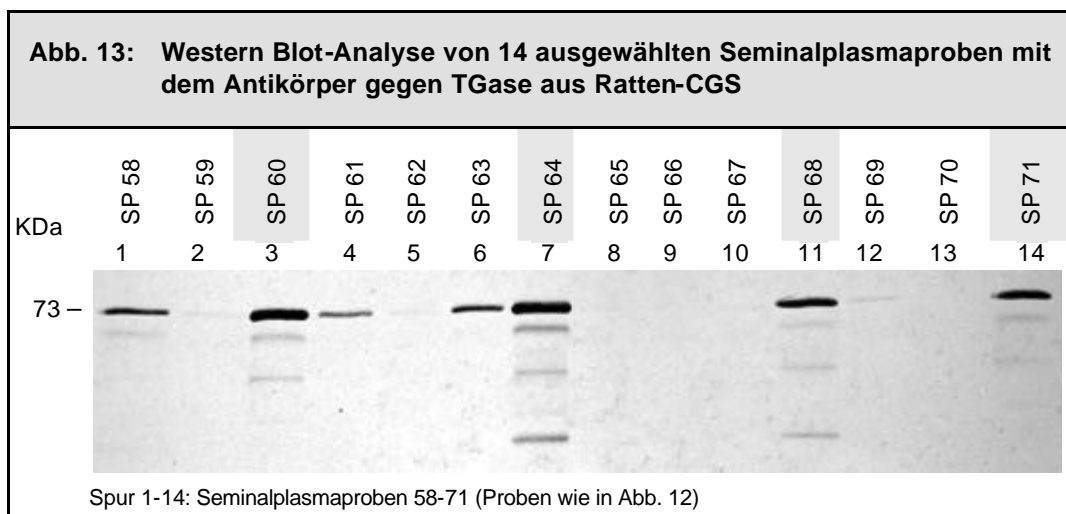
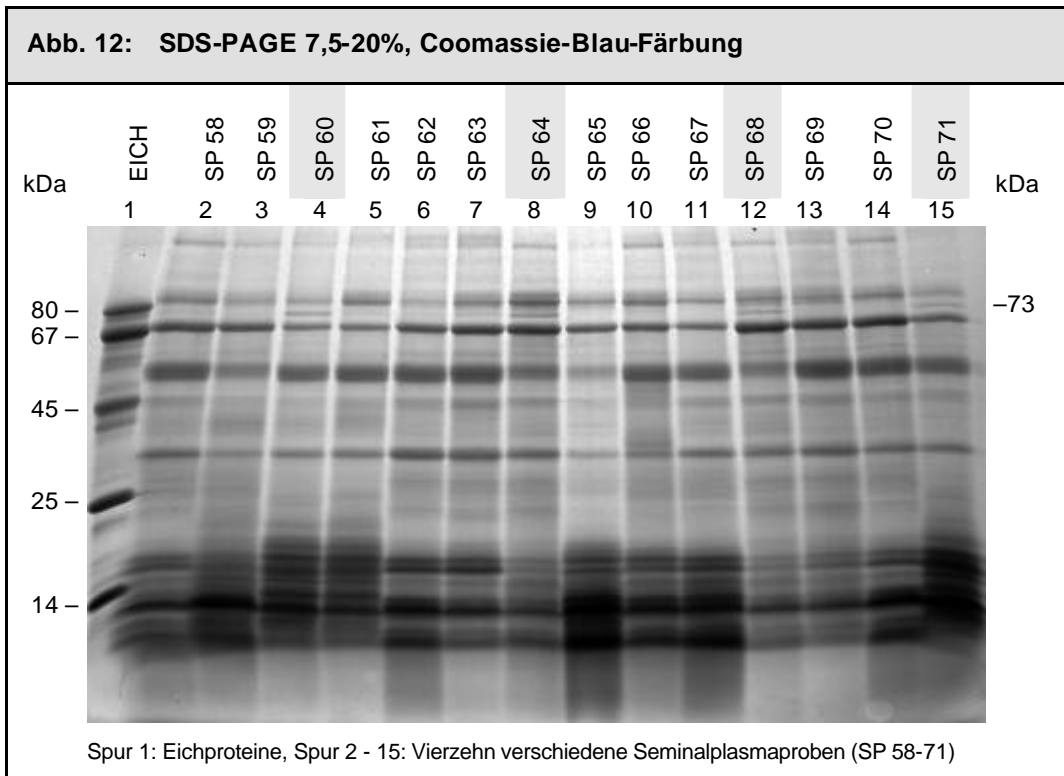
durchgeführt (s. Abb. 11). Als Referenz wurde CGS der Ratte eingesetzt, die die sekretorische TGase mit 65 kDa enthält. Bei fünf der zehn menschlichen Ejakulatproben konnte eine immunologisch reaktive Bande mit 73 kDa identifiziert werden.



**SDS-PAGE: Gradientengel mit 7,5-20% Acrylamid (AA)**

Nach Auftrennung von 14 Seminalplasmaproben in einem SDS-Gradientengel (7,5-20% AA) waren die Proteinbanden zwischen 67 und 80 kDa noch deutlicher zu differenzieren (s. Abb. 12).

Die Western Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen die Ratten-CGS-TGase zeigte in 7 Fällen wieder das Hauptprotein bei 73 kDa. Zusätzlich waren in einigen Proben auch immunologisch kreuzreaktive Abbaubanden (s. Abb. 13) zu erkennen.



**Zusammenfassung:**

- ◆ Eine SDS-PAGE in einem Gradientengel mit 7,5-20% AA erlaubte eine sehr gute Auftrennung der Seminalplasmaproteine im Bereich zwischen 67 und 80 kDa.
- ◆ Etwa die Hälfte der getesteten Proben enthielt ein Protein mit 73 kDa, das mit dem Antikörper gegen CGS-TGase der Ratte kreuzreagierte.
- ◆ In einigen Proben waren auch immunpositive Abbaubanden nachzuweisen.

**3.3. Auswertung der Western Blot-Analyse aller Seminalplasmaproben**

Nachdem nun das optimale Gelsystem für die Trennung der Seminalplasmaproben feststand, wurden 143 verschiedene Samenflüssigkeiten auf TGase-Immunreaktivität untersucht.

In 63% der untersuchten Proben (= 90 Proben) konnte eine positive Bande mit 73 kDa nachgewiesen werden. Zur genaueren Differenzierung wurde je nach Stärke der Immunreaktionen eine Einteilung in stark, mittel, schwach und negativ vorgenommen. (s. Tab. 3).

<b>Tab. 3: Kreuzreaktivität von sekretorischer Anti-TGase der Ratte gegen menschliche Seminalplasmaproben im Western Blot</b>		
Stärke der 73 kDa -Bande	Anzahl	Prozent
stark	22	15,4
mittel	32	22,4
schwach	36	25,2
negativ	53	37
Summe	143	100

In 21 der 90 Proben, die eine Hauptbande mit 73 kDa aufwiesen, wurden zusätzliche Abbaubanden unterhalb dieses Wertes gefunden. Sie waren entsprechend Tab. 3 entweder als mittel oder schwach einzustufen (s. Tab. 4).

<b>Tab. 4: Kreuzreaktivität unterhalb 73 kDa von sekretorischer Anti-TGase der Ratte gegen menschliche Seminalplasmaproben im Western Blot</b>		
Reaktionsstärke der Abbaubanden	Anzahl	Prozent
stark	0	0
mittel	4	4,4
schwach	17	18,9
negativ	69	76,7
Summe	90	100

Von 13 Männern lagen mehrere zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnene Ejakulatproben vor. Tab. 5 fasst die Daten dieser Proben zusammen.

Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass die Seminalplasmaproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten von demselben Probanden gespendet worden waren, sich sowohl in Volumen (maximale Differenz 1,5 ml) als auch in der Proteinmenge und der immunologischen Reaktivität der TGase sehr ähneln. Dies galt sowohl für die Hauptbande bei 73 kDa als auch für deren Abbaubanden.

**Zusammenfassung:**

- ◆ Bei den Proben mit einer starken 73kDa-Bande fanden sich auch die meisten Abbaubanden. Diese reagierten jedoch immer schwächer mit dem Antikörper gegen die Ratten-CGS-TGase.
- ◆ Ejakulatproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten von demselben Probanden gespendet worden waren, zeigten kaum Unterschiede in der immunologischen Reaktivität. Dies galt sowohl für die Hauptbande bei 73 kDa als auch für die Abbaubanden.
- ◆ Volumen, Proteinkonzentration (mg/ml) und Gesamtproteingehalt blieben bei den Mehrfachspenden jeweils fast konstant.

**Tab. 5: Probanden mit mehr als 1 Ejakulatabgabe: Angaben zum Patientenalter, Abstand zwischen den Proben, Volumen des Ejakulats und Proteinmenge sowie Reaktionsbanden bei und unterhalb 73 kDa**

Proband	Alter des Probanden bei Probe-Abgabe (Jahre)	Abstand zwischen Proben (Tage)	Kreuzaktivität bei 73 kDa	Banden unter 73 kDa	Ejakulat-Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamt-Protein (mg)
1	37		schwach	negativ	4	18,8	75,2
	37	44	mittel	negativ	4	17,8	71,2
2	36		negativ	negativ	4	16,25	65
	36	40	schwach	negativ	3	13,75	41,25
3	34		schwach	negativ	5,5	14,75	81,13
	34	139	negativ	negativ	5	14,75	73,75
4	30		stark	negativ	3,2	22,5	72
	30	26	stark	schwach	3,2	21,75	69,6
	32	438	mittel	negativ	4	23	92
5	27		mittel	schwach	3,5	7,4	25,9
	29	391	stark	negativ	4	6,55	26,2
6	28		mittel	negativ	2	44,8	89,6
	30	522	mittel	negativ	3	30,5	91,5
7	27		negativ	negativ	4	23	92
	29	489	negativ	negativ	3,2	25,3	80,96
8	27		stark	mittel	5	8,25	41,25
	27	15	stark	mittel	5	15,75	78,75
9	28		schwach	negativ	5	27,5	137,5
	28	26	negativ	negativ	6,5	19,3	125,45
10	25		stark	schwach	8,5	3,86	32,81
	26	266	mittel	negativ	10	14,75	147,5
11	27		schwach	negativ	2,5	29,5	73,75
	27	29	schwach	negativ	2	34,8	69,6
12	27		mittel	negativ	2	21	42
	27	26	stark	schwach	2,8	21,3	59,64
13	23		mittel	schwach	4	26,75	107
	24	354	mittel	negativ	5	23,3	116,5

### 3.4. Reinigung der löslichen seminalen Transglutaminase

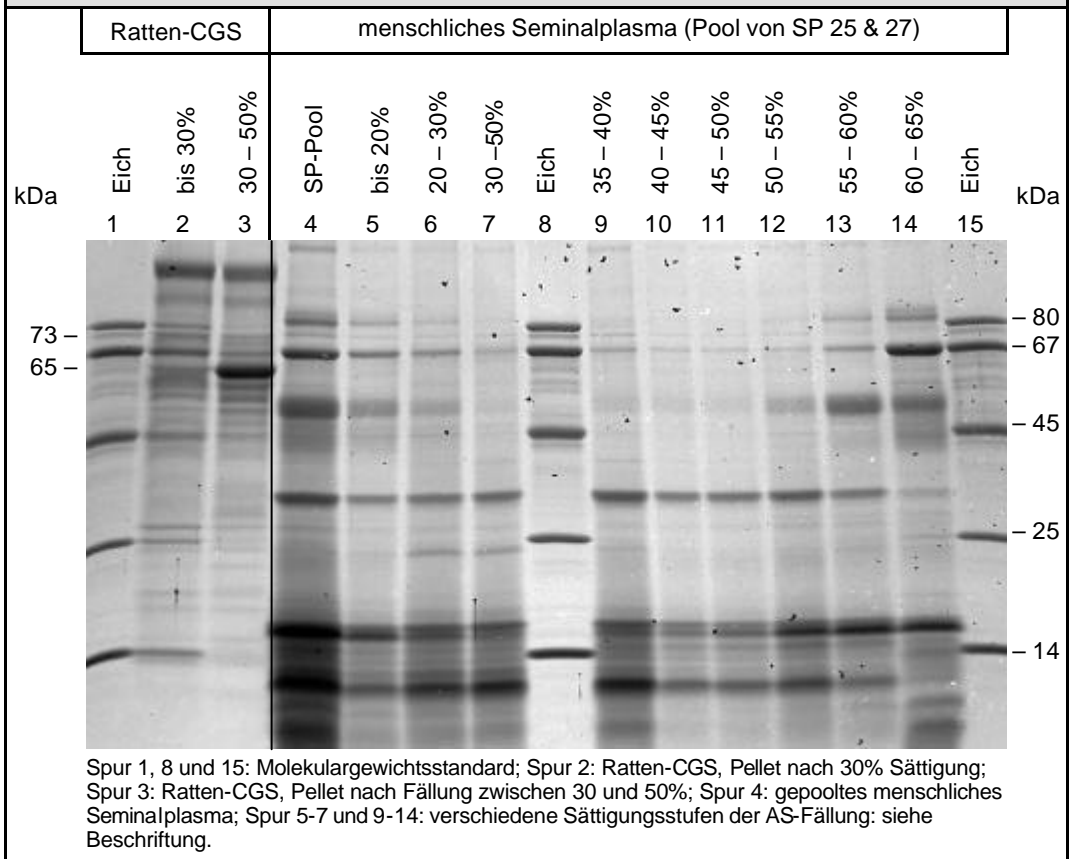
#### 3.4.1. Ammoniumsulfatfällung

Um die TGase anzureichern, wurde eine fraktionierte Salzfällung mit Ammoniumsulfat (Konzentrationen bis 80%) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten gepoolte Seminalplasmaproben, die im Western Blot-Verfahren mit dem Ratten-CGS-TGase-AK eine deutliche Bande bei 73 kDa aufgezeigt hatten. Sie wurden, wie in Kap. 2.5.4.5 beschrieben, aufbereitet.

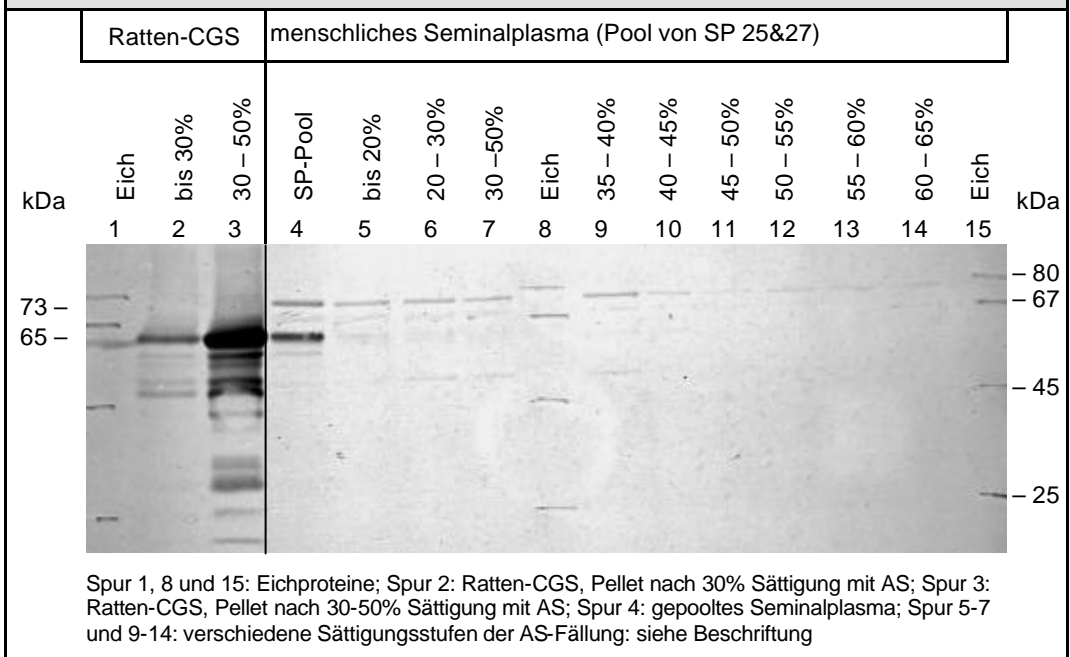
Nach Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat wurde das Salz durch eine Dialyse entfernt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE in einem Gradientengel mit 7,5-20% AA aufgetrennt und durch Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein der 73 kDa-Bande untersucht. Für jede Fraktion wurde entsprechend Kap. 2.5.3 die TGase-Enzymaktivität bestimmt. Ziel war, die optimale Ammoniumsulfatkonzentration zu ermitteln, mit der das Enzym aus dem Ausgangsmaterial gefällt wurde. Die Analyse der fraktionierten Fällung der gepoolten Fraktionen SP 25 und 27 ist in Abb. 14 und 15 dargestellt.



**Abb. 14: SDS-PAGE (7,5-20%): fraktionierte Ammoniumsulfatfällung der TGasen aus Ratten-CGS und aus menschlichem Seminalplasma**



**Abb. 15: Western Blot-Analyse der AS-Fällungen**



Zum Vergleich wurde eine fraktionierte Fällung der TGase aus Ratten-Koagulationsdrüsensekret (CGS) durchgeführt, deren optimaler Präzipitationsbereich schon aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe bekannt war.

Die Western Blot-Analyse (Abb. 15) zeigt, dass die CGS-TGase der Ratte im bekannten Sättigungsbereich von 30-50% Ammoniumsulfat (Spur 3) gefällt wird (vergleiche: *SEITZ et al., 1987*). Die intensive Reaktion in Spur 3 ist auf das Auftragen einer zu großen Menge an Protein zurückzuführen. Dadurch wurden auch Proteolysefragmente aus der 65 kDa-Bande sehr viel deutlicher sichtbar. Gleichzeitig führte das Überladen der Spur dazu, dass ein Teil des Ratten-TGase-Antigens in die Spur 4 (SP-Pool) geriet, so dass neben der relativ schwachen 73 kDa-Bande auch artifiziell dazugekommene Ratten-CG-TGase mit dem detektierenden Antikörper reagierte. Die im Seminalplasma befindliche menschliche TGase selbst fällt überwiegend bei einer Sättigung mit Ammoniumsulfat von etwa 40% aus, allerdings sind auch noch schwache 73 kDa-Banden in höheren Sättigungsbereichen von 40-80% zu erkennen.

In der hier aufgeführten AS-Fällung von gepooltem Seminalplasma wurden eine TGase-Enzymaktivitätsmessung der Fraktionen im Sättigungsbereich von 0-40% durchgeführt. Die Fraktionen des Bereiches über 40%-Sättigung wurden nicht untersucht, da im Gegensatz zum Sättigungsbereich 0-40% diese Fraktionen im Western Blot kaum immunreaktive Banden mit dem Ratten-CGS-TGase-AK aufwiesen. Die Ausbeute der Fraktionen 0-40% betrug nur 21% der Ausgangsaktivität (s. Tab. 6).

<b>Tab. 6: TGase-Aktivitätsmessung einer Ammoniumsulfatfällung von gepoolten Seminalplasmen</b>						
Probe	Ausgangs- volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Spez. Aktivität (nU/mg)	Gesamt - nU	nU/ml	% Ausbeute
Zwei gepoolte Seminalplasma- proben	10	2,30	1,111	25,546	2,555	100,0
0-20%	0,5	0,79	3,262	1,288	2,577	5,0
20-30%	0,5	2,96	1,018	1,507	3,013	5,9
30-35%	0,5	7,30	0,525	1,917	3,835	7,5
35-40%	0,5	8,50	0,154	0,653	1,307	2,6
Summe 0-40%						21,0

Der Grund für diese geringe Ausbeute (Gesamt-nU) ist eventuell darin begründet, dass die Salze, die zur Proteinfällung benutzt wurden, eine hemmende Wirkung besitzen könnten. Bezogen auf die spezifische Aktivität (nU/mg), findet man in der Fraktion 0-20% mit 3,26 nU/mg eine dreifache Anreicherung im Vergleich zum Ausgangsmaterial (1,11 nU/mg).

**Zusammenfassung:**

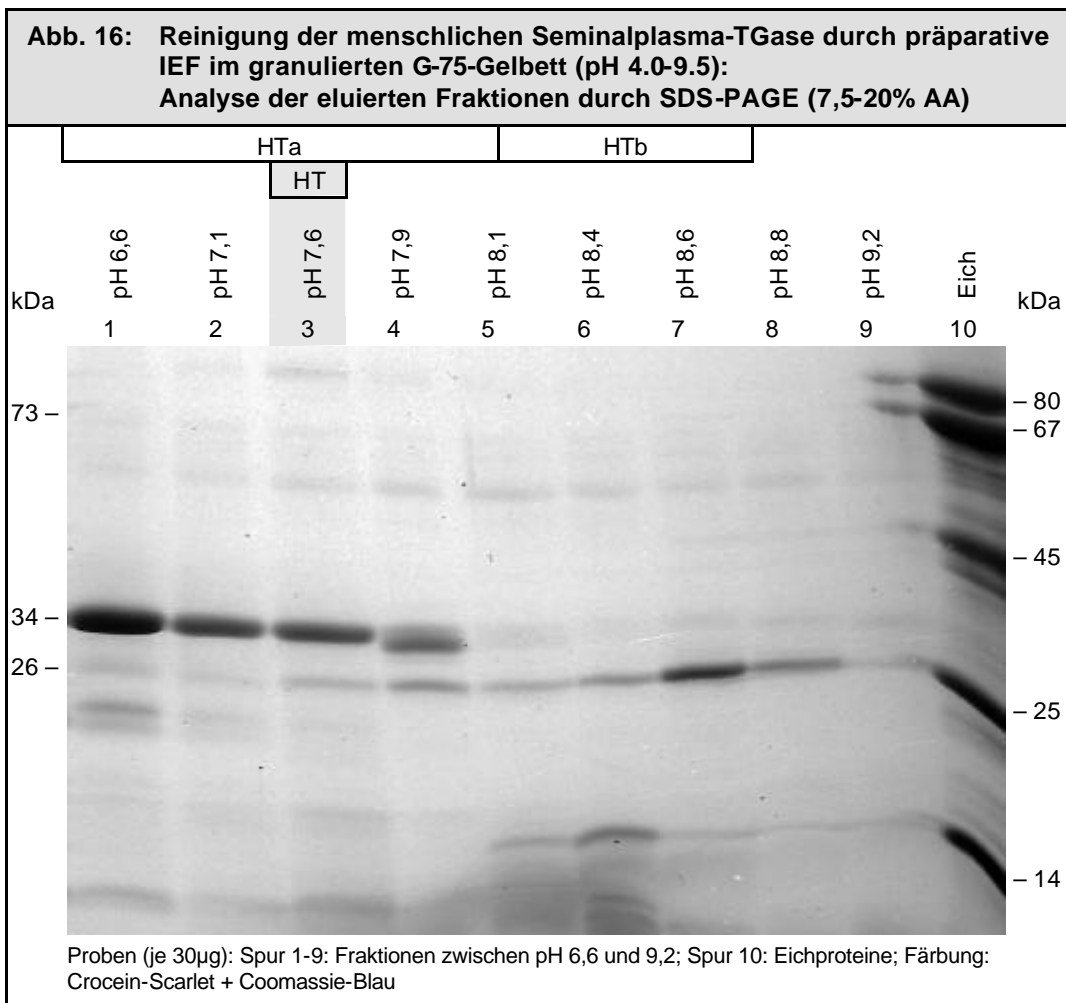
- ◆ Der überwiegende Teil der im menschlichen Seminalplasma enthaltenen TGase kann nach Sättigung mit 40% Ammoniumsulfat gefällt werden.
- ◆ Nach der Ammoniumsulfatfällung im Sättigungsbereich 0-40% beträgt die Ausbeute nur etwa 21%.
- ◆ Im Sättigungsbereich 0-20% kommt es zu einer dreifachen Anreicherung der TGase-Aktivität.

### 3.4.2. Präparative Isoelektrische Fokussierung

Nach Sättigung der Seminalplasmaprobe mit 40% Ammoniumsulfat wurden neben der TGase (73 kDa) auch noch weitere kontaminierende Proteine kopräzipitiert.

Um die TGase in homogener Form zu erhalten, wurde eine präparative Isoelektrische Fokussierung in einem granulierten Gelbett durchgeführt, die sich auch schon bei der Reinigung der Ratten-TGase bewährt hatte. Nach Ende der Fokussierung wurden die mit dem Gitterrahmen herausgestochenen Fraktionen zunächst mit Aqua bidest. eluiert. Eine anschließende Elution der Gelmatrix mit STM/DTE/KSCN und 1 M NaCl erbrachte keine Verbesserung der Ausbeute. Der pH-Wert jeder wässrigen Probe wurde mit einer Kontaktelektrode gemessen. Dann wurden sie durch Dialyse von den Ampholyten befreit und schließlich mittels Gefriertrocknung auf ca. 300µl konzentriert.

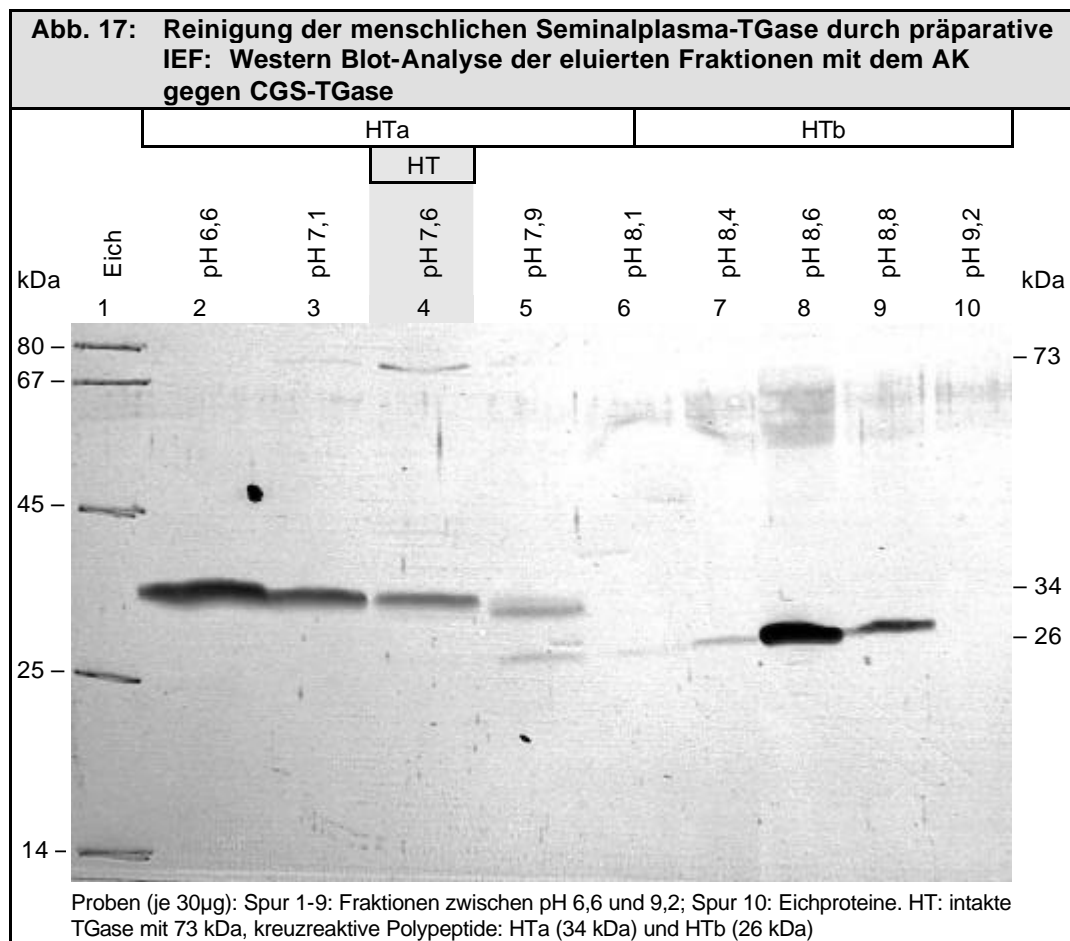
Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (Gradientengel 7,5-20% AA) und Western Blot-Analyse analysiert. Auf dem mit Crocein-Scarlet und Coomassie gefärbten Gel (Abb. 16) ist zu erkennen, dass neben einigen kleineren Verunreinigungen in den Fraktionen zwischen pH 6 und 8 ein Polypeptid (HTa) nachzuweisen war, dessen Molekulargewicht 34 kDa beträgt. Etwa ab pH 7 ist dagegen ein etwas kleineres Protein (HTb) mit 26 kDa dominierend.



Die anschließende Western Blot-Analyse (Abb. 17) ergab, dass beide Polypeptide mit dem Antiserum gegen die Ratten-CGS-TGase reagierten. Es handelt sich offensichtlich um immunreaktive Proteolysefragmente, die während der isoelektrischen Fokussierung unter Einfluss einer seminalen Protease (möglicherweise dem Prostata-spezifischen Antigen, PSA) entstanden waren. Das intakte 73 kDa-Protein (HT) wurde ausschließlich in Fraktion 4 bei einem pH-Wert von 7,6 gefunden. Daraus kann geschlossen werden, dass der isoelektrische Punkt der menschlichen seminalen TGase etwa bei diesem pH-Wert liegen muss.

**Zusammenfassung:**

- ◆ Die intakte seminale TGase (HT: 73 kDa) fokussiert bei pH 7,6.
- ◆ Zwei Polypeptide, die mit dem Antiserum gegen CGS-TGase reagieren, waren zwischen pH 5,9 und 8,0 (HTa: 34 kDa) bzw. zwischen pH 8,0 und 8,8 (HTb: 26 kDa) nachzuweisen.

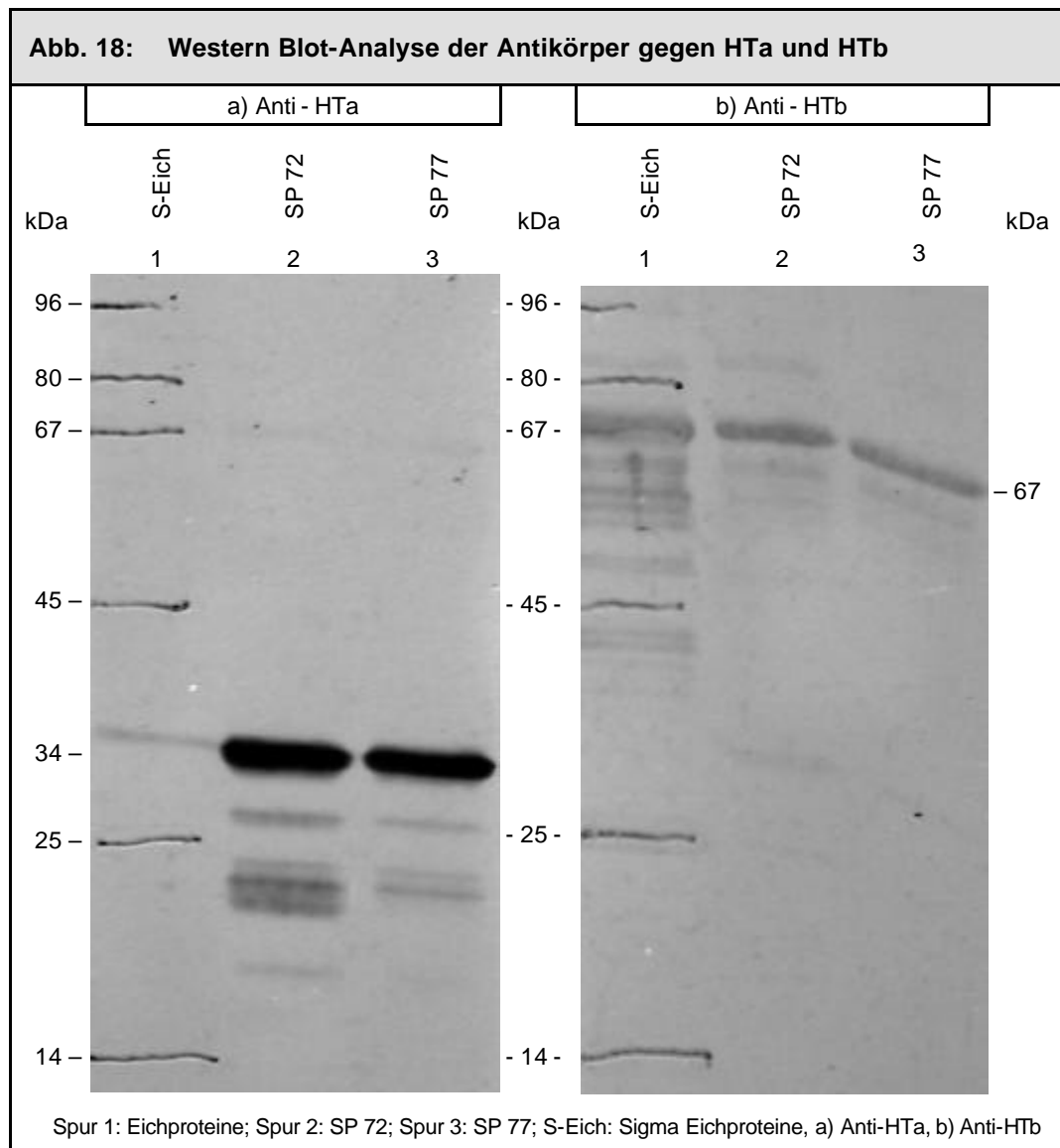


**3.5. Herstellung von Antikörpern gegen HT, HTa und HTb**

Die bei der isoelektrischen Fokussierung (s. 2.6.3.) angereicherten Polypeptide HT: (73 kDa), HTa (34 kDa) und HTb (26 kDa) wurden zur Antikörperherstellung jeweils einem Kaninchen injiziert.

Der Antikörper gegen HT reagierte im Western Blot-Verfahren nicht wie erwartet mit einer Bande im Bereich vom 73 kDa, sondern mit einem unbekanntem Protein bei 100 kDa, sowie mit einigen Banden zwischen 70 und 50 kDa, bei denen es sich wahrscheinlich um Formen von menschlichem Keratin handelte. Er wurde deshalb nicht weiter verwendet.

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper gegen HTa und HTb wurden zwei Seminalplasmaproben (SP 72 und SP 77) verwendet, die mit dem Antikörper gegen die TGase aus der Ratten-Koagulationsdrüse positiv reagiert hatten (siehe Abb.18). Zur Kontrolle wurden die gleichen Proben mit den jeweiligen Präimmunsereen getestet, hier zeigten sich jedoch keinerlei Reaktionen mit Antigenen im Seminalplasma.



Das Antiserum gegen HTa zeigt eine deutliche Reaktion mit der 34 kDa Bande, färbt aber auch mit einigen kleineren Polypeptiden im Bereich vom 30-18 kDa. Der Antikörper reagierte jedoch nicht mit dem 73kDa-Protein. Da keine aktuelle Kontrolle der beiden SP-Proben mit dem Antikörper gegen CGS-TGase durchgeführt wurde, kann nicht entschieden werden, ob das intakte Enzym in der Zwischenzeit degradiert worden war

oder ob Anti-HTa eine abweichende Spezifität besitzt (d.h. nur das kleinere Polypeptid mit 34 kDa erkennt).

Anti-HTb reagiert deutlich mit einem 67 kDa-Protein im Seminalplasma und schwächer mit kleineren Proteinen bis 30 kDa. Außerdem färbt das Antiserum auch sehr intensiv das Eichprotein Serumalbumin und dessen größere Proteolysefragmente.

### **3.6. Optimierung der Enzymaktivitätsmessung für die seminale TGase**

Um die TGase in menschlichen Ejakulatproben zu bestimmen, wurde der von *EGBRING et al. (1973)* beschriebene Test zur Quantifizierung der Faktor XIII-Aktivität in verschiedenen Parametern modifiziert. Basis des Tests ist die kovalente Verknüpfung von  $^{14}\text{C}$ -Putrescin mit dimethyliertem Casein.

#### **Einfluss von pH und Puffersystem auf die Aktivität der seminalen TGase**

Zunächst wurde die Zusammensetzung und der pH-Wert des Testpuffers variiert. Als Proben verwendet wurden jeweils eine Leerprobe, frisches Seminalplasma, drei längere Zeit eingefrorene Seminalplasmaproben, Sekret der Ratten-Koagulationsdrüse sowie ein Extrakt aus kultivierten Ratten-Hodenzellen (enthalten gewebsständige TGase in den Peritubulärzellen), der von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde (*HÜNTEMANN, 1987*).

Die Tabellen 7a und 7b zeigen, dass die spezifische TGase-Aktivität der Seminalplasmaproben unabhängig von der Aufbewahrungsart und dem Puffer im pH-Bereich von 8-9 am höchsten ist. Längeres Einfrieren der Proben führt in allen Fällen zu einem Aktivitätsverlust von 80 bis mehr als 90%. Die gewebsständige Hoden-TGase der Ratte zeigt bei Messung in Gegenwart von HEPES-Puffer (pH 8,5) die maximale spezifische Aktivität. In Gegenwart von TRIS-Puffer (pH 9,0) liegt sie leicht höher (s. Tab. 7a). Auch hier führte das kurzzeitige Einfrieren der Proben zu einem leichten Aktivitätsabfall. Die CGS-TGase hat in Gegenwart von HEPES-Puffer ihre maximale spezifische Aktivität bei pH 8,5.

Als Konsequenz dieser Messungen wurde für die weitere Quantifizierung der menschlichen seminalen TGase HEPES-Puffer mit pH 8,5 verwendet.

#### **Einfluss der $\text{CaCl}_2$ -Konzentration auf die TGase-Aktivität**

Calciumionen sind für die Enzymaktivität der TGase essentiell. Untersuchungen unserer (aber auch anderer) Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die optimale Calciumkonzentration für jede Isoform verschieden ist. Deshalb wurde zur Verbesserung des Enzymtests auch für die seminale TGase die optimale Menge des Kations im Konzentrationsbereich zwischen 1mM - 10mM gesucht (s. Tab. 8).

**Tab. 7a: TGase-Enzymaktivitätsmessung\* – Einfluss von Puffersystem und pH-Wert (Teil 1)**

Probe	17 Tage eingefrorenes Koagulationsdrüsensekret der Ratte			2 Tage eingefrorenes Extrakt aus Hoden-Zellen			15 Tage eingefrorenes Extrakt aus Hoden-Zellen			1,5 Jahre eingefrorenes Seminalplasma, Probe 1			1,5 Jahre eingefrorenes Seminalplasma, Probe 2		
	(nU/ml)	(nU)	(nU/mg)	(nU/ml)	(nU)	(nU/mg)	(nU/ml)	(nU)	(nU/mg)	(nU/ml)	(nU)	(nU/mg)	(nU/ml)	(nU)	(nU/mg)
HEPES 7,5	326,31	1631,53	38,39	9,30	46,50	13,29	24,76	123,82	44,22	1,40	7,73	0,06	0,66	3,96	0,05
HEPES 8,0	354,08	1770,40	41,66	22,22	111,11	31,75	52,39	261,97	93,56	1,00	5,51	0,04	1,55	9,31	<b>0,12</b>
HEPES 8,5	726,18	3630,91	<b>85,43</b>	35,52	177,59	50,74	98,77	493,84	<b>176,37</b>	2,02	11,09	<b>0,08</b>	0,70	4,21	0,05
HEPES 9,0	642,95	3214,76	75,64	36,45	182,26	<b>52,08</b>	88,77	443,84	158,52	1,98	10,87	<b>0,08</b>	0,37	2,22	0,03
HEPES 9,5	657,73	3288,66	77,38	19,26	96,30	27,52	48,06	240,29	85,82	0,38	2,09	0,02	0,00	0,00	0,00
TRIS 8,0	541,42	2707,12	63,70	18,87	94,36	26,96	49,40	247,01	88,22	1,14	6,28	0,05	0,00	0,00	0,00
TRIS 8,5	542,07	2710,33	63,77	11,40	57,02	16,29	23,87	119,37	42,63	0,45	2,46	0,02	0,00	0,00	0,00
TRIS 9,0	787,48	3937,40	92,64	39,39	196,96	<b>56,27</b>	81,21	406,05	<b>145,02</b>	1,23	6,76	0,05	0,53	3,21	0,04
TRIS 9,5	791,22	3956,12	<b>93,09</b>	32,85	164,23	46,92	68,40	341,98	122,14	1,31	7,19	0,05	2,35	14,11	<b>0,18</b>
Volumen (ml)	5,0			5,0			5,0			5,5			6,0		
Proteinkonz. (mg/ml)	8,50			0,70			0,56			25,00			13,25		
Gesamtprotein (mg)	42,50			3,50			2,80			137,50			79,50		

\* - nU/ml = Volumen-Aktivität, nU = Gesamt-Units, nU/mg = Spez. Aktivität

Tab. 7b: TGase-Enzymaktivitätsmessung* – Einfluss von Puffersystem und pH-Wert (Teil 2)															
Probe	15 Tage eingefrorenes Koagulationsdrüsensekret			frisches Extrakt aus Hoden-Zellen			13 Tage eingefrorenes Extrakt aus Hoden-Zellen			27 Monate eingefrorenes Seminalplasma			25 Monate eingefrorenes Seminalplasma		
	nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg
HEPES 7,5	319,73	1598,66	37,62	17,37	86,83	24,81	15,95	79,73	28,47	1,93	10,60	0,26	5,61	47,66	1,45
HEPES 8,0	505,26	2526,32	59,44	18,35	91,76	26,22	30,00	150,02	53,58	2,90	15,93	0,39	6,38	54,23	<b>1,65</b>
HEPES 8,5	683,72	3418,61	<b>80,44</b>	44,93	224,67	<b>64,19</b>	39,13	195,65	<b>69,87</b>	5,57	30,63	<b>0,76</b>	5,15	43,73	1,33
TRIS 8,0	526,31	2631,57	61,92	26,98	134,92	38,55	32,37	161,84	57,80	1,27	6,98	0,17	4,75	40,37	1,23
TRIS 8,5	675,26	3376,32	79,44	42,69	213,47	60,99	53,93	269,67	<b>96,31</b>	2,30	12,64	0,31	3,38	28,70	0,87
Volumen (ml)	5,00			5,00			5,00			5,50			8,50		
Proteinkonz. (mg/ml)	8,50			0,70			0,56			7,35			3,86		
Gesamtprotein (mg)	42,50			3,50			2,80			40,43			32,81		

\* - nU/ml = Volumen-Aktivität, nU = Gesamt-Units, nU/mg = Spez. Aktivität



Tab. 8: Einfluss der CaCl <sub>2</sub> -Konzentration auf die TGase-Aktivität							
Probe		6 Wochen lang eingefrorene Seminalplasmaprobe			20 Tage lang eingefrorene Hoden-Zellen		
CaCl <sub>2</sub> -Konzentration (mMol)		nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg
Ausgangs-Konzentration (150µl)	Endkonzentration in der Probe (850µl)						
10	1,76	0,39	1,10	0,02	138,34	691,71	247,04
9	1,59	1,08	3,01	0,05	127,46	637,30	227,61
8	1,41	1,03	2,87	0,05	141,15	705,75	252,05
7	1,24	0,68	1,89	0,03	155,01	775,05	276,80
6	1,06	0,77	2,16	0,04	153,31	766,53	273,76
5	<b>0,88</b>	0,66	1,86	0,03	<b>153,73</b>	<b>768,64</b>	<b>274,51</b>
4	<b>0,71</b>	0,30	0,84	0,01	<b>158,60</b>	<b>792,98</b>	<b>283,21</b>
3	0,53	1,10	3,09	0,05	151,35	756,77	270,27
2	0,35	0,00	0,01	0,00	136,77	683,83	244,22
1	0,18	0,89	2,50	0,04	103,48	517,42	184,79
Volumen (ml)		2,80			5,00		
Proteinkonzentration (mg/ml)		21,30			0,56		
Gesamtprotein (mg)		59,64			2,80		

Die TGase-Aktivität im Hoden-Extrakt besitzt ein Optimum bei 4 - 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Die untersuchte Seminalplasmaprobe zeigte schon ohne weiteren Zusatz von Ca<sup>2+</sup> eine Aktivität, die durch weitere Addition des Kations nicht mehr signifikant erhöht werden konnte. Dies lag möglicherweise daran, dass in der vorliegenden Probe an sich schon ausreichend Calciumionen vorhanden waren, so dass nach dem Aktivitätsverlust durch das längere Einfrieren für die wenigen, noch aktiven Enzymmoleküle keine weitere Substitution mit Ca<sup>2+</sup> mehr notwendig war. Um dies abzusichern wurde eine flammenphotometrische Bestimmung des Calciumgehaltes der beiden Proben vorgenommen. Der Calciumgehalt des Hoden-Zell-Extrakts lag im unteren Messbereich (0,03 - 0,04 mMol/l) der Methode, der der Seminalplasmaprobe betrug dagegen 0,13 mMol/l. Da der endogene Ca<sup>2+</sup>-Gehalt von Seminalplasmaproben normalerweise mit 0,1-0,3 mM jedoch unterhalb der aktivierenden Konzentration für TGasen liegt, wurde dem Testgemisch standardmäßig 150 µl 5mM CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration: 0,88 mM CaCl<sub>2</sub>) zugesetzt.

#### **Einfluss der Trichloressigsäure-Konzentration auf die TGase-Aktivitätsmessung**

Trichloressigsäure (TCA) wird dazu verwendet, um das durch die TGase-Katalyse radioaktiv markierte Casein auszufällen und um gleichzeitig den Test abzustoppen. Normalerweise werden nach *EGBRING et al. (1973)* dem Testansatz nach 30 Minuten ein gleiches Volumen an 10%iger wässriger TCA-Lösung zugesetzt. Es wurde nun

untersucht, ob eine Verdoppelung der TCA-Konzentration die Ausbeute an gefälltem radioaktiv markiertem Substratprotein erhöht.

In Tab. 9 ist zu erkennen, dass die Fällung des markierten Casein 20% Trichloressigsäure keine signifikante Verbesserung des Tests bringt, die präzipitierte Radioaktivität ist tendenziell sogar etwas niedriger. Außerdem bestätigte sich, dass eine nur 14 Tage lang eingefrorene Probe eine erheblich höhere TGase-Enzymaktivität aufwies als die 6 Wochen lang eingefrorene Probe.

<b>Tab. 9: Notwendige Trichloressigsäure (TCA)-Konzentration zur Fällung von Putrescin-markiertem Casein und Einfluss der CaCl<sub>2</sub>-Konzentration auf die TGase-Aktivität bei Seminalplasmaproben</b>								
Probe			6 Wochen lang eingefrorenes Seminalplasma (selbe Probe wie in Tab. 8)			14 Tage lang eingefrorenes Seminalplasma		
Konzentration von			nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg
TCA (%)	CaCl <sub>2</sub> (mMol)							
	Ausgangs-Konzentration (150µl)	End-Konzentration in der Probe (850µl)						
10	100	17,65	<b>4,98</b>	<b>13,96</b>	<b>0,23</b>	41,01	172,25	2,02
	50	<b>8,82</b>	3,74	10,47	0,18	<b>84,15</b>	<b>353,41</b>	<b>4,15</b>
	5	0,88	3,60	10,09	0,17	67,94	285,33	3,35
20	100	17,65	4,70	13,16	0,22	39,32	165,16	1,94
	50	8,82	2,66	7,46	0,13	74,47	312,76	3,67
	5	0,88	2,33	6,52	0,11	60,50	254,08	2,98
Volumen (ml)			2,80			4,20		
Proteinkonz. (mg/ml)			21,30			20,30		
Gesamtprotein (mg)			59,64			85,26		

Anschließend wurde zum Vergleich eine weitere Seminalplasmaprobe eingesetzt, die nur 14 Tage eingefroren war und somit eine deutlich höhere Enzymaktivität besaß. Beide Proben zeigten identische Kreuzreaktivität (stark) in der Western Blot-Analyse. Zusätzlich wurde die CaCl<sub>2</sub>-Endkonzentration im Testansatz variiert: es wurden zunächst 17,6, dann 8,8 und schließlich 0,88 mM zugesetzt.

In der frischeren Seminalplasmaprobe wurde die höchste Enzymaktivität bei der Verwendung ca. 9 mM CaCl<sub>2</sub> und anschließender Fällung mit 10% Trichloressigsäure nachgewiesen.

**Zusammenfassung: optimaler Test für die menschliche seminale TGase :**

- ◆ 9 mM HEPES (pH 8,5) mit 1 mM DTE und 9 mM Ca<sup>2+</sup>-Ionen liefern optimale Bedingungen, um die Aktivität der seminalen TGase zu bestimmen.
- ◆ Die Reaktion sollte durch Zugabe von 10% Trichloressigsäure gestoppt werden (Endkonzentration: 5 %), um so das Putrescin-markierte Casein zu fällen.
- ◆ Ein Einfrieren von Proben (Seminalplasma oder Hoden-Zell-Extrakte) über längere Zeit führte zu einem deutlichen Verlust an TGase-Aktivität.

**3.7. Verteilung der TGase-Enzymaktivität in einer frischen Ejakulatprobe**

Eine frische, d.h. weniger als 30 min alte Seminalplasmaprobe (Proteingehalt 29,8 mg/ml) wurde zentrifugiert, um die Aktivität im Überstand und im Pellet getrennt zu bestimmen. Überraschenderweise war die spezifische Enzymaktivität des Überstandes nach Zentrifugation bei 5000 upm mit 0,08 nU/mg sehr niedrig. Im Vergleich dazu waren die Enzymwerte in Überständen von zwei Wochen bzw. sechs Wochen lang eingefrorenen Seminalplasma Proben (s. Tab. 9) bis zu 27 mal höher gewesen.

<b>Tab. 10: Verteilung der TGase-Enzymaktivität in frischen Ejakulatproben</b>						
1. Probe	Frische Ejakulatprobe					
	Überstand = Seminalplasma			Pellet		
Enzymaktivität	nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg
	2,37	9,48	0,08	58,40	20,44	11,45
Volumen (ml)	4,0			0,35		
Proteinkonz. (mg/ml)	29,8			5,1		
Gesamtprotein (mg)	119,2			1,79		
2. Probe	Frische Ejakulatprobe					
	Überstand = Seminalplasma			Pellet		
Enzymaktivität	nU/ml	nU	nU/mg	nU/ml	nU	nU/mg
	0,02	0,05	0,001	0,74	0,26	0,12
Volumen (ml)	3,0			0,35		
Proteinkonz. (mg/ml)	25,60			6,40		
Gesamtprotein (mg)	76,80			2,24		

Auch das Pellet, das ja hauptsächlich aus Samenzellen besteht, wurde in 350 µl Testpuffer (50 mM HEPES, pH 8,5, 5 mM DTE) aufgenommen. Sein Proteingehalt betrug 5,1 mg/ml, die Volumenaktivität 58,4 nU/ml (siehe Tab. 10). Daraus ergab sich eine spezifische Enzymaktivität von 11,45 nU/mg, d.h. im Pellet war (bezogen auf die Proteinmenge) eine mehr als 100-fach höhere TGase-Aktivität. Auch die zweite, frische Probe, die deutlich weniger Gesamtaktivität (im Bereich der Nachweisgrenze) besaß, zeigte tendenziell eine ähnliche Verteilung der TGase.

Die TGase lag in den beiden frischen Proben somit ganz offensichtlich partikulär, d.h. membrangebunden oder in Vesikeln verpackt, und damit pelletierbar vor.

### 3.8. Extraktion der an menschliche Spermien gebundenen Transglutaminase

Das zuletzt beschriebene Ergebnis zeigt ganz offensichtlich, dass sich die seminale TGase unmittelbar nach der Ejakulation nicht, wie ursprünglich angenommen, frei, d.h. gelöst, im Seminalplasma befindet, sondern als Teil des Spermienpellets oder sogar an den Spermien gebunden vorliegt.

#### Extraktion der Pellets mit HEPES/DTE-Puffer.

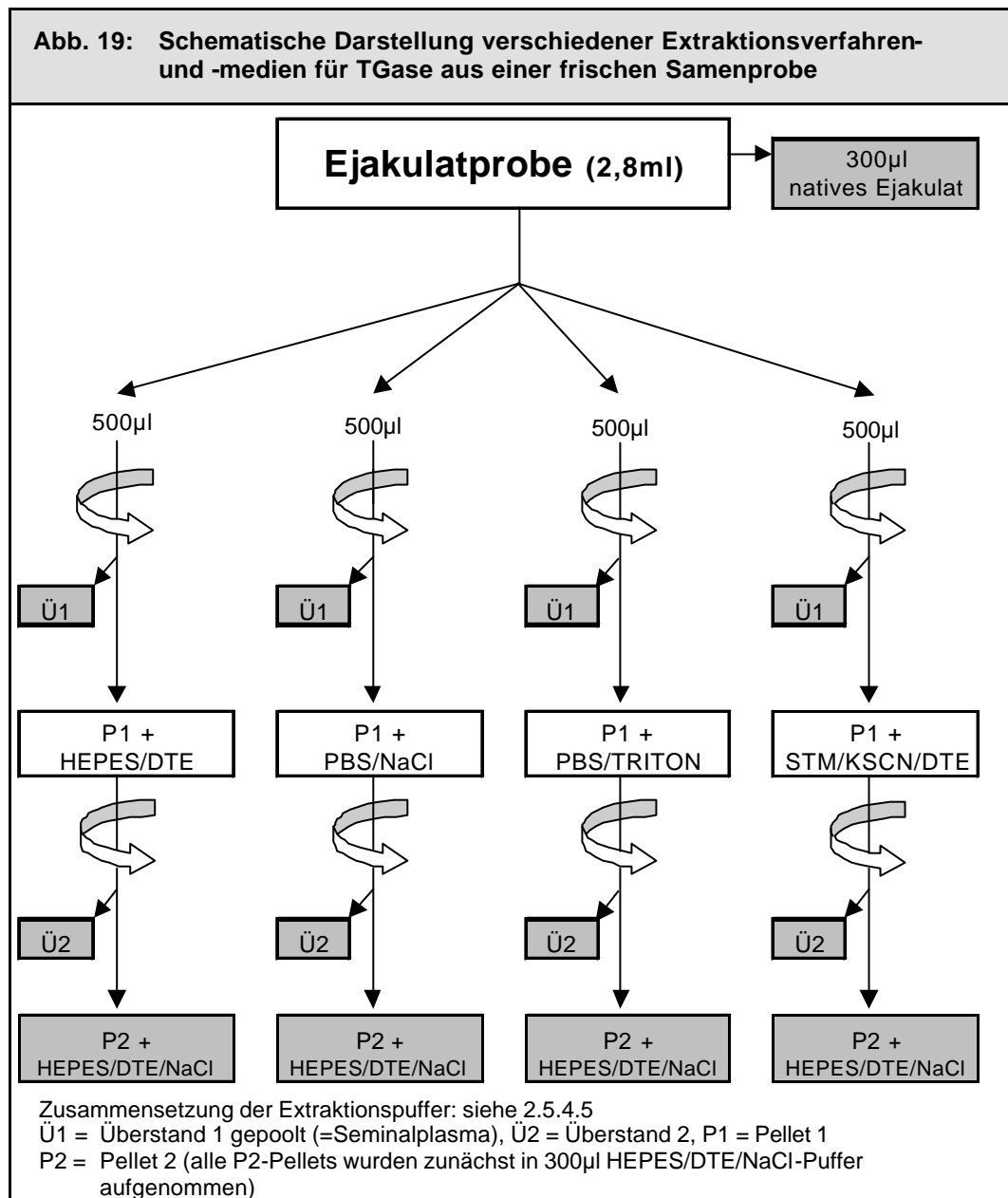
Um dies zu überprüfen, wurden zunächst die Pellets von zwei weiteren zentrifugierten Seminalplasmaproben ebenfalls mit 500 µl HEPES/DTE-Puffer suspendiert. Dabei zeigte sich, dass die Pellets zwar deutlich weniger Protein enthalten, jedoch eine bis fast 150x (143x und 37x) höhere spezifische Aktivität und eine 2 bzw. 5fache Gesamt-Aktivität besitzen als das partikelfreie Seminalplasma (=Überstand der Samenprobe) der hier gemessenen Proben (s. Tab. 11).

<b>Tab. 11: Verteilung der TGase-Enzymaktivität bei zwei frischen Ejakulatproben: Seminalplasma (Ü1) und Spermienpellet (P1, in HEPES/DTE-Puffer suspendiert)</b>						
<b>Frische Ejakulatprobe</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Protein (mg/ml)</b>	<b>Gesamt-Protein (mg)</b>	<b>Volumen-Aktivität (nU/ml)</b>	<b>Gesamt-Units (nU)</b>	<b>Spez. Aktivität (nU/mg)</b>
1. Ejakulatprobe Seminalplasma	0,95	33,0	31,35	8,68	8,24	0,26
Spermienpellet	0,6	9,3	5,55	19,97	11,98	2,16
2. Ejakulatprobe Seminalplasma	1,005	24,5	24,62	6,47	6,50	0,26
Spermienpellet	0,54	4,8	2,57	11,4	6,15	2,4

Es wurde nun versucht, ein effizienteres Extraktionsmedium für die partikuläre TGase zu finden. Dazu wurde eine frische Samenprobe (21,3 mg/ml Protein; 0,5 nU/mg spezifische TGase- und 29,7 nU Gesamt-TGase-Aktivität) knapp 5 Minuten nach der Ejakulation in 5 Portionen aufgeteilt. Die erste Fraktion wurde verwendet, um die Proteinmenge und die spezifische Enzymaktivität im Gesamtejakulat sowie nach Zentrifugation im dessen Überstand (Seminalplasma) zu bestimmen (s. Abb. 19 und Tab. 12).

Bei dieser ersten Extraktion wurde eine deutlich höhere spezifische Aktivität erzielt, wenn PBS, das zusätzlich Kochsalz oder das Detergenz Triton enthielt, oder aber das Lösungsgemisch STM/KSCN/DTE, das erfolgreich bei der Isolierung von gewebsständiger TGase aus Leber- oder Sertoli-Zellen angewandt worden war, zur Extraktion der partikulären TGase-Fraktion verwendet wurde. Die dabei jeweils

extrahierten Proteinmengen waren mit ca. nur 0,5 – 0,8% des Gesamtproteins relativ niedrig. Gleichzeitig stieg die spezifische TGase-Aktivität auf den 16-fachen Wert an. Dies spricht dafür, dass bevorzugt TGase extrahiert worden war.



Eine zweite Extraktion der 4 Spermienpellets (Tab. 13) unter identischen Bedingungen zeigte, dass in ihnen noch messbare Mengen TGase gebunden waren, die offensichtlich bei der 1. Extraktion noch nicht herausgelöst werden konnten.

Bei dieser zweiten Extraktion konnte mit HEPES/DTE-Puffer allein aus dem Pellet kaum noch TGase extrahiert werden. Die anderen Extraktionsmedien lösten jedoch weitere TGase ab, deren spezifische Aktivität nicht signifikant höher als in den jeweiligen ersten Extrakten war. Die Ausbeuten (Gesamt-nU) waren jedoch mit nur noch 15% (PBS/NaCl), 22,7% (PBS/Triton) bzw. 71% (STM/KSCN/DTE) – bezogen auf die entsprechenden ersten Extrakte – deutlich geringer.

**Tab. 12: TGase-Aktivität einer frischen Ejakulatprobe unter Verwendung verschiedener Extraktionsmedien (siehe Abb. 19)**

frische Ejakulatprobe	Ausgang-Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Volumen-Aktivität (nU/ml)	Gesamt-Units (nU)	Spez. Aktivität (nU/mg)
natives Ejakulat	2,8	21,3	10,62	29,73	0,50
Ü1 Seminalplasma (gepoolt)	1,48	23,8	10,04	14,86	0,42
Ü2 HEPES/DTE	0,47	1,1	5,58	2,62	5,19
P2 HEPES/DTE/NaCl	0,33	1,1	1,13	0,37	1,03
Ü2 PBS/NaCl	0,48	1,5	11,30	5,42	7,41
P2 HEPES/DTE/NaCl	0,33	0,7	5,23	1,73	7,22
Ü2 PBS/TRITON	0,47	1,7	13,62	6,40	8,13
P2 HEPES/DTE/NaCl	0,3	1,3	10,29	3,09	7,92
Ü2 STM/KSCN/DTE	0,47	1,7	12,63	5,94	7,43
P2 HEPES/DTE/NaCl	0,325	1,9	12,99	4,22	6,93

**Tab. 13: Zweite Extraktion (Fraktion P2) der TGase aus Spermien unter Verwendung verschiedener Puffer, gleiche Probe wie in Tab. 12**

Extraktionslösung	Protein (mg/ml)	Volumen-Aktivität (nU/ml)	Gesamt-Units (nU)	Spezifische Aktivität (nU/mg)
HEPES/DTE	1,1	1,13	0,37	1,03
PBS / NaCl	1,5	5,23	1,73	7,22
PBS / Triton	1,7	10,29	3,09	7,92
STM / KSCN / DTE	1,7	12,99	4,22	6,93

**Zusammenfassung:**

- ◆ Nach Zentrifugation von frischen Samenproben konnte aus dem Spermienpellet TGase extrahiert werden, deren spezifische Aktivität deutlich höher als die des Enzyms im Überstand (Seminalplasma) war.
- ◆ Ein Teil dieser pelletierten TGase konnte mit HEPES/DTE-Puffer selbst abgelöst werden, war also nur mit den Samenzellen assoziiert.
- ◆ Ein weiterer Teil ließ sich jedoch nur mit Hilfe von Salzen bzw. noch effizienter mit dem Detergenz Triton X100 bzw. in STM/KSCN/DTE solvatisieren, war also offensichtlich membrangebunden oder lag sogar in pelletierbaren Vesikeln im Samen verpackt vor.

### 3.9. TGase-Enzymaktivität in einer Ejakulatprobe mit Azoospermie

Bei den bisherigen Untersuchungen waren Ejakulatproben mit eindeutiger Diagnose Normospermie verwendet worden. Durch die Marburger Andrologie wurde auch eine frisch gewonnene Ejakulatprobe eines Patienten mit nachgewiesener Azoospermie zur Verfügung gestellt, um auch in ihr die partikuläre TGase-Enzymaktivität zu bestimmen.

Tab. 14 zeigt, dass die Ejakulatprobe mit bekannter Azoospermie einen vergleichbaren Proteingehalt wie bei Patienten mit normaler Spermatozoenzahl aufwies. TGase-Enzymaktivität konnte jedoch weder in der Gesamtprobe, noch im Seminalplasma, noch im Spermienpellet gemessen werden.

Tab. 14: Untersuchung* einer Ejakulatprobe mit bekannter Azoospermie		
Probe	Protein (mg/ml)	Spezifische Aktivität (nU/mg)
Ejakulat nativ	21,7	unter der Nachweisgrenze
Seminalplasma	26,2	unter der Nachweisgrenze
Extraktion	2,9	unter der Nachweisgrenze

\* - Nach Zentrifugation und Entfernen des Seminalplasmas wurde das Pellet in HEPES zur TGase-Extraktion gelöst und nach erneuter Zentrifugation der Überstand zur Enzymaktivitätsmessung verwendet.

Zur Absicherung des negativen Ergebnisses wurde von diesem Ejakulat (Seminalplasmafraktion) eine Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers gegen Ratten-CGS-TGase durchgeführt. Zwar konnte eine kreuzreaktive Bande im Bereich von 73 kDa identifiziert werden, diese war jedoch im Vergleich zu der entsprechenden Bande bei Normospermieproben ausgesprochen schwach.

#### Zusammenfassung:

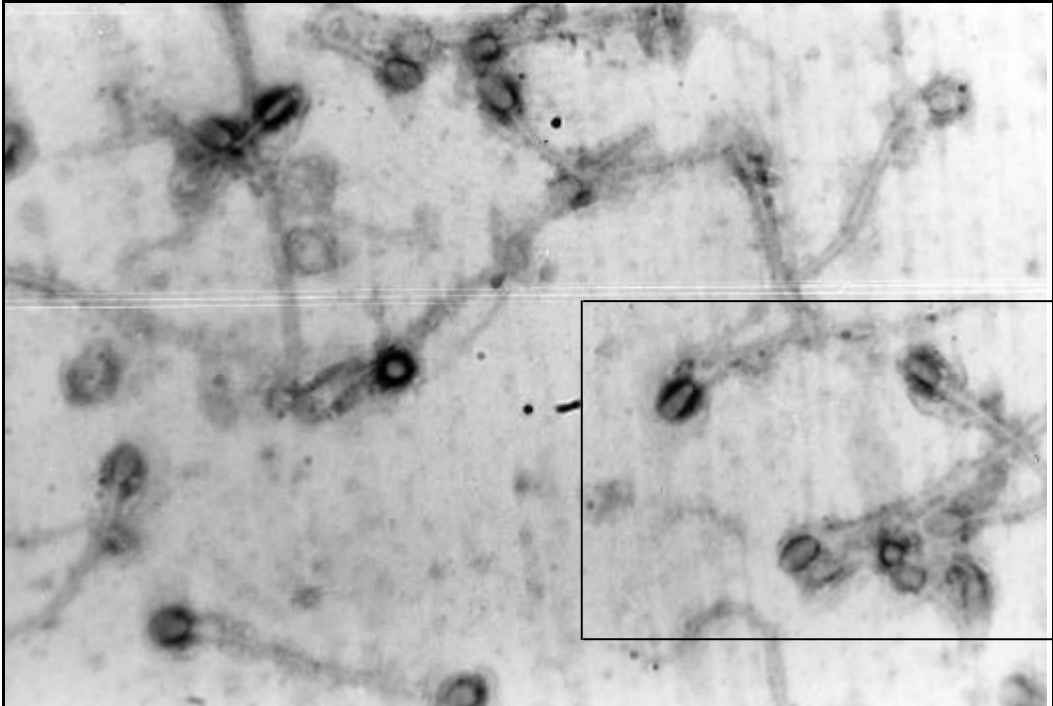
- ◆ In einem Ejakulat mit Diagnose Azoospermie konnte im Western Blot eine sehr schwache Bande mit 73 kDa nachgewiesen werden. Die TGase-Aktivität der Probe lag bei normalem Proteinwert unter der Nachweisgrenze. Es wurde somit bei dem betreffenden Patienten nahezu keine TGase sezerniert.

### 3.10. Lokalisation der TGase in menschlichen Ejakulatproben

Es galt nun mit Hilfe morphologischer Techniken zu klären, wo genau die enzymatisch und immunchemisch im Spermienpellet nachgewiesene seminale TGase mit 73 kDa zu lokalisieren ist.

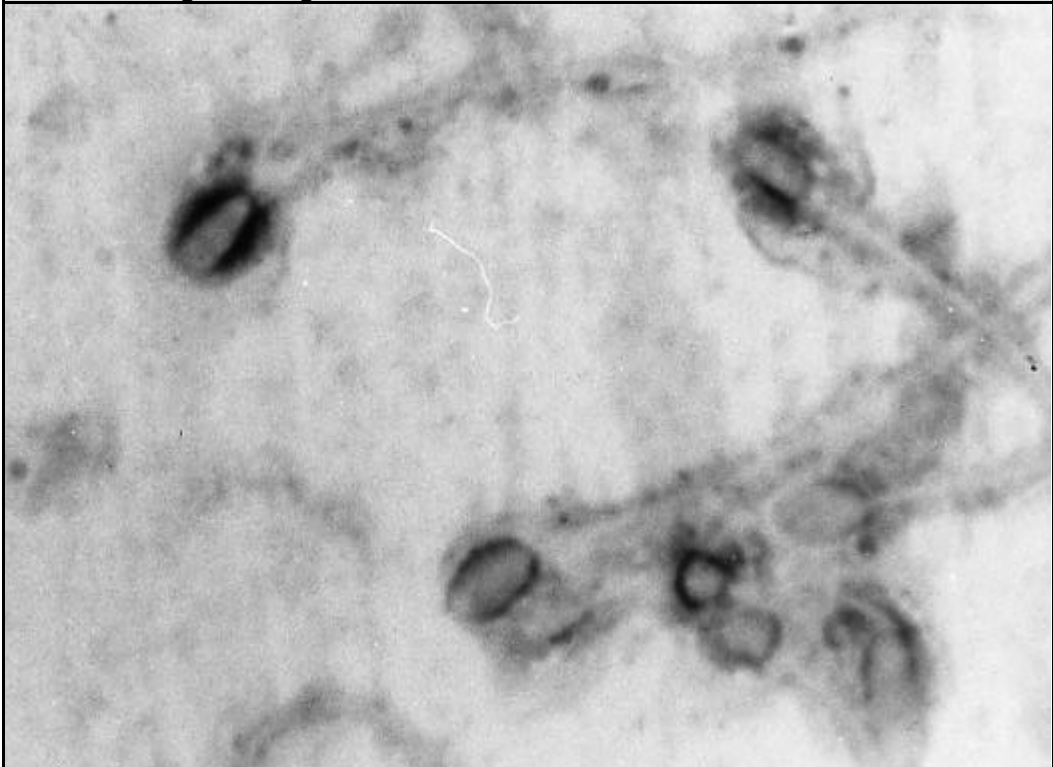
Hierzu wurden jeweils 2,5 µl einer frischen Ejakulatprobe mit 1% Formaldehyd in PBS vorfixiert und dann auf mit Chromalaungelatine vorbehandelten Objektträgern ausgestrichen. Nach kurzer Nachfixierung mit Immunfixans wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit PBS/Tween blockiert. Anschließend wurde mit dem Antikörper gegen Ratten-CGS-TGase inkubiert und der Immunkomplex mit Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP, s. 2.8.1.) markiert (s. Abb. 20 und 21).

**Abb. 20: Immunhistochemie: Nachweis der spermiengebundenen TGase mit dem Antikörper gegen Ratten-CGS-TGase in Ausstrichen von menschlichem Ejakulat (Immunhistologische Färbung mit PAP)**



Ausschnitt vergrößert, s. Abb. 21

**Abb. 21: Immunhistochemie: Nachweis der spermiengebundenen TGase mit dem Antikörper gegen Ratten-CGS-TGase in Ausstrichen von menschlichem Ejakulat (Immunhistologische Färbung mit PAP) Vergrößerungs-Ausschnitt vom Abb. 20**



Die Immunreaktion wurde unter einem Mikroskop (Axiomat) beurteilt und anschließend photographiert. Die Kontrolluntersuchung mit nur PBS-Puffer (ohne Antikörper gegen



Ratten-CGS-TGase) zeigte keine Immunreaktion. Die Abb. 20 – 21 zeigen, dass die Immunreaktion ausschließlich am Spermienkopf unter Aussparung der Spitze zu erkennen ist. Die Auflösung erlaubt jedoch nicht zu unterscheiden, ob das Antigen außer- oder innerhalb der Membran sitzt.

**Zusammenfassung:**

- ◆ Mittels Immunhistochemie wurde gezeigt, dass die spermienassoziierte TGase an den Spermienköpfen unter Aussparung der Kopfspitze zu lokalisieren ist.

### **3.11. Isolierung der partikulären TGase von menschlichen Spermien durch präparative SDS-PAGE**

Zwei frische Normospermie-Ejakulate (SP 174 und SP 175) wurden verwendet, um aus ihrem Spermienpellet partikuläre TGase zu isolieren. Dabei bot sich eine präparative SDS-PAGE als effiziente und auch sehr schnelle Isolierungstechnik an.

Bei einer vorgeschalteten analytischen SDS-PAGE war die 73 kDa Bande deutlich zu erkennen gewesen. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Bande um ein einzelnes Protein oder mehrere Polypeptide mit nahezu identischem Molekulargewichten handelte, die nur bei schlechter Auflösung des Gels komigrierten, wurden anschließend Mini-SDS-PAGE mit variablen Gelgradienten (8-12%, 10-12% und 10-14% AA) getestet.

Die Effizienz der Trennung wurde mit Hilfe von vorgefärbten Sigma-Eichproteinen direkt überprüfbar. Dabei wurde insbesondere auf eine optimale Trennung von Transferrin (80 kDa) und Serumalbumin (67 kDa) geachtet.

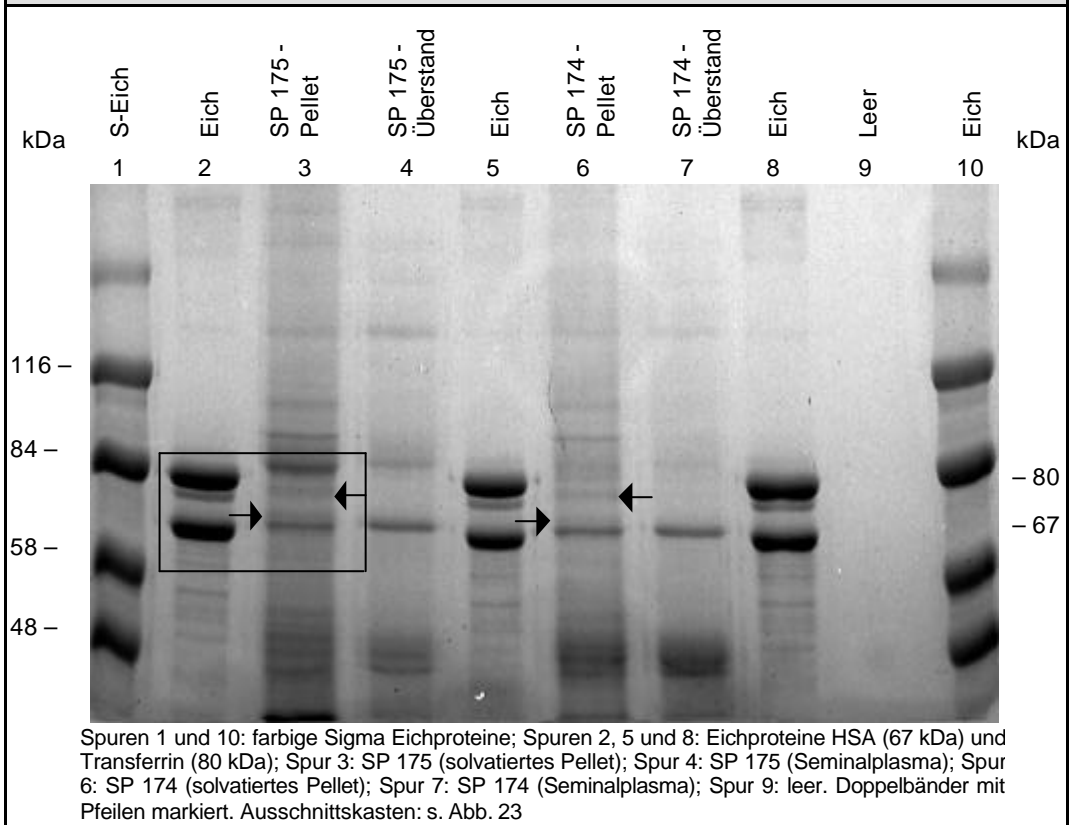
Die beste Trennung dieser beiden Eichproteine erfolgte in dem Gradientengel mit 10-12% AA. Die Abb. 22 zeigt, dass nach Elektrophorese der Pellets der beiden Ejakulatfraktionen (Spuren 3 und 6) in einem derartigen Gradientengel im Bereich vom 73 kDa (zwischen 58 und 84 kDa) nun zwei Doppelbanden zu erkennen waren.

Durch Western Blot-Analyse eines entsprechenden Gels wurden die oberen zwei Doppelbanden mit Anti-Ratten-CG-TGase-AK als TGase identifiziert, die anderen zwei Proteinbanden (untere Doppelbanden) reagierten dagegen nicht mit dem Antikörper gegen CGS-TGase (s. Abb. 23).

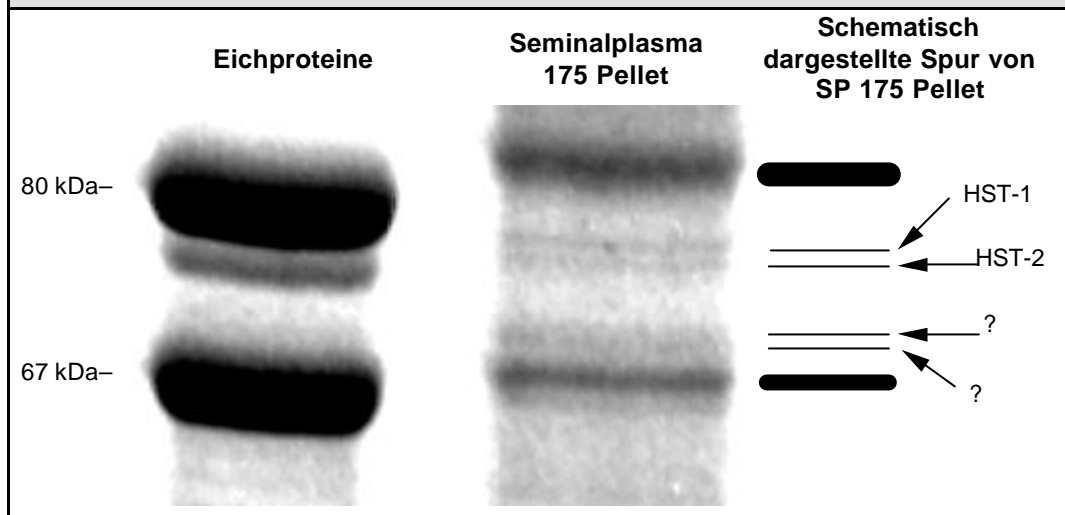
**Zusammenfassung:**

- ◆ Durch die Verwendung von 10-12% SDS-PAGE wurde die Trennung im Bereich von 73 kDa optimiert. Statt einer Bande wurden jetzt 2 Doppelbanden gefunden (= 4 Banden).
- ◆ Die oberen Doppelbanden reagierten mit Anti-Ratten-CG-TGase-AK im Western Blot; diese wurden HST-1 (obere) und HST-2 (untere) genannt. Die unteren Doppelbanden enthielten keine TGase.

**Abb. 22: Mini-SDS-PAGE: Gradientengel mit 10-12% AA**



**Abb. 23: Ausschnitt aus Abb. 22 (Darstellung der Doppelbande HST-1 und HST-2)**



### 3.12. Herstellung eines Antikörpers (Anti-HST-1) gegen partikuläre TGase aus menschlichen Spermien

Es wurde nun erneut versucht, einen polyklonalen Antikörper gegen partikuläre TGase aus dem menschlichen Spermienpellet zu erzeugen. Hierzu wurde zunächst das Pellet aus frischem Ejakulat durch Extraktion mit HEPES/DTE/Triton (s. 2.5.4.5) aufbereitet. Die

dadurch angereicherte TGase in der Fraktion Ü2 (siehe Abb. 19) wurde dann mittels präparativer SDS-PAGE 10-12% aufgetrennt. Einer der Ränder des präparativen SDS-PA-Gels wurde durch Western Blot-Analyse erneut gefärbt, um so die immunpositive Doppelbande exakt zu lokalisieren. Die im Bereich von 73 kDa identifizierten beiden Polypeptide (von uns als HST-1 und HST-2 bezeichnet) wurden (s. 2.7) ausgeschnitten und nach Mischung mit immunstimulierenden Adjuvantien Kaninchen injiziert.

**Zusammenfassung:**

- ◆ Durch Extraktion mit HEPES/DTE/Triton-Puffer und anschließender präparativer SDS-PAGE (10-12% AA-Gel) war es möglich, aus menschlichen Ejakulatproben 2 Antigene zu gewinnen, die Kaninchen injiziert wurden, um so Antikörper gegen die partikuläre TGase in menschlichen Ejakulatproben zu erzeugen.

### **3.13. Syntheseort der seminalen TGase**

Die oben beschriebenen Untersuchungen hatten ergeben, dass die TGase in frischen Ejakulatproben in geringerem Maß gelöst im Seminalplasma und überwiegend im 5000upm-Pellet des Ejakulats nachzuweisen war. Nach Einfrieren und Wiederauftauen der Proben war jedoch deutlich mehr TGase-Enzym bzw. –Antigen in gelöster Form aufzufinden.

Das Enzym konnte somit ebenso von den Spermien selbst während ihrer Entstehung im Hoden gebildet, als auch während der Passage durch den Nebenhoden auf sie übertragen worden sein. Schließlich war auch denkbar, das es von einer der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sezerniert und dann erst bei der Ejakulation an die Spermien gebunden worden war.

Um Aufschluss über den wirklichen Synthesort zu finden, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten von männlichen Geschlechtsorganen wie Hoden, Nebenhoden, Prostata und Bläschendrüse durchgeführt, bei denen sowohl die Antiseren gegen CGS- als auch gegen humane seminale TGase verwendet wurden (s. Abb. 24 - 25). Außerdem wurde zum Vergleich eine Färbung mit einem kommerziellen Antikörper gegen menschliches Serumalbumin durchgeführt, das biochemisch und immunchemisch ebenfalls im menschlichen Seminalplasma nachgewiesen werden kann.

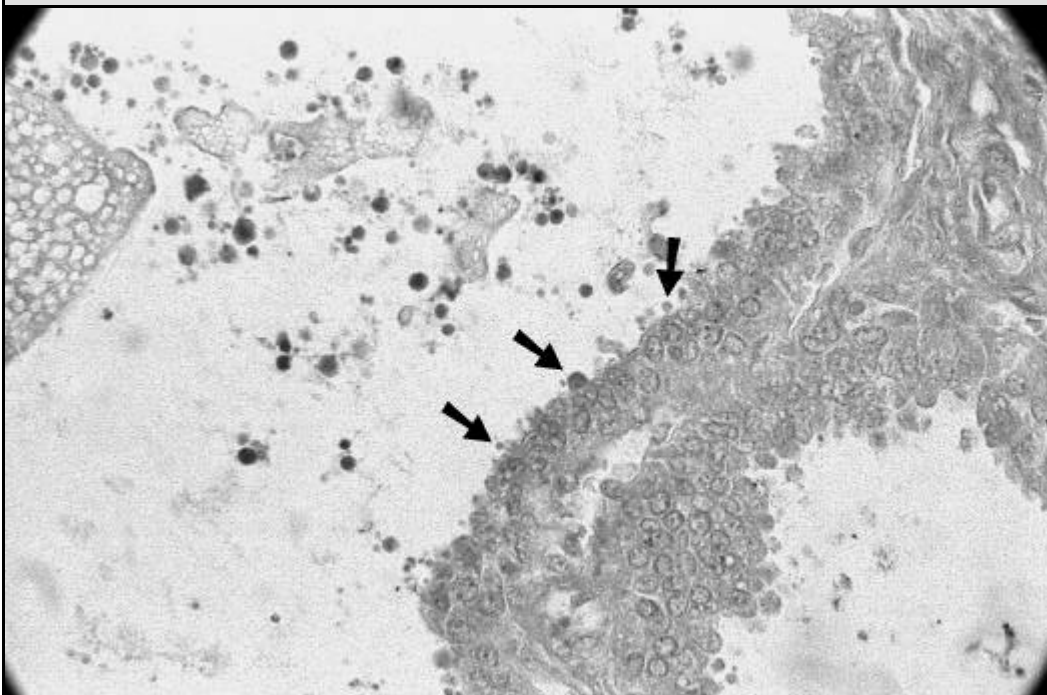
Nur in der menschlichen Bläschendrüse war eine deutliche Immunreaktion mit den beiden Antiseren (Anti-Ratten-CG-TGase-AK und Anti-HST-1-Ak) gegen die sekretorischen TGasen zu erkennen. Alle anderen männlichen Genitalorgane zeigten keine oder nur schwache und unspezifische Anfärbung. Die negativen Kontrollen zeigten ebenfalls keine Immunreaktion.

**Abb. 24a: Immunhistochemischer Nachweis von sekretorischer TGase in der menschlichen Bläschendrüse mit dem Antiserum gegen CGS-TGase (1:300)**



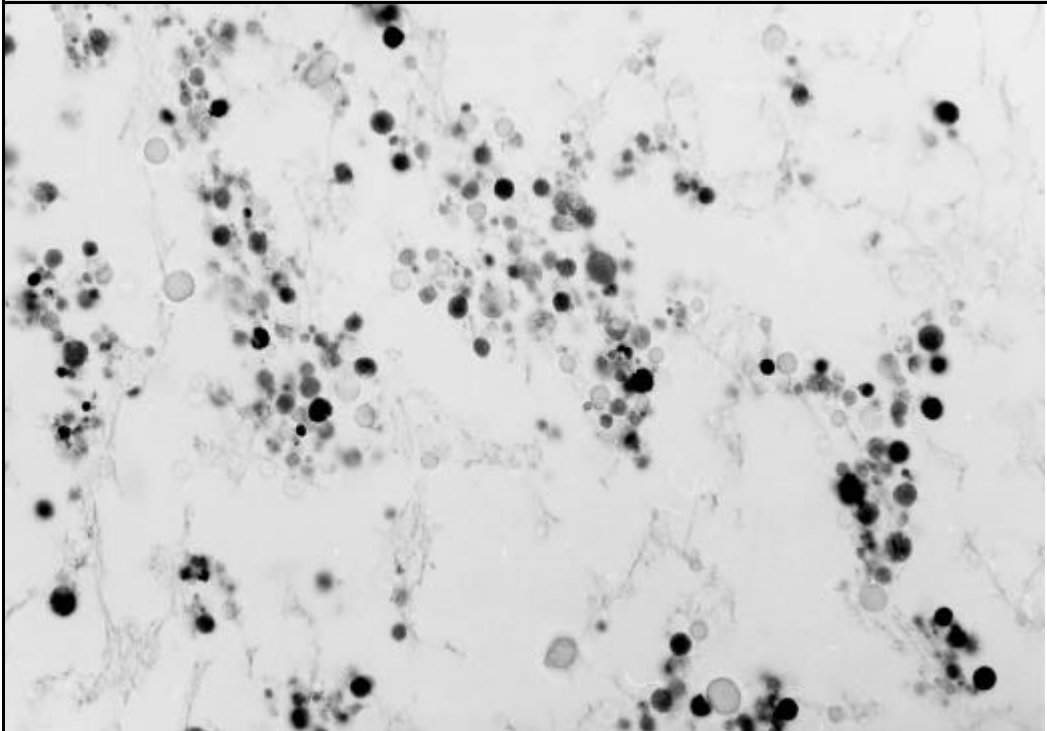
(a): Epithel und intraluminal Vesikulosen (x4)

**Abb. 24b: Immunhistochemischer Nachweis von sekretorischer TGase in der menschlichen Bläschendrüse mit dem Antiserum gegen CGS-TGase (1:300)**



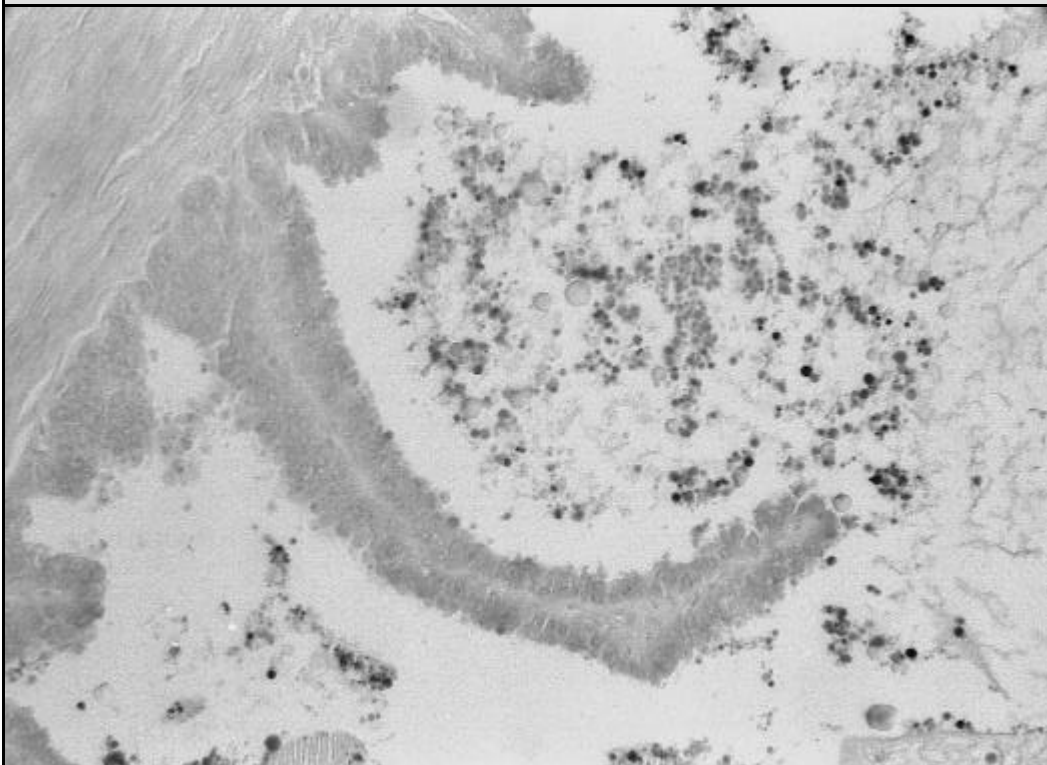
(b) Epithel, apikale Sekretblasen (Pfeile) und Vesikulosen (x40)

**Abb. 24c: Immunhistochemischer Nachweis von sekretorischer TGase in der menschlichen Bläschendrüse mit dem Antiserum gegen CGS-TGase (1:300)**



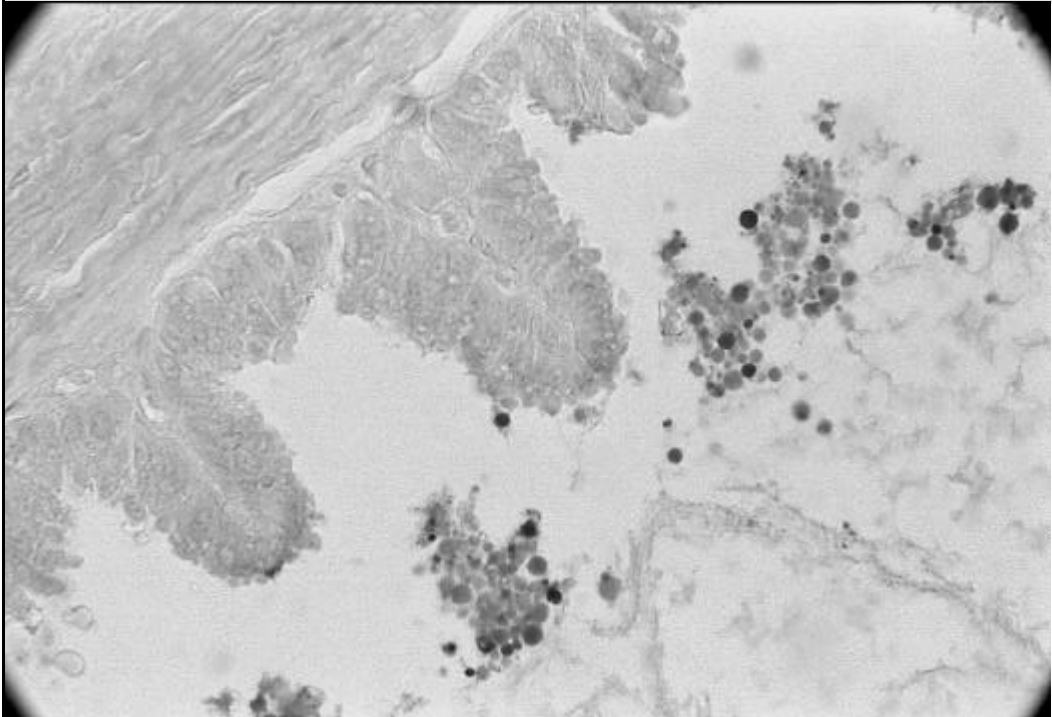
(c) luminale Vesikulosomen (x40)

**Abb. 25a: Immunhistochemischer Nachweis von sekretorischer TGase in der menschlichen Bläschendrüse mit dem Antiserum gegen menschliche sekretorische TGase (Anti-HST1;1:300)**



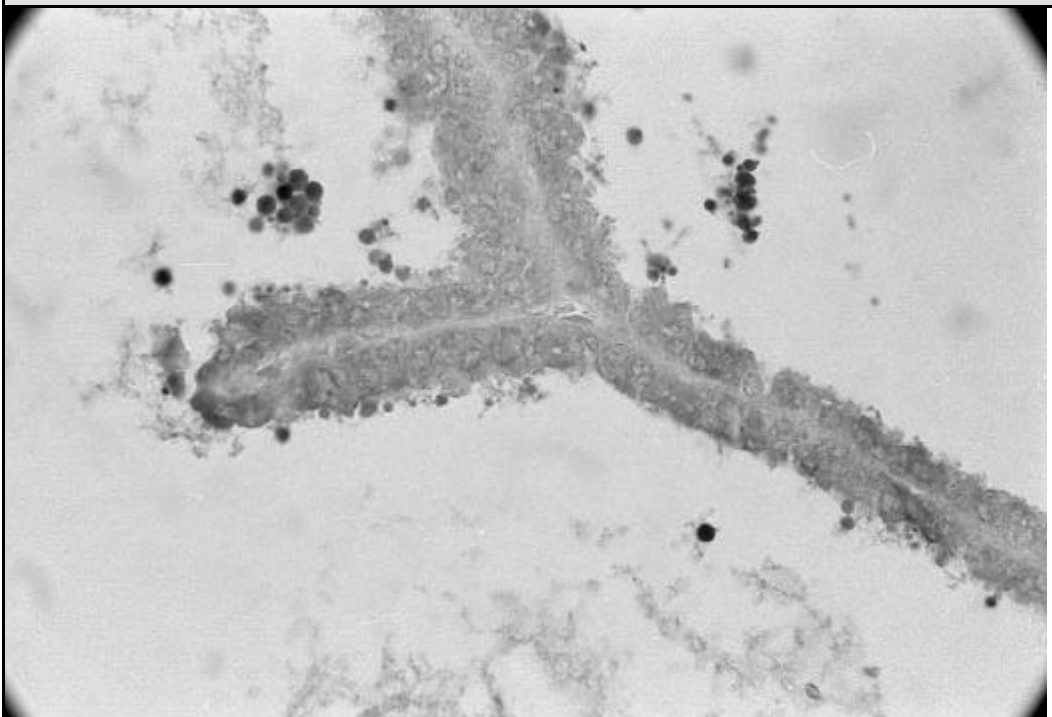
(a) Drüseneithel und intraluminale Vesikulosomen (x20)

**Abb. 25b: Immunhistochemischer Nachweis von sekretorischer TGase in der menschlichen Bläschendrüse mit dem Antiserum gegen menschliche sekretorische TGase (Anti-HST1;1:300)**



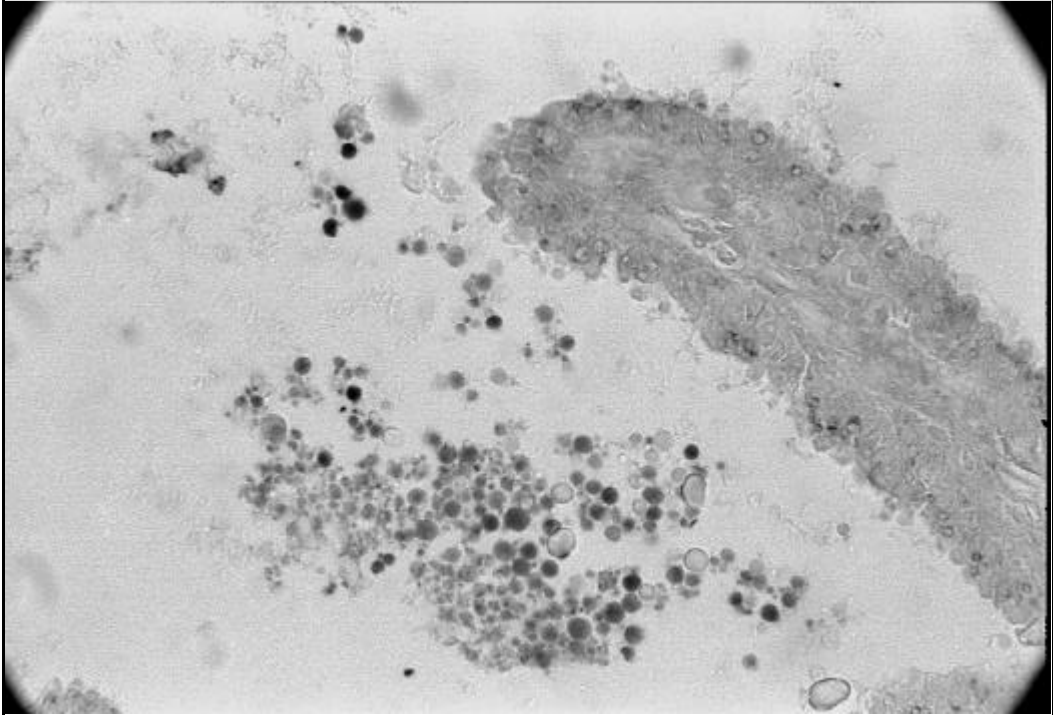
(b) Epithel, apikale Blebs und Vesikulosomen (x40)

**Abb. 25c: Immunhistochemischer Nachweis von sekretorischer TGase in der menschlichen Bläschendrüse mit dem Antiserum gegen menschliche sekretorische TGase (Anti-HST1;1:300)**



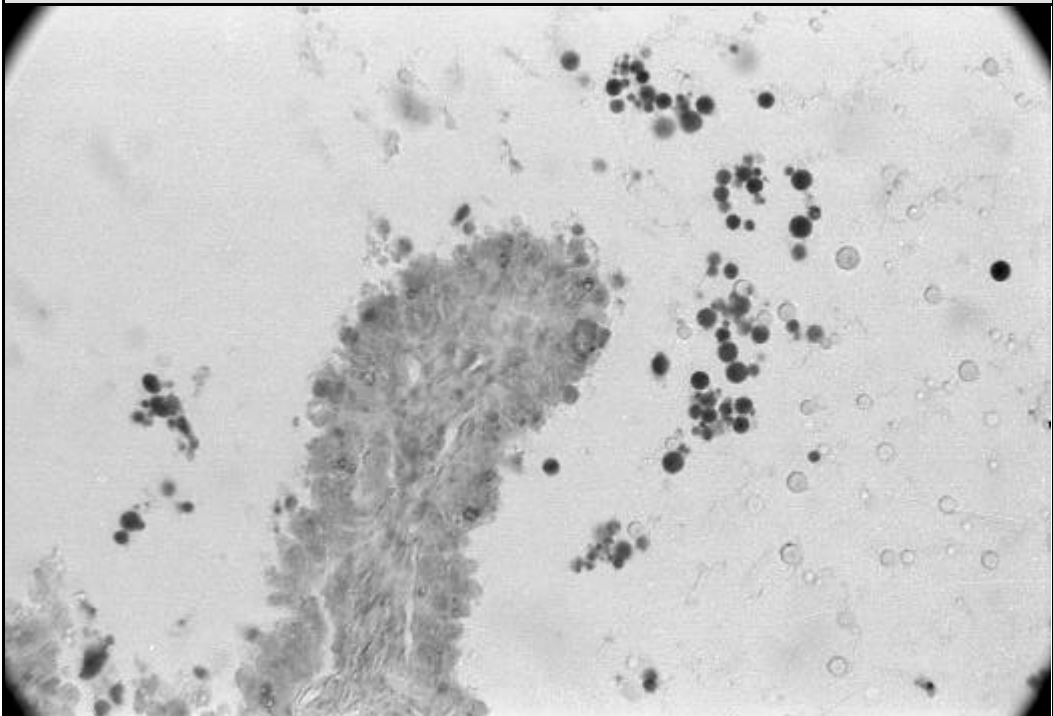
(c) Epithel, apikale Blebs und Vesikulosomen (x40)

**Abb. 26a: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen Serumalbumin (1:3000)**



Markierung der Epithelzellen, der apikalen Blebs sowie von intraluminalen Vesikulosomen

**Abb. 26b: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen Serumalbumin (1:3000)**



Markierung der Epithelzellen, der apikalen Blebs sowie von intraluminalen Vesikulosomen

Bei der Bläschendrüse wirkte sich außerordentlich positiv aus, dass das Gewebe während der Operation eines Blasenkarzinoms sehr schonend herausgenommen wurde und sofort in dem optimalen Fixans (Bouin) konserviert worden war. So war es möglich, die intraluminalen Blasen (Vesikulosomen) intakt zu erhalten. Bei Material, das für pathologische Untersuchungen oft mehrere Stunden post mortem entnommen wird, ist diese perfekte Gewebserhaltung fast nie gegeben, zumal da die Bläschendrüse sich häufig nach kurzer Zeit autolytisch verändert. In der uns zur Verfügung stehenden Gewebeprobe war zu erkennen, dass das Drüsenepithel selbst nur verhältnismäßig schwach mit den beiden Antikörpern reagierte. Die Färbung erstreckte sich dabei über das gesamte Zytoplasma und war nicht auf eindeutig differenzierbare Strukturen wie z.B. den Golgiapparat oder Sekretgranula beschränkt, was man eigentlich bei einem sekretorischen Protein erwartet hätte. Sehr deutlich waren aber die am apikalen Zellpol entstehenden Blasen sowie zahlreiche intraluminale Blebs markiert. Das eigentliche intraluminale Sekret war wiederum völlig ungefärbt.

Anhand diesen morphologischen Daten kann die eindeutige Aussage getroffen werden, dass die sekretorische TGase von den Epithelzellen der menschlichen Bläschendrüse apokrin sezerniert wird - anders gesagt: sie wird ebenso wie die TGase der Ratten-Koagulationsdrüse alternativ zum klassischen ekkrinen (merokrinen) Sekretionsmodus exportiert. Ein analoger Exportweg in der menschlichen Bläschendrüse ließ sich bei dem vorliegenden Gewebe auch ganz offensichtlich für Serumalbumin dokumentieren (s. Abb. 26a und 26b). Auch hier reagierte ein Antikörper (Anti-66K), der sowohl mit Serumalbumin der Ratte als auch mit Serumalbumin aus menschlichem Blut reagiert, spezifisch mit dem Zytoplasma der Epithelzellen, mit abknospenden Blasen sowie sehr deutlich mit den meisten intraluminalen Vesikulosomen.

**Zusammenfassung:**

- ◆ Die sekretorische TGase war im männlichen Genitaltrakt spezifisch und exklusiv in der Bläschendrüse nachzuweisen.
- ◆ Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen lässt auf einen alternativen Export des Enzyms, eine sogenannte apokrine Sekretion, schließen.
- ◆ Analog zur TGase wird auch Serumalbumin von den Bläschendrüsenepithelzellen apokrin sezerniert.



## 4. DISKUSSION

Schon 1896 erkannten *CAMUS und GLEY*, dass das Sekret der Bläschendrüse nach Zugabe eines Enzyms aus dem Prostatasekret von Nagern koaguliert. Sie nannten das Enzym Vesikulase. *WALKER (1910)* identifizierte die Koagulationsdrüse (früher: anteriore Prostata) als hauptsächlichen Bildungsort für diese Vesikulase. Erst in den späten 60er Jahren konnten *NOTIDES und WILLIAMS-ASHMAN (1967)* zeigen, dass die Bläschendrüsene Proteine in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über  $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -Lysyl-Isopeptidbrücken kovalent verknüpft werden, das Enzym also eine Transglutaminase-Aktivität besitzt.

Auch beim Menschen koaguliert der Samen unmittelbar nach der Ejakulation. Er verflüssigt sich jedoch normalerweise schon nach wenigen Minuten wieder, wofür vor allem kallikreinartige Proteasen im Prostatasekret verantwortlich sind. In den Hydrolysefragmenten, die hauptsächlich aus den Bläschendrüsene Proteinen Semenogelin I und II sowie Fibronectin entstehen, wurden jedoch keine Glu-Lys-Isopetide gefunden, so dass man heute davon ausgeht, dass die Samenkoagulation beim Menschen ohne Beteiligung einer TGase-Aktivität abläuft (*PETER et al., 1998*).

### 4.1. Transglutaminasen im menschlichen männlichen Genitaltrakt

Andererseits ist aber auch bekannt, dass in Extrakten aus menschlichen männlichen Genitaldrüsen sowie in deren Sekreten Transglutaminase-Aktivität nachgewiesen werden kann. *PORTA et al. (1986)* berichteten, dass in ca. 60% der von ihnen untersuchten Seminalplasmaproben TGase nachzuweisen war, sie charakterisieren das Enzym jedoch nicht genauer. *WHYARD et al. (1989)* isolierten eine TGase mit 83 kDa aus menschlichem Seminalplasma. *ABLIN und WHYARD (1991)* erzeugten in Kaninchen ein Antiserum gegen dieses seminale Protein und zeigten durch Immunfluoreszenz, dass es mit einem Antigen im Bereich von Hals und Schwanz von normalen Spermien reagierte. In einer weiteren Untersuchung reinigten die genannten Autoren die Isoform weiter auf und erzeugten erneut einen Antikörper in Kaninchen. Sie wiesen das Protein durch Immunfluoreszenz im Stroma, in den Epithelzellen der Drüsenacini sowie im Drüsenlumen der menschlichen Prostata nach. Nach biochemischer und immunologischer Charakterisierung stuften sie das Enzym als Gewebe-Isoform (TG<sub>C</sub>) ein (*WHYARD und ABLIN, 1997*).

1994 wurde die cDNA einer Transglutaminase aus einer cDNA-Bank der menschlichen Prostata kloniert. Die Sequenz war zu 51% identisch mit derjenigen der TGase aus der Rattenprostata (*HO et al., 1992*), die Verwandtschaft zu anderen Isoformen war dagegen deutlich geringer (*GRANT et al., 1994*). Aus den kodierten 679 Aminosäuren des Proteins

(PID: g1351232) konnte ein Molekulargewicht von 76,6 kDa und ein pI von 6,22 berechnet werden.

In den letzten Jahren gelang Erik J. Dubbink aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schröder und Dr. Romijn an der Erasmus-Universität Amsterdam ebenfalls die Klonierung und Charakterisierung einer TGase aus menschlichem Prostatagewebe (hTG<sub>P</sub>). Die 2983 bp lange cDNA kodierte für ein Protein (PID: g2146968) mit 684 Aminosäuren, aus denen sich ein Molekulargewicht von 77 kDa und ein pI von 6,51 berechnen ließ (*DUBBINK et al., 1996*). Die Sequenzhomologie betrug 53% zur Rattenprostata-TGase, die Verwandtschaft zu den anderen bekannten menschlichen Isoformen lag nur bei etwa 30%. Dot-Blot-Analysen ergaben, dass nach Testen von RNAs aus 50 verschiedenen menschlichen Geweben nur die Prostataprobe mit der hTG<sub>P</sub>-Sonde reagierte (*DUBBINK et al., 1998*). Bedauerlicherweise wurde in dieser Studie keine RNA aus der Bläschendrüse untersucht. Immunhistologische Färbungen mit einem spezifischen polyklonalen Antiserum gegen hTG<sub>P</sub> bestätigten, dass das Antigen nur in Epithelzellen der menschlichen Prostata und in einigen Prostata-Zelllinien nachzuweisen war. Dabei war die Variationsbreite in den Drüsenacini sehr hoch: z.T. färbten nur einzelne Epithelzellen, in anderen Präparaten einzelne Acini und nur in wenigen Proben fast alle Acini. Bei dieser Studie reagierte Prostatakarzinomgewebe ebenso wenig wie das Bläschendrüsenepithel. Das Färbespektrum erinnerte teilweise an das Muster, das *FRIEDRICHS et al. (1995)* mit einem Antikörper gegen eine TGase aus menschlichen Erythrozyten (TG<sub>C</sub>) erhalten hatten. Western Blot-Analysen mit dem Antiserum gegen hTG<sub>P</sub> ergaben in verschiedenen Proben von Prostataflüssigkeit eine Hauptbande bei 77 kDa und eine Unterbande bei 70-72 kDa. Auch in fast allen getesteten Seminalplasmaproben war die 77 kDa-Bande, wenn auch in sehr unterschiedlicher Stärke, zu erkennen. Erstaunlicherweise war von 6 untersuchten Proben nur in einem Gewebeextrakt der Prostata die 77 kDa-Bande eindeutig zu identifizieren (*DUBBINK et al., 1999*). In Flüssigkeitsproben, die aus isolierten Bläschendrüsen massiert worden war, konnte kein kreuzreaktives Antigen identifiziert werden.

1998 korrigierten *GRANT und Mitarbeiter* ihre Proteinsequenz (neue PID: g2766556) in der SWISS-PROT-Datenbank (<http://www.expasy.ch/sprot>, *BAIROCH und APWEILER, 2000*): sie hatte nun ebenfalls 684 Aminosäuren und einen kalkulierten pI von 6,51 – und war somit identisch mit der von Dubbink publizierten hTG<sub>P</sub>.

#### **4.2. Humane seminale Transglutaminase: Verwandtschaft zur Isoform in der Koagulationsdrüse der Ratte**

1990 gelang es *SEITZ et al.* zum ersten Mal, die Transglutaminase aus dem Sekret der Ratten-Koagulationsdrüse (Ratten-CGS-TGase) in homogener Form zu isolieren. Sie erzeugten in Kaninchen einen spezifischen polyklonalen Antikörper und konnten damit

zeigen, dass er in der Western Blot-Analyse sowohl mit DP1 aus der dorsalen Rattenprostata als auch mit zwei Proteinen in Extrakten aus der Meerschweinchen-Koagulationsdrüse mit 80 und mit 65 kDa kreuzreagierte.

In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass auch in einigen Proben von menschlichem Seminalplasma und in einem Extrakt aus der menschlichen Prostata ein Protein mit 73 kDa und pI 7,6 nachzuweisen war, das ebenfalls mit dem Antikörper gegen die RCG-TGase reagierte und darüber hinaus auch TGase-Aktivität aufwies (*ERKEL et al., 1988; ENDERLE-SCHMITT et al., 1989*). Dabei wurden in Western Blot 143 Seminalplasmaproben auf die Anwesenheit des kreuzreaktiven Antigens untersucht. Bei 64,4% dieser Proben lagen klinische Hinweise auf Infertilität vor. In dieser Gruppe (n=73) enthielten 70,2% das 73-kDa-Protein mit Kreuzreaktivität zur Ratten-CGS-TGase. Bei den Proben von Spendern ohne Fertilitätsstörung war bei ca. 57% ein entsprechendes immunpositives Protein nachzuweisen.

Die Anwesenheit von TGase ließ somit keine allgemeinen Schlüsse auf Fertilitätsstörungen zu. Es ergeben sich jedoch Hinweise, dass bei bestimmten Fällen von Infertilität die Transglutaminase als Markerprotein mit herangezogen werden könnte.

### **4.3. Untersuchungen zur Isolierung der Seminalplasma-TGase**

Mit Hilfe des Ratten-CGS-TGase-Antikörpers wurde versucht, die Isolierung des seminalen Proteins, das von uns als „HT“ bezeichnet wurde, durchzuführen. Dabei kamen zunächst die Methoden zu Einsatz, die *SEITZ et al. (1990)* zur Reinigung der Koagulationsdrüsen-TGase verwendet hatten.

#### **Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse**

Als initiale Methode, die sich bei der Reinigung der Ratten-CGS-TGase bewährt hatte, wurde die Proteinfällung mit Ammoniumsulfat angewandt. Das Salz hat einen zusätzlichen, sehr entscheidenden Vorteil: es hemmt die meisten Proteasen und verhindert somit eine weitere Degradation von Polypeptiden. Zunächst wurde der optimale Fällungsbereich für HT ermittelt. Nach Dialyse zur Entfernung des überschüssigen Salzes wurden die jeweiligen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Die Auswertung ergab, dass der größte Anteil der im Seminalplasma befindlichen menschlichen TGase bis zu Sättigung mit Ammoniumsulfat 40% ausfiel. Eine Erhöhung der Salzkonzentration bis 80% Sättigung führte zwar zur vollständigen Fällung des Enzyms, die zusätzliche Ausbeute war jedoch nahezu irrelevant.

Auch *SEITZ et al. (1987, 1990)* hatten bei ihrer Isolierung der Ratten-CGS-TGase einen Sättigungsbereich von 30-50% als optimal ermittelt. Somit erwies sich die

Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse als eine durchaus geeignete Konzentrationsmethode.

Da die Auswertung nur durch Western Blot-Analyse erfolgte, konnte zunächst nicht geklärt werden, ob bei der Fällung die Aktivität der TGase beeinträchtigt wurde. Dieser Aspekt erschien uns zunächst aber als nicht so relevant, da das primäre Ziel war, ein möglichst homogenes Antigen zu erhalten.

Nach Etablierung eines optimalen Testsverfahrens für die HT (s.u.) werteten wir die Fraktionen nach Ammoniumsulfatfällung jedoch auch quantitativ aus. Es zeigte sich, dass es schon im Pellet nach 0-20% Sättigung der Seminalplasmaproben mit Ammoniumsulfat zu einer 3-fachen Anreicherung an TGase kam, die sich durch weitere Zugabe des Salzes trotz Erhöhung der Ausbeute quantitativ nicht steigern ließ.

### **Präparative Isoelektrische Fokussierung**

Während der präparativen isoelektrischen Fokussierung konzentrierte sich die intakte HT ( $M_r$  73 kDa) bei einem pH-Wert von 7,6. Die Auswertung der restlichen Fraktionen ergab jedoch, dass die menschliche Seminalplasma-TGase in die zwei Fragmente HTa (34 kDa, fokussiert zwischen pH 5,9 -8,0) und HTb (26 kDa, fokussiert zwischen pH 8,0-8,8) gespalten wurde. Die beiden Fragmente reagierten weiterhin mit dem Antiserum gegen die Ratten-CGS-TGase. Dies ließ vermuten, dass die HT während des Reinigungsschrittes durch eine Protease, wahrscheinlich das Prostata-spezifische Antigen (PSA), gespalten worden war. Interessant ist hier, dass eine 73 kDa Form sowie eine analoge Abbaubande von 33 kDa vor kurzem auch von *DUBBINK et al. (1999)* nach Analyse von Prostataflüssigkeit und Seminalplasma auf hTG<sub>P</sub> beschrieben wurde.

Gegen HT, HTa und HTb wurden in Kaninchen Antikörper erzeugt. Anti-HT zeigte im Western Blot nicht die erwartete Immunreaktion mit der Seminalplasma-TGase, sondern reagierte nur mit menschlichem Keratin. Anti-HTa zeigte eine deutliche Reaktion mit einem Seminalplasmaprotein bei 34 kDa sowie schwächere Reaktionen mit mehreren Proteinen im Bereich vom 18 - 30 kDa, reagierte aber nicht mit dem Hauptprotein HT bei 73 kDa. Anti-HTb reagierte mit einem Protein bei 67 kDa, markierte daneben schwächere Reaktionen im Bereich vom 30 - 65 kDa. Dieses Reaktionsmuster spricht dafür, dass der Antikörper vor allem gegen Human-Serum-Albumin (HSA) und seine typischen Proteolysefragmente gerichtet war. Bestätigt wird dies dadurch, dass er auch mit dem Eichprotein HSA reagierte (siehe Abb. 18).

Die verwendeten Reinigungsmethoden hatten somit noch keine perfekte Isolierung von HT bzw. seiner Fragmente ermöglicht; die zur Immunisierung verwendeten Antigene waren weiterhin mit menschlichen Proteinen verunreinigt. Nicht ausgeschlossen werden kann auch, dass die verwendeten Kaninchen schon vorher IgG gegen Keratin und Albumin erzeugt hatten und diese Antigenität in einer Art „Memory-Effekt“ durch Kontakt mit menschlichen Personen (z.B. Tierpfleger) geboostert worden war.

Auf jeden Fall musste nun eine weitere Methode zur vollständigen Isolierung der Seminalplasma-TGase für eine Immunisierung von Kaninchen gefunden werden. Auch bei der Isolierung der sekretorischen Rattenisoform hatte die Abtrennung von Serumalbumin große Probleme bereitet. Dies wird auch durch kürzlich veröffentlichte Untersuchungen von *WILHELM et al. (1999)* bestätigt, die zeigen konnten, dass Serumalbumin mit hoher Spezifität an die Ratten-CGS-TGase bindet. Es bot sich also eine Technik an, bei der durch Einsatz von Denaturierungsschritten bzw. von Detergentien die nun ebenfalls vermuteten Wechselwirkungen aufgehoben werden konnten: die präparative SDS-PAGE.

### **Präparative SDS-PAGE**

Ein Gradientengel mit einer Acrylamidkonzentration von 7,5-20%, wie es auch von *SEITZ et al. (1991<sup>1</sup>, 1991<sup>2</sup>)* bei der Isolierung der sekretorischen Transglutaminase aus der Koagulationsdrüse der Ratte verwendet wurde, erwies sich als ungeeignet, um die TGase von den restlichen Seminalplasmaproteinen zu trennen.

Durch Verwendung von vorgefärbten Eichproteinen war es möglich, die Auftrennung im interessierenden Molekulargewichtsbereich durch direkte Schtkontrolle zu optimieren. Als optimal erwies sich schließlich ein Gel mit 10-12% Acrylamid, das eine deutliche Trennung der relevanten Eichproteine im Bereich von 60 bis 90 kDa und eine optimale Separation der 73 kDa HT-Bande von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht ermöglichte.

Die deutlich verbesserte Proteinauftrennung ergab außerdem auch, dass nun im Bereich von 67 bis 80 kDa zwei Doppelbanden zu erkennen waren. Bei der anschließenden Western Blot-Analyse reagierte nur die obere Doppelbande mit dem Antikörper gegen Ratten-CGS-TGase. Somit war klar, dass nur diese beiden Polypeptide zur Erzeugung eines spezifischen Antikörpers herangezogen werden durften. Beide wurden ausgeschnitten und Kaninchen subkutan injiziert. Die daraus resultierenden Antikörper wurden mit Anti-HST-1 und Anti-HST-2 bezeichnet. Sie wurden vor allem zum immunhistologischen Nachweis des Syntheseorts der seminalen TGase verwendet (siehe Kap. 3.12 und 4.8).

Wurde dieses optimal trennende SDS-Gel nun auch zur Analyse der anderen zur Verfügung stehenden Seminalplasmaproben verwendet, so zeigten sich besonders bei den Proben, die im anschließenden Western Blot ein sehr deutlich reagierendes Protein bei 73 kDa aufwiesen, zusätzliche kreuzreaktive Proteine mit kleinerem Molekulargewicht. Diese Proteolysefragmente wurden jedoch nicht für eine Immunisierung verwendet.

#### 4.4. Optimierung der Aktivitätsmessung für seminale TGase

Zur weiteren Charakterisierung der seminalen Isoform war es jedoch auch erforderlich einen reproduzierbaren Aktivitätstest zu etablieren.

Als Grundlage diente die 1973 von *EGBRING et al.* eingeführte Methode für Plasma-TGase (Faktor XIII), die auf der kovalenten Kopplung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Putrescin an N,N'-Dimethyl-Casein beruht. In Zusammenarbeit mit Prof. Egbring war dieser Test zuvor in unserer Arbeitsgruppe zur Quantifizierung der TGasen im Koagulationsdrüsensekret in Hodenextrakten sowie im Erythrozytenlysate verwendet worden.

Das eigene Augenmerk richtete sich auf die Festlegung des optimalen pH-Bereichs, den Einfluss der Pufferkomponenten, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die zur Fällung des Reaktionsprodukts notwendige Konzentration an Trichloressigsäure.

Alle TGasen besitzen auf ihrer Primärstruktur ein oder zwei Epitope, die potentielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen darstellen können. Auf der kürzlich veröffentlichten Sequenz der hTGp (*DUBBINK et al., 1996*) sind es die Aminosäuren 144-154 (EDMVFMPDEDE) und 433-453 (DITYEYKYPEGSSSEERQVMDH), die zwar kein typisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsmotiv darstellen, aber aufgrund der zahlreichen sauren Reste zur Bindung des Kations geeignet sind.

Beim Faktor XIIIa (siehe 1.2.1) wie bei der gewebsständigen TGase (siehe 1.2.4) führt eine Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu einer starken Konformationsänderung, erst jetzt können höhermolekulare Substrate an das aktive Zentrum andocken (*CASADIO et al., 1999*). Für die sekretorische Ratten-CGS-TGase (siehe 1.2.5.1) wurden ebenfalls 2 Bindungsstellen identifiziert, an die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen so fest binden, dass die Aktivität der Isoform nahezu unabhängig von einer weiteren Zugabe des Kations ist (*ESPOSITO et al., 1996*).

Alle anderen TGasen benötigen zur minimalen Aktivierung bis 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , für eine optimale Aktivität müssen zwischen 3 und 7 mM zugesetzt werden. Die eigenen Versuche ergaben, dass optimale Messergebnisse der Enzymaktivität der seminalen HT erzielt wurde, wenn diese in HEPES-Puffer (pH 8,5), dem maximal 9 mM  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt wurden, gemessen wurde. Eine Zugabe von 10% Trichloressigsäure erwies sich als optimal zur Fällung des Putrescin-markierten Caseins.

##### **Einfluss der Vorbehandlung der Ejakulatprobe auf die TGase-Aktivität**

Bei der Standardisierung der TGase-Enzymaktivitätsmessung zeigte sich, dass Seminalplasma aus längere Zeit eingefrorenen Ejakulatproben (und Hoden-Zellen) deutlich weniger TGase-Aktivität aufwies als frische Proben.

*CRITSER et al. (1987)* hatten untersucht, welchen Effekt das Einfrieren auf die Fertilisationseffizienz von Ejakulatproben hat. Sie führten aus, dass die Befruchtungsrate von Spermien aus eingefrorenem Ejakulat generell niedriger sei als die aus frischem

Ejakulat. Alle eingefrorenen Proben wiesen eine herabgesetzte Überlebensrate der Spermien und einen höheren Verlust an Akrosomenintegrität auf.

Dass es nach Einfrieren und Wiederauftauen bei vielen Enzymen zu einem Verlust an Enzymaktivität kommt, ist bekannt. Man setzt deshalb den Proben häufig Schutzfaktoren wie Albumin und/oder Glycerin zu, was den Aktivitätsverlust dann häufig mindert. Als sehr effizient hat sich seit kurzem auch die Zugabe von sogenannten „Ectoinen“ erwiesen, das sind kleine Moleküle, mit denen Bakterien unter extremen Bedingungen die Aktivität ihrer essentiellen Proteine schützen. Diese Substanzen, die heute kommerziell erhältlich sind, standen jedoch bei den eigenen Untersuchungen noch nicht zur Verfügung. Die Abnahme der TGase-Aktivität in den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Seminalplasmaproben ohne vorherige Zugabe von Schutzfaktoren war daher nicht sehr überraschend.

Bei den von uns getesteten Proben war stets die Dauer der Aufbewahrung in eingefrorenem Zustand bekannt. Man muss jedoch davon ausgehen, dass die untersuchten Ejakulatproben, die oft von Patienten mit Fertilitätsstörungen stammten, nicht optimal zur Bestimmung der „normalen“ biochemischen Eigenschaften der seminalen TGase waren.

Um mögliche Einschränkungen durch pathologische Veränderungen auszuschließen, wurde ein durch Masturbation gewonnenes Ejakulat eines fertilen Probanden ca. 30 Minuten, d.h. nach erfolgter Liquefaktion, zentrifugiert. Der Überstand (Seminalplasma) wurde unmittelbar danach auf TGase-Gesamt- und spezifische Aktivität getestet.

Ausgehend von der Vermutung, dass die Enzymaktivität erst nach längerer Aufbewahrung oder der Belastung durch Einfrieren und Auftauen einem Abbau unterliegt, wurde erwartet, dass in dieser frischen Seminalplasmaprobe die TGase-Aktivität deutlich höher sein sollte. Es zeigte sich jedoch, dass der frische Überstand eindeutig weniger spezifische und Gesamt-TGase-Aktivität enthielt als die meisten vor längerer Zeit eingefrorenen Samenproben.

Bisher waren wir davon ausgegangen, dass es sich bei der HT um eine lösliche, d.h. in die Samenflüssigkeit frei sezernierte Isoform handelte. Von anderen TGase-Isotypen war aber durchaus bekannt, dass sie auch an Membranen gebunden, also „partikulär“ vorliegen konnten. Es war somit dringend notwendig geworden, auch die vorher nicht berücksichtigten Pellets (bestehen vor allem aus Spermien) genauer zu untersuchen. Hinzu kam, dass *PORTA et al. (1986)* und *ABLIN und WHYARD (1991)* schon nachgewiesen hatten, dass TGase an normalen menschlichen Spermien gebunden vorliegen kann. Es stand daher zu erwarten, dass wir auch bei der uns zur Verfügung stehenden, frischen Ejakulatprobe in der resovatierten Spermien suspension eine sehr hohe TGase-Aktivität finden würden.

#### **4.5. Lokalisation der TGase in menschlichem Ejakulat**

Um die Hypothese, dass die TGase bei sehr frischen Ejakulatproben an den Spermien gebunden vorliegt, zu bestätigen, wurden zunächst einige dieser Ejakulatproben sofort nach Erhalt immunhistologisch mit dem Ratten-CGS-TGase-Antikörper untersucht.

Das Antiserum reagierte sehr deutlich im Bereich des Spermienkopfs unter Aussparung des Akrosoms. Eine Reaktion im Bereich des Halses und am Schwanz der Spermien, wie sie *ABLIN und WHYARD (1991)* beschrieben hatten, war bei der eigenen Untersuchung jedoch nicht zu erkennen.

Die Ergebnisse unserer Immunfärbungen lassen zunächst vermuten, dass bei frischen Ejakulatproben ein großer Teil der seminalen TGase an den Spermien gebunden vorliegen muss, während nur wenig TGase im Seminalplasma gelöst ist. Nach dem Auftauen von längere Zeit eingefrorenen Ejakulatproben scheint sich dagegen ein großer Teil der TGase von den Spermien zu lösen und ist deshalb im Überstand (=Seminalplasma) nachzuweisen.

Hinzu kommt, dass bei Proben, die nur zwei Wochen eingefroren waren, eine wesentlich höhere Aktivität zu messen war als nach 6 Wochen Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe. Da beide Proben nur jeweils einmal eingefroren und aufgetaut worden waren, muss vermutet werden, dass es auch während der Lagerung in eingefrorenem Zustand zu negativen Veränderungen kommt, und dies um so mehr, je länger die Lagerung andauert.

#### **4.6. Extraktion der im Spermienpellet gebundenen Transglutaminase**

Da die TGase im Spermienpellet bereits nach dem Auftauen im Überstand nachzuweisen ist, muss man annehmen, dass sie nicht in die Membran der Samenzellen integriert ist. Eine Assoziation an die Spermienoberfläche ist somit ebenso denkbar wie eine Bindung an weitere membranöse Strukturen im Pellet.

*SLIFE et al. (1987)* hatten bei Studien zur membrangebundene Form der Gewebe-TGase (TG<sub>C</sub>) in Rattenleberzellen gefunden, dass sich diese partikuläre Form nach längerer Lagerung der Zellen bei 4°C von der Membran ablöste und vermehrt im Überstand nachzuweisen war.

Falls es sich bei der seminalen TGase nun ebenfalls um ein an die Membran assoziiertes Enzym handeln sollte, so dürfte seine Solvatisierung auch mit relativ milden Mitteln möglich sein. Für die entsprechenden Versuche wurden nur Ejakulatproben von fertilen Spendern verwendet, die Proben wurden außerdem direkt nach der Samenverflüssigung untersucht.



Im Seminalplasma (Überstand) dieser Proben war nur eine relativ geringe spezifische Aktivität an TGase nachzuweisen. Das Pellet wurde zunächst in Puffern mit relativ geringer Ionenstärke resuspendiert und danach erneut zentrifugiert. In dem resultierenden Überstand fand sich eine etwa zehnfach höhere spezifische Aktivität als im zugehörigen Seminalplasma. Danach wurde das Pellet ein zweites Mal in einem Puffer mit höherer Salzkonzentration suspendiert. Auch dies führte zur Freisetzung von TGase mit hoher spezifischer Enzymaktivität. Man kann daraus schließen, dass TGase mit unterschiedlicher Bindungsaffinität im Spermienpellet vorliegt.

#### **4.7. Untersuchung von Ejakulat mit Azoospermie**

Es stellt sich nun die Frage, ob diese TGase sich bereits während der Reifung der Spermien im Nebenhoden an diese gebunden hat, oder ob sie im Rahmen der Ejakulation von einer der akzessorischen Drüsen abgegeben wurde und dann erst sekundär an die Spermien assoziiert wurde.

*AUMÜLLER et al.* untersuchten 1989, ob im Nebenhoden der Ratte TGase nachzuweisen ist. Sie präparierten Nebenhodenkopf und -schwanz und isolierten daraus die jeweilige Spermatozoenfraktion. Nach Homogenisation der Samenzellen konnten sie zeigen, dass nach Zentrifugation des Homogenats von Spermien aus dem Caputbereich im Überstand eine hohe TGase-Aktivität nachzuweisen war, die TGase also nur lose an den Spermien assoziiert vorgelegen hatte. Im Überstand des Homogenats von Cauda-Spermien war dagegen nur eine geringe TGase-Aktivität nachzuweisen. Deutlich mehr Enzymaktivität konnte jedoch aus dem Pellet der Cauda-Spermien gelöst werden, wenn Detergentien eingesetzt wurden. Die Autoren schlossen daraus, dass die Bindung von Transglutaminase an die Nebenhodenspermien ein Teil des Reifungsprozesses dieser Zellen bei der Ratte darstellt.

Wenn ein derartiger Reifungsprozess auch beim Menschen stattfindet, so dürfte im Umkehrschluss im Ejakulat von Azoospermie-Patienten mangels Zielzellen nahezu keine membrangebundene TGase nachzuweisen sein.

Da uns von der Marburger Andrologie ein derartiges Ejakulat zur Verfügung gestellt wurde, konnten wir versuchen, dies zu überprüfen. Der Proteingehalt der Seminalplasmafraktion lag in etwa im gleichen Bereich wie bei den früher untersuchten Proben von fertilen Spendern. Eine TGase-Aktivität war mit unserem Enzymtest nicht nachzuweisen, sie lag eindeutig unter der Nachweisgrenze. Das Seminalplasma wurde auch durch Western Blot-Analyse mit dem Ratten-CGS-TGase-Antikörper getestet. Nach längerer Anfärbung der Nitrocellulosemembran war eine schwache Bande bei 73 kDa zu erkennen. Durch das deutlich sensitivere immunchemische Verfahren konnte also eine geringe Menge an TGase-Antigen nachgewiesen werden. Mangels Materials war es aber nicht möglich, auch das Pellet dieser Azoospermieprobe zu untersuchen, so dass wir keine Aussage über den membrangebundenen Anteil an TGase machen konnten.

#### 4.8. Syntheseort der seminalen TGase

Nach Extraktion der beiden HST-Antigene aus den Spermienpellets und ihrer Isolierung durch präparative SDS-PAGE war es uns gelungen, gegen beide Polypeptide Antikörper in Kaninchen herzustellen. Ihre Spezifität wurde durch Western Blot bestätigt.

Wir verwendeten die beiden Antikörper Anti-HST-1 und Anti-HST-2 nun auch dazu, durch immunhistologisches Screening den Bildungsort der partikulären TGase-Isoform zu finden. Mit der Immunperoxidasetechnik wurden deshalb Paraffinschnitte aus menschlichem Hoden, Nebenhoden, Prostata und Bläschendrüse angefärbt. Zur Kontrolle wurden entsprechende Schnitte auch mit dem Antikörper gegen die Ratten-CGS-TGase gefärbt.

Anti-HST-2 zeigte auf keinem der untersuchten Schnitte eine spezifische Färbung. Die beiden anderen Antiseren (Anti-Ratten-CGS-TGase und Anti-HST-1) reagierten dagegen nahezu identisch: sie färbten spezifisch Epithelzellen in der Bläschendrüse. Keine oder nur unspezifische Immunreaktionen waren dagegen im Hoden, im Nebenhoden und in der Prostata zu registrieren.

Weitaus interessanter war die genaue Interpretation der immunpositiven Bläschendrüsenschnitte: Man konnte erkennen, dass besonders intensiv Blasen (Vesikulomen), die sich am apikalen Zellpol der Drüsenzellen abschnürten und auch in großer Zahl frei im Lumen vorlagen, mit den beiden Antikörpern reagierten. Das Färbemuster war somit identisch mit der Immunreaktion des Ratten-CGS-TGase-Antikörpers in der Ratten-Koagulationsdrüse. Auch hier hatten besonders deutlich die apikal sich bildenden "Aposomen" ebenso wie intraluminal verteilte Blasen reagiert. SEITZ et al. (1990) hatten daraus geschlossen, dass die Ratten-CGS-TGase nicht klassisch merokrin, sondern apokrin sezerniert wird.

Die apokrine Sekretion ist ein alternativer Exportweg für Proteine, die kein hydrophobes Signalpeptid zur Translokation in das ER-Lumen besitzen. Ihre Ausschleusung aus der sie produzierenden Zelle erfolgt also nicht über den Golgi-Apparat und Sekretgranula, sondern direkt aus dem Zytoplasma mittels apikaler Blasen (Aposomen).

Der von uns produzierte Antikörper gegen das HST-1-Antigen färbt nun völlig identisch. Daraus kann geschlossen werden:

1. Die von uns aus der partikulären Ejakulatfraktion extrahierte TGase (seminale TGase) wird in der Bläschendrüse gebildet und von dieser durch apokrine Sekretion exportiert.
2. Sie ist nicht identisch mit der menschlichen Prostata-TGase (hTG<sub>P</sub>), die von *ABLIN*, *DUBBINK* oder *GRANT* und ihren jeweiligen Mitarbeitern (Zitate s.o.) beschrieben wurden, sie ist aber möglicherweise strukturell verwandt. Auch die Prostata-Isoform besitzt kein Signalpeptid für die Translokation in das ER-Lumen. Sie dürfte aber nach

ihrer immunhistologischen und molekularen Charakterisierung eher der Gruppe der Gewebe-TGase zuzuordnen sein. Eine Freisetzung in die "Prostataflüssigkeit" dürfte eher auf eine Undichtigkeit oder die Zerstörung einzelner Zellen zurückzuführen sein.

3. Diese seminale TGase wird wahrscheinlich verpackt in intakten Blasen dem Ejakulat beigemischt. Diese Blasen könnten nach dem Zell-zu-Zell-Transfer-Modell von *KIRCHHOFF und HALE (1996)* helfen, die HT schließlich auch auf Spermien zu übertragen. Ob die seminale TGase dort zur Spermienreifung (*PAONESSA et al., 1984; PORTA et al., 1986*) oder zur Immunsuppression (*ABLIN et al., 1985; ABLIN und WHYARD, 1991*) wie im Rattenmodell (*METAFORA et al., 1989*) beiträgt, muss jedoch noch geprüft werden. Auf jeden Fall scheint der überwiegende Teil an "partikulärer" TGase im Ejakulat bzw. im Spermienpellet aus dieser in Vesikulosen verpackten Form zu bestehen. Es ist somit verständlich, warum in frischem Ejakulat die TGase vor allem im Pellet und nicht im Überstand (Seminalplasma) vorliegt. Wird die Samenprobe dagegen eingefroren und wieder aufgetaut, so platzen die Vesikulosen - und die HT ist dann gelöst im Überstand nachzuweisen.
4. Die Verpackung in intakten Vesikulosen im Ejakulat erklärt auch, warum im menschlichen Ejakulat die beiden Bläschendrüsene Proteine Semenogelin I und II, die den Hauptanteil des menschlichen Samenkoagulats bilden, *in vivo* nicht durch Glu-Lys-Isopeptidbindungen verbunden sind, obwohl sie *in vitro* sehr gute TGase-Substrate darstellen. Artifizial durch TGase vernetzte Semenogelinaggregate können im übrigen nur sehr schlecht durch PSA wieder hydrolysiert werden. Man kann deshalb vermuten, dass bei Samenproben, die eine sehr stark verzögerte Liquefifikation (Viskositopathie) oder überhaupt keine Liquefifikation zeigen (auch uns lag eine derartige Samenprobe vor, die nicht wieder verflüssigte), die genannten Bläschendrüsene Proteine durch Platzen von Vesikulosen bzw. untypisch hohe Zufuhr von Prostata-TGase (hTG<sub>P</sub>) quervernetzt und damit unlöslich gemacht wurden.

Durch einen weiteren Befund wird die große Homologie zum apokrinen Sekretionsmodus in der Ratten-Koagulationsdrüse bestätigt: *WILHELM et al. (1999)* konnten vor kurzen zeigen, dass deren Drüsene epithelzellen Serumalbumin auf einem noch unbekanntem Weg in das Zytoplasma aufnehmen. Das Serumprotein bindet dann mit großer Spezifität an die beiden apokrinen Proteine TGase und Carboanhydrase II und wird dann gemeinsam mit diesen in die Aposomen verpackt (*WILHELM et al., 1998; AUMÜLLER et al. 1999*). Es wirkt somit offensichtlich als Carrier für die apokrinen Proteine. Ein kommerzieller Antikörper gegen menschliches Serumalbumin färbt nun auf den Schnitten von menschlicher Bläschendrüse nahezu deckungsgleich zum Ratten-CGS-TGase- und zum HST-1-Antikörper die abknospenden und intraluminale Blasen (Vesikulosen). Man kann deshalb vermuten, dass Serumalbumin auch bei der menschlichen Drüse aus dem Blut in das Zytoplasma der Bläschendrüsene epithelzellen transportiert wird, dort an die HT bindet und zusammen mit dieser über Vesikulosen exportiert wird.

## 4.9 Folgerungen

HST-1 ( $M_r$  73 kDa,  $pI$  7,6) unterscheidet sich von den bisher gefundenen humanen „seminalen TGasen“ die u.a. von *ABLIN und WHYARD 1991* (tissue type (TG<sub>C</sub>), membrangebunden,  $M_r$  83 kDa) und *DUBBINK (1999)*, prostata-spezifische TGase (hTGp), sekretorisch,  $M_r$  77 kDa) bisher nachgewiesen wurden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um HST-1 genauer (molekulargenetisch) zu charakterisieren und um deren Rolle in der Biologie der Reproduktion und deren Pathologien zu erforschen.

Da die Ejakulatproben, die in dieser Arbeit verwendet wurden, hauptsächlich von Patienten im Rahmen einer Infertilitätsabklärung gewonnen wurden, ist eine Abweichung des TGase-Vorkommens verglichen mit dem der Normalbevölkerung möglich. Daher wäre es sinnvoll, im Rahmen von Vasektomien das Ejakulat von ein und dem selben Patienten vor und nach der Vasektomie auf das Vorkommen von TGase im Ejakulat zu untersuchen. Hierdurch könnte leicht festgestellt werden, ob die TGase bei solchen gesunden und vor der Vasektomie fertilen Patienten an Spermien gebunden in das Ejakulat gelangt, und wie das Enzym sich nach der Vasektomie verhält. Bei Patienten, die vor der Vasektomie fertil waren, könnte eventuell auch festgestellt werden, ob das Vorkommen bzw. Fehlen von TGase im Ejakulat mit der Fertilität korreliert.

Im Ejakulat wurden beim Menschen bisher drei TGase-Isoformen nachgewiesen (s.o.). Bei der Extraktion der sekretorischen, partikulär vorliegenden, seminalen TGase (HST-1) hatte sich in einem ersten Extraktionsschritt eine hohe TGase-Aktivitätsmenge von den Spermien lösen lassen. Ein weiteres Lösen der verbliebenen Enzymaktivität ließ sich nur mit drastischen Methoden erzielen. Es sollte mit spezifischen Antikörpern geklärt werden, ob es sich bei der lose und der fest gebundenen Form um die gleiche TGase handelt oder ob eine andere Isoform vorliegt (s.o.).

Im Epithel der Koagulationsdrüse der Ratte wurde eine apokrine Sekretion von Ratten-Serumalbumin, TGase und Carboanhydrase in dem apikalen Zellpol und in intraluminalen Blasen (Vesikulosen) von anderen Autoren (*WILHELM et al., 1999; WILHELM et al., 1998; AUMÜLLER et al., 1999*) bereits nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine TGase und Human-Serumalbumin ebenfalls im Bläschendrüseneithel und in intraluminalen Vesikulosen immunhistochemisch gezeigt. Es wäre auch von Interesse, mittels spezifischer Antikörper gegen menschliche Carboanhydrasen Bläschendrüsenschnitte immunologisch zu untersuchen, um festzustellen, ob im apikalen menschlichen Bläschendrüseneithel und in dessen Vesikulosen ebenfalls Carboanhydrase vorhanden ist. Die Funktionen dieser Proteine/Enzyme im Reproduktionstrakt müssen noch geklärt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Transglutaminasen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige intra- und extrazelluläre Enzyme, die die Quervernetzungen von Proteinen und/oder Polyaminen katalysieren. In der vorliegenden Arbeit sollte das Vorkommen spezifischer Formen der Transglutaminase im menschlichen Ejakulat und in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen untersucht werden. Es sollte außerdem eine Methode zur Reinigung und Isolierung der dort vorkommenden Transglutaminase etabliert und das Molekulargewicht und pI der isolierten Enzymform bestimmt werden. Durch die Erzeugung von spezifischen TGase-Antikörpern sollte der Syntheseort des Enzyms im männlichen Genitaltrakt lokalisiert werden.

In etwa der Hälfte der 143 untersuchten menschlichen Ejakulatproben wurde eine Transglutaminase (HST-1, human seminal TGase) bei einem Molekulargewicht von 73 kDa und pI von 7,6 nachgewiesen. Zur Detektion im Western Blot wurde die immunologische Kreuzreaktivität mit der TGase im Sekret der Rattenkoagulationsdrüse (CGS-TGase, DP1) genutzt. Immunhistochemische Untersuchungen mit dem Antikörper gegen diese CGS-TGase an Ausstrichen von humanem Ejakulat zeigten, dass die kreuzreaktive menschliche Isoform (HST-1) u.a. assoziiert am Kopf ejakulierter Spermien (unter Aussparung des Akrosoms) nachgewiesen werden kann.

Nachdem es gelungen war, HST-1 (73 kDa) durch Western Blot-Analyse in einem Teil der menschlichen Ejakulate eindeutig nachzuweisen, wurde versucht, diese TGase aus dem Ejakulat bzw. nach Solubilisierung aus der Spermienfraktion zu isolieren. Ein Teil des Enzyms konnte mit Hilfe milder Puffer von den Spermien abgelöst werden, war also nur locker mit den Samenzellen assoziiert. Ein weiterer Teil lies sich erst nach Erhöhung der Salzkonzentration bzw. noch effizienter nach Zusatz von Detergentien solvatisieren. Diese Fraktion war also offensichtlich membrangebunden oder lag verpackt in pelletierbaren Vesikeln im Samen vor. Ein radioaktiver Enzymtest mit hoher Spezifität wurde eingesetzt, um die einzelnen Reinigungsschritte quantitativ auszuwerten. HST-1 wurde schließlich zur Homogenität gereinigt und für die Herstellung eines spezifischen Antikörpers (Anti-HST-1) Kaninchen injiziert

Mit diesem neuen Antikörper gegen die seminale TGase war das HST-1 Antigen nach immunhistologischer Untersuchung des gesamten männlichen Genitaltrakts ausschließlich in der Bläschendrüse nachzuweisen. Im humanen Hoden, Nebenhoden und in der Prostata konnte HST-1 immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden, es wird also ganz offensichtlich beim Menschen spezifisch von den Bläschendrüsen gebildet. Die detaillierte Auswertung der immunhistologischen Färbungen ergab außerdem eine spezifische Markierung des Zytoplasmas am apikalen Zellpol sowie von zahlreichen Blasen (Vesikulosen) im Lumen der Drüse. Das Enzym liegt somit nach der Abgabe in Vesikeln verpackt und nicht gelöst im Sekret vor. Wir schließen daraus, dass HST-1 wie die TGase der Rattenkoagulationsdrüse über einen alternativen

Exportmodus, die sogenannte apokrine Sekretion, abgegeben wird. Zur Kontrolle wurden Folgeschnitte der humanen Bläschendrüse mit Anti-CGS-TGase gefärbt, das Färbemuster war, wie zu erwarten, identisch mit dem des Anti-HST-1-Antikörpers. Schließlich konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass auch humanes Serumalbumin von den Bläschendrüseneithelzellen apokrin sezerniert wird. Wir vermuten, dass das basal von den Zellen aufgenommene Serumprotein wie bei der Rattenkoagulationsdrüse als Carrierprotein dienen könnte, um die TGase unter Ausschluss der übrigen zytoplasmatischen Proteine in die Vesikulosomen zu transportieren.

Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das menschliche Bläschendrüseneithel zwei Sekretionsmodi für Proteine benutzt: die merokrine Art für Semenogelin und Fibronectin, den apokrinen Weg für HST-1 und Albumin.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ablin** RJ, Bartkus JM, Gonder MJ : Immunosuppression by seminal plasma. *Immunology Today* **1985**; 6: 200
- Ablin** RJ, Whyard TC: Identification and possible biological relevance of spermatozoal transglutaminase. *Experientia* **1991**; 47: 277-279
- Ablin** RJ: Transglutaminase: Co-factor in aetiology of AIDS. *The Lancet* **1985** (April 6); 813-814
- Achyuthan** KE: Enhanced chemiluminescent assay for transglutaminases. *BioTechniques* **1999**; 26: 435-441
- Acott** TS, Hoskin DD: Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **1981**; 24(2): 234-240
- Adany** R, Antal M: Three different cell types can synthesize factor XIII subunit a in the human liver. *Thromb Hemost* **1996**; 76:74-79
- Adany** R: Intracellular factor XIII: cellular distribution of factor XIII subunit a in humans. *Semin Thromb Hemost* **1996**; 22: 399-408
- Aeschlimann** D, Kaupp O, Paulsson M: Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminy substrate. *J Cell Biol* **1995**; 129: 881-892
- Aeschlimann** D, Koeller MK, Allen-Hoffmann BL, Mosher DF: Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. Detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Biol Chem* **1998**; 273: 3452-3460
- Anderson** D, Peterson C: High resolution electrophoresis of proteins in SDS polyacrylamide gels. *Electrophoresis '81*. Walter de Gruyter & Co., Berlin New York, **1981**
- Asahina** T, Kobayashi T, Terao T: Studies on the immunohistochemical localization of adhesive factors at the site of implantation in early pregnancy. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **1990**; 42(9): 1168-1174
- Aumüller** G, Adler G: Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res* **1979**; 198: 145-158
- Aumüller** G, Enderle-Schmitt U, Seitz J, Muntzing J, Chandler JA: Ultrastructure and immunohistochemistry of the lateral prostate in aged rats. *Prostate* **1987**; 10: 245-256
- Aumüller** G, Hüntemann S, Larsch KP, Seitz J: Seminal proteins binding to spermatozoa. *Prog Clin Biol Res* **1989**; 296: 241-8
- Aumüller** G, Pohl C, van Etten RL, Seitz J: Immunohistochemistry of acid phosphatase in the human prostate: normal and pathologic. *Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases II*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **1981**; 35(3): 249-62
- Aumüller** G, Seitz J: Immunelectron microscopic evidence for different compartments in the secretory vacuoles of the rat seminal vesicles. *Histochem J* **1986**; 18(1): 15-23

- Aumüller G, Seitz J:** Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **1990**; 121: 127-231
- Aumüller G, Vesper M, Seitz J, Kemme M, Scheidt KH:** Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell Tissue Res* **1988**; 252: 377-384
- Aumüller G, Wilhelm B, Seitz J:** Apocrine secretion – fact or artifact? *Ann Anat* **1999** 181: 437-446
- Bairoch A, Apweiler R:** The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* **2000**; 28(1): 45-8
- Ballestar E, Abad C, Franco L:** Core histones are glutaminyl substrates for tissue transglutaminase. *J Biol Chem* **1996**; 271: 18817-18824
- Bergamini CM:** GTP modulates calcium binding and cation-induced conformational changes in erythrocyte transglutaminase. *FEBS Lett* **1988**; 239: 255-258
- Bernerd F, Asselineau D:** Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Dev Biol* **1997**; 183(2): 123-138
- Birckbichler PJ, Orr GR, Patterson MK Jr:** Differential transglutaminase distribution in normal rat liver and rat hepatoma. *Cancer Res* **1976**; 36(8): 2911-2914
- Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJ:** Factor XIII: inherited and acquired deficiency. *Blood Rev* **1993**; 7: 229-242
- Bottenus RE, Ichinose A, Davie EW:** Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII. *Biochemistry* **1990**; 29: 11195-11209
- Bowness JM, Sewell AS, Tarr AH:** Increases  $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$  crosslinking associated with increased protein synthesis in the inner layers of healing rat skin wounds. *Biochim Biophys Acta* **1992**; 1116(3): 324-330
- Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**; 72: 248-254
- Brenner SC, Wold F:** Human erythrocyte transglutaminase purification and properties. *Biochim Biophys Acta* **1978**; 522(1): 74-83
- Bures DM, Goldsmith LA, Stone KR:** Transglutaminase activity of cultured human prostatic epithelium. *Invest Urol* **1980**; 17: 298-301
- Buxman MM, Lobitz CJ, Wuepper KD:** Epidermal transglutaminase. Identification and purification of a soluble substrate with studies in vitro cross-linking. *J Biol Chem* **1980**; 255(3): 1200-1203
- Buxman MM, Wuepper KD:** Cellular localisation of epidermal transglutaminase: a histochemical and immunochemical study. *J Histochem Cytochem* **1978**; 26(5): 340-348
- Buxman MM, Wuepper KD:** Isolation, purification and characterisation of bovine epidermal transglutaminase. *Biochem Biophys Acta* **1976**; 452(2): 356-369
- Buxman MM, Wuepper KD:** Keratin cross-linking and epidermal transglutaminase. A review with observations on the histochemical and immunochemical localization of the enzyme. *Invest Dermatol* **1975**; 65(1): 107-112



- Camus L**, Gley, E: Notes sur quelques faits relatifs à l'enzyme prostatique (vésiculase) et sur la fonction des glandes vésiculaires. C. R. Soc. Biol. (Paris) **1896**; 48: 787-790
- Cassadio R**: Polverini E, Mariani P, Spinozzi F, Carsughi F, Fontana A, Polverino de Laureto P, Matteucci G, Bergamini CM: The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions. Eur J Biochem **1999**; 262, 672-679
- Chaistitvanich N**, Boonsaeng V: Molecular structure of human seminal coagulum: the role of disulfid bonds. Andrologica **1983**; 15(5): 446-451
- Chow PH**, Pang SF: Ultrastructure of secretory cells of male accessory sex glands of golden hamster and effect of melatonin. Acta Anat **1989**; 134: 327-340
- Chung SI**, Chang SK, Cocuzzi ET, Folk JE, Kim HC, Lee SY, Martinat N, Nigra T, Sun HS: Modulation of cellular transglutaminase: protease-induced activation. Adv Exp Med Biol **1988**; 231: 1-13
- Chung SI**, Folk JE: Transglutaminase from hair follicle of guinea pig (crosslinking-fibrin-glutamyllysine-isoenzymes-purified-enzyme). Proc Natl Acad Sci USA **1972**; 69(2): 303-307
- Cocuzzi ET**, Chung SI: Cellular transglutaminase: lung matrix-associated transglutaminase: characterization and activation with sulfhydryls. J Biol Chem **1986**; 261(18): 8122-8127
- Commo S**, Bernard BA: Immunohistochemical analysis of tissue remodelling during the anagen-catagen transition of the human hair follicle. Br J Dermatol **1997**; 137(1): 31-38
- Connellan JM**, Chung SI, Whetzel NK, Bradley LM, Folk JE: Structural properties of guinea pig liver transglutaminase. J Biol Chem **1971**; 246(4): 1093-1098
- Cooper AJ**, Sheu KF, Burke JR, Strittmatter WJ, Gentile V, Peluso G, Blass JP: Pathogenesis of inclusion bodies in (CAG)<sub>n</sub>/Qn-expansion diseases with special reference to the role of tissue transglutaminase and to selective vulnerability. J Neurochem **1999**; 72: 889-899
- Cooper<sup>1</sup> TG**: Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin New York, **1981**: 348-352
- Cooper<sup>2</sup> TG**: Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin New York, **1981**: 355-357
- Cooper<sup>3</sup> TG**: Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin New York, **1981**: 196-199
- Critser JK**, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD: Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. Fertil Steril **1987**; 47(4): 656-63. Published erratum appears in Fertil Steril **1987**; 48(3): 575
- Crowle AJ**, Cline LJ: An improved stain for immunodiffusion tests. J Immunol Methods **1977**; 17(3-4): 379-381
- Cummings M**: Apoptosis of epithelial cells in vivo involves tissue transglutaminase upregulation. J Pathol **1996**; 179: 288-293
- Dias JA**: Transglutaminase activity in testicular homogenates and serum-free Sertoli cell cultures. Biol Reprod **1985**; 33: 835-843

- Dieterich** W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* **1997**; 3: 797-801
- Dubbink** HJ, de Waal L, van Haperen R, Verkaik NS, Trapman J, Romijn JC: The human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4): genomic organization, tissue-specific expression, and promoter characterization. *Genomics* **1998**; 51:434-444
- Dubbink** HJ, Hoedemaeker RF, van der Kwast TH, Schröder FH, Romijn JC: Human prostate-specific transglutaminase: a new prostatic marker with a unique distribution pattern. *Lab Invest* **1999**; 79: 141-150
- Dubbink** HJ, Verkaik NS, Faber PW, Trapman J, Schroder FH, Romijn JC: Tissue-specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase. *Biochem J* **1996**; 315: 901-908
- Duckert** F, Jung E, Schmerling DH: A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. *Thromb Diath Haemorrh* **1960**; 5: 179-186
- Egbring** R, Kroninger A, Seitz R: Factor XIII deficiency: pathogenic mechanisms and clinical significance. *Semin Thromb Hemost* **1996**; 22:419-425
- Egbring** R, Schmidt W, Havemann K: Die vereinfachte radiologische Faktor-XIII-Bestimmung und ihre klinische Anwendung bei kongenitalem Faktor-XIII-Mangel (I). *Blut* **1973**; 27(1): 6-19
- Eitan** S, Schwartz M: A transglutaminase that converts interleukin-2 into a factor cytotoxic to oligodendrocytes. *Science* **1993**; 261: 106-108
- Eitan** S, Solomon A, Lavie V, Yoles E, Hirschberg DL, Belkin M, Schwartz M: Recovery of visual response of injured adult rat optic nerves treated with transglutaminase. *Science* **1994**; 264:1764-1768
- El Alaoui** S, Legastelois S, Roch AM, Chantepie J, Quash G: Transglutaminase activity and N epsilon (gamma glutamyl) lysine isopeptide levels during cell growth: an enzymic and immunological study. *Int J Cancer* **1991**; 48: 221-226
- Enderle-Schmitt** U, Erkel J, Goebel HW, Heils A, Rausch U, Seitz J, Aumüller G: Specific proteins of the prostate. In: *New aspects in the regulation of prostatic function* (ed. G. Aumüller, M. Krieg, T. Senge). Zuckschwerdt-Verlag, München, Bern, Wien, San Francisco **1989**, 82-96
- Erkel** J, Seitz J, Aumüller G: Transglutaminases in rodent and human seminal fluid. *Zuchthygiene* **1988** Juni; 23 (3): 100. XIII. Gemeinschaftstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (Fachgruppe "Fortpflanzung und ihre Störungen"), Vortragsveranstaltung Physiologie u. Pathologie d. Fortpflanzung 11./12.02.1988, Hannover
- Esposito** C, Esposito C, Caputo I, Colicchio P, Porta R, Ragone R: Overlapping between fluorescence modifications and activation of prostate transglutaminase induced by sodium dodecyl sulfate. *Arch Biochem Biophys* **1999**; 366: 47-54
- Esposito** C, Pucci P, Amoresano A, Marino G, Cozzolino A and Porta R: Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. *J Biol Chem* **1996**; 271: 27416-27423
- Fésus** L, Arato G: Quantitation of tissue transglutaminase by a sandwich ELISA system. *J Immunol Methods* **1986**; 94(1-2): 131-136

- Fésus L**, Davies PJA, Piacentini M: Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* **1991**; 56: 170-177
- Fésus L**, Laki K: Two antigenic sites of tissue transglutaminase. *Biochemistry* **1977**; 16: 4061-4066
- Fésus L**, Thomazy V, Falus A: Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* **1987**; 224: 104-108
- Fink ML**, Shao YY, Kersh GJ: A fluorometric, high-performance liquid chromatographic assay for transglutaminase activity. *Anal Biochem* **1992**; 201(2): 270-276
- Fisher S**, Rikover M, Naor S: Factor XIII deficiency with severe hemorrhagic diathesis. *Blood* **1966**; 28(1): 34-39
- Floyd EE**, Jetten AM: Regulation of type I (epidermal) transglutaminase mRNA levels during squamous differentiation: down regulation by retinoids. *Mol Cell Biol* **1989**; 9: 4846-4851
- Folk<sup>1</sup> JE**: Transglutaminases. *Annu Rev Biochem* **1980**; 49: 517-531 Review
- Folk<sup>2</sup> JE**, Park MH, Chung SI, Schroede J, Lester EP, Cooper HL: Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. *J Biol Chem* **1980**; 255(8): 3695-3700
- Friedrichs B**, Riedmiller H, Goebel HW, Rausch HW, Aumüller G: Immunological characterisation and activity of transglutaminases in human normal and malignant prostate and in prostate cancer cell lines. *Urol Res* **1995**; 23: 301-310
- Galdiero F**, Tufano MA, De Martino L, Capasso C, Porta R, Ravagnan G, Peluso G, Metafora S: Inhibition of macrophage phagocytic activity by SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. *J Reprod Immunol* **1989**; 16: 269-284
- Gibbs<sup>1</sup> S**, Vicanova J, Bouwstra J, Valstar D, Kempenaar J, Ponc M: Culture of reconstructed epidermis in a defined medium at 33 degrees C shows a delayed epidermal maturation, prolonged lifespan and improved stratum corneum. *Arch Dermatol Res* **1997**; 289(19): 585-595
- Gibbs<sup>2</sup> S**, Vicanova J, Bouwstra J, Valstar D, Wolf R, Lo Schiavo A, Lombardi ML, Esposito C, Ruocco V: The effect of hydrochloroquine on skin morphology and transglutaminase. *Int J Dermatol* **1997**; 36(9): 704-707
- Gomis R**, Arbos MA, Sener A, Malaisse WJ: Glucose-induced activation of transglutaminase in pancreatic islets. *Diabetes Res* **1986**; 3(3): 115-117
- Gorman JJ**, Folk JE: Transaminase amine substrates for photochemical labeling and cleavage cross-linking of proteins. *J Biol Chem* **1980**; 255(3): 1175-1180
- Gotterer G**, Ginsberg D, Schulman T, Banks J, Willims-Ashman HG: Enzymatic coagulation of semen. *Nature* **1955**; 176: 1209-1211
- Grant FJ**, Taylor DA, Sheppard PO, Mathewes SL, Lint W, Vanaja E, Bishop PD, O'Hara PJ: Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from a human prostate cDNA library. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**; 203(2): 1117-1123
- Grasso P**, Dattatreymurthy B, Dias J, Reichert LE Jr: Transglutaminase activity in bovine calf testicular membranes: evidence for a possible role in the interaction of follicle-stimulating hormone with its receptor. *Endocrinology* **1987**; 121(2): 459-465

- Greenberg** CS, Birckbichler PJ, Rice RH: Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* **1991**; 5(15): 3071-3077
- Grinnell** F, Feld M, Minter, D: Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* **1980**; 19: 517-525
- Groos** S, Wilhelm B, Renneberg H, Riva A, Reichelt R, Seitz J, Aumüller G: Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland. *Cell Tissue Res* **1999**; 295:495-504
- Grundmann** U, Amann E, Zettlmeissl G, Kupper HA: Characterization of cDNA coding for human factor XIIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**; 83(21): 8024-8028
- Grundmann** U, Nerlich C, Rein T, Zettlmeissl G: Complete cDNA sequence encoding the B subunit of human factor XIII. *Nucleic Acids Res* **1990**; 18: 2817-2818
- Gudemann** DM, Brightman MW, Merisko EM, Merrill CR: Release from live choroid plexus of apical fragments and electrophoretic characterization of their synthetic products. *J Neurosci Res* **1989**; 24: 184-191
- Hansen** LA, Alexander N, Hogan ME, Sundberg JP, Dlugosz A, Threadgill DW, Yuspa SH: Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *Am J Pathol* **1997**; 150(6): 1959-1975
- Harding** HW, Rogers GE: Formation of the  $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$  lysine cross-link in hair proteins. Investigation of transamidases in hair follicles. *Biochemistry* **1972**; 11(15): 2858-2863
- Harris** SE, Harris MA, Johnson CM, Bean MF, Dodd JG, Matusik RJ, Carr SA, Crabb JW: Structural characterization of the rat seminal vesicle secretion II protein and gene. *J Biol Chem* **1990**; 265(17): 9896-9903
- Hawkins** WE, Geuze JJ: Secretion in the rat coagulating gland after copulation. *Cell Tissue Res* **1977**; 181: 519-529
- Hines** MD, Allen-Hoffmann BL: Keratinocyte growth factor inhibits cross-linked envelope formation and nucleosomal fragmentation in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* **1996**; 271(11): 6245-6251
- Ho** K-C, Quarmby VE, French FS, Wilson EM: Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA. *J Biol Chem* **1992**; 267: 12660-12667
- Hohl** D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM: Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem* **1991**; 266(10): 6626-6636
- Homann** B, Blumenberg D, Lerner H: Das Verhalten des Faktor XIII nach Operationen. *Anaesthesist* **1984**; 33(3): 145-148
- Hornyak** TJ, Shafer JA: Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry* **1992**; 31(2): 423-429
- Hüntemann** S: Nachweis und Charakterisierung von Transglutaminase im Samenleitenden Epithel der Ratte. Diplomarbeit im Fach Humanbiologie, Fachbereich Medizin Philipps-Universität Marburg. **1987**
- Ichinose** A, Hendrickson LE, Fujikawa K, Davie EW: Amino acid sequence of the  $\alpha$  subunit of human factor XIII. *Biochem* **1986**; 25(22): 6900-6906

- Ideguchi** H, Nishimura J, Nawata H, Hamasaki N: A genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* **1990**; 74(3): 347-353
- Im** MJ, Russel MA, Feng JF: Transglutaminase II: a new class of GTP-binding protein with new biological functions. *Cell Signal* **1997**; 9:477-482
- Jackson** CM, Nemerson Y: Blood coagulation. *Ann Rev Biochem* **1980**; 49: 765-811  
Review
- James** K, Hargreave TB: Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol Today* **1984**; 5: 357-363
- Jetten** AM, Shirley JE, Stoner G: Regulation of proliferation and differentiation of respiratory tract epithelial cells by TGF beta. *Exp Cell Res* **1986**; 167(2): 539-549
- Jetten** AM, Shirley JE: Characterization of transglutaminase activity in rabbit tracheal epithelial cells. Regulation by retinoids. *J Biol Chem* **1986**; 261(32): 15097-15101
- Johnson** EW, Meunier SF, Roy CJ, Parenteau NL: Serial cultivation of normal human keratinocytes: a defined system for studying the regulation of growth and differentiation. *In vitro Cell Dev Biol* **1992**; 28A(6): 429-435
- Johnson** TS, Griffin M, Thomas GL, Skill J, Cox A, Yang B, Nicholas B, Birckbichler PJ, Muchaneta-Kubara C, Meguid El Nahas A: The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *J Clin Invest* **1997**; 99: 2950-2960
- Jones** LN, Steinert PM: Hair keratinization in health and disease. *Dermatol Clin* **1996**; 14(4): 633-650
- Katoh** S, Nakagawa N, Yano Y, Satoh K, Kohno H, Ohkubo Y: Transglutaminase induced by epidermal growth factor negatively regulates the growth signal in primary cultured hepatocytes. *Biochem J* **1996**; 313(Pt1): 303-309
- Katz** DF, Davis RO: Automatic analysis of human sperm motion. *J Androl* **1987**; 8(3): 170-181
- Keski-Oja** J, Mosher DF: Cross-linking of a major fibroblast surface-associated glycoprotein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XIII. *Cell* **1976**; 9(1): 23-35
- Kim** HC, Lewis MS, Gorman JJ, Park SC, Girard JE, Folk JE, Chung SI: Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem* **1990**; 265: 21971-21978
- Kim** SY, Chung SI, Steinert PM: Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* **1995**; 270: 18026-18035
- Kirchhoff** Ch , Hale G: Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* **1996**; 2: 177-184
- Knight**<sup>1</sup> CR, Rees RC, Elliott BM, Griffin M: The existence of an inactive form of transglutaminase within metastasizing tumours. *Biochim Biophys Acta* **1990**; 1053(1): 13-20

- Knight**<sup>2</sup> CR, Rees RC, Elliott BM, Griffin M: Immunological similarities between cytosolic and particulate tissue transglutaminase. *FEBS Lett* **1990**; 265(1-2): 93-96
- Kojima** S, Nara K, Rifkin, DB: Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Biol* **1993**; 121: 439-448
- Korsgren** C, Lawler J, Lambert S, Speicher D, Cohen CM: Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 42. *Proc Natl Acad Sci* **1990**; 87(2):613-617
- Krause** W, Rothauge CF: *Andrologie*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, **1991**
- Krichen** C, Klinische Bedeutung des Faktor-XIII-Mangels und dessen Bestimmung mit einfachen Löslichkeitstests. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, **1985**: 18-27
- Kumazawa** Y, Ohtsuka T, Ninomiya D, Seguro K: Purification and calcium dependence of transglutaminases from sheep hair follicle. *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**; 61(7): 1086-1090
- Kurosumi** K, Shibasaki S, Ito T: Cytology of the secretion in mammalian sweat glands. *Int Rev Cytol* **1984**; 87: 253-329
- Kvedar** HC, Pion IA, Bilodeau EB, Baden HP, Greco MA: Detection of substrates of keratinocyte transglutaminase in vitro and in vivo using a monoclonal antibody to dansylcadaverine. *Biochemistry* **1992**; 31(1): 49-56
- Laemmli** UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **1970**; 227(259): 680-685
- Lai** TS, Slaughter TF, Koropchak CM, Haroon ZA, Greenberg CS: C-terminal deletion of human tissue transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *J Biol Chem* **1996**; 271(49): 31191-31195
- Lai** TS, Slaughter TF, peoples KA, Hettasch LM, Greenberg CS: Regulation of human tissue transglutaminase function by magnesium-nucleotide complexes. *J Biol Chem*. **1998**; 273: 1776-1781
- Lamirande** E, Gagnon C: Effects of transglutaminase substrates and inhibitors on the motility of demembrated reactivated spermatozoa. *Gamete Res* **1989**; 22: 179-192
- Lee** KN, Arnold SA, Birckbichler PJ, Patterson MK Jr., FraiJ BM, Takeuchi Y, Carter HA: Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity. *Biochim Biophys Acta* **1993**; 1202: 1-6
- Lee** KN, Birckbichler PJ, Fésus L: Purification of human erythrocyte transglutaminase by immunoaffinity chromatography. *Prep Biochem* **1986**; 16: 321-335
- Lee** KN, Birckbichler PJ, Patterson MK Jr: GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**; 162: 1370-1375
- Lesort** M, Attavanich K, Zhang J, Johnson GV: Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase. *J Biol Chem* **1998**; 273:11991-11994
- Lichti** U, Ben T, Yuspa SH: Retinoic acid-induced transglutaminase in mouse epidermal cells is distinct from epidermal transglutaminase. *J Biol Chem* **1985**; 260(3): 1422-1426

- Lichti U:** Hair follicle transglutaminases. *Ann N Y Acad Sci* **1991**; 642: 82-98; discussion 98-99
- Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB:** Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* **1987**; 80: 281-285
- Loewy AG:** Wirkungsmechanismus des Faktor XIII. *Thromb Diath Haemorrh Suppl* **1968**; 28:1-12; discussion; 23-54
- Lorand L, Conrad SM:** Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* **1984**; 58: 9-35
- Lorand L, Siefering GE Jr, Tong YS, Bruner-Lorand J, Gray AJ Jr.:** Dansylcadaverine specific staining for transamidating enzymes. *Anal Biochem* **1979**; 93(2): 453-458
- Lundwall A, Peter A, Lovgren J, Lilja H, Malm J:** Chemical characterization of the predominant proteins secreted by mouse seminal vesicles. *Eur J Biochem* **1997**; 249: 39-44
- Lundwall A:** The cloning of a rapidly evolving seminal-vesicle-transcribed gene encoding the major clot-forming protein of mouse semen. *Eur J Biochem* **1996**; 235: 424-430
- Maccioni RB, Arechaga J:** Transglutaminase (TG) involvement in early embryogenesis. *Exp Cell Res* **1986**; 167(1): 266-270
- Maccioni RB, Seeds NW:** Transglutaminase and neuronal differentiation. *Mol Cell Biochem* **1986**; 69(2): 161-168
- Manjunath R, Chung SI, Mukherjee AB:** Crosslinking of uteroglobin by transglutaminase. *Biochem Biophys Res Commun* **1984**; 121: 400-407
- Martinet N, Kim HC, Girard JE, Nigra TP, Strong DH, Chung SI, Folk JE:** Epidermal and hair follicle transglutaminase. *J Biol Chem* **1988**; 263(9): 4236-4241
- Melino G, De Laurenzi V, Catani MV, Terrinoni A, Ciani B, Candi E, Marekov L, Steinert PM:** The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Results Probl Cell Differ* **1998**; 24:175-212
- Metafora S, Peluso G, Persico P, Ravagnan G, Esposito C, Porta R:** Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 121-131
- Michel M, L'Hereux N, Auger FA, Germain L:** From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J Cell Physiol* **1997**; 171(2): 179-189
- Miller ML, Johnson GV:** Rapid, single-step procedure for the identification of transglutaminase-mediated isopeptide crosslinks in amino acid digests. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1999**; 732: 65-72
- Mirza A, Liu SL, Frizell E, Zhu J, Maddukuri S, Martinez J, Davies P, Schwarting R, Norton P, Zern MA:** A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. *Am J Physiol* **1997**; 272: G281-G288
- Mosher DF, Schad PE, Vann JM:** Cross-linking of collagen and fibronectin by factor XIIIa. Localization of participating glutaminy residues to a tryptic fragment of fibronectin. *J Biol Chem* **1980**; 255(3): 1181-1188

- Mukherjee** DC, Agrawal AK, Manjunath R, Mukherjee AB: Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase in vitro. *Science* **1983**; 219: 989-991
- Muszbek** L, Adany R, Kawai M, Boda Z, Lopaciuk S: Monocytes of patients congenitally deficient in plasma factor XIII lack factor XIII subunit A antigen and transglutaminase activity. *Thromb Haemost* **1988**; 59(2): 231-235
- Muszbek** L, Adany R, Mikkola H: Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci* **1996**; 33(5): 357-421
- Nara** K, Ito S, Suzuki Y, Ghoneim MA, Tachibana S, Hirose S: Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem (Tokyo)* **1994**; 115: 441-448
- Nissen** JB, Kragballe K: Enkephalins modulate differentiation of normal human keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol* **1997**; 6(5): 222-229
- Nonaka** M, Matsuda Y, Shiroshi T, Moriwaki K, Nonaka M, Natsuume-Sakai S: Molecular cloning of the b subunit of mouse coagulation factor XIII and assignment of the gene to chromosome 1: close evolutionary relationship to complement factor H. *Genomics* **1993**; 15: 535-542
- Notides** AC, Williams-Ashman HG: The basic protein responsible for the clotting of guinea pig semen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1967**; 58(5): 1991 -1995
- Nussbaum** M, Morse BS: Plasma fibrin stabilizing factor activity in various diseases. *Blood* **1964**; 23: 669-678
- Ohlenschläger** G, Berger I, Depner W: Synopsis der Elektrophorese-Techniken. G-I-T Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt, **1980**
- Oridate** N, Esumi N, Lotan D, Hing WK, Rochette-Egly C, Chambon P, Lotan R: Implications of retinoic acid receptor gamma in squamous differentiation and response to retinoic acid in head and neck SqCC/Y1 squamous carcinoma cells. *Oncogene* **1996**; 12: 2019-2028
- Paonessa** G, Metafora S, Tajana G, Abrescia P, De Santis A, Gentile V, Porta R: Transglutaminase mediated modifications of the rat sperm surface in vitro. *Science* **1984**; 226: 852-855
- Pappas** PW: The use of chrome alum-gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections. *Stain Technol* **1971**; 46(3): 121-124
- Parenteau** NL, Pilato A, Rice RH: Induction of keratinocyte type-I transglutaminase in epithelial cells of the rat. *Differentiation* **1968**; 33(2): 130-141
- Paye**<sup>1</sup> M, Lapiere CM: Wundheilung: Der Beitrag des Gerinnungsfaktors XIII. Die Gelben Hefte **1986**; XXVI: 128-135
- Paye**<sup>2</sup> M, Lapiere CM: The lack of attachment of transformed embryonic lung epithelial cells to collagen I is corrected by fibronectin and F XIII. *J Cell Sci* **1986**; 95-107
- Peluso** G, Porta R, Esposito C, Tufano MA, Toraldo MA, Vuotto ML, Ravagnan G, Metafora S: Suppression of rat epididymal sperm immunogenicity by a seminal vesicle secretory protein and transglutaminase both in vivo and in vitro. *Biol Reprod* **1994**; 50: 593-602



- Peter A**, Lilja H, Lundwall A, Malm J: Semenogelin I and semenogelin II, the major gel-forming proteins in human semen, are substrates for transglutaminase. *Eur J Biochem* **1998**; 252: 216-221
- Piredda L**, Amendola A, Clizzi V, Davies PJ, Farrace MG, Fraziano M, Gentile V, Uray I, Piacentini M, Fésus L: Lack of 'tissue' transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macromolecules from dying cells: relationship to development of autoimmunity in MRLlpr/lpr mice. *Cell Death Differ* **1997**; 4: 463-472
- Piredda L**, Farrace MG, Lo Bello M, Malorni W, Melino G, Petruzelli R, Piacentini M: Identification of 'tissue' transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *Faseb J* **1999**; 13:355-364
- Porta R**, Esposito C, De Santis A, Fusco A, Iannone M, Metafora S: Sperm maturation in human semen: role of transglutaminase-mediated reactions. *Biol Reprod* **1986**; 35: 965-970
- Porta R**, Metafora S, Esposito C, Mariniello L, Persico P, Mancuso F, Peluso G: Biological activities of a major protein secreted from the rat seminal vesicles after structural modification catalyzed by transglutaminase in vitro. *Immunopharmacology* **1993**; 25(2): 179-188
- Raghu**nath M, Hopfner B, Aeschlimann D, Luthi U, Meuli M, Altermatt S, Gobet R, Bruckner-Tuderman L, Steinmann B: Cross-linking of the dermo-epidermal junction of skin regenerating from keratinocyte autografts. Anchoring fibrils are a target for tissue transglutaminase. *J Clin Invest* **1996**; 98: 1174-1184
- Rasche H**: Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung. *Klin Wochenschr* **1975**; 53(24): 1137-1145
- Reisner AH**, Nemes P, Bucholtz C: The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **1975**; 64(2): 509-516
- Remington JA**, Russel DH: Intracellular distribution of transglutaminase activity during rat liver regeneration. *J Cell Physiol* **1982**; 113(2): 252-256
- Rice RH**, Wong VJ, Price DVH, Hohl D, Pinkerton KE: Cuticle cell defects in lamellar ichthyosis hair and anomalous hair shaft syndromes visualized after detergent extraction. *Anat Rec* **1996**; 246(4): 433-440
- Rice**, RH, Mehrpouyan M, O'Callahan W, Parenteau NL, Rubin AL: Keratinocyte transglutaminase: differentiation marker and member of an extended family. *Epithelial Cell Biol* **1992**; 1(3): 128-137
- Rifkin JM**, Olson GE: Characterization of maturation-dependent extrinsic proteins of the rat sperm surface. *J Cell Biol* **1985**; 100(5): 1582-1591
- Roch AM**, Noel P, El Alaoui S, Charlot C, Quash G: Differential expression of isopeptide bonds N epsilon (gamma glutamyl) lysine in benign and malignant human breast lesions: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* **1991**; 48: 215-220
- Rogers G**, Winter B, McLaughlan C, Powell B, Nesci T: Peptidylarginine deiminase of the hair follicle: characterisation, localisation, and function in keratinizing tissues. *J invest Dermatol* **1997**; 108(5): 700-707
- Romijn JC**: Polyamines and transglutaminase actions. *Andrologia* **1990**; 22: 83-91

- Rubin** AL, Rice RH: Differential regulation by retinoic acid and calcium of transglutaminases in cultured neoplastic and normal human keratinocytes. *Cancer Res* **1986**; 46: 2356-2361
- Sato**<sup>1</sup> H, Sugimoto I, Matsunaga T, Tsuchimoto M, Ohta T, Uno H, Kiyoki M: Tacalcitol (1,24(OH)2D3, TV-02) inhibits phorbol ester-induced epidermal proliferation and cutaneous inflammation, and induces epidermal differentiation in mice. *Arch Dermatol Res* **1996**; 288 (11): 656-663
- Sato**<sup>2</sup> H, Sugimoto I, Fukuoka M, Ohta T, Kiyoki M: The effect of 1,24 (R)(OH)2D3 cream and ointment on epidermal proliferation and differentiation in mice. *Dermatology* **1996**; 192(3): 233-238
- Schiefferdecker** P: Die Hautdrüsen des Menschen und der Säugetiere, ihre biologische und rassenanatomische Bedeutung, sowie die Muscularis sexualis. *Biol Zentralbl* **1917**; 37: 634-662
- Schirren** C: *Praktische Andrologie*. Verlag Brüder Hartmann, Berlin **1971**
- Schroeder** WT, Thacher SM, Stewart-Galetka S, Annarella M, Chema D, Siciliano MJ, Davies PJ, Tang HY, Sowa BA, Duvic M: Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J Invest Dermatol* **1992**; 99(1): 27-34
- Sedmak** JJ, Grossberg SE: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* **1977**; 79(1-2): 544-552
- Seitz** J, Aumüller G: Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases V: Electrophoretic studies on the heterogeneity of acid phosphatases from human prostate, seminal fluid, and leukocytes. *Prostate* **1985**; 7(1): 73-90
- Seitz** J, Aumüller G: Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases. III. Inhibition experiments of lysosomal and secretory acid phosphatases of the rat ventral prostate. *Basic Appl Histochem* **1981**; 25(2): 95-104
- Seitz** J, Aumüller G: Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases. I. Cytochemistry and isoelectric focussing of acid phosphatases of the rat ventral prostate. *Histochemistry* **1980**; 67(1): 99-111
- Seitz** J, Keppler C, Aumüller G, Polzar B, Mannerz HG: SVS II -- an androgen-dependent actin-binding glycoprotein in rat semen. *Eur Cell Biol* **1992**; 57(2): 308-316
- Seitz** J, Keppler C, Rausch U, Aumüller G: Immunohistochemistry of secretory transglutaminase from rodent prostate. *Histochemistry* **1990**; 93: 525-530
- Seitz** J, Plog A, Keppler C, Dreher M, Aumüller G: Transglutaminase ein sekretorisches Protein der Koagulationsdrüse und der lateralen Prostata der Ratte. *Verh Anat Ges* **1987**; 81: 837-839
- Seitz**<sup>1</sup> J, Keppler C, Hüntemann S, Rausch U, Aumüller G: Purification and molecular characterization of a secretory transglutaminase from coagulating gland of the rat. *Biochim Biophys Acta* **1991**; 1078: 139-146
- Seitz**<sup>2</sup> J, Keppler C, Hüntemann S: Purification and characterisation of transglutaminases from the genital tract of the male rat. *J Chromatogr* **1991**; 587: 55-60
- Seiving** B, Stenberg P, Nilsson B: A new assay for transglutaminase. *J Clin Lab Invest* **1991**; 51(2): 119-124

- Sermadiras S**, Dumas M, Joly-Berville R, Bonte F, Meybeck A, Ratinaud MH: Expression of Bcl-2 and Bax in cultured normal human keratinocytes and melanocytes: relationship to differentiation and melanogenesis. *Br J Dermatol* **1997**; 137(6): 883-889
- Shivaji S**, Scheidt KH, Bhargava PM: Proteins of seminal plasma. John Wiley & Sons, New York, **1990**
- Signorini M**, Chiozzi P, Bergamini CM: Interaction of erythrocyte transglutaminase with calcium ions. *Biochem Int* **1989**; 19(6): 1205-1212
- Singh US**, Erickson JW, Cerione RA: Identification and biochemical characterization of an 80 kilodalton GTP-binding/transglutaminase from rabbit liver nuclei. *Biochemistry* **1995**; 34(48):15863-15871.
- Slife CW**, Dorsett MD, Bouquett GT, Register A, Taylor E, Conroy S: Subcellular localization of a membrane-associated transglutaminase activity in rat liver. *Arch Biochem Biophys* **1985**; 241(2): 329-336
- Slife CW**, Dorsett MD, Tillotson ML: Subcellular location and identification of a large molecular weight substrate for the liver plasma membrane transglutaminase. *J Biol Chem* **1986**; 261(7): 3451-3456
- Slife CW**, Morris GS, Snedeker SW: Solubilization and properties of the liver plasma membrane transglutaminase. *Arch Biochem Biophys* **1987**; 257(1): 39-47
- Stanwell C**, Denning MF, Rutberg SE, Cheng C, Yuspa SH, Dlugosz AA: Staurosporine induces a sequential program of mouse keratinocyte terminal differentiation through activation of PKC isozymes. *J Invest Dermatol* **1996**; 106(3): 482-489
- Steinert PM**, Chung SI, Kim SY: inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**; 221: 101-106
- Steinhoff M**, Eicheler W, Holterhus PM, Rausch U, Seitz J, Aumüller G: Hormonally induced changes in apocrine secretion of transglutaminase in the rat dorsal prostate and coagulating gland. *Europ J Cell Biol* **1994**; 65: 49-59
- Sung LA**, Chien S, Chang LS, Lambert K, Bliss SA, Bouhassira EE, Nagel RL, Schwartz RS, Rybicki AC: Molecular cloning of human protein 4.2: a major component of the erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**; 87: 955
- Takagi J**, Saito Y, Kikuchi T, Inada Y: Modification of transglutaminase assay: Use of ammonium sulfate to stop the reaction. *Anal Biochem* **1986**; 153(2): 295-298
- Takahashi N**, Takahashi Y, Putnam FW: Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinoligase, transglutaminase) from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**; 83: 8019-8023
- Tamada Y**, Takama H, Kitamura T, Ikeya T, Yokochi T: Expression of transglutaminase in human anagen hair follicles. *Acta Derm Venereol* **1995**; 75(3): 190-192
- Tarcsa E**, Marekov LN, Andreoli J, Idler WW, Candi E, Chung SI, Steinert PM: The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J Biol Chem* **1997**; 272(44): 27893-27901
- Testa-Riva F**, Puxeddu P: Secretory mechanism of human ceruminous glands. *Anat Rec* **1980**; 196: 363-372
- Thomazy V**, Fésus L: Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. *Cell Tissue Res* **1989**; 255(1): 215-224

- Towbin** H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci U S A* **1979**; 76(9): 4350-4354
- Upchurch** HF, Conway E, Patterson MK Jr, Maxwell MD: Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. *J Cell Physiol* **1991**; 149: 375-382
- van der Vleuten**<sup>1</sup> CJ, de Jong EM, van de Kerkhof PC: Epidermal differentiation characteristics of the psoriatic plaque during short contact treatment with dithranol cream. *Clin Exp Dermatol* **1996**; 21(6): 409-414
- van der Vleuten**<sup>2</sup> CJ, de Jong EM, van de Kerkhof PC: Epidermal differentiation characteristics of the psoriatic plaque during treatment with calcipotriol. *Arch Dermatol Res* **1996**; 288(7): 366-372
- van der Vleuten**<sup>3</sup> CJ, de Jong EM, van de Kerkhof PC: Effects of calcipotriol and clobetasol-17-propionate on UVB-irradiated human skin: an immunohistochemical study. *Skin Pharmacol* **1996**; 9: 355-365
- Van Ruissen** F, de Jong GJ, Zeeuwen PL, Van Erp PE, Madsen P, Schalkwijk J: Induction of normal and psoriatic phenotypes in submerged keratinocyte cultures. *J Cell Physiol* **1996**; 168: 442-452
- Wagner** CL, Kistler WS: Analysis of the major large polypeptides of rat seminal vesicle secretion: SVS I, II, and III. *Biol Reprod* **1987**; 36: 501-510
- Walker** G: A special function discovered in a glandular structure hitherto supposed to form a part of the prostate gland in rats and guinea pigs. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **1910**; 21: 182
- Weisberg** LJ, Shiu DT, Greenberg CS, Kan YW, Shuman MA: *J Clin Invest* **1987**; 79: 649-652
- Whyard** TC, Ablin RJ, Song ZL: Partial purification, characterization and localization of human seminal plasma transglutaminase. *Am J Reprod Immunol* **1989**; 19: 75
- Whyard** TC, Ablin RJ: A tissue type transglutaminase in human seminal plasma. *Am J Reprod Immunol* **1997**; 38: 391-399
- Wilhelm** B, Keppler C, Hoffbauer G, Lottspeich F, Linder D, Meinhardt A, Aumüller G, Seitz J: Cytoplasmic carbonic anhydrase II of rat coagulating gland is secreted via the apocrine export mode. *J Histochem Cytochem* **1998**; 46(4): 505-511
- Wilhelm** B, Meinhardt A, Renneberg H, Linder D, Gabius HJ, Aumüller G, Seitz J: Serum albumin as a potential carrier for the apocrine secretion of proteins in the rat coagulating gland. *Europ J Cell Biol* **1999**; 78: 256-264
- Wilhelm** B, Meinhardt A, Seitz J: Transglutaminases: purification and activity assays. *J. Chromatography B* **1996**; 684: 163-177
- Williams-Ashman** HG, Beil RE, Wilson J, Hawkins M, Grayhack J, Zunamon A, Weinstein NK: Transglutaminases in mammalian reproductive tissues and fluids: relation to polyamine metabolism and semen coagulation. *Adv Enzyme Regul* **1980**; 18: 239-258
- Williams-Ashman** HG, Cannellakis ZN: Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect Biol Med* **1979**; 22: 421-453

- Williams-Ashman** HG, Notides AC, Pabalan SS, Lorand L: Transamidase reactions involved in the enzymatic coagulation of semen: isolation of -glutamyl- -lysine dipeptide from clotted secretion protein of guinea pig seminal vesicle. Proc Natl Acad Sci USA: **1972**; 69: 2322-2325
- Williams-Ashman** HG, Wilson J, Beil RE, Lorands L: Transglutaminase reactions associated with the rat semen clotting system: modulation by macromolecular polyanions. Biochem Biophys Res Commun **1977**; 79: 1192-1198
- Williams-Ashman** HG: Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. Mol Cell Biochem **1984**; 58(1-2): 51-61
- Wilson** EM, French FS: Biochemical homology between dorsal prostate and coagulating gland. J Biol Chem **1980**; 255: 10946-10953
- Wilson** J, Beil RE, Hawkins M, Zunamon A, Lorand L, Williams-Ashman HG: Unique transglutaminases and rat coagulating gland. Fed Proc **1979**; 38: 570
- Wing** D, Curtis CG; Lorand L, Williams-Ashman HG: Isolation of a transglutaminase from the coagulating gland of the guinea pig prostate. Fed Proc **1974**; 33: 290
- Wing** D: Guinea Pig Coagulating Gland Transamidase. Promotionsarbeit im Fach „Biological Chemistry“ an der Northwestern University, Evanston, Illinois, U.S.A. **1977**
- Yee** VC, Le Trong I, Bishop PD, Pedersen LC, Stenkamp RE, Teller DC: Structure and function studies of factor XIIIa by x-ray crystallography. Semin Thromb Hemost **1996**; 22: 377-384
- Zaneveld** LJ, Tauber PF, Port C, Propping D, Schumacher GF: Scanning electron microscopy of the human, guinea pig and rhesus monkey seminal coagulum. J Reprod Fertil **1974**; 40: 223-225
- Zhang** J, Lesort M, Johnson GV: Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP. J Biol Chem **1998**, 23; 273: 2288-2295

# Lebenslauf

17. Mai 1960 geboren in Fort Sill, Oklahoma, U.S.A., als ältester Sohn von Gerald Erkel und Alma Erkel geb. Ramy. Zwei Brüder und eine Schwester
- 1966-1972 Holy Rosary Grade School, North Mankato, Minnesota, U.S.A.
- 1972-1974 Fitzgerald Middle School, Mankato, Minnesota, U.S.A.
- 1974-1978 Loyola High School, Mankato, Minnesota, U.S.A.
- Sept. 1978 Beginn des Studiums der Betriebswirtschaft an der University of Minnesota in Minneapolis, U.S.A. Zusätzlich Sprachkurse in Spanisch, Französisch and Arabisch
- Jan.-März 1980 Studienaufenthalt in Guadalajara, Mexiko. Gleichzeitig Krankenpflegepraktikum auf der Unfallstation des "Hospital del Ferrocarril"
- Dezember 1982 Abschluss meines Studiums an der University of Minnesota mit dem "Bachelor of Science in Business"
- Feb.-Mai 1983 Französisch Sprachkurs an der Université de la Sorbonne, Paris, Frankreich
- WS 1983 Einschreibung an der Philipps-Universität Marburg, zunächst im Fach Germanistik als sprachliche Vorbereitung auf das Medizinstudium
- SS 1984 Aufnahme des Medizinstudiums in Marburg
- Okt. 1985 Heirat mit Sybille Kamme aus Weilburg
- März 1986 Physikum an der Philipps-Universität Marburg
- August 1989 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Marburg
- Okt. 1989- Nov.1990 Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern in Siegen  
Innere Medizin und Chirurgie - KKH (Haus Siegen), Pädiatrie - DRK-Kinderklinik
- November 1990 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Siegen an der DRK-Kinderklinik
- Jan. 1991 AiP und anschließend Assistenzarzt an der DRK-Kinderklinik Siegen, Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin
- Februar 1991 Geburt der Tochter Emily  
August 1992 Geburt der Tochter Natalie
- April - Juni 1994 Assistenzarzt, Sektion Neonatologie, Universitäts-Kinderklinik Ulm
- Juli 1994-März 1999 Assistenzarzt, Kinderklinik des St. Marienhospitals Vechta
- Dez. 1994 Zusatzbezeichnung Rettungsmedizin
- Seit März 1999 Facharzt für Pädiatrie, Kinderklinik des St. Marienhospitals Vechta

## Akademische Lehre

Meine **akademischen Lehrer der Medizin in Marburg** waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arnold, Aumüller, Aziz, Basler, Beato, Blankenburg, Brandis, Bürger, Daume, Dombrowski, Drenkhahn, Egbring, Eschenbach, Exner, Friederich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Glanz, Golenhofen, Gotzen, Graul, Gressner, Griss, Habermehl, Hartmann, Havemann, Heye, Hilgermann, Himmelmann, Höhl, Huffmann, Ihm, Kaffarnik, Kaiser, Kalbfleisch, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klingelhöfer, Knoll, Koch, Koecke, Koolmann, Krause, Kretschmer, Kuni, Lange, Lauer, Leititis, Lennartz, Mannheim, Mannherz, Maroske, Martini, Massarrat, Mühlberger, Netter, Oepen, Perst, Pohlen, Prinz, Remschmidt, Rieger, Rodeck, Schachtschnabel, Schaumlöffel, Schmitz-Moormann, Schulz, Seitz, Siegrist, Slenczka, Straub, Stempel, Thomas, Trojan, Unsicker, Vohland, von Kraft, von Wichert, Wiegandt, Zelder, Zwirner.

## Danksagung

Am Schluss dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Seitz für die freundliche Überlassung des Themas, seine stets fördernde Unterstützung durch zahlreiche wertvolle Hilfestellungen und viele Diskussionen, sein jederzeit verständnisvolles Entgegenkommen, seine Geduld sowie die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. med. G. Aumüller möchte ich ebenfalls meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt ferner Frau Keppler, Frau Plog und Herrn Jennemann für die hilfreiche Unterstützung bei den Laboruntersuchungen und für das Anfertigen der Photographien. Ich möchte nicht zuletzt allen Angehörigen des Institutes für Anatomie und Zellbiologie, die mir für die Planung und Durchführung der Versuche wertvolle Anregungen gegeben haben, danken.

Herrn Dr. med. Günther W. Himmelmann, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, möchte ich ausdrücklich danken für seine Unterstützung bei der Aufarbeitung der Statistik.

Herrn Professor Dr. med. Krause (Medizinischen Zentrum für Hautkrankheiten der Philipps-Universität, Marburg, Leiter der Abteilung Andrologie) bin ich für die große Hilfe bei der Beschaffung der Ejakulatproben und für die freundliche Übernahme des Correferates zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. Semjanow, Oberarzt der Klinik für Urologie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. L. Hertle) möchte ich ebenfalls für die menschlichen Proben, die im Rahmen von radikalen Zystektomien mit pelvinen Lymphadenektomien bei Harnblasenkarzinomen gewonnen wurden, danken.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Axel Zwirner danke ich für die Hilfe bei der Überarbeitung der Formulierung dieser Arbeit, er hat mir geholfen, die vielen Tücken der deutschen Sprache zu meistern.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Sybille Kamme-Erkel, meinen Kindern Emily und Natalie und meinen Eltern Gerald und Alma Erkel für ihre Unterstützung und liebevolle Geduld danken.