

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie
Leiter: Prof. Dr. G. Aumüller

**Expression und Lokalisation der PMCA-Isoformen 1 bis 4
in den Geschlechtsorganen des Bullen und Interaktion des
Enzyms mit dem Bläschendrüsensprotein PDC-109**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Timo Brandenburger

aus Siegen

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 05. November 2009

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. B. Wilhelm, Prof. Dr. G. Aumüller

Korreferent: Prof. Dr. A. Hasilik

We shall not cease from exploration, and the end of all our exploring will be to arrive where we started and know the place for the first time.

T. S. Eliot

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen VI

1	Einleitung	1
1.1	Der Calciumhaushalt der Zelle	1
1.2	Die Ca-ATPase der Plasmamembran (PMCA)	2
1.2.1	Allgemeines	2
1.2.2	Die Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran: Eine P-Typ ATPase	2
1.2.3	Struktur und Aufbau der PMCA	4
1.2.4	Die vier Isoformen der PMCA und die Rolle des alternativen Spleißens für die Entstehung weiterer Varianten	5
1.2.5	Gewebeverteilung der PMCA-Isoformen und ihrer Spleißvarianten	8
1.3	Die Geschlechtsorgane des Bullen	10
1.3.1	Anatomie des Geschlechtstrakts des Bullen	10
1.3.1.1	Makroskopische Anatomie	10
1.3.1.2	Mikroskopische Anatomie	12
1.3.2	Das Bläschendrüsensekret des Bullen	16
1.4	Das Protein PDC-109 aus der Bläschendrüse des Bullen	16
1.4.1	Struktur und Aufbau von PDC-109	16
1.4.2	Bindungspartner von PDC-109	18
1.4.3	Fibronektin Typ II-Domänen Proteine im Genitaltrakt anderer Spezies	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme	26
2.1.4	Bakterienkultur	26
2.1.5	Zellkultur	26
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.7	Bakterienstämme	27
2.1.8	Gewebe und Zelllinien	27
2.1.9	Oligonukleotide	28
2.1.10	Plasmide	29
2.1.11	Antikörper	30
2.1.12	Verwendete Datenbanken und Analyseprogramme im Internet	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1.1	RNA-Extraktion	32
2.2.1.2	Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	32

2.2.1.3	Denaturierendes RNA-Formaldehydgel	32
2.2.1.4	Kurzer DNase-Verdau der präparierten RNA	33
2.2.1.5	Reverse-Transkription der RNA (cDNA-Synthese)	33
2.2.1.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.1.7	Agarosegel	35
2.2.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	35
2.2.1.9	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	36
2.2.1.10	Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA	36
2.2.1.11	Präparation von Plasmid-DNA (Minipräp)	37
2.2.1.12	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
2.2.1.13	Analyse der positiven Plasmide durch Sequenzierung	39
2.2.1.14	In situ-Hybridisierung	39
2.2.1.15	Klonierung der Gesamt-PMCA	43
2.2.1.16	Mutagenese	44
2.3	Proteinchemische Methoden	46
2.3.1	Quantifizierung von Proteinen	46
2.3.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	46
2.3.3	Western Blot	47
2.3.4	Immunhistochemie	48
2.3.5	Herstellung eines Antikörpers gegen die PMCA4-Spleißvariante a	49
2.3.6	Calcium-ATPase Assay zum Nachweis der PMCA-Aktivität	50
2.4	Insektenzellkultur	51
2.4.1	Das Baculovirus-Expressionsystem	51
2.4.2	Kultur von Lepidopterenzelllinien Sf9, Sf21 und High Five™	53
2.4.3	Primäre Transfektion mit dem pMelBac B – Vektorkonstrukt und linearisierter Baculovirus-DNA	54
2.4.4	Plaque Assay	55
2.4.5	Herstellung eines viralen High Titer Stocks	56
2.4.6	Expression des rekombinanten PDC-109 durch High Five™-Zellen	57
2.4.7	Isolierung des rekombinant exprimierten Proteins	57
3	Ergebnisse	58
3.1	Genexpression der PMCA in den Geschlechtsorganen des Bullen	59
3.1.1	Nachweis der Genexpression mittels RT-PCR	59
3.1.2	Sequenzierung der PCR-Fragmente	63
3.1.3	Nachweis der Genexpression mittels In situ-Hybridisierung (ISH)	64
3.1.4	Klonierung der bovinen PMCA-Isoformen 1 und 4	68
3.2	Proteinexpression und Lokalisation der PMCA in den Keimzellen und dem Nebenhoden des Bullen	75
3.2.1	Nachweis der PMCA mittels Western Blot Analyse	75
3.2.2	Nachweis der PMCA mittels Immunhistochemie (IHC)	78

3.2.2.1	Immunhistochemie: Pan - PMCA (5F10)	79
3.2.2.2	Immunhistochemie: PMCA4	81
3.2.2.3	Immunhistochemie: PMCA4a	83
3.3	Interaktion der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase mit dem Bläschendrüsensprotein PDC-109	84
3.3.1	Calcium-ATPase Test – Einfluss von PDC-109 auf die Aktivität der humanen PMCA-Isoformen 2a, 4a und 4b	84
3.3.2	Site directed mutagenesis	88
3.3.3	Western Blot des rekombinant exprimierten PDC-109	90
4	Diskussion	91
4.1	Expression und Lokalisation der PMCA in den Keimzellen und im Nebenhoden des Bullen	91
4.2	Der apokrine Sekretionsmechanismus und seine mögliche Bedeutung für die Ausstattung boviner Spermien mit der PMCA-Isoform 4	97
4.3	Identifizierung der bovinen PMCA4-Spleißvarianten a und b und Vergleich der Sequenzen mit denen anderer Säugetierspezies	100
4.4	Die physiologische Bedeutung der PMCA4-Spleißvarianten a und b in bovinen Spermien	102
4.5	Interaktion von PDC-109 mit der PMCA	106
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis	111
7	Anhang	119
7.1	Vektorkarten	119
7.2	Gesamtsequenzen der PMCA4a und PMCA4b	123
7.3	Danksagung	125
7.4	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	126

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
A. dest.	aqua destillata
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
cDNA	DNA-Kopie von RNA, komplementäre DNA
DIG	Digoxigenin
DIG-dUTP	Digoxigenin-markiertes Desoxyuridintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LacZ	Gen für β-Galaktosidase
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
M	Molar
MCS	multiple cloning site

MESG	2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurinribosid
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
μ	Mikro-
n	Nano-
Neo	Neomycin
OD_{nm}	optische Dichte (Index nm gibt Meßwellenlänge an)
PBS	Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4 (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMCA	Plasma Membran Ca²⁺-ATPase
PNP	Purin Nucleosid Phosphorylase
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaktion
s	second(s) [Sekunde(n)]
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERCA	Smooth Endoplasmatic Reticulum Ca ATPase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMS	TransmembranSegment
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	über Nacht

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
x-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indoyl- β -D-Galaktosid

1 Einleitung

1.1 Der Calciumhaushalt der Zelle

Calcium ist essentiell für die Lebensvorgänge eukaryonter Zellen. Es bildet gemeinsam mit anorganischem Phosphat den anorganischen Bestandteil des Knochens, des Dentins und Schmelzes der Zähne. Durch Bindung an γ -Carboxylgruppen von Gerinnungsfaktoren ist es entscheidend an der Blutgerinnung – sowohl dem extrinsischen, als auch dem intrinsischen Weg – beteiligt. Auch zur Stabilisierung des Membranpotentials wird Calcium benötigt. Schließlich nimmt Calcium eine Schlüsselrolle bei der Zellaktivierung ein. Darunter versteht man Prozesse, die eine Zelle zur Ausübung einer bestimmten Funktion wie z.B. Muskelkontraktion, Nervenleitung, Sekretion, transzellulären Ionentransport o.a. anregen. Carafoli beschreibt die Wichtigkeit des Calciums für die Aktivierung von Zellen folgendermaßen: „...the Ca^{2+} signal is important in cells from their origin to their death. It controls the creation of cells at fertilization, masterfully guides them from infancy through adulthood to old age, and finally assists them at the time of their demise.” (Carafoli 2003).

Die zytosolische Calciumionenkonzentration beträgt etwa 10^{-7} M, im Extrazellulärraum etwa 10^{-3} M. Damit liegt ein Konzentrationsgradient um den Faktor 10.000 zwischen Zytosol und dem Extrazellulärraum vor. Dieser Gradient ist Voraussetzung für die Calcium-abhängige Aktivierung von Zellen. Während dieser Zellaktivierungsprozesse dringt Calcium über ligandenaktivierbare oder spannungsgesteuerte Calciumkanäle aus dem Extrazellulärraum oder durch Mobilisierung aus intrazellulären Calciumspeichern in das Zytosol ein. Nach Abschluss des Aktivierungsprozesses muss der Calciumgradient zwischen Zytosol und Extrazellulärraum wiederhergestellt werden. Daran sind verschiedene zelluläre Mechanismen beteiligt: Die Ca^{2+} -Ionen können entweder in intrazelluläre Kompartimente oder in den extrazellulären Raum transportiert werden (Abb. 1.1). Die Ca^{2+} -ATPase des glatten Endoplasmatischen Retikulums (SERCA) transportiert Ca^{2+} vom Zytosol ins Endoplasmatische Reticulum. Der mitochondriale Uniporter befördert Ca^{2+} vom Zytosol ins Mitochondrium. Schließlich existiert eine Pumpe, die Ca^{2+} vom Zytosol in den Golgi-Apparat transportiert (*secretory pathway Ca^{2+} pump*, SPCA, nicht gezeigt).

Für den Ca^{2+} -Transport aus der Zelle existieren zwei membranständige Proteine, der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran (PMCA). Die Wiederherstellung des Calciumgradienten durch die genannten Mechanismen ist ein entscheidender Prozess, da eine ständig erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration den Zellstoffwechsel beeinträchtigen und u.a. zur Aktivierung von Proteasen, zur DNA-Fragmentierung und zur Apoptose führen kann (Bachs and Carafoli 1987).

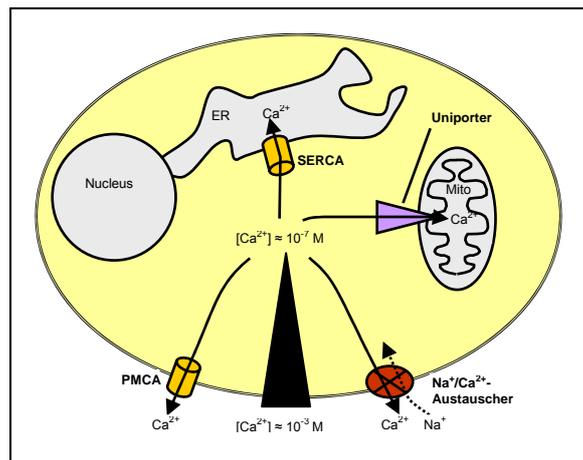


Abb. 1.1
 Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Calciumgradienten zwischen dem Zytosol und dem Extrazellulärraum. ER: Endoplasmatisches Reticulum, PMCA: Ca-ATPase der Plasmamembran, SERCA: Ca-ATPase des Endoplasmatischen Reticulums

1.2 Die Ca-ATPase der Plasmamembran (PMCA)

1.2.1 Allgemeines

1966 wurde erstmals von Schatzmann entdeckt, dass Ca^{2+} durch ein ATP-abhängiges System aus den Erythrozyten gepumpt wird (Schatzmann 1966). Die Isolierung der Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran gelang 1979 mit Hilfe einer Calmodulin-Affinitäts-Chromatographie aus menschlichen Erythrozyten (Niggli, Penniston et al. 1979). Später wurde klar, dass alle eukaryotischen Zellen die PMCA exprimieren (Carafoli und Guerini, 1993). Auch in Prokaryonten konnten Ca^{2+} -transportierende ATPasen gefunden werden (Axelsen and Palmgren 1998). In den meisten Zellen ist die Expression auf einem sehr niedrigen Level, so dass der Anteil an PMCA 0,1 - 0,3% des gesamten Membranproteins einer Zelle nicht überschreitet (Stauffer, Guerini et al. 1995).

1.2.2 Die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran: Eine P-Typ ATPase

P-Typ ATPasen transportieren Ionen über Membranen. Dazu nutzen sie die durch die Hydrolyse von ATP freigesetzte Energie (Carafoli 1992). Die P-Typ

ATPasen bilden eine große Familie, zu der neben der Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran beispielsweise auch die ubiquitäre Na^+/K^+ -ATPase oder die H^+/K^+ -ATPase des Magens gehören (Alberts 2003). Alle P-Typ ATPasen zeigen den gleichen grundlegenden Reaktionsmechanismus des Ionentransports: Die durch ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie treibt Transportmechanismen an, die mit Konformationsänderung des Enzyms sowie der Phosphorylierung eines Aspartatrests einhergehen (Berg, 2005). Neben den P-Typ ATPasen existieren drei weitere Typen, die F-Typ, V-Typ und ABC-Typ ATPasen (Pedersen 2005). Die PMCA ist eine P-Typ ATPase (Axelsen and Palmgren 1998; Palmgren and Axelsen 1998). Sie transportiert ein Ca^{2+} -Ion während eines Reaktionszyklus in den Extrazellulärraum (Carafoli 1992). Der Mechanismus des Calciumtransports ist in Abbildung 1.2 dargestellt: Die PMCA kann in den Zuständen E_1 und E_2 vorliegen (Adamo, Rega et al. 1990). Im Zustand E_1 binden ATP und intrazelluläres Ca^{2+} an die ATPase (①). Durch Hydrolyse des ATP's und die Phosphorylierung der PMCA an einem Aspartatrest wird das Enzym in den Zustand E_2 versetzt (②). Diese Zustandsänderung führt zu Konformationsänderungen im Enzym (③). Durch diese Konformationsänderung nimmt die Ca^{2+} -Affinität der PMCA ab, das Ca^{2+} wird in den Extrazellulärraum freigesetzt (④). Schließlich wird der Phosphatrest hydrolytisch abgespalten (⑤) und die PMCA kehrt in den Zustand E_1 zurück (⑥).

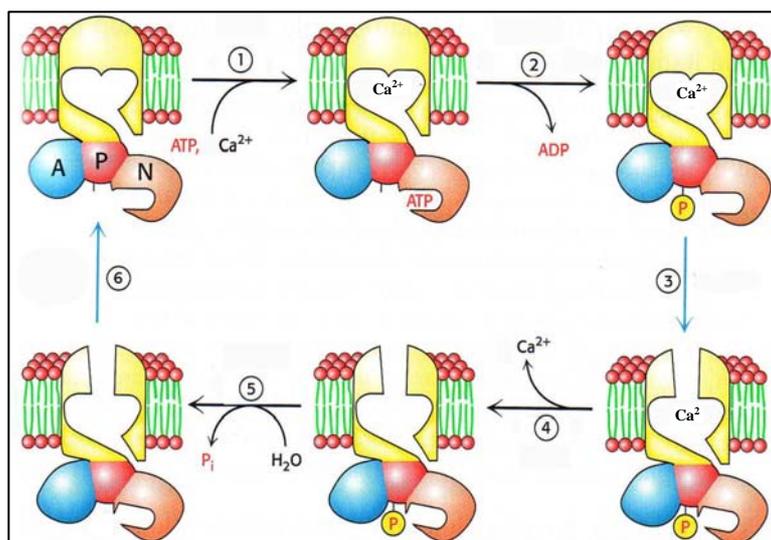


Abb. 1.2
Postulierter Reaktionszyklus des Calciumtransports durch die PMCA (nach Stryer 5th edition und Adamo 1990):

- ① Im Zustand E_1 bindet die Ca-ATPase ATP und ein Ca^{2+} -Ion
- ② Durch ATP-Hydrolyse und Phosphorylierung wird die ATPase in den Zustand E_2 versetzt
- ③ Die Umwandlung vom E_1 - in den E_2 -Zustand führt zu einer Konformationsänderung im Enzym
- ④ Im phosphorylierten E_2 -Zustand ist die Ca^{2+} -Affinität niedrig → Calcium wird freigesetzt
- ⑤ Durch Hydrolyse wird der Phosphatrest abgespalten
- ⑥ Die ATPase kehrt in den E_1 -Zustand zurück

A: Aktivator der N-terminalen Domäne, P: Phosphorylierungsstelle, N: ATP-Bindungsstelle

1.2.3 Struktur und Aufbau der PMCA

Die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran der Säugetiere besteht aus etwa 1200 Aminosäuren und ist zwischen 125 und 135 kDa groß. Sie hat zehn Transmembransegmente (TMS). Der größte Teil der PMCA befindet sich intrazellulär, gleiches gilt für die N- und C-terminale Domäne (Abb. 1.3). Die drei entscheidenden Regionen der PMCA sind zum einen der intrazelluläre Loop zwischen den TMS zwei und drei. An dieser Stelle befindet sich die „Transduktions-Domäne“, von der man annimmt, dass sie eine wichtige Funktion während des Calciumtransport-Zyklus spielt. Zudem befindet sich hier eine Phospholipid-Bindungsstelle. Der mit etwa 400 AS größte intrazelluläre Loop befindet sich zwischen den TMS 4 und 5. Er enthält die katalytische Domäne des Enzyms, dazu zählen unter anderem die ATP-Bindungsstelle und das Aspartat, das während der ATP-Hydrolyse ein Acylphosphat-Intermediat bildet.

Die dritte entscheidende Region der PMCA ist schließlich der intrazelluläre Anteil des C-Terminus. Dieser hat vor allem regulatorische Funktion (Carafoli 1991; Strehler 1991; Carafoli 1994; Penniston and Enyedi 1998) und besitzt als markantes Merkmal eine Calmodulin-Bindungsstelle.

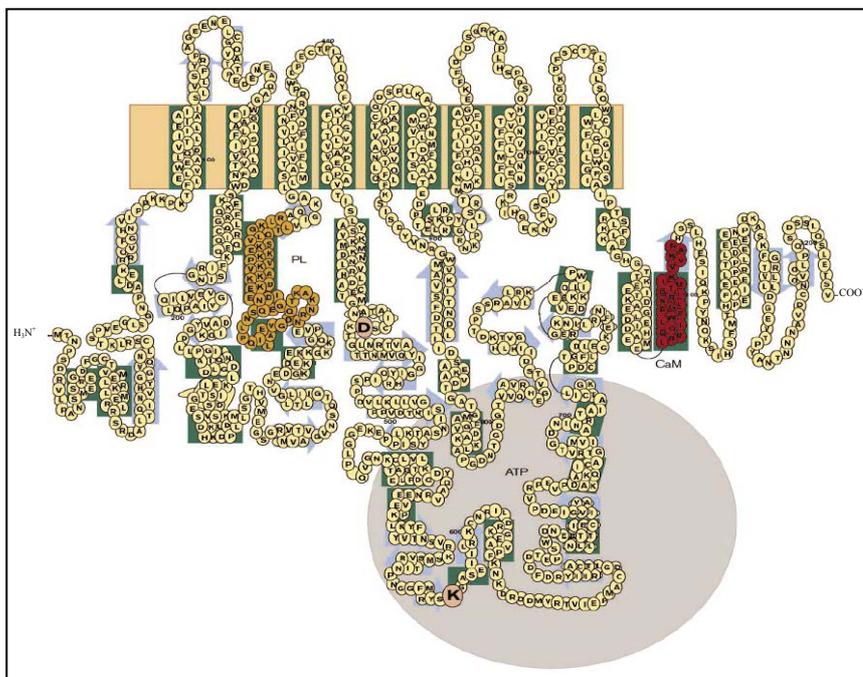


Abb. 1.3

Modell der PMCA, basierend auf der Sequenz der humanen PMCA4-Sequenz

grün: α -Helix-Bereiche, blaue Pfeile: β -Faltblatt-Bereiche, besonders gekennzeichnete Aminosäuren: D =

Phosphorylierungsstelle (Aspartat), K = Bindungsstelle von Fluoreszein Isothiozyanat (Lysin); grauer Kreis: ATP

Bindungsdomäne, gelb: Phospholipid-Bindungsstelle, rot: Calmodulinbindungsstelle (Carafoli and Brini 2000)

Eine theoretisch vorhergesagte Struktur der PMCA ist in Abbildung 1.4 dargestellt (Lushington, Zaidi et al. 2005).

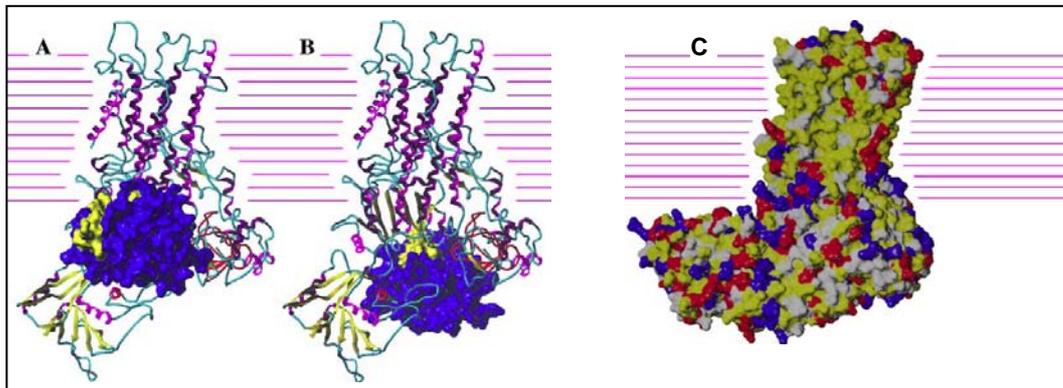


Abb. 1.4 A / B
Charakteristische Strukturen der am meisten vorherrschenden (A) und der experimentell plausibelsten (B) C-terminal gebundenen PMCA im E1 Status. Gelb: β -Faltblatt; Magenta: α -Helix; Cyan: unstrukturierte Areale; blau: C-Terminus. Die horizontalen Linien entsprechen den angenommen 10 TMS
C Connolly Oberflächendarstellung der PMCA. Gelbe Oberflächen sind hydrophob, rote sauer, blaue sind basisch und weisse neutral. (Lushington, Zaidi et al. 2005)

1.2.4 Die vier Isoformen der PMCA und die Rolle des alternativen Spleißens für die Entstehung weiterer Varianten

Die Gesamtsequenzen von zwei Ratten- und einer menschlichen Isoform der PMCA wurden erstmals 1988 publiziert (Shull and Greb 1988; Verma, Filoteo et al. 1988). Insgesamt existieren bei der Ratte und beim Menschen vier verschiedene Isoformen der PMCA, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Vermutlich ist dies für alle Säugetiere zutreffend. Beim Menschen sind die Gene für die vier Isoenzyme der PMCA folgendermaßen lokalisiert: Chromosom 12q21-q23 für PMCA1, 3p25-p26 für PMCA2, Xq28 für PMCA3 und 1q25-q32 für PMCA4 (Olson, Wang et al. 1991; Wang, Roufogalis et al. 1991; Brandt, Ibrahim et al. 1992; Latif, Duh et al. 1993). Zwischen zwei unterschiedlichen Spezies wie der Ratte und dem Menschen zeigen die jeweiligen Isoformen eine Identität von über 90%. Dahingegen sind die verschiedenen Isoformen einer und derselben Spezies nur zu 75 – 80% identisch und zu 85 – 90% ähnlich (Strehler 1991).

Durch alternatives Spleißen der primären Transkriptionsprodukte können mehr als 20 verschiedene Varianten der PMCA entstehen. Dabei spielen die beiden Spleißregionen A und C eine entscheidende Rolle (Abb. 1.5 und 1.6). Die Existenz und die Bedeutung einer Spleißregion B werden kontrovers beurteilt (Burk and Shull 1992; Hilfiker, Strehler-Page et al. 1993; Keeton, Burk et al. 1993; Stauffer, Hilfiker et al. 1993). Die Spleißregion A ist sowohl in der Ratte

als auch im Menschen charakterisiert (Burk and Shull 1992; Stauffer, Hilfiker et al. 1993; Keeton and Shull 1995; Zacharias, Dalrymple et al. 1995). Bei den Isoformen 1, 3 und 4 betrifft sie ein kurzes Exon mit einer Länge zwischen 36 und 42 Nucleotiden. Dieses Exon kodiert für einen kleinen Abschnitt des ersten intrazellulären Loops des Enzyms. Interessanterweise ist das kleine Exon in der PMCA1 immer vorhanden, daher sind alle Varianten der PMCA1 vom x-Typus (Abb. 1.5). Dahingegen kann das Exon in den Isoformen 3 und 4 vorhanden sein (x-Variante) oder fehlen (z-Variante) (Strehler and Zacharias 2001).

Für die PMCA2 existieren 3 verschiedene Exons in der Region A mit einer Länge zwischen 33 und 60 Nucleotiden. Das würde eine theoretische Zahl von acht verschiedenen Spleißvarianten ergeben, von denen allerdings bisher nur vier verschiedene beschrieben wurden. Diese Varianten tragen das Kürzel w (enthält alle 3 Exons), x (schließt nur das 42 Nucleotide große Exon ein), y (besitzt das 33 und 60 Nucleotide große Exon) und z (alle 3 Exons entfernt) (Strehler and Zacharias 2001).

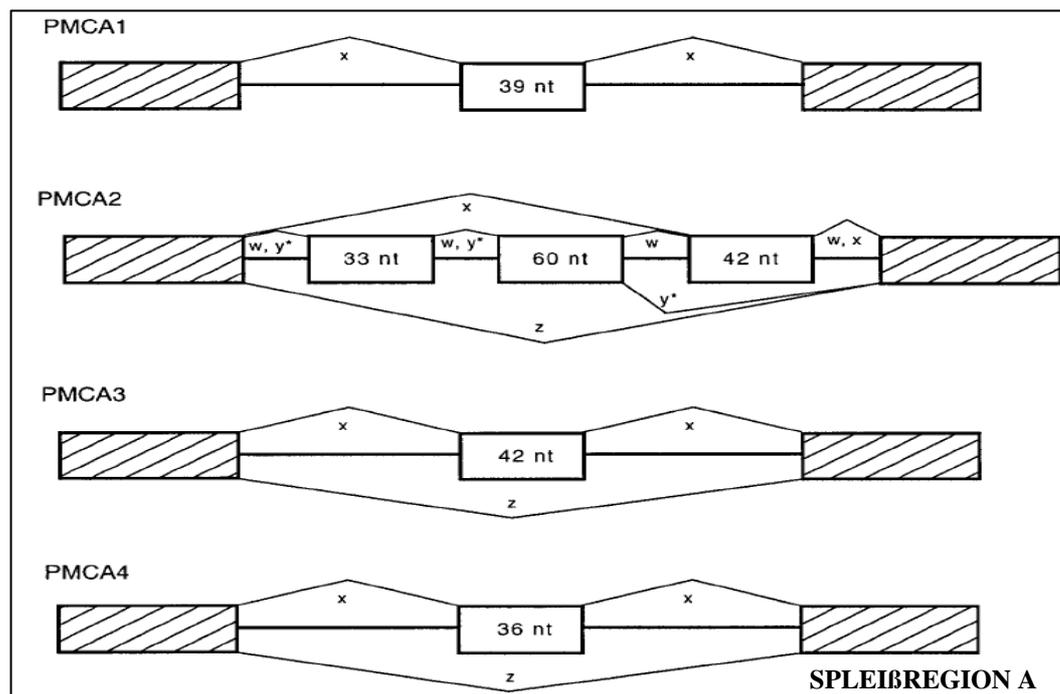


Abb. 1.5
Varianten der Spleißregion A nach (Strehler and Zacharias 2001; Brandenburger and Bajorat 2006). Durch alternatives Spleißen können von der PMCA1 eine, von der PMCA2 vier und von PMCA3 und 4 jeweils zwei unterschiedliche Spleißvarianten generiert werden.

An der Spleißregion C finden die komplexeren Spleißvorgänge statt (Abb. 1.6). Diese sind für die Ratte (Keeton, Burk et al. 1993) und den Menschen (Stauffer, Hilfiker et al. 1993) ausführlich beschrieben. Die Spleißregion C befindet sich im C-terminalen Anteil der PMCA.

Von der PMCA1 sind fünf verschiedene Spleißvarianten bekannt, die mit den Buchstaben a-e gekennzeichnet werden (Strehler, Strehler-Page et al. 1989; Keeton, Burk et al. 1993; Stauffer, Hilfiker et al. 1993). Bei der PMCA2 findet das alternative Spleißen an einem 227 Nucleotide großen Exon statt, das bei der Ratte in zwei Exons getrennt ist (Keeton, Burk et al. 1993). Insgesamt existieren drei Spleißvarianten der PMCA2. Die Variante 2a enthält ein 172 Nucleotide großes Exon, die Variante 2b keines und die Variante 2c besitzt das gesamte 227 Nucleotide große Exon. Für die Isoform 3 der PMCA unterliegen zwei Exons der Region C dem alternativen Spleißvorgang. Insgesamt können hier sechs verschiedene Varianten entstehen, die alphabetisch von a bis f durchnummeriert werden. Für die PMCA4 schließlich ist nur ein 175 Nucleotide großes Exon bekannt (Brandt, Neve et al. 1992). Einschluss dieses Exons führt zur Isoform 4a, der Ausschluss zur Isoform 4b.

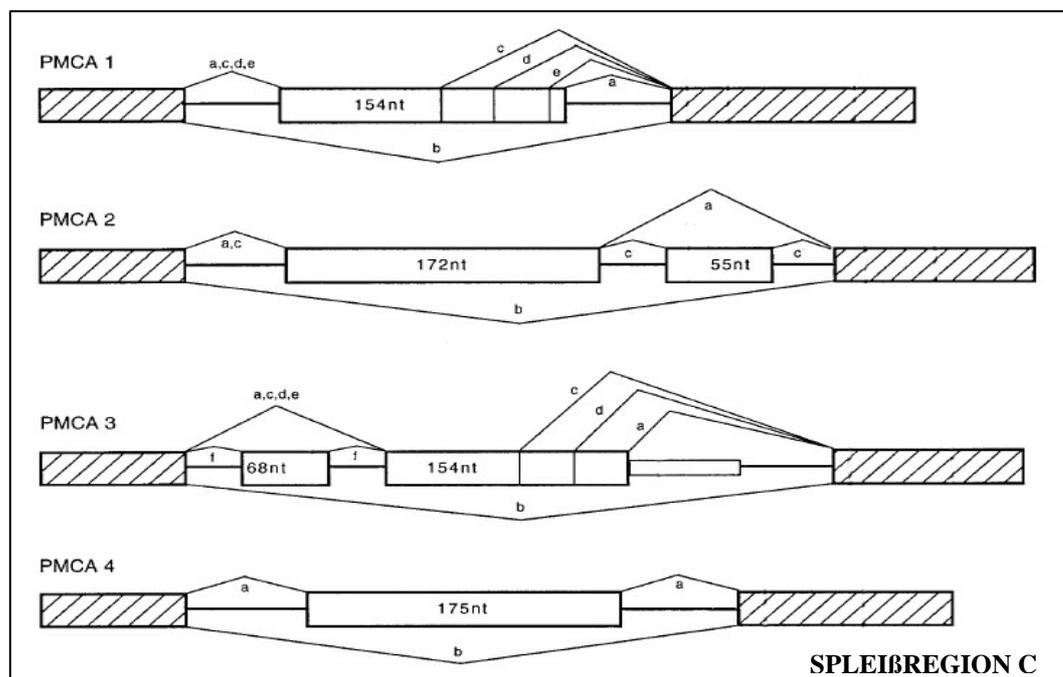


Abb. 1.6 Varianten der Spleißregion nach (Strehler and Zacharias 2001). Durch alternatives Spleißen in der Region C können von der PMCA1 fünf, von der PMCA2 drei, von der PMCA3 vier und von der PMCA4 zwei unterschiedliche Spleißvarianten generiert werden.

1.2.5 Gewebeverteilung der PMCA-Isoformen und ihrer Spleißvarianten

Durch Northern Blot, *in situ* Hybridisierung und RT-PCR ist die Expression der verschiedenen PMCA-Isoformen und deren Spleißvarianten in unterschiedlichen Geweben untersucht worden. Sehr gut ist die Quellenlage für den Menschen (Brandt, Neve et al. 1992; Howard, Legon et al. 1992; Howard, Legon et al. 1993; Stauffer, Hilfiker et al. 1993; Howard, Barley et al. 1994; Stauffer, Guerini et al. 1995; Paszty, Kovacs et al. 1998) und die Ratte (Howard, Legon et al. 1993; Keeton, Burk et al. 1993; Stauffer, Guerini et al. 1995; Reinhardt, Filoteo et al. 2000). Schlechter ist sie für die Maus (De Jaegere, Wuytack et al. 1993), Hase (Khan and Grover 1991) und Schwein (De Jaegere, Wuytack et al. 1990). In den Tabellen 1.1 bis 1.4 ist der heutige Wissensstand zur differentiellen Expression der PMCA-Isoformen in unterschiedlichen Geweben zusammengefasst.

Tab. 1.1 Expression der PMCA1-Isoformen und Spleißvarianten in ausgesuchten Geweben.						
Gewebe	Spleißvarianten					
	Region A	Region C				
	1x	1a	1b	1c	1d	1e
Gehirn	++	++	+	+	+/-	+
Rückenmark	++	++	+	+	-	NU
Hoden	++	-	++	-	-	-
Herz	++	+	++	++	++	-
Leber	++	-	++	+/-	-	-
Pankreas	++	-	++	-	-	-
Dünndarm	++	-	++	-	-	-
Dickdarm	++	-	++	-	-	-
Niere	++	+/-	++	+/-	+/-	-
Uterus	++	-	++	-	-	-
Skelettmuskel	++	+	++	++	+	-
Erythrozyten	++	-	++	-	-	NU

++ - starke Expression, + Expression vorhanden, +/- schwache Expression, - keine Expression, NU nicht untersucht

Tab. 1.2 Expression der PMCA2-Isoformen und Spleißvarianten in ausgesuchten Geweben

Gewebe	Spleißvarianten						
	Region A				Region C		
	2w	2x	2y	2z	2a	2b	2c
Gehirn	+	+	+/-	++	+	++	+/-
Rückenmark	NU	NU	NU	NU	+	+	+/-
Hoden	NU	NU	NU	NU	-	+	+
Herz	+	+	+/-	+	+	+/-	-
Leber	+/-	+/-	-	-	-	+	+/-
Pankreas	NU	NU	NU	NU	-	NU	NU
Dünndarm	NU	NU	NU	NU	+/-	+/-	-
Dickdarm	NU	NU	NU	NU	-	NU	NU
Niere	+	+/-	-	-	-	+	+/-
Uterus	+	-	-	-	+	+	+/-
Skelettmuskel	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-
Erythrozyten	NU	NU	NU	NU	-	NU	NU

++ - starke Expression, + Expression vorhanden, +/- schwache Expression, - keine Expression, NU nicht untersucht

Tab. 1.3 Expression der PMCA3-Isoformen und Spleißvarianten in ausgesuchten Geweben

Gewebe	Spleißvarianten							
	Region A		Region C					
	3x	3z	3a	3b	3c	3d	3e	3f
Gehirn	+	+/-	++	+	+/-	+/-	+	+/-
Rückenmark	NU	NU	++	+	NU	NU	NU	NU
Hoden	NU	NU	+	+/-	+/-	-	NU	-
Herz	NU	NU	-	NU	NU	NU	NU	NU
Leber	NU	NU	-	NU	NU	NU	NU	NU
Pankreas	NU	NU	-	NU	NU	NU	NU	NU
Dünndarm	NU	NU	+/-	-	-	-	NU	-
Dickdarm	NU	NU	+/-	-	-	-	NU	-
Niere	NU	NU	+/-	+/-	+/-	+	NU	-
Uterus	NU	NU	+/-	-	-	-	NU	-
Skelettmuskel	+	-	+/-	+	+/-	-	-	+
Erythrozyten	NU	NU	-	NU	NU	NU	NU	NU

++ - starke Expression, + Expression vorhanden, +/- schwache Expression, - keine Expression, NU nicht untersucht

Tab. 1.4 Expression der PMCA 4-Isoformen und Spleißvarianten in ausgesuchten Geweben

Gewebe	Spleißvarianten			
	Region A		Region C	
	4x	4z	4a	4b
Gehirn	++	-	++	++
Rückenmark	NU	NU	++	++
Hoden	+	++	++	+
Herz	+	++	++	++
Leber	++	-	+/-	++
Pankreas	NU	NU	+/-	++
Dünndarm	++	-	++	+
Dickdarm	++	-	-	++
Niere	++	-	-	++
Uterus	++	-	++	+
Skelettmuskel	++	-	+	++
Erythrozyten	NU	NU	-	++

++ - starke Expression, + Expression vorhanden, +/- schwache Expression, - keine Expression, NU nicht untersucht

1.3 Die Geschlechtsorgane des Bullen

1.3.1 Anatomie des Geschlechtstrakts des Bullen

1.3.1.1 Makroskopische Anatomie

Skrotum und Hoden des Rindes weisen in Relation zur Körpergröße beachtliche Maße auf. Die Hoden des Bullen haben eine gestreckt ovale Form. Bei einer Länge von etwa 15 cm erreichen sie ein Gewicht von 250 – 300 g (Nickel, Schummer et al. 2003). Der Caput epididymidis legt sich dem Hoden in einem Bogen von kaudal auf. Über den etwa 10 cm langen Corpus epididymidis geht sie schließlich in die Cauda epididymidis über, die sich am kaudalen Hodenpol befindet. Die Cauda dient als Spermienreservoir (Abb. 1.8) (Nickel, Schummer et al. 2003).

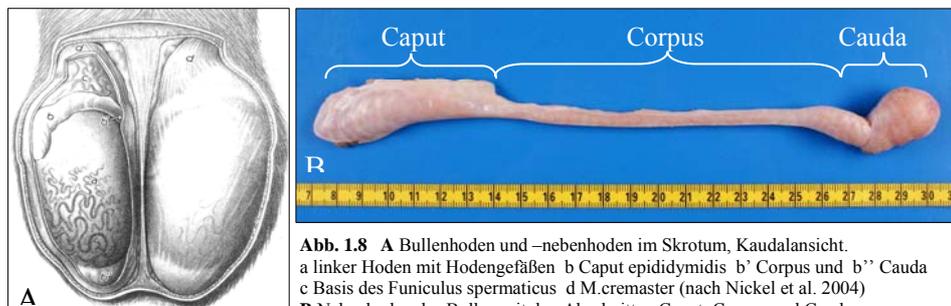


Abb. 1.8 A Bullenhoden und –nebenhoden im Skrotum, Kaudalansicht. a linker Hoden mit Hodengefäßen b Caput epididymidis b' Corpus und b'' Cauda c Basis des Funiculus spermaticus d M.cremaster (nach Nickel et al. 2004) B Nebenhoden des Bullen mit den Abschnitten Capus, Corpus und Cauda

Der Funiculus spermaticus des Bullen ist entsprechend der Lage des Hodens lang und aufgrund seines Gefäßreichtums dick. Der Ductus deferens steigt durch den Halsteil des Skrotums senkrecht zum Leistenkanal auf. Er bildet mit dem Ausführungsgang der Samenblase den gemeinsamen Ductus ejaculatorius und mündet schließlich auf dem Colliculus seminalis der Urethra (Konig, Aumuller et al. 1985).

Die akzessorischen Geschlechtsorgane umfassen die Bläschendrüse (Glandula vesicularis), die Prostata und die Glandula bulbourethralis. Von den dreien ist die Bläschendrüse das größte Organ. Sie ist etwas mehr als 10 cm lang und zwischen 1,5 und 3 cm dick. Aufgrund der sehr groben Läppchenstruktur ist sie unregelmäßig geformt. Sie enthält ein wässriges Sekret (s. Kap. 1.3.3).

Die Prostata des Bullen besteht aus dem Corpus prostatae und der Pars disseminata. Das Corpus liegt als schmale Spange direkt im Anschluss an die Bläschendrüse auf der Urethra. Es ist etwa 1 cm lang und 3 cm breit bei einem Durchmesser von etwa 1,5 cm. Die Pars disseminata umschließt die Urethra mantelartig (Nickel, Schummer et al. 2003).

Die Glandula bulbourethralis schließlich ist beim Bullen relativ klein. Sie liegt der Urethra im Bereich des Arcus ischiadicus auf (Abb. 1.9).

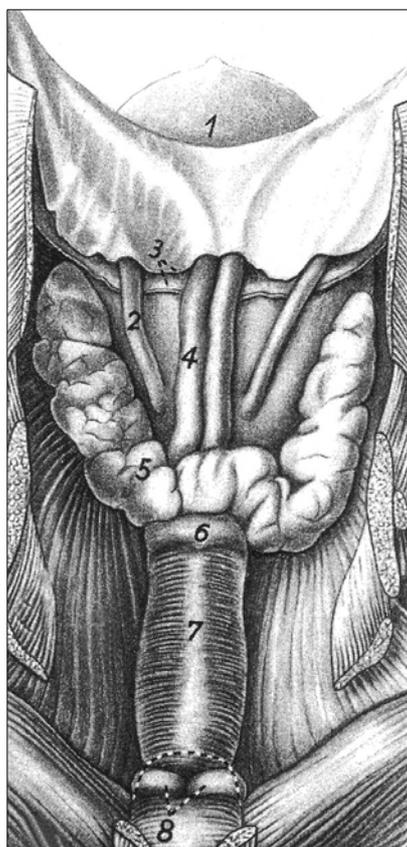


Abb. 1.9
Harn- und Geschlechtsorgane des Bullen im Bereich des Beckenbodens
1 Vesica urinaria
2 Ureter
3 Lamellen der Plica genitalis
4 Ampulla ductus deferentis
5 Glandula vesicularis
6 Corpus prostatae
7 Pars pelvina urethrae, vom M. urethralis umgeben
8 Glandula bulbourethralis, gestrichelt ist der abpräparierte Teil des M. bulbospongiosus (nach Nickel et al. 2004)

Der Penis des Bullen ist annähernd zylindrisch aufgebaut. Er beginnt mit der proximalen Radix, auf diese folgt ein proximaler Schaftabschnitt, der in die Flexura sigmoidea übergeht. Es schließt sich der distale Schaftabschnitt an, der in der intrapräputial gelegenen Pars libera penis endet. Im gestreckten Zustand hat der Penis des Bullen eine Länge von 0,9 bis 1m (Abb. 1.10), (Nickel, Schummer et al. 2003).

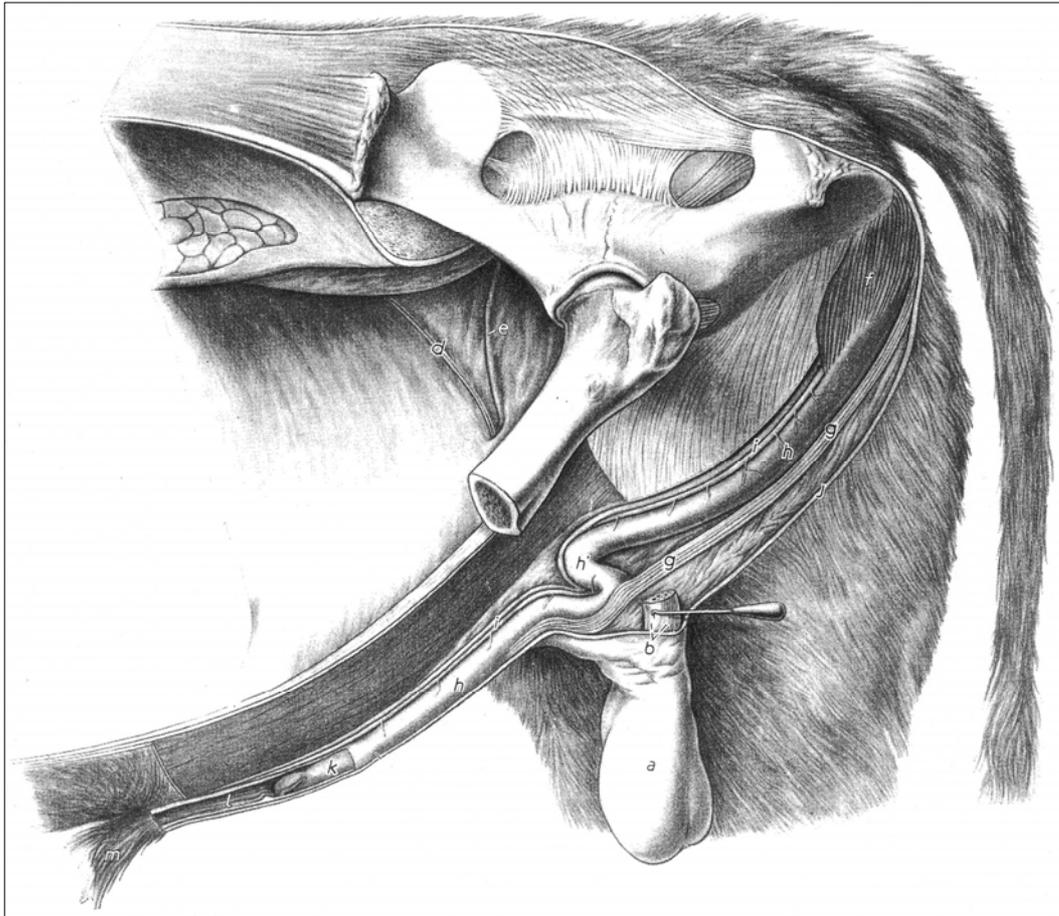


Abb. 1.10
Geschlechtsorgane des Bullen in situ
a Skrotum b Processus vaginalis c Anulus vaginalis d A. und V. testicularis e Ductus deferens f M. ischioavernosus g M. retractor penis
h Corpus penis h' Flexura sigmoidea penis i A. und V. dorsalis penis k Pars libera penis l Präputialschlauch l' Umschlagrand der Schleimhaut im Cavum preputiale m Haare (Pinsel) im Bereich des Ostium preputiale (nach Nickel et al. 2004)

1.3.1.2 Mikroskopische Anatomie

Im Testis findet die Reifung der männlichen Keimzellen statt. Sie wird als Spermatogenese bezeichnet und unterteilt sich in die zwei Stadien Spermatozytogenese und Spermio-genese. Am Anfang der Spermatozytogenese stehen die Keimzellen, die Spermato gonien. Bei diesen unterscheidet man die A-

Spermatogonien von den I-Spermatogonien (Intermediär-Spermatogonien) und den B-Spermatogonien. Letztere haben den Kontakt zur Basalmembran bereits verloren. Aus diesen entstehen zunächst die Spermatozyten 1. Ordnung. Sie durchlaufen die Phasen der meiotischen Prophase, die Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese umfasst. Die Spermatozyten 1. Ordnung entwickeln sich weiter zu Spermatozyten 2. Ordnung. Nach der zweiten Reifeteilung differenzieren sich diese schließlich zu Spermatischen.

Bei Spermatischen sind die Zahl der Chromosomen und der DNA-Gehalt bereits halbiert (1n). Es folgt die Spermiogenese. In dieser reifen die Spermatischen zu Spermien. Dieser Reifungsprozess findet in vier Schritten statt: Golgi-Phase, Kappenphase, Akrosomenphase und Reifungsphase. In allen diesen Schritten stehen die Spermatischen in intensivem Stoffaustausch mit den Sertoli-Zellen

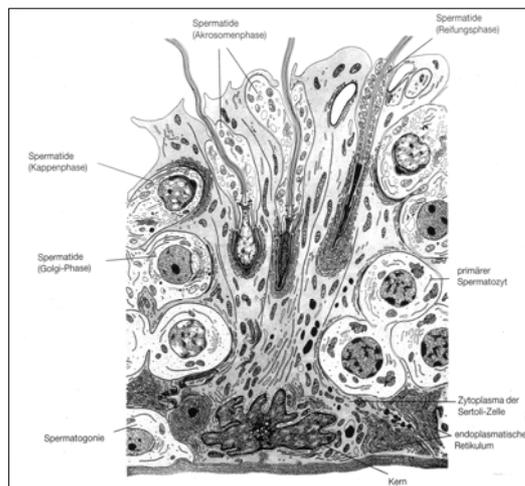


Abb. 1.11
Sertoli-Zelle mit verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatogenese des Bullen (Erläuterungen s. Text, Abb. nach Liebich 2003)

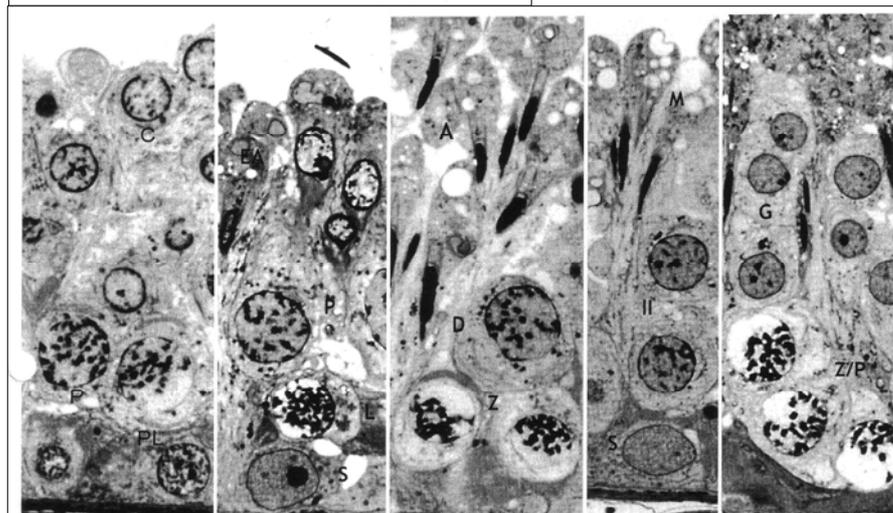


Abb. 1.12 Morphologie unterschiedlicher Zellen der Spermatogenese des Bullen (nach Dellmann's Textbook of Veterinary Histology 2006, Vergrößerung 1560fach)
A Spermatic in Akrosomenphase, **C** Spermatic in Kappenphase, **D** Spermatozyt 1.Ord. (Diplotän), **EA** Spermatic in früher Akrosomenphase, **G** Spermatic in Golgi-Phase, **L** Spermatozyt 1.Ord (Leptotän), **M** Spermatic in Reifungsphase, **P** Spermatozyt 1.Ord (Pachytän), **PL** Spermatozyt 1.Ord (Präleptotän), **S** Spermatogonie, **Z** Spermatozyt 1.Ord (Zygotän), **Z/P** Spermatozyt 1.Ord (Zygotän-Pachytän), **II** Spermatozyt 2.Ord

Am Ende der Spermiogenese steht ein reifes Spermium, das aus Spermienkopf und Spermischwanz aufgebaut ist. Letzterer wird unterteilt in Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück (Abb. 1.13). Den Großteil des Kopfes nimmt der Kern ein. Diesem sitzt kappenartig das Akrosom auf, das etwa 2/3 des Kerns umhüllt. Es enthält zahlreiche Enzyme wie Hyaluronidase, α - und β -D-Galaktosidase, Neuraminidase und Arylsulfatase A-C (Tulsiani, Abou-Haila et al. 1998). Gleichzeitig wurden zahlreiche Proteasen im Inneren des Akrosoms identifiziert. Dazu zählen Akrosin, eine spermien-spezifische Serin-ähnliche Protease, Cathepsin D und L sowie Akrolysin.

Der Spermienhals mit seinem Gelenkstück dient als Verbindung zwischen Kopf und distalen Abschnitten. Dem Hals schließt sich das Mittelstück an, das die typische Geißelstruktur (2 zentrale Tubuli umgeben von 9 Doppelmikrotubuli) besitzt. Außen angelagert ist dem Mittelstück eine Scheide aus Spiralmitochondrien. Es schließt sich der mit etwa 50 μ m längste Spermienabschnitt, das Hauptstück, an. Diesem folgt letztlich das Endstück (Liebich 2003).

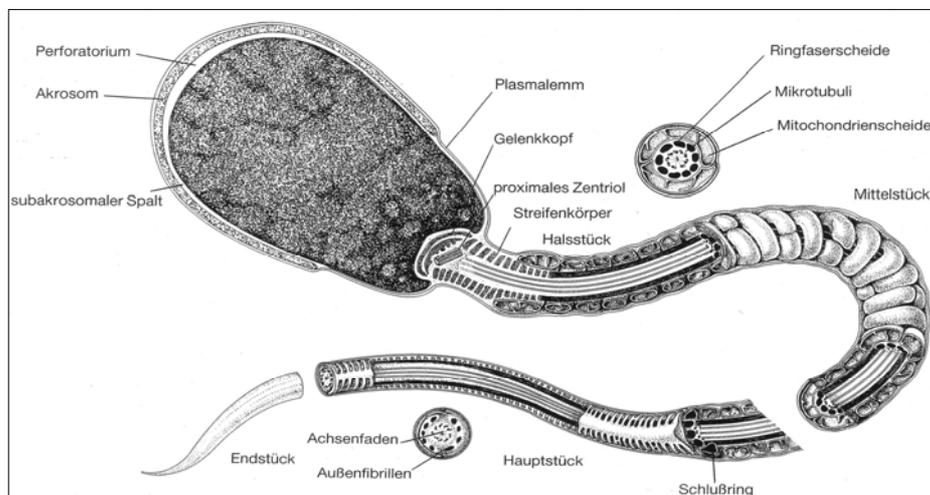


Abb. 1.13
Schematischer
Aufbau eines
Bullenspermiums.
(Abb. nach Liebich
2003)

Die Gesamtdauer der Spermatogenese des Bullen beträgt etwa 52 Tage. Die endgültige Reifung der Spermien erfolgt im Nebenhoden. Dieser besteht aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis (Abb. 1.8 B). Den Übergang vom Hoden in den Nebenhodenkopf (Caput epididymidis) bilden die Ductuli efferentes. Diese gehen in den Nebenhodengang (Ductus epididymidis) über, der beim Bullen eine Länge von etwa 50 m hat und sich in die Segmente 1 bis 6 unterteilt.

Die Segmente 1 bis 3 befinden sich im Nebenhodenkopf, die Segmente 4 und 5 im Nebenhodenkörper, das Segment 6 im Nebenhodenschwanz. Der Ductus epididymidis wird von zweireihigem, hochprismatischem Epithel ausgekleidet. Umgeben wird dieses von einer Schicht glatter Muskulatur. Die Höhe des Epithels nimmt nach kaudal ab. Im Verlauf des Nebenhodenganges werden etwa 90% der Samenflüssigkeit resorbiert, bevorzugt im Caput und Corpus epididymidis. Dort findet auch die wichtige posttestikuläre Spermienreifung statt, während der Nebhodenschwanz vornehmlich als Spermienreservoir dient. Auffällig im Bereich des Nebhodenschwanzes sind intraluminale Aposomen, die durch Abschnürung der apikalen Zellmembran entstehen (Abb. 1.14) (Aumuller, Wilhelm et al. 1999; Haendler, Toda et al. 1999).

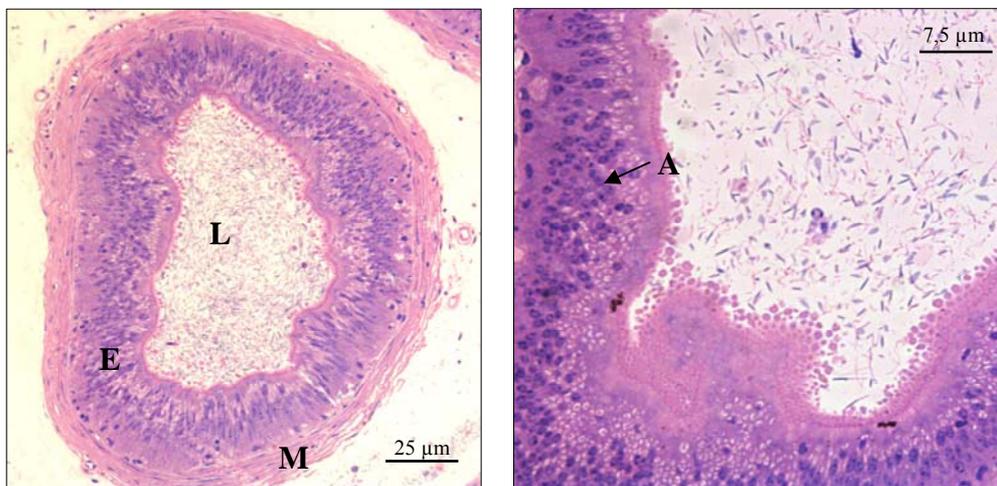


Abb. 1.14
Cauda epididymidis des Bullen links: zweireihiges Epithel (E) umgeben von glatter Muskulatur (M) zentral: Lumen (L)
Vergrößerung 275fach rechts: Vergrößerung zur Darstellung der Aposomen (A) 400fach; Färbung: HE

Die Aposomen haben direkten Kontakt zu den Spermien während deren Aufenthalts im Nebhodenschwanz (Abb. 1.15)

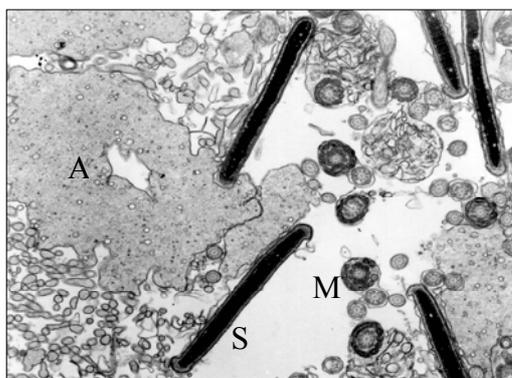


Abb. 1.15 Elektronenmikroskopische Aufnahme aus dem Nebhodenschwanz des Bullen
A Aposom
M Mittelstück eines Spermiums
S Spermienkopf

1.3.2 Das Bläschendrüsensekret des Bullen

Die Bläschendrüse des Bullen ist eine verästelte Drüse mit weitlumigen Sammelräumen. Ihr Sekret hat einen alkalischen pH-Wert, der die Motilität der Spermien anregt und sie gegen das saure Milieu im weiblichen Genitaltrakt schützt. 25 bis 30 % des Ejakulat-Volumens werden beim Bullen von der Bläschendrüse gebildet. Es enthält unter anderem Prostaglandine, Ergothionin, Citrat, Fruktose und Proteine. Der Ausführungsgang der Samenblase vereint sich für ein kurzes Stück mit dem Samenleiter und mündet in die Harnröhre (Nickel, Schummer et al. 2003).

Zu den Proteinen im Bläschendrüsensekret des Bullen zählen der basische Akrosin-Inhibitor (basic acrosin inhibitor) (Cechova, Jonakova et al. 1979; Cechova, Jonakova et al. 1979), die RNase BS1 (Shivaji, Rukmini et al. 1989) und Seminalplasmin (Shivaji 1988). Durch immunhistochemische Methoden konnte gezeigt werden, dass alle diese Proteine zum größten Teil von der Bläschendrüse gebildet werden (Aumuller and Scheit 1987). Weitere Proteine der Bläschendrüse sind das niedermolekulare Protein (low molecular weight protein, LMWP) (Tamblyn 1983) und die 5' Nukleotidase (Fini, Palmerini et al. 1990). Das quantitativ wichtigste Protein der Bläschendrüse ist das Major Protein, wegen seiner 109 Aminosäuren auch als PDC-109 (**P**rotein with **N**-terminus **a**spartic acid, **D**, and **c**arboxy terminus **C**ystein, having **109** amino acids) bezeichnet.

1.4 Das Protein PDC-109 aus der Bläschendrüse des Bullen

1.4.1 Struktur und Aufbau von PDC-109

Im Jahr 1983 wurden drei Proteine aus dem Bläschendrüsensekret des Bullen isoliert, die BSP I, BSP II and BSP III (bovine seminal vesicle protein) genannt wurden (Esch, Ling et al. 1983). Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass es sich bei BSP II und III um identische Proteine handelte (Esch, Ling et al. 1983), die PDC-109 genannt wurden (Esch, Ling et al. 1983). Später fand man heraus, dass BSP-I lediglich die glykosylierte Form des PDC-109 war. Es enthält einen einfachen O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidrest (NeuNAc α (2-

6)-Gal β (1-3)-GalNAc) gebunden an Threonin 11 (Calvete, Raida et al. 1994). PDC-109 hat eine Länge von 109 Aminosäuren und eine Größe von etwa 13 kDa. Es macht einen Anteil von etwa 40 % des gesamten Bläschendrüsensekrets und heißt daher auch Major Protein (Scheit, Kemme et al. 1988). Die Konzentration von PDC-109 in der Flüssigkeit der Bläschendrüse des Bullen beträgt 15 bis 20 mg/ml (Calvete, Raida et al. 1994).

PDC-109 besitzt zwei identische Domänen mit jeweils zwei Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren 24 und 48, 38 und 61, 69 und 94, sowie 83 und 109 (Esch, Ling et al. 1983; Seidah, Manjunath et al. 1987) (Abb. 1.16).

1	Met	Ala	Leu	Gln	Leu	Gly	Leu	Phe	Leu	Ile	Trp	Ala	Gly	Val	Ser	15
16	Val	Phe	Leu	Gln	Leu	Asp	Pro	Val	Asn	Gly	Asp	Gln	Asp	Glu	Gly	30
31	Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	45
46	Asp	Glu	Glu	Cys	Val	Phe	Pro	Phe	Val	Tyr	Arg	Asn	Arg	Lys	His	60
61	Phe	Asp	Cys	Thr	Val	His	Gly	Ser	Leu	Phe	Pro	Trp	Cys	Ser	Leu	75
76	Asp	Ala	Asp	Tyr	Val	Gly	Arg	Trp	Lys	Tyr	Cys	Ala	Gln	Arg	Asp	90
91	Tyr	Ala	Lys	Cys	Val	Phe	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Lys	Lys	Tyr	105
106	Glu	Thr	Cys	Thr	Lys	Ile	Gly	Ser	Met	Trp	Met	Ser	Trp	Cys	Ser	120
121	Leu	Ser	Pro	Asn	Tyr	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Trp	Lys	Tyr	Cys		

Abb. 1.16

Aminosäuresequenz von PDC-109 (rot) und des Signalpeptids (schwarz) (Quelle: http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?SFP1_BOVIN)

Im PDC-109 ist ein Threoninrest an Position 11 der Peptidkette glykosyliert (Abb. 1.17). PDC-109 besitzt zwei Fibronektin Typ 2 Domänen (¹F_{n2} resp. ²F_{n2}) (Abb. 1.17) (Esch, Ling et al. 1983), diese entsprechen einer von drei repetitiven Domän-Typen, die im Plasmaprotein Fibronektin vorkommen (Romero, Varela et al. 1997). Im Fibronektin tragen diese Domänen zur Kollagenbindung bei.

1	Met	Ala	Leu	Gln	Leu	Gly	Leu	Phe	Leu	Ile	Trp	Ala	Gly	Val	Ser	15
16	Val	Phe	Leu	Gln	Leu	Asp	Pro	Val	Asn	Gly	Asp	Gln	Asp	Glu	Gly	30
31	Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	45
46	Asp	Glu	Glu	Cys	Val	Phe	Pro	Phe	Val	Tyr	Arg	Asn	Arg	Lys	His	60
61	Phe	Asp	Cys	Thr	Val	His	Gly	Ser	Leu	Phe	Pro	Trp	Cys	Ser	Leu	75
76	Asp	Ala	Asp	Tyr	Val	Gly	Arg	Trp	Lys	Tyr	Cys	Ala	Gln	Arg	Asp	90
91	Tyr	Ala	Lys	Cys	Val	Phe	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Lys	Lys	Tyr	105
106	Glu	Thr	Cys	Thr	Lys	Ile	Gly	Ser	Met	Trp	Met	Ser	Trp	Cys	Ser	120
121	Leu	Ser	Pro	Asn	Tyr	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Trp	Lys	Tyr	Cys		

Abb. 1.17

Blau: Glykosylierungsstelle Threonin 11 (Gal-GalNAc Dissaccharid, modifiziert mit Sialinsäure), **Rot:** Fibronektin Typ II Domäne 1; **Grün:** Fibronektin Typ II Domäne 2

Jede der beiden Fibronektin-Domänen zeigt eine komplexe Faltung, welche aus zwei doppelsträngigen antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut ist (β_1 -4 resp. β_1' -4'). Die beiden Domänen sind über eine kurze Aminosäuresequenz (Reste 62-68) miteinander verbunden. Zwei α -Helices befinden sich ebenfalls in dem Protein, die erste verbindet die beiden Fn2-Domänen, die andere befindet sich zwischen β_3' und β_4' (Abb. 1.18) (Wah, Fernandez-Tornero et al. 2002).

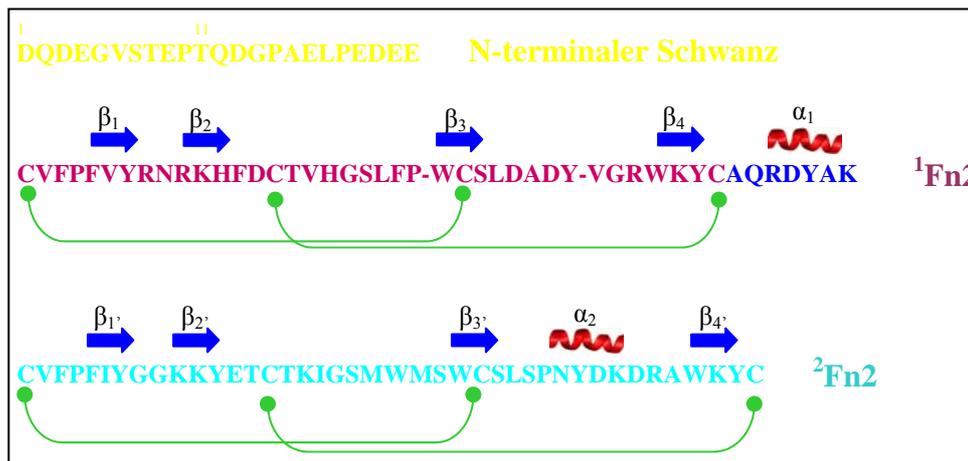


Abb. 1.18

Struktur von PDC-109

gelb: N-terminale Extension; pink: Fibronektin Typ II Domäne 1; dunkelblau: Zwischenstück, verbindet $^1\text{Fn2}$ mit $^2\text{Fn2}$ hellblau: Fibronektin Typ II Domäne 2.

➡ β -Faltblatt-Regionen  α -Helix-Regionen  Disulfidbrücken

nach (Wah, Fernandez-Tornero et al. 2002)

1.4.2 Bindungspartner von PDC-109

PDC-109 bindet mit hoher Spezifität an Phosphatidylcholin (Muller, Erlemann et al. 1998), den Hauptbestandteil der Spermien-Plasmamembran. Durch diese Bindung wird der Efflux von Cholesterol und Phospholipiden ausgelöst, der im frühen Stadium der Kapazitation beobachtet wird. Im weiblichen Genitaltrakt bewirkt an Spermien gebundenes PDC-109 die Rekrutierung von Heparin-ähnlichen Glycosaminoglykanen und HDL (high-density-lipoproteins). PDC-109 ist als Multimer von mindestens vier Molekülen in der Lage, Heparin und HDL zu binden (Therien, Soubeyrand et al. 1997; Manjunath, Nauc et al. 2002). Die Heparin-induzierte bovine Spermien-Kapazitation stimuliert die Ca^{2+} -Aufnahme in das Spermium, eine intrazelluläre Alkalinisierung und schließlich die Aktivitätszunahme der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Lane, Therien

et al. 1999). Durch PDC-109 kommt es ferner zu einer Zunahme der Bindungsstellen für Heparin auf der Spermienoberfläche.

Dadurch potenziert es die Heparin-induzierte Kapazitation der bovinen Spermien (Chandonnet, Roberts et al. 1990; Therien, Bleau et al. 1995).

Der HDL-induzierte Cholesterolefflux aus der Spermienmembran führt zu einer Abnahme des Cholesterol:Phospholipid-Quotienten und damit auch zu einer Abnahme der Fluidität der Spermienmembran und zu einer Destabilisierung der Membran (Therien, Moreau et al. 1998). Diese ist verbunden mit einer Reorganisation Membran-gebundener Komponenten. Die kombinierten intra- und extrazellulären Effekte von PDC-109 auf die Spermien könnten dazu beitragen, dass die Spermien zur akrosomalen Reaktion befähigt werden (Visconti, Galantino-Homer et al. 1998). In vivo wird dies als Beginn der Kapazitation gedeutet (Therien, Moreau et al. 1998; Moreau, Frank et al. 1999; Muller, Greube et al. 2002).

Die Destabilisierung der Membran geschieht einerseits durch eine Erhöhung des Hydratationsgrades, andererseits durch eine Erhöhung der Unordnung der Acyl-Reste innerhalb der Membran (Gasset, Magdaleno et al. 2000; Tannert, Kurz et al. 2007). Nach Bindung an die Spermienmembran ist das Protein in der Lage, in das hydrophobe Innere der Membran einzudringen (Muller, Erlemann et al. 1998) und dort mit Lipiden zu interagieren (Ramakrishnan et al. 2001). Diesem Effekt könnte der Efflux von Lipoprotein-Partikeln unterliegen, der beobachtet wird, wenn man epididymale Spermatozoen mit PDC-109 inkubiert (Ramakrishnan, Anbazhagan et al. 2001).

Gwathmey et al. fanden heraus, dass PDC-109 die bovinen Spermien dazu befähigt, an das Epithel des Ovidukts zu binden (Gwathmey, Ignatz et al. 2003). Ein Vergleich der PDC-109-Bindung an verschiedene Phospholipide konnte zeigen, dass die Bindung an Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) stärker war als die Bindung an Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) und Dimyristoylphosphat-Säure (DMPA) in der Reihenfolge: DMPC > DMPG > DMPA.

Aktivitätsanalysen legen die Vermutung nahe, dass die Bindung an Cholin-haltige Phospholipide aufgrund einer starken Entropiesteigerung begünstigt wird (Thomas, Anbazhagan et al. 2003).

Ferner hat PDC-109 einen Dosis-abhängigen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) und die Tyrosin-Protein-Kinase (TPK) (Yu, Zhao et al. 2003). Obwohl über Struktur und Funktion von PDC-109 bereits einiges bekannt ist, liegen die genauen Mechanismen der Interaktion mit den bovinen Spermien dennoch im Dunkeln.

Kristallographische Strukturanalysen lassen vermuten, dass die Bindungsspezifität zwischen PDC-109 und Cholin-Phospholipiden auf einer Kation- π -Interaktion zwischen der quartären Ammoniumstruktur des Cholins und dem aromatischen Indol-Ring eines Tryptophanrests des PDC-109 beruht (Wah, Fernandez-Tornero et al. 2002). Weiterhin wird die Bindung zwischen PDC-109 und Phosphatidylcholin durch Wasserstoffbrücken zwischen Tyrosinresten im PDC-109 und der Phosphatgruppe des Phosphatidylcholins stabilisiert (Wah, Fernandez-Tornero et al. 2002).

In der ¹F_n2-Domäne interagiert das Tryptophan an Position 47 (Trp47) mit dem quartären Ammonium, die Tyrosinreste an Position 30 und 54 (Tyr30 und Tyr54) bilden Wasserstoffbrücken mit dem Phosphatrest des Phosphatidylcholins aus (Abb. 1.19a). Etwas komplizierter sind die Bindungsverhältnisse in der ²F_n2-Domäne. Zur Interaktion mit Phospholipiden bildet das PDC-109 Dimere oder gar Multimere aus (s.o.). In der ²F_n2-Domäne nutzen die Monomere A und B unterschiedliche Aminosäurereste, um mit Phosphatidylcholin zu interagieren. Im Monomer A interagiert das Ammonium mit dem Tryptophan an Position 106 (Trp106), an den Wasserstoffbrücken sind die Tyrosinreste 75 und 100 (Tyr 75 und Tyr100) beteiligt. Im Monomer B findet die π -kationische Interaktion zwischen dem Tryptophan 93 (Trp93) und der Ammoniumstruktur statt (Abb. 1.19b).

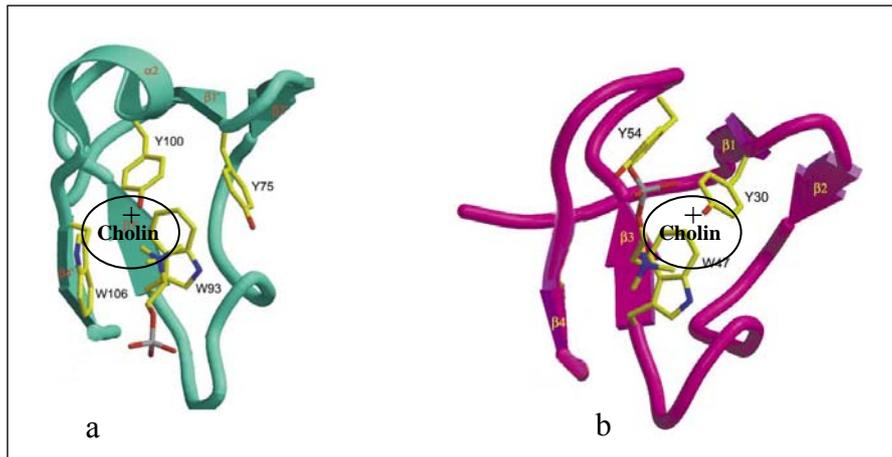


Abb. 1.19 Interaktion der ¹F_n2 (a) und der ²F_n2 – Domäne (b) mit dem positiv teilgeladenen Cholin nach (Wah, Fernandez-Tornero et al. 2002)

1.4.3 Fibronektin Typ II-Domänen Proteine im Genitaltrakt anderer Spezies

Die Fibronektin-TypII (Fn2) -Domänen-Proteine kommen nicht nur im Genitaltrakt des Bullen vor. Sie unterscheiden sich bei unterschiedlichen Spezies jedoch durch die Zahl ihrer Fn2-Domänen, durch die Länge der N-Termini und durch den Grad ihrer Glykosylierung (Calvete, Mann et al. 1996). Sie bilden nicht nur beim Bullen einen Hauptbestandteil der Seminalplasma-Proteine, sondern auch beim Hengst (horse seminal protein, HSP-1/2). HSP 1 und 2 machen einen Gesamtproteinanteil am Seminalplasma von über 60 % aus (Calvete, Raida et al. 1994; Salois, Menard et al. 1999). HSP-1 und HSP-2 unterscheiden sich ebenfalls in dem Grad ihrer Glykosylierung und der Länge ihrer N-terminalen Bereiche (Calvete, Mann et al. 1995). Eine Oligomerisierung von HSP-1 mit HSP-2, ähnlich wie bei PDC-109, ist die Voraussetzung zur Bindung von Heparin. Allerdings ist nur eine der beiden Formen zur Bildung von Oligomeren in der Lage (Calvete, Reinert et al. 1995). Auch das aus dem Seminalplasma des Ebers isolierte porcine homologe Protein (pB1) besitzt zwei Fn2-Domänen.

Es weist eine 60-65%-ige Sequenzübereinstimmung zu den equinen und bovinen Seminalplasmaproteinen auf und verfügt ebenso wie diese über die Fähigkeit an Heparin und Phosphatidylcholin zu binden (Calvete, Raida et al. 1997). Im Gegensatz zu diesen kommt pB1 jedoch in einer vergleichsweise geringen Menge im Seminalplasma vor (Calvete, Raida et al. 1997; Plucienniczak, Jagiello et al. 1999). Im Seminalplasma der Ziege wurden vier weitere Vertreter der Fibronectin-TypII-Domänen-Protein-Familie nachgewiesen. Diese als GSP-20 und GSP-22 (Goat Seminal Plasma Protein) bezeichneten Proteine sind ebenfalls zur Bindung an Heparin befähigt (Villemure, Lazure et al. 2003).

Kürzlich wurde auch beim Menschen das Humane-Epididymis-Protein-12 (HE12), ein weiteres hochkonserviertes Fn2-Domänen-Protein beschrieben. Es wird vorwiegend im Corpus-Bereich des Nebenhodens synthetisiert (Saalman, Munz et al. 2001). Das HE12 zeichnet sich im Gegensatz zu den Fn2-Domäne-Proteinen der Huftiere durch vier tandemartig hintereinander angeordnete Fn2-Domänen aus. Nur die beiden ersten zeigen eine Übereinstimmung von 50-60 % der Aminosäuren mit den Fn2-Domänen des PDC-109 und des HSP1/2. Dagegen sind die beiden anderen eher den Fn2-Domänen der Gelatinasen bzw. dem Hagemann-Faktor ähnlich (Saalman, Munz et al. 2001). Eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Heparin-bindenden Proteinen aus dem Seminalplasma der Huftiere (PDC-109, HSP-1, HSP-2 und pB1) weisen auch die HE12-homologen CE12 Proteine des Hundes auf (Saalman, Munz et al. 2001). Diese verfügen ebenfalls über vier tandemartig hintereinander geschaltete Fn2-Domänen, von denen auch die ersten beiden den Domänen der Seminalplasmaproteine der Huftiere signifikant ähneln (Desnoyers and Manjunath 1992; Calvete, Mann et al. 1995; Calvete, Mann et al. 1996; Calvete, Raida et al. 1997). Der Ort der Synthese der Fn2-Domänen-Proteine des Seminalplasmas variiert speziesspezifisch. So werden die BSP-Proteine des Rindes überwiegend von der Bläschendrüse sezerniert. Der Hauptort der Sekretion von HSP-1 und -2 ist die Ampulla ductus deferentis. HSP-1 konnte jedoch schon an Spermien aus dem distalen Nebenhodenkörper nachgewiesen werden (Topfer-Petersen, Romero et al. 1998). Der Produktionsort der schweine- und ziegenhomologen Proteine ist bislang noch nicht bekannt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Jahr 2004 haben Schuh et al. gezeigt, dass PMCA4 knockout Mäuse aufgrund einer eingeschränkten Spermienmotilität infertil sind (Schuh, Cartwright et al. 2004). Aufgrund dieser Tatsache sollen Expressions- und Lokalisationsstudien zur Calcium-ATPase der Plasmamembran in den inneren Geschlechtsorganen, sowie in der Spermienmembran boviner Spermien die Frage beantworten, welche die vorherrschende PMCA-Isoform in der Spermienmembran des Bullen ist. Da die endgültige Reifung der Spermien vorwiegend im Nebenhoden stattfindet, soll ergänzend gezeigt werden, ob die bovinen Spermien die PMCA bereits im Testis erhalten, oder aber, wie es Voruntersuchungen vermuten lassen, erst bei der Passage durch den Nebenhoden mit der Ca^{2+} -ATPase ausgestattet werden. Da die vorherrschende PMCA-Isoform in den Spermien der Säugetiere die PMCA4 ist, sollen die beiden Spleißvarianten PMCA4a und 4b kloniert und sequenziert werden. Nicht zuletzt dienen die Sequenzen der Herstellung Spleißvariantenspezifischer Antikörper, die bisher nicht kommerziell erhältlich sind.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion der PMCA mit dem Bläschendrüsensprotein PDC-109. In einem Assay, der humane PMCA, exprimiert in Insektenzellen, verwendet soll gezeigt werden, ob das PDC-109 einen Effekt auf die PMCA hat. Dabei ist insbesondere die Frage von Bedeutung, ob es sich bei der Interaktion der PMCA mit dem PDC-109 um einen direkten Effekt handelt, oder ob diese indirekt durch Bindung an Phospholipide in der Spermienmembran ausgelöst wird. Durch gezielte Mutationen im PDC-109 soll dann der Grundstein für die Beantwortung der Frage gelegt werden, ob die sogenannte π -kationische Interaktion eine Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion spielt.

2 Material und Methoden

„Das den Menschen spezifische Handeln kommt zustande durch die Klugheit und durch die ethische Tugend. Und zwar bewirkt die Tugend, dass das Ziel richtig ist, und die Klugheit, dass man die richtigen Mittel dazu wählt.“

Aristoteles (Nikomachische Ethik 1144 a 6-9)

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bakterien Inkubator	Memmert, Schwabach
Diaphot 300 Mikroskop	Nikon, Japan
Elektronenmikroskop EM/OA/B	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenz- und Licht-Mikroskop	Leica MD KD
Gel Electrophoresis Chambers	Biorad, Hercules, CA,USA
Geltrockner Modell 583	Biorad, München
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
PTC-200 DNA Engine thermal cycler	Biozym Diagnostik, Oldendorf/Hess
Sterile Werkbank Lamin Air HLB 2448	Kendro, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckmann, München
Zellkultur Inkubator BBD6220	Kendro, Hanau

2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphat (dNTPs)	Roche, Mannheim
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol Hydrochlorid (DAPI)	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Groningen, NL
Chloroform	Merck, Darmstadt
DIG-labeled Uridine Triphosphat (11-dUTP)	Roche, Mannheim
DNA- und Protein-Marker	Peqlab,
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG)	Applichem, Darmstadt
NBT / BCIP Stammlösung	Roche, Mannheim
Phenol / Chloroform / Isopropanol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Poly (dI-dC)	Sigma-Aldrich, München
Rotiphorese Gel 30,	Roth, Karlsruhe
Sodium acetate	Roth, Karlsruhe
Sodium acide	Merck, Darmstadt
Sodium chloride	Sigma-Aldrich, München
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trizol TM	Invitrogen, Groningen, NL
Urea	Merck, Darmstadt
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

DNase I	[1 U/ μ l]	Promega, Madison/USA
RNase A		Roche, Mannheim
Pfu Turbo DNA polymerase	[2.5 U/ μ l]	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	[60 U/ μ g]	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsendonukleasen		Roche, Mannheim GE Healthcare,
Rnasin	[20 U/ μ l]	Perkin Elmer, Langen
SP6/T7 Polymerase	[10 U/ μ l]	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	[5 U/ μ l]	Invitrogen, Groningen, NL

2.1.4 Bakterienkultur

Ampicillin		Sigma-Aldrich, München
Bacto-Trypton		Invitrogen, Groningen, NL
Bacto-yeast extract		Invitrogen, Groningen, NL
Borate		Merck, Darmstadt
Calcium Chloride		Merck, Darmstadt

2.1.5 Zellkultur

Sf9, Sf21, High Five - Zellen		Invitrogen, Groningen, NL
Grace Insect Medium		Invitrogen, Groningen, NL
SF-900 SFM		Invitrogen, Groningen, NL
Bac-N-Blue TM Transfection and Expressio Kit		Invitrogen, Groningen, NL
Fetal Calf Serum (FCS)		PAA, Marburg
Amphotericin B		Invitrogen, Groningen, NL
Ampicillin		Invitrogen, Groningen, NL
Streptomycin		Invitrogen, Groningen, NL

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Biodyne®, B nylon membranes	Pall Gelman Laboratory
BioMax Röntgenfilme	KODAK, USA
Deckglas	Superior, Lauda-Königshofen
ECL Nitrocellulose Membranen	Amersham, Braunschweig, heute GE Healthcare
Objektträger	Superior, Lauda-Königshofen
Probe Purification Columns	Stratagene, Heidelberg
Reaktionsgefäße 0.5 ml (thin)	Perkin Elmer, Foster City/USA
Reaktionsgefäße 0.5, 1.5 und 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen 25, 75 und 185 ml	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden

2.1.7 Bakterienstämme

Es wurden Top 10F⁷ – Zellen aus dem Topo TA Cloning® Kit, Invitrogen, Carlsbad USA, verwendet. Zur Mutagenese wurden XL1-Blue superkompetente Zellen aus dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene, Heidelberg, eingesetzt.

2.1.8 Gewebe und Zelllinien

Vom lokalen Schlachthof wurden folgende Gewebe von geschlechtsreifen Bullen bezogen: Hoden, Bläschendrüse, Nebenhoden, Herz, Leber und Gehirn (Medulla oblongata und Cerebellum). Als Kontrolle wurden Gewebe der Ratte (Gehirn, Leber, Herz) und des Menschen (Gehirn, Leber, Herz) verwendet.

2.1.9 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonucleotidprimer wurden mithilfe des frei im Internet verfügbaren Programms „Primer 3“ konzipiert und über die Firma MWG, Ebersbach, bezogen:

β-Aktin_for	5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3'
β-Aktin_rev	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
PMCA 1_for	5'-TGT AAG CTG AAT GTT AAC AC-3'
PMCA 1_rev	5'-CAG CAG TAT TTG AAG GAC TA-3'
PMCA 2_for	5'-AGG CAC CCA ACT CAC CCA AG-3'
PMCA 2_rev	5'-CAG TCT CGG AAA AGT ATA CG-3'
PMCA 3_for	5'-TGT CCA CAG AAC AGT GGC TC-3'
PMCA 3_rev	5'-ATG CCG CTG TCT ATG GCG TT-3'
PMCA 4_for:	5'-CAC CTT CGT GCT CAT GCA GC-3'
PMCA 4_rev:	5'-TGG AGT GAC CTC ACC ATC CAG-3'
PMCA 1cloning_for	5'-AAT GCT GCT GAT GCT CCT TT-3'
PMCA 1cloning_rev	5'-CCA AAA AGC ACC CTC AGT CT-3'
PMCA 2cloning_for	5'-GGG GAC TGC AGC AGA CAT-3'
PMCA 2cloning_rev	5'-CAT CCA GGC ACC TGA CTG AC-3'
PMCA 3cloning_for	5'-TGG ATG GAG GTC TTG GAT TC-3'
PMCA 3cloning_rev	5'-GCA GGA TGG GCG ACG TG-3'
PMCA 4cloning_for	5'-GTT GAG GGG CTT GGT AAC AG-3'
PMCA 4cloning_rev	5'-TGG AGT GAC CTC ACC ATC CAG-3'
MutW47F_for	5'-CAT GGT TCC TTA TTC CCG TTC TGT TCC CTC GAT GCA GAC-3'

MutW47F_rev	5'-GTC TGC ATC GAG GGA ACA GAA CGG GAA TAA GGA ACC ATG-3'
MutW93F_for	5'-GGG AGT ATG TGG ATG TCT TTC TGC TCA CTC TCT CCA AAC-3'
MutW93F_for	5'-GTT TGG AGA GAG TGA GCA GAA AGA CAT CCA CAT ACT CCC-3'
MutW47H_for	5'-GCA TGG TTC CTT ATT CCC GCA CTG TTC CCT CGA TGC AGA C-3'
MutW47H_rev	5'-GTC TGC ATC GAG GGA ACA GTG CGG GAA TAA GGA ACC ATG C-3'
MutW93H_for	5'-ATT GGG AGT ATG TGG ATG TCT CAC TGC TCA CTC TCT CCA AAC TAC-3'
MutW93H_for	5'-GTA GTT TGG AGA GAG TGA GCA GTG AGA CAT CCA CAT ACT CCC AAT-3'

2.1.10 Plasmide

Der pCR II-TOPO® Vektor (Invitrogen, Groningen, NL) ist ein abgewandelter Bluescript-Vektor mit TOPO-Klonierungsstelle (Abb. 7.1a). Für die Klonierung der Gesamt PMCA's wurde der TOPO® XL-Vektor von Invitrogen angewendet (Abb. 7.1b). Zur zellfreien Proteinexpression wurde der Vektor pET21a® Novagen, Madison, USA eingesetzt (Abb. 7.1c). In der Insektenzellkultur fand der pMelBac B® - Vektor der Firma Invitrogen Anwendung (Abb. 7.1d).

2.1.11 Antikörper

In der Arbeit wurden folgende mono- und polyklonalen Antikörper eingesetzt. Die humanen PMCA-Antikörper wurden entweder über Dianova bezogen oder durch Aida Filoteo aus dem Labor von Prof. Strehler, Mayo Clinic, Rochester, USA, zur Verfügung gestellt (Tab. 2.1, 2.2).

Antikörper	Isoform	mono- / polyklonal	Referenz
5F10	PMCA1 bis 4	monoklonal	(Borke, Minami et al. 1987)
NR1	PMCA1	polyklonal	(Filoteo, Elwess et al. 1997)
NR2	PMCA2	polyklonal	(Filoteo, Elwess et al. 1997)
NR3	PMCA3	polyklonal	(Filoteo, Elwess et al. 1997)
JA9 / NR4	PMCA4	monoklonal	(Borke, Minami et al. 1987)
JA3	humane PMCA4b	monoklonal	(Borke, Minami et al. 1987)
PMCA 4 bov	bovine PMCA4a	polyklonal	eigene Herstellung
Anti PDC-109	PDC-109	polyklonal	(Sanchez-Luengo, Aumuller et al. 2004)

Cy TM 3 markiert	monoklonal Anti-Maus 1:350 für IHC	Dianova, Hamburg
Anti-DIG-AP Konjugat	polyklonal Schaf-Anti-DIG 1:200 für ISH	Roche, Mannheim
ECL TM horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Antibody	polyklonale Anti-Kaninchen 1:5000 für Western Blot	Amersham, heute GE Healthcare

2.1.12 Verwendete Datenbanken und Analyseprogramme im Internet

Zur Literatursuche und Analyse von Nukleotidsequenzen wurden folgende Internetseiten benutzt:

GDB	(http://gdbwww.dkfz-heidelberg.de)
NIX	(http://www.hgmS.mrc.ac.uk/NIX/)
Human genome draft sequence	(http://genome.ucsc.edu)
BLAST	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
BLAST 2 sequences	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html)
ExPASy translate tool	(http://www.expasy.org/tools/dna.html).
Multiple sequence alignment tool	(http://W3.toulouse.inra.fr/lgc/multalin/multalin.html)
Primer X Primer Design	(http://bioinformatics.org/primerx/)
Start codon	(http://www.hri.co.jp/atgpr/)
PeptideMass	(http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)
Repeatmasker	(http://repeatmasker.genome.washington.edu)
Restrictionmapper	(http://www.restrictionmapper.org/)
Stratagene	(http://labtools.stratagene.com/QC)
UniGene database	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/)
Primer3	(http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
PubMed	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Limits&DB=PubMed)
PredictProtein	(http://www.cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/predictprotein.html)
SwissModell	(http://www.expasy.ch/sw3d/)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Hoden, Bläschendrüse, Nebenhoden, Herz, Leber und Gehirn (Medulla oblongata und Cerebellum) des Bullen erfolgte mit Hilfe der TRIzol™-Methode (GibcoBRL, Grand Island NY) nach den Angaben des Herstellers. Diese in unserem Labor etablierte Methode besteht aus den Schritten Homogenisieren, Phasentrennung, RNA-Präzipitation sowie dem Waschen und Lösen der RNA. Die auf diese Weise präparierte RNA wurde bei –80°C gelagert.

2.2.1.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

DNA, RNA und Oligonukleotide wurden durch photometrische Messung bei 260 nm quantifiziert. Gleichzeitig gab der Quotient von 260/280 nm Hinweise auf den Reinheitsgrad der Präparation. Eine saubere Präparation sollte einen Quotient zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen. Bei einer optischen Dichte von 1 in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm, liegen 50 µg/ml doppelsträngige DNA vor, 40 µg/ml einzelsträngige DNA oder RNA und 33 µg/ml Oligonukleotide vor.

2.2.1.3 Denaturierendes RNA-Formaldehydgel

Die Trennung der RNA in Agarosegelen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Trennung von DNA (s.u.). Die Agarose wurde in Membrapure-H₂O gekocht. Anschließend wurden 37% deionisiertes Formaldehyd sowie 10 x MOPS-Puffer hinzugegeben. Nach kurzem Mischen wurde das Gel gegossen. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Mindestens 3 – 5 µg Total-RNA wurden mit autoklaviertem Wasser auf 5 µl (höchstens 15 µl) Gesamtvolumen gebracht. Nach der Zugabe von 25 µl Probenpuffer (je nach Probenmenge auch weniger) und von 1,5 µl 0,1% EtBr wurden die Proben für 15 Minuten bei 65°C denaturiert und danach auf Eis gekühlt und aufgetragen.

2.2.1.4 Kurzer DNase-Verdau der präparierten RNA

Zur Eliminierung genomischer DNA-Verunreinigungen wurde die Gesamt-RNA vor der reversen Transkription mit RNase freier DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim) behandelt. Der Reaktionsansatz bestand aus:

10 µg gesamt RNA

1 µl RNase OUTTM RNase-Inhibitor (40 U/µl), Invitrogen (Karlsbad)

1 µl RNase freie DNase I (10 U/µg), Roche Diagnostics (Mannheim)

2 µl 10 x DNase I-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,3),

ad 20 µl Aqua

Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C und anschließend 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Zum Ausschluß von Verunreinigungen mit genomischer DNA wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt (s.u.). Die aufgereinigte RNA wurde für die cDNA-Synthese verwendet.

2.2.1.5 Reverse-Transkription der RNA (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktionsanalyse erfolgte über die „two step“-Methode. Zuerst wurde die isolierte Gesamt-RNA unter Verwendung von „Ready-To GoTM You-Prime First-Strand Beads“ in „full-length“ einzelsträngige copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde die „Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV“-Reverse Transkriptase verwendet, die in Beads gemeinsam mit dem Puffer, dNTP's und RNase/DNase freiem BSA enthalten war (Ready-To GoTM You-Kit, Amersham San Francisco).

Entsprechend der gemessenen Nukleinsäure-Konzentration wurden 5 µg in der cDNA-Synthese eingesetzt. Mit DEPC-behandeltem A. bidest wurde auf 32 µl aufgefüllt und die RNA 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Nach sofortiger Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurde die RNA in die Reaktionsgefäße mit den „First-Strand Beads“ pipettiert, 1 µl Random-Primer (pd(N)6) zugegeben und nach kurzem Mischen 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Bis zum Einsatz in den verschiedenen PCR-Reaktionen wurden die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.2.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingeschlossen werden, vervielfältigen kann. Sie wurde von Kary B. Mullis im Jahre 1985 entwickelt. Er erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie.

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich mit jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. Zur Durchführung einer PCR wurden folgende Bestandteile benötigt (Tab. 2.3):

Komponente		Vol. (µl)
10x PCR Puffer		2.5
dGTP	10 mM pro dNTP	0.5
dATP		
dTTP		
dCTP		
Taq-Polymerase		0.125
50 mM MgCl ₂		1.0
Primer forward	100 pmol/µl	0.5
Primer reverse		0.5
DNA		~ 1 µl
H ₂ O		ad 25 µl

Die PCR läßt sich in drei Teilschritte Denaturieren, Annealing (Hybridisieren) und Extending (Verlängern) einteilen. Durch Zugabe eines Enzyms (DNA-Polymerase), welches die Primer als Startsignale erkennt, sowie von einem Gemisch aus Nucleotiden (dNTPs), werden die Primer verlängert und zu einem DNA-Doppelstrang ergänzt (72°C). Nach 20 bis 40 Zyklen (Abb. 2. 2) wird der gesuchte DNA-Abschnitt millionenfach verlängert.

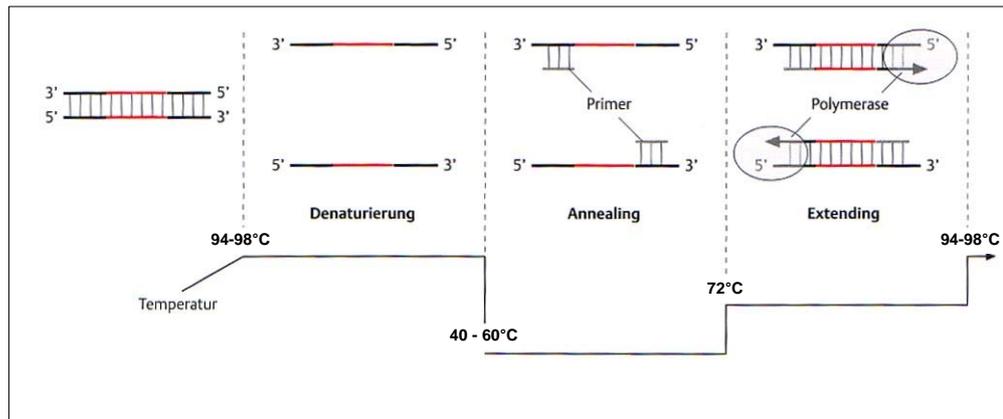


Abb. 2.1
Ablauf der PCR nach (Königshoff and Brandenburger 2007)

2.2.1.7 Agarosegel

Sowohl für analytische Zwecke als auch für präparative DNA-Isolierungen wurden DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose (Invitrogen, Groningen, NL) wurde in einer Konzentration von 0,8 bis 2 % in 1x TBE in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Etbr) versetzt. Das Gel wurde anschließend in eine Horizontalkammer (Peqlab, Erlangen) mit eingesetztem Kamm gegossen.

Aufgrund der negativen Ladungen werden DNA-Fragmente in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Zugabe von Ethidiumbromid ermöglicht die Darstellung der aufgetrennten Nukleotidfragmente. Die planaren Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basenpaaren der Nukleotide und können durch kurzwelliges UV-Licht (260 nm) zur Emission von orange-rottem Fluoreszenzlicht (590 nm) angeregt werden.

2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde das „Wizard® SV Gel und PCR Clean-up System“ der Firma Promega, Madison/USA verwendet. Dazu wurde die DNA Bande mit 1 µl „Membran Binding Solution“ pro µg Gel versetzt. Das Gemisch wurde bei 60°C geschmolzen und in eine mitgelieferte Minisäule pipettiert. Nach Inkubation bei RT wurde bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Für den anschließenden Waschschrift wurde die Säule mit 700 µl „Membrane Wash Solution“ befüllt und erneut für eine Minute bei

13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Schließlich wurde die Minisäule mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser befüllt und erneut für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die nun eluierte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Das "TOPO TA Cloning Kit" bietet die spezielle Möglichkeit, PCR-Fragmente ohne Blunt-Reaktion, Dephosphorylieren des Vektors oder DNA-Aufreinigung über ein Gel in den PCR-Script Vektor zu klonieren. Eluierte DNA-Banden (s.o.) wurden nach dieser in unserem Labor etablierten Methode in den TOPO pCR II – Vektor inkloniert (Abb. 2.3).

2.2.1.10 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

2 µl der Klonierungsreaktion wurden mit chemisch kompetenten E.coli gemischt und für 5 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad geschockt. Es schloss sich die sofortige Lagerung auf Eis an. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) gemischt und für 1 Stunde bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 10 bis 100 µl der transformierten Zellen auf bei 37°C vorgewärmten LB_{amp}-Platten (LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml mit X-Gal und IPTG) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C erfolgte die Auswahl von Klonen, die ein Insert-tragendes Plasmid enthielten, nach dem Blau-Weiß-Screening. Das PCR-Produkt (Insert) unterbricht auf dem Plasmid die Sequenz für das Enzym β-Galaktosidase, das daher nicht vollständig translatiert werden kann. Das Substrat X-Gal kann daher nicht umgesetzt werden, so dass die entsprechenden Kolonien ihre weiße Farbe behalten. Kolonien mit Substrat-Umsatz, also ohne Insert im Plasmid, erscheinen dagegen blau. Es wurden 5 bis 10 weiße Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin über Nacht (16 bis 18 Stunden) im 37°C-Schüttler bei 225 rpm vermehrt.

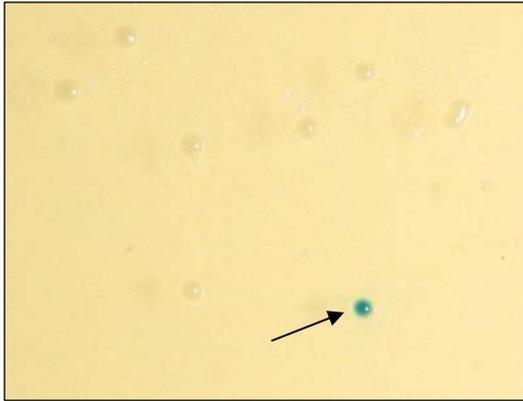


Abb.2.2
Nach Transformation tragen mehrere Plasmid-Kolonien das Insert und erscheinen daher weiss, eine Kolonie trägt eine Blaufärbung als Zeichen des fehlenden Inserts (Pfeil)

2.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräp)

Von der Übernachtskultur (s.o.) wurden 1,5 ml bei 5000 rpm für 2 - 3 Minuten bei 4°C in 2 ml Eppendorf-Cups zentrifugiert. Es bildete sich hierbei ein Bakterienpellet am Boden des Röhrchens. Die Plasmid-DNA wurde nach der Phenol-Chloroform Methode nach den Angaben des Herstellers (Roth, Karlsruhe) extrahiert.

2.2.1.12 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Kontrolle und Analyse der präparierten Plasmide wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Eine Restriktion wurde in 20 µl Gesamtansatz durchgeführt. Zu 2 – 3 µg der DNA kamen 3 – 5 U Enzym pro µg einsetzter DNA sowie 2 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers. Mit H₂O wurde auf die 20 µl Endvolumen aufgefüllt. und für 1,5 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 30 Minuten bei 65°C bzw. 85°C inaktiviert. Das richtige Insert wurde anhand eines Agarosegels kontrolliert und durch Sequenzierung bestätigt.

Die zuvor beschriebenen Schritte der Ligation, Transformation und Plasmidpräparation sind in Abbildung 2.3 zusammengefasst.

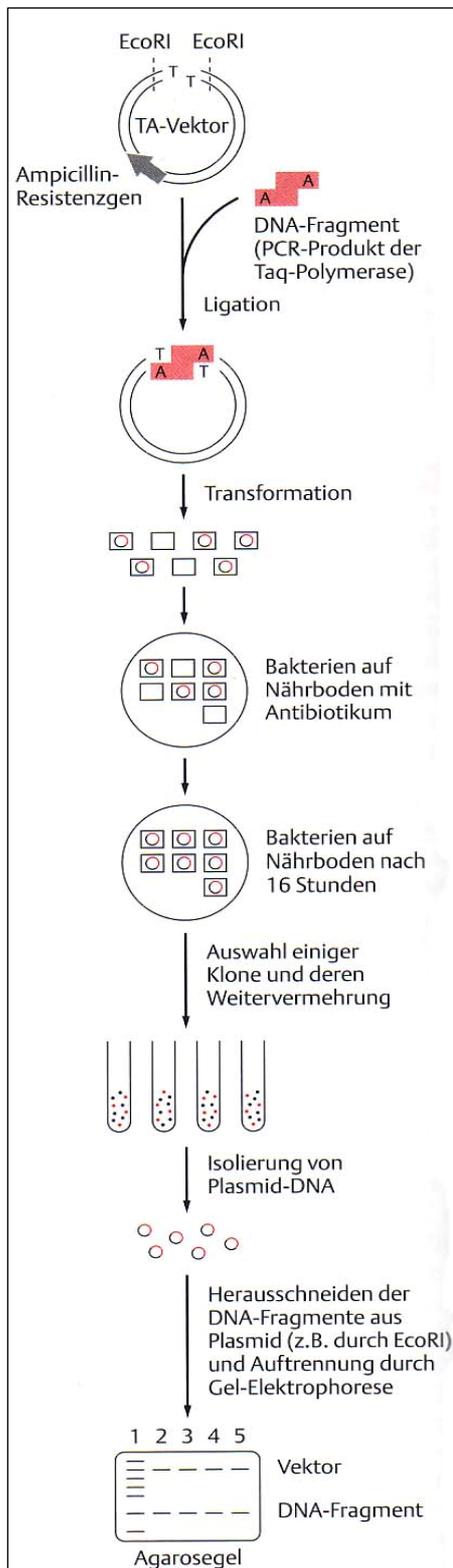


Abb. 2.3
Ligation und Transformation und Einsatz von Restriktionsendonucleasen nach (Brandenburger and Bajorat 2006)

2.2.1.13 Analyse der positiven Plasmide durch Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 1 – 2 µg der DNA-Probe in lyophilisiertem Zustand an MWG-Biotech gesendet. Die erhaltene Sequenz wurde im Computer mit veröffentlichten Sequenzen verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.2.1.14 In situ-Hybridisierung

Anders als bei der RT-PCR weist man bei der *in situ*-Hybridisierung die RNA direkt im Gewebe nach. Dazu werden in diesem Fall markierte einzelsträngige RNA-Sonden hergestellt, die auf einem Gewebedünnschnitt an die dort vorhandene mRNA binden und sichtbar gemacht werden.

2.2.1.14.1 Herstellung von markierten RNA - Sonden

Markierte RNA kann durch *in vitro*-Transkription der DNA synthetisiert werden, wenn diese in 3'-Richtung eines Sp6- oder T7-Promotors kloniert ist. Die Sp6- bzw. T7-RNA-Polymerasen erkennen diese Promotorregion und synthetisieren unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem Uridintriphosphat markierte "run-off"-Transkripte. Statistisch ist jedes 20. bis 25. Nukleotid der neu-synthetisierten RNA ein DIG-UTP. Mit dieser Methode kann eine große Menge markierter RNA erzeugt werden. Unter Standardbedingungen werden von 1 µg Template-DNA ca. 10 µg DIG-markierte RNA transkribiert.

Für die *in vitro* Transkription musste das Plasmid zunächst linearisiert werden. Die Plasmide müssen in zwei Ansätzen auf beiden Seiten ihrer multiplen Klonierungsstelle geschnitten werden, damit mit der entsprechenden Polymerase (Sp6 oder T7) die Sense- bzw. Antisense-Sonde gebildet werden kann. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme XhoI resp. BamHI in einer Konzentration von 5U /µg DNA eingesetzt.

Im Anschluss an den zweistündigen Verdau wurden die Enzyme durch den Einsatz von Proteinase K inaktiviert. Anschließend wurde das Gemisch mit dem gleichen Volumen Rotiphenol versetzt und die DNA nach dem Chloroform/Ethanol-Verfahren (s.o.) aufgereinigt.

Daraufhin wurde die Konzentration der linearisierten DNA mithilfe eines Markers zur Konzentrationsbestimmung (High DNA MassTM Ladder, invitrogen, Groningen) bestimmt. Für die RNA-Markierung wurde 1 µg lineare Template-DNA im Standard-Ansatz eingesetzt. Die Markierung erfolgte nach einem Protokoll nach Roche Diagnostics, Mannheim. Neben der DNA bestand der Reaktionsansatz aus 2 µl 10x Transkriptions-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim), 2µl NTP-Markierungsgemisch (Dig-RNA-Labeling Mix, Roche Diagnostics, Mannheim), 2 µl Sp6- bzw. T7-RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim), 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), Invitrogen (Groningen, NL) und Membrapure-H₂O ad 20 µl.

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dem schloss sich eine DNase-Behandlung und Fällung der Dig-markierten RNA-Sonden an. Das Pellet wurde mit 100 µl Membrapure H₂O resuspendiert mit 1 µl RNase-Inhibitor versetzt. Der Erfolg der in vitro Transkription wurde durch einen Dot-Blot (s.u.) kontrolliert.

2.2.1.14.2 Dot-Blot

Zunächst wurden verschiedene Verdünnungen der RNA-Sonden angelegt. Anschließend wurde eine Nylonmembran und drei- bis viermal 3mm-Whatman Papier (Whatman, USA) auf Kammergröße zurechtgeschnitten, in 2 x SSC eingelegt und anschließend in eine Blotkammer eingespannt. Nachdem die Sondenverdünnungen aufgetragen waren, wurde die Membran luftgetrocknet und die RNA wurde anschließend beidseitig mit 1,23 kJ/cm² durch Crosslinking fixiert.

Zur Detektion der Sonde wurde die Membran zunächst zweimal je fünf Minuten mit Waschpuffer (0,5% SDS in Puffer 1 [11,61 g Maleinsäure, 8,77 g NaCl, 11 Membrapure H₂O, pH 7,5]) gewaschen. Darauf folgte die Blockierung mit 2% Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) in Puffer 1 für 30 Minuten. Der Anti-DIG-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in Blocking-Puffer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei RT für 30 Minuten.

Nach der erneuten Inkubation mit Blocking-Puffer ohne Anti-DIG-Antikörper (ebenfalls 30 Minuten bei Raumtemperatur) folgten zweimal 15 Minuten im Waschpuffer und die Äquilibration auf Puffer 3 (10 ml 1M Tris pH 9,5, 2 ml 5 M NaCl, 5 ml 1 M MgCl₂, 83 ml Membrapure-H₂O). Zum Nachweis von Sonden wurde das colorimetrische Substrat NBT/BCIP benutzt, das zu einem lila-braunen Präzipitat direkt auf der Membran führt.

2.2.1.14.3 *In situ*-Hybridisierung auf Gewebedünnschnitten

Die *in situ*-Hybridisierung ist eine Nachweismethode zur Lokalisation definierter RNA-(oder auch DNA-) Sequenzen, die mit komplementären RNA-Abschnitten auf Gewebe-schnitten unter geeigneten Bedingungen hybridisieren.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte zweimal 15 Minuten in Xylol 100% entparaffiniert. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe, bei der die Schnitte je 5 Minuten zweimal in 96% und je 5 Minuten einmal in 80%, 70% und 50%igen Ethanol gebracht wurden. Es folgten 2x 5 Minuten in Aq. dest., 10 Minuten in 0,2 M HCl zur Deproteinierung und 2 x 5 Minuten in PBS (NaCl 1,5 M = 87,6 g/l, K₂HPO₄ 22,8 g/l, KH₂PO₄ 6,8 g/l ad 1 l mit Membrapure-Wasser, pH 7,4). Danach wurden die Schnitte für 20 Minuten mit 1 – 10µg/ml Proteinase K bei 37°C im Hybridisierungs-ofen behandelt. Die Schnitte wurden nach der Enzymbehandlung wieder in PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrirte für je 5 Minuten in PBS. Zum Blockieren der positiven Ladungen im Gewebe wurden die Schnitte 30 Minuten in 0,1 M Triethanolamin (pH 8) mit 0,25% Essigsäureanhydrid inkubiert. Nach zwei erneuten Waschschrirten für je 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe je 5 Minuten in 70%, 80% und 96%igem Ethanol wieder entwässert und anschließend luftgetrocknet. Es schloss sich die Prähybridisierung mit 100 µl Prähybridmix (Formamid 50%, Tris HCl, pH 7,5 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 20 mM, t-RNA 250 µg/ml [Sigma-Aldrich, München], Denhardt's 2,5x in H₂O [Sigma-Aldrich, München], vor Gebrauch 1:1 mit 100% Formamid versetzen) pro Schnitt bei 48°C im *in situ* -Block des Thermocyclers (PTC-200, s.o.) an.

Nach der zweistündigen Prähybridisierung wurden die Lösungen mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Hybridmix wurde jeweils kurz vor Gebrauch aus verschiedenen Lösungen zusammengestellt. Die Sonde wurde entsprechend der geforderten Endkonzentration (5 bis 10 ng/ μ l) mit Wasser verdünnt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und mit dem Hybridmix gemischt.

Dieser bestand neben der Sonde aus:

- 50% Formamid
- 1x Grundmix (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, pH 8,0, 5 mg/ml t-RNA, 1 mg/ml poly-A RNA (Sigma-Aldrich, München) 10 x Denhardt's Reagenz in H₂O)
- 0,3M NaCl
- 10% Dextransulfat

Für die Hybridisierung wurden 20-30 μ l Hybridmix auf jeden Schnitt pipettiert. Anschließend wurden sie mit RNase-freien Deckgläschen (Hybrislip 22x22 mm und 22x60 mm, Sigma-Aldrich, München) eingedeckt und mit Fixogum abgedichtet. In der feuchten Kammer wurden die Gewebe zunächst für 30 bis 60 Minuten auf 80°C erhitzt. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 45 bis 48°C statt.

Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen zunächst vorsichtig abgenommen. und in einer Küvette für 30 Minuten in 2x SSC und 1 h in 1x SSC mit 50% Formamid bei jeweils 53°C im Hybridisierungssofen gewaschen. Die weiteren Waschschriffe erfolgten bei Raumtemperatur. Nach zwei Waschschriffen für 10 Minuten in 0,5x SSC und 10 Minuten in 0,2x SSC folgte ein Waschschriff für 15 Minuten in 0,1x SSC. Schließlich wurden die Schnitte für 10 Minuten in Maleinsäurepuffer (0,1M Maleinsäure, pH 7,5, 0,15M NaCl) gewaschen und anschließend in Puffer II (1,0% (w/v) Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim), 0,5% (w/v) BSA) für die folgende Inkubation äquibriert. Für die Antikörperreaktion wurden je Schnitt 30 μ l des Anti-DIG-AP in einer 1:500 Verdünnung in Puffer II verwendet. Die Reaktion fand über Nacht bei 4°C statt.

Am dritten Tag erfolgte die Detektion. Zunächst wurde unspezifisch gebundener und noch in der Lösung vorhandener Antikörper durch zweimalige Inkubation in Puffer I für je 15 Minuten abgewaschen.

Nachdem sich das Gewebe für 2 Minuten in der Küvette in Puffer III (1:1 Gemisch aus Puffer IIIa [400 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 9,5] und Puffer 3b [200 mM MgCl₂] befunden hatte, wurde jeder Schnitt mit 100 µl Entwicklungspuffer (10 ml Puffer III, 5 mg Levamisol [Sigma-Aldrich, München], 50 µl NBT, 37,5 µl BCIP [beide Roche Diagnostics, Mannheim], in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten bis zu 6 h waren Reaktionen feststellbar. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Objektträger in Membrapure H₂O gespült und eingedeckt.

2.2.1.15 Klonierung der Gesamt-PMCA

In dieser Arbeit sollten die Gesamtsequenzen der PMCA-Isoformen 1 und 4 in einer PCR vervielfältigt und über den TOPO XL Vektor schließlich in den Expressionsvektor pET21a einkloniert werden. Ziel war zum einen die Durchsequenzierung der Isoformen 1 und 4 sowie einiger Spleißvarianten dieser beiden Isoformen, da die Gesamtsequenzen der PMCA des Bullen derzeit allenfalls partiell bekannt sind. Zum anderen sollte die in den Expressionsvektor pET21a einklonierte Gesamt-PMCA mit Hilfe einer Kooperation mit Dr. Christian Klammt (Structural Biology Laboratory, The Salk Institute, 10010 North Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA) zellfrei exprimiert werden. (Klammt, Lohr et al. 2004; Klammt, Schwarz et al. 2006; Klammt, Schwarz et al. 2007). Zunächst wurde die DNA aus dem Nebenhodenschwanz und dem Gehirn des Bullen eingesetzt, um die PMCA-Sequenzen der Isoformen 1 und 4 in einer PCR (s. 2.2.1.6) zu vervielfältigen. Der einzige Unterschied zum oben geschilderten Procedere bestand in der Verwendung der Accu Prime Polymerase (Invitrogen, Groningen). Die PCR-Produkte mit einer Größe von etwa 3600 bp wurden analog zu 2.2.1.9 in den TOPO XL – Vektor (TOPO® XL PCR Cloning Kit, Invitrogen) einkloniert und in chemisch kompetente E.coli (XL Gold) transformiert. Nach Vermehrung und Minipräp (s. oben) wurde das Insert durch EcoRI herausgeschnitten und durch ein Agarosegel verifiziert. Die Gesamtsequenz wurde in mehreren Schritten durch die Firma MWG (s. oben) bestimmt.

Im Anschluss daran erfolgte das Herausschneiden des Inserts durch die Restriktionsenzyme HindIII und SacI.

Dazu wurden 3 µg DNA, 3 µl One-Phor-All Puffer und 10 bis 20 U Enzym ad 30 µl H₂O zusammengefügt und in zwei Schritten für jeweils 2 Stunden verdaut. Das gleiche Prozedere wurde mit dem pET21a Vektor durchgeführt. Beides wurde schließlich auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die Banden eluiert (s. 2.2.1.8). Das Insert wurde nun durch eine T4 DNA-Ligase (Invitrogen) in den aufgeschnittenen pET21a-Vektor kloniert. Dazu wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis 3:1 eingesetzt, in diesem Fall 75ng Insert und 25ng Vektor. Nach Zugabe von 0,1 U Ligase und 4 µl Ligase-Puffer wurde mit H₂O auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt und über Nacht bei 15°C ligiert. Das Konstrukt wurde anschließend in XL-Gold Zellen transformiert und die DNA schließlich durch Minipräp isoliert (s. 2.2.1.10 und 2.2.1.11).

2.2.1.16 Mutagenese

Von der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Leitung Prof. Dr. C. Kirchhoff, damals Insitut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, Hamburg, heute Institut für Molekulare Andrologie der Universitätsklinik Hamburg) wurde ein Konstrukt zur Verfügung gestellt, das der rekombinanten Expression von PDC-109 im Insektenzellsystem dienen sollte (Abb. 2.4). Gleichzeitig wurde es als Template für Mutationen eingesetzt, die die für die π -kationische Interaktion zentralen Tryptophane verändern sollte.

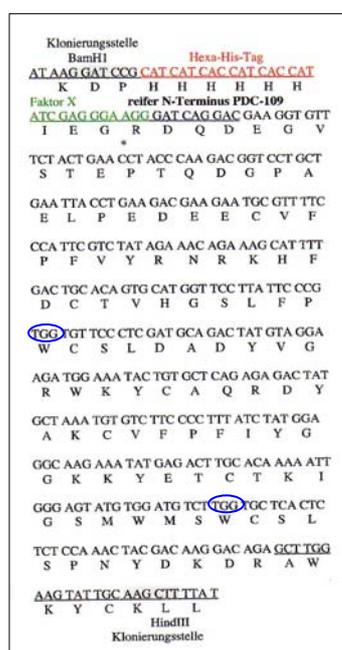


Abb. 2.4

PDC-109 Konstrukt zur rekombinanten Expression im Insektenzellsystem (Vektor: pMelBac B). Flankiert wird die Sequenz von den BamHI- und HindIII – Schnittstellen. Unterstrichen sind die Primersequenzen. Rot: Hexa-His Tag, Grün: Faktor X, * Faktor Xa – Schnittstelle im exprimierten Protein, Blau umrahmt: Die beiden mutierten Tryptophane an Position 47 und 93

Die Sequenz des Konstrukts ist von einer BamH1 und einer HindIII-Schnittstelle eingerahmt. Vor dem N-terminalen Bereich des PDC-109 sitzt eine Faktor Xa-Schnittstelle, die dazu dienen sollte, den Hexa-Histidin-Tag entfernen zu können. Dieser wurde zur verbesserten Aufreinigung eingefügt.

Für die Mutation wurde das „QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene eingesetzt. Die Reaktion bestand aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe der Mutationsprimer die mutierte DNA synthetisiert. Der Ansatz bestand aus 5 µl 10x Reaktionspuffer, 30 ng Template DNA, je 1,25 µl Primer (100ng/µl), 1 µl dNTP's, 1 µl Pfu Polymerase (2,5U/µl) und H₂O ad 50µl. Das Gemisch wurde bei 98°C denaturiert und dann 16 Reaktionszyklen (95°C für 30 Sek, 55°C für 1 Minute und 68°C für 5 Minuten) unterzogen. Anschließend wurde die DNA durch das Enzym Dpn I verdaut. Die Zielsequenz von Dpn I (5'-Gm6ATC-3') ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA. Da aus E.coli isolierte DNA – also auch die hier eingesetzte Template DNA – methyliert ist, wird sie durch Dpn I verdaut. Im Gegensatz dazu ist die in der Reaktion entstandene mutierte DNA nicht methyliert und wird daher auch nicht verdaut. Der Dpn I – Verdau wurde nach Zugabe von 1 µl Dpn I zum Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei 37°C durchgeführt (Abb.2.5).

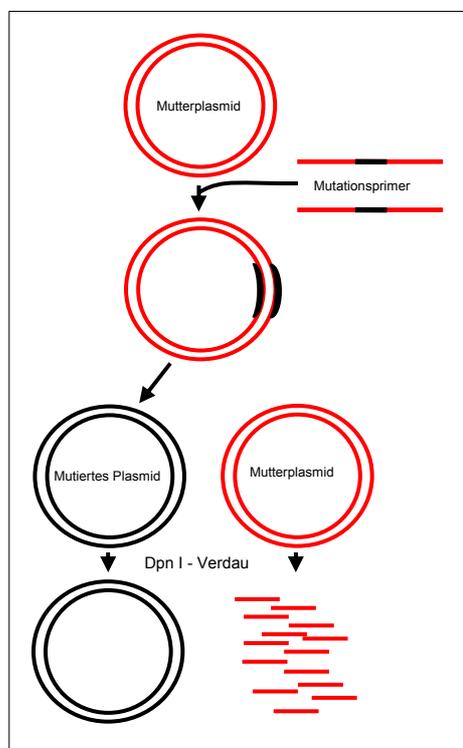


Abb. 2.5

Schematische Darstellung der in vitro Mutation mit Hilfe der Mutationsprimer.

Erläuterung s. Text

1µl der Dpn I – behandelten DNA wurde anschließend zu 50µl XL1-Blue superkompetenten E.coli gefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 45 Sekunden lang bei 42°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden 500 µl NZY⁺-Medium hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 225rpm inkubiert. Es folgte die Ausplattierung auf IPTG/X-gal – Platten (s.o.). Es wurden weisse Klone gepickt und vermehrt. Die durch Minipräp gewonnene DNA wurde durch zwei hintereinandergeschaltete Restriktionsverdau mit HindIII und BamHI herausgeschnitten. Die Mutation wurde durch Sequenzierung (MWG-Biotech, Ebersbach) verifiziert.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Quantifizierung von Proteinen

Die photometrische Bestimmung von Proteinen erfolgte nach der in unserem Labor etablierten Methode nach Bradford (Bradford 1976). Die eingesetzten Proteinproben wurden aus den Organen resp. Spermien des Bullen isoliert (Parrish, Susko-Parrish et al. 1988).

2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-Page werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst in einem Gel mit niedriger Acrylamidkonzentration gesammelt und dann im Trenngel aufgetrennt (Wilhelm, Keppler et al. 1998).

Vor dem Auftragen auf ein 10%-iges Peptid-Gel wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt (4 ml Aqua dest., 1 ml Lsg. IV, 1g Glycerin, 1,6 ml Lsg. V, 0,64g Dithioerytriol und 0,2 ml Bromphenolblau [0,05%]) und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Zusätzlich wurde ein Marker (Peqlab, München) aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 45 bis 60 Minuten bei konstanten 200 V. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt oder für den Western-Blot weiterverwendet.

Oberes Protokoll wurde für den PDC-109-Nachweis eingesetzt. Für SDS-Page und Western-Blot zum Nachweis der PMCA wurde ein alternatives Protokoll nach Filoteo eingesetzt. Ein wichtiger Unterschied bestand darin, dass die Proben nicht erhitzt wurden, sondern für mindestens 15 Minuten bei RT in

modifiziertem Laemmli's Puffer, der 125mg/ml Harnstoff und 100 μ M DTT enthielt, inkubiert. Die Proben wurden anschliessend in einem 7,5%-igen Fertiggel (Invitrogen oder Biorad) aufgetrennt.

2.3.3 Western Blot

Im Western-Blot werden die Proteine oder Zellysate nach der Elektrophorese mittels Elektroblothing bei 140 mA für 90 Minuten auf eine Nitrocellulose-Transferrmembran (ECL Nitrozellulose-Membran, Amersham Biosciences, Freiburg, heute GE Healthcare) transferiert. Die im Folgenden beschriebenen Schritte dienen dem Nachweis des PDC-109 auf der Membran. Dafür wurden zuerst über 2 Stunden unspezifische Bindungen mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Becton Dickinson) in PBS bei RT auf dem Schüttler blockiert. Dann erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem Erstantikörper in 5% Magermilchpulver. Anti-PDC-109 wurde in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt. Nichtgebundener Antikörper wurde mit PBS entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einem Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:5000 inkubiert (Kaninchen, Anti-IgG, Amersham, heute GE Healthcare). Danach wurde die Membran mit ECL Detection Reagenz (1:1 Reagenz 1 und Reagenz 2) für 60 Sekunden behandelt. Danach wurde die Membran mit Haushaltsfolie abgedeckt. In einer Expositionskammer wurde die Membran auf Kodak Biomax Filmen für 1-15 Minuten exponiert.

Das Blotting der PMCA-Proben wurde folgendermassen durchgeführt: Die Proteine im Gel wurden auf eine 0,2 μ m dicke PVDF Membran geblottet (PeqLab). Die Transferlösung enthielt 0,7 Mol Glycin und 25 mM Tris (pH-Anpassung nicht notwendig). Nach dem 35 bis 45 –minütigen Transfer wurde die Membran für 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 Stunde bei RT in 10% Magermilch in PBS blockiert (alternativ bei 4°C über Nacht). Daran anschliessend wurde die Membran für 1 Stunde mit dem Primärantikörper (in PBS mit 1mg/ml BSA) in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Danach wurde 2 mal 5 Minuten in PBS plus 0,05% TWEEN-20 gewaschen.

Nach einem weiteren Waschschrift in Aqua dest. fand die Inkubation mit dem Zweitantikörper statt. Dieser Anti-Maus resp. Anti-Kaninchen Antikörper wurde in einer 1:4000-Verdünnung in PBS für 30 Minuten angewendet. Zur Detektion wurde die DAB-Lösung verwendet (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich, München D-5905). Eine Tablette wurde eine halbe Stunde vor Detektion in 30 ml PBS aufgelöst. Kurz vor Gebrauch wurden 35 µl 8% Nickelsulfat und 35 µl 30% H₂O₂ zugefügt. Die Membran wurde für etwa 5 bis 15 Sekunden mit der Detektionslösung inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit deionisiertem Wasser gewaschen.

2.3.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde als Peroxidase-Antiperoxidase-Reaktion (PAP) nach Sternberger durchgeführt (Sternberger, Hardy et al. 1970). Die Paraffinschnitte wurden über Xylol I-III entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert. 3x Isopropanol, 2x 96% Ethanol, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol je 5 Minuten, Aqua dest. 5 Minuten. Anschließend wurden die im Gewebe befindlichen Peroxidasen durch Einlegen in 3% H₂O₂ in PBS für 30 Minuten bei RT inaktiviert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte mit unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers über Nacht bei 4 – 6°C inkubiert. Dabei wurden die beiden monoklonalen PMCA-Antikörper (5F10 und JA9) in einer 1:2000- Verdünnung und der PMCA4-Antikörper in einer 1:500- Verdünnung eingesetzt. Am Folgetag wurden die Schnitte mit gekoppeltem Zweitantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem PAP-Antikörper für 10 Minuten bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in eine DAB-haltige Lösung getaucht (35mg DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, 100 ml Na-Acetatpuffer, 50 µl H₂O₂). Durch die Peroxidase bildet sich bei Vorhandensein von DAB und Wasserstoffperoxid ein brauner Farbstoff (Graham and Karnovsky 1966). Zur besseren Färbung wurde das Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse verwendet (DAKO Deutschland, Hamburg).

2.3.5 Herstellung eines Antikörpers gegen die PMCA4-Spleißvariante a

Um die Spleißvariante PMCA4a des Bullen nachweisen zu können, wurde ein Antikörper gegen ein Peptid aus der Spleißregion C hergestellt. Der Selektions- und Antikörperproduktionsprozeß wurde von der Firma Corin System in Gernsheim durchgeführt. Das Peptid wurde anhand der höchsten Antigenitätswahrscheinlichkeit über Datenbank-Screening und eine Homologie-Suche ermittelt. Darauf aufbauend wurde ein Antigenitätsindex bestimmt. Das zusätzliche Peptid der Spleißvariante a im Vergleich zur PMCA4b hat folgende Aminosäuresequenz:

NH₂-DVINTFQTGASFKGV LKRQTMGQHLDVKHVPSSSYVTVAPVKSPPT
TSVAAAVSSPTLG-CONH₂

Die ausgewählte Peptidsequenz lautet: NH₂-C-GQHLDVKHVPSSSYV-CONH₂.

Die Peptidsynthese erfolgte laut Angaben des Herstellers nach der Festphasenmethode und der Fmoc-Strategie unter Einsatz moderner Syntheseautomaten. Anschließend fand eine Kopplung an Trägerproteine statt. Über verschiedene funktionelle Gruppen (Carboxyl-, Amino-, Sulfhydryl-, Phenol-, Guanidin-, Imidazol-, Indol-, Thioether-Gruppen) wurde das Peptid an KHL als Carrier gebunden. Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern wurden zwei Kaninchen immunisiert (s. Tab. 2.4). Anschliessend wurden mit einem Festphasen-Enzymimmunoassay alle Antipeptid-Antikörper auf ihre Immunreaktion getestet (ELISA). Schließlich wurde das Serum über Sepharose-Säulen, die mit dem korrespondierenden Peptid beladen sind, gereinigt. Die immungereinigten Antikörper wurden über ELISA erneut auf ihre Immunreaktion getestet. Nach Erhalt wurde der neue PMCA4a-spezifische polyklonale Antikörper in der Immunhistochemie und dem Western Blot eingesetzt.

Tab. 2.4 Protokoll der Antikörpersynthese gegen die Spleißvariante PMCA 4a des Bullen

Datum	Tag	Protokoll
15.09.2005	D0	<p style="text-align: center;">Präimmun-Blutabnahme (4 - 5 ml)</p> <p style="text-align: center;">1. Injektion (1 ml)</p> <p style="text-align: center;">Ansatz für 2 Kaninchen:</p> <p style="text-align: center;">1 ml Ag + 1 ml komplettes Freund's Adjuvans</p>
06.10.2005	D21	<p style="text-align: center;">2. Injektion (1 ml)</p> <p style="text-align: center;">Ansatz für 2 Kaninchen:</p> <p style="text-align: center;">1 ml Ag + 1 ml inkomplettes Freund's Adjuvans</p>
27.10.2005	D42	3. Injektion (1 ml/Kaninchen)
07.11.2005	D53	Blutabnahme (4 - 5 ml)
08.11.2005	D54	Versand der Seren D0 und D53
17.11.2005	D63	4. Injektion (1 ml/Kaninchen)
28.11.2005	D74	Blutabnahme (12 - 15 ml)
29.11.2005	D75	Versand der Seren D74
12.12.2005	D88	LETZTE BLUTENTNAHME
		Immunoaffinitätsreinigung und ELISA-Titration
20.12.2005	D96	Versand des Serums D88, der gereinigten Antikörper, der beladenen Immunoaffinitätssäule und der nicht benötigten Peptide

2.3.6 Calcium-ATPase Assay zum Nachweis der PMCA-Aktivität

Im Labor von Prof. Strehler in Rochester, USA, wurde ein dort etablierter Ca-ATPase Assay durchgeführt. Bei diesem photometrischen Test wird auf indirektem Weg die Bildung freien Phosphats gemessen. Das in der Reaktion gebildete Phosphat reagiert mit 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurinribosid (MESG) und wird anschließend durch eine Purin-Nucleosidphosphorylase (PNP) zu 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin und Ribose 1-phosphat metabolisiert (Abb. 2.6). Die Konzentration des 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin wird bei 360nm photometrisch bestimmt. Zur Durchführung dieses Assays wurde zunächst eine 4-fach konzentrierte Salzlösung hergestellt. Diese bestand aus 480 mM KCl, 120 mM Tes-TEA (pH7,2 bei 25°C), 20 mM MgCl₂, 0,8 mM EGTA, 20 mM NaN₃ und 2 mM Ouabain, einem Inhibitor der Na/K-ATPase. 500 ml dieser 4-fach konzentrierten Salzlösung wurden mit 4 µl 20 µM Thapsigargin, 2 µl Oligomycin (5 mg/ml) und 494 µl H₂O zu einer zweifach konzentrierten Lösung verdünnt. Thapsigargin ist ein bekannter Inhibitor der ATPase des Endoplasmatischen Retikulums, Oligomycin ein Hemmstoff der ATP-Synthase.

250 μl der 2-fach Lösung wurden im Test eingesetzt. Ausserdem wurden 100 μl MESG, 20,8 μl 60 mM ATP, 5 μl PNP, eine variierende Menge der Membranpräparationen und H_2O bidest. eingesetzt. Dieses Gemisch wurde für 2 Minuten stabilisiert und anschließend die Magnesium-abhängige Aktivität für 4 bis 6 Minuten gemessen. Dann wurden 10,55 μl CaCl_2 zugesetzt, dies entsprach 10 μM Calcium im Ansatz. Nach weiteren 2 Minuten, die der Calcium-abhängigen Aktivierung der ATPase entsprachen, wurden dann aufsteigende Mengen PDC-109 eingesetzt. Der Assay wurde mit oder ohne den Zusatz von Calmodulin durchgeführt. Bei Anwesenheit von Calmodulin wurden 10 μl 0,25 mg/ml Calmodulin zugegeben, was einer Endkonzentration von 300 nM entsprach. Die Messwerte wurden statistisch mithilfe des Programms Graphpad Prism ausgewertet.

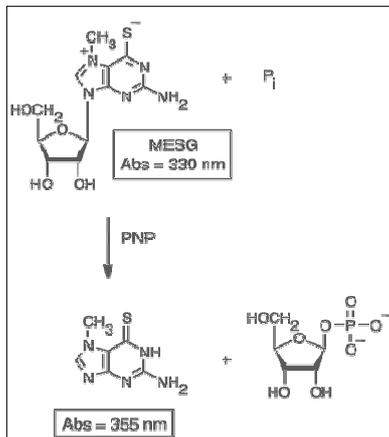


Abb. 2.6
Grundlage des Ca-ATPase Assays, die Entstehung des 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin durch PNP

2.4 Insektenzellkultur

2.4.1 Das Baculovirus-Expressionsystem

Das Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) wurde Ende der 1970'er Jahre entwickelt (Summers and Smith 1978; Smith, Summers et al. 1983). Beim BEVS werden Insektenzellen durch ein rekombinantes, insektenpathogenes Baculovirus infiziert und das rekombinante Virus inklusive des interessierenden Fremdproteins exprimiert. Baculoviren sind insektenpathogene Viren, die zu den Kernpolyhedrosis-Viren gehören. Am häufigsten wird das lytische Doppelstrang-DNA-Virus *Autographa californica* Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus (AcMNPV, auch Wildtyp genannt) verwendet. Ein entscheidender Vorteil des BEVS gegenüber prokaryontischen Expressionssystemen besteht vor allem darin,

dass Insektenzellen in der Lage sind, die Proteine korrekt zu prozessieren (proteolytische Spaltung), zu modifizieren (Phosphorylierung, Acylierung), zu assemblieren (Oligomerisierung) und zu lokalisieren (Miyamoto, Smith et al. 1985). Die Glycosylierung weicht jedoch von der in Vertebratenzellen ab. Zwar wurden *N*- und *O*-Glykosylierung nachgewiesen, doch werden kaum komplexe *N*-Glykane gebildet (Wagner, Liedtke et al. 1996), sondern vorwiegend Zuckerstrukturen vom High-Mannose-Typ (Kuroda, Geyer et al. 1990). Außerdem können große Mengen des heterolog exprimierten Proteins gewonnen werden, da die Expression der Fremd-DNA unter Kontrolle eines starken Promotors steht (bis zu 1mg pro $1-2 \times 10^6$ infizierte Zellen).

Zur Herstellung eines rekombinanten Virus muss das entsprechende Gen zunächst in einen Transfektor mit Polyhedrin-Promotor kloniert werden. Der rekombinante Vektor mit dem entsprechenden Fremdgen, dessen 5' und 3'-Region von viruspezifischen Sequenzen flankiert wird, wird mit der Virus-DNA in Insektenzellen transfiziert. Dort wird das Fremdgen durch homologe Rekombination in die DNA des Wildtyps integriert (Abb. 2.7). Unter der Kontrolle des Polyhedrin Promotors wird das Fremdgen anschließend transkribiert. Wesentlich verbessert wird die Ausbeute an Protein durch Linearisierung der viralen Wildtyp-DNA.

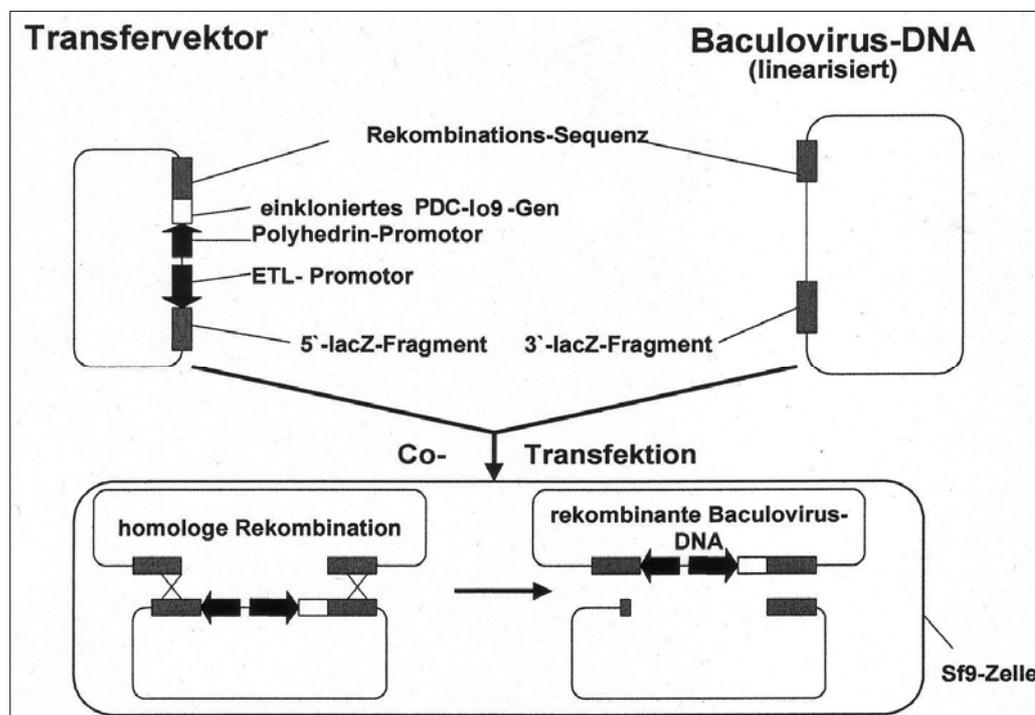


Abb. 2.7
Co-Transfektion von linearisierter viraler DNA und Fremd-DNA im Transfektor. (mod. nach Invitrogen, Bac-N-Blue™ Transfection and Expression Guide)

Der Transfervektor pMelBac mit dem PDC-109-Gen (s. u.) wurde vom Institut für Molekulare Andrologie der Univeritätsklinik Hamburg-Eppendorf, Prof. Dr. Christiane Kirchhoff zur Verfügung gestellt.

Für die Verwendung des BEVS ist die Kultivierung von Insektenzellen als Wirtszellen Voraussetzung. Gebräuchlich sind dabei Zellkulturen der Spezies *Spodoptera frugiperda* (Sf) und *Trichoplusia ni*.

2.4.2 Kultur von Lepidopterenzelllinien Sf9, Sf21 und High Five™

Für die Expression von rekombinantem PDC-109 wurden Sf9-, Sf21- und High Five™ – Zellen verwendet (Invitrogen). Es stellte sich bald heraus, dass die Sf9-Zellen aufgrund ihres sehr regelmäßigen Wachstums besonders zur Herstellung eines High Titer geeignet waren (s.u.). Die High-Five™- Zellen wurden für die anschließende Expression des rekombinanten PDC-109 verwendet.

Sf9- und Sf21- Zellen stammen von dem Wurm *Spodoptera frugiperda* ab (Vaughn, Goodwin et al. 1977). Dabei ist die Sf9-Zelle ein Klon der Sf21-Zellen. Die Sf9-Zellen fallen durch ihre sehr regelmäßige Formation eines Monolayers auf, im Mikroskop haben sie ein kopfsteinpflasterartiges Aussehen. Die High-Five™- Zellen wurden aus der Raupe *Trichoplusia ni* isoliert (Davis, Trotter et al. 1992; Wickham and Nemerow 1993). Sie zeichnen sich durch eine sehr kurze Verdopplungszeit, irreguläre Monolayer und eine sehr hohe Expressionsrate für sezernierte Proteine aus (Davis, Trotter et al. 1992) (Tab. 2.5).

Zellen	Verdopplungszeit	Aussehen	Medium
Sf9	72h	kugelförmig, sehr regulär in ihrer Größe. Haften fest an Oberflächen	TNM-FH komplett
Sf21	24h	kugelförmig, unterschiedliche Größe. Haften fest an Oberflächen	TNM-FH komplett
High Five™	18h	kugelförmig, unterschiedliche Größe. Haften lose an Oberflächen	Express Five® SFM

Die Zellkultur wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Die Sf9- und Sf21- Zellen wurden in Grace Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 10µg/ml Gentamicin (hier TNM-FH genannt, Trichoplusia ni Medium-Formulation Hink) bei 27°C inkubiert.

Die High Five™-Zellen wurden in Express Five®-Medium (plus 45 ml 200 mM L-Glutamin/500 ml Medium) ohne Zusatz von FKS kultiviert. Nach spätestens 30 Passagen wurde die Kultur abgebrochen und frische Zellen angezogen.

2.4.3 Primäre Transfektion mit dem pMelBac B – Vektorkonstrukt und linearisierter Baculovirus-DNA

Für die Transfektion wurde das Bac-N-Blue™ Transfection Kit (Invitrogen) verwendet. Voraussetzung für die Transfektion waren in der log-Phase befindliche Sf9-Zellen ($1,6 - 2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). 2×10^6 Sf9-Zellen wurden in einer 60 mm Petrischale in komplettem TNM-FH-Medium aufgenommen und durch vorsichtiges Schwenken gleichmässig verteilt. Danach ruhten die Zellen für 15 Minuten, um ein Anheften an die Platten zu ermöglichen. Die Sf9-Zellen wurden anschließend mit dem PDC-109-pMelBac B – Konstrukt und der linearisierten Bac-N-Blue™ DNA (Invitrogen) kotransfiziert. Dazu wurde der folgende Transfektionsmix angesetzt:

Rekombinantes Transferplasmid (1µg/µl)	4µl
Grace's Insect Medium (ohne Zusätze und FKS)	1µl
Cellfectin Reagenz (Liposomen-Mixtur)	20µl

Der Ansatz wurde vorsichtig für 10 Sek gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen zweimal mit zusatzfreiem Grace's Medium gewaschen, ohne den Monolayer zu zerstören. Anschließend wurde das Medium erneut abpipettiert und der gesamte Transfektionsmix auf die Zellen gegeben. Die 60 mm Petrischalen wurden nun unter seitlichem Schwenken für 4 Stunden bei RT inkubiert. Daran anschliessend wurde 1 ml TNM-FH – Medium zugefügt, die Petrischalen mitsamt einem feuchten Papiertuch in Plastikfolien eingeschweißt und bei 27°C für 72 Stunden inkubiert.

War die Transfektion erfolgreich, so befinden sich nach 72 h geknospte Virionen im Überstand. Dieser wurde geerntet und in 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden nicht verworfen, sondern mit 3 ml TNM-FH versehen und für weitere 48h inkubiert. Sie wurden mit Hilfe eines Inversionsmikroskops (250 – 400-fache Vergrößerung) auf Anzeichen der erfolgreichen Transfektion untersucht.

Dazu zählen

- Zunahme des Zelldurchmessers um mehr 25%
- Verschiebung der Kern-Plasma-Reaktion zugunsten des Kerns
- Aussetzen der Zellteilung
- Granuliertes Aussehen
- Auftreten lichtbrechender Okklusionskörper im Karyoplasma
- Ablösen vom Boden der Petrischale
- Lyse

Nach erfolgreicher Transfektion wurde das rekombinante Baculovirus durch einen Plaque Assay isoliert.

2.4.4 Plaque Assay

Im geernteten Überstand befinden sich bis zu 90% rekombinante Viren. Um diese von Wildtyp-Viren und nicht homologen Rekombinanten zu isolieren, wurde der Plaque Assay durchgeführt.

Dazu wurden 5×10^6 in der log-Phase befindliche Sf9-Zellen in 100 mm Petrischalen ausgesät. Insgesamt sollten die Zellen zu 50 bis 70% konfluent sein. Anschließend wurden 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} -Verdünnungen der Virionen hergestellt. 3 ml des Mediums wurden von den 100 mm Platten abgezogen und durch 1 ml der Virus-Verdünnung ersetzt. Insgesamt wurden drei Platten pro Verdünnungsstufe angelegt. Unter vorsichtigem Seit-zu-Seit-Schütteln wurden die Zellen für 1 Stunde bei RT inkubiert. Während dieser Stunde wurde der Agarose/Medium-Mix angesetzt. Dieser bestand aus folgenden Komponenten:

- 25 ml Grace Insect Medium (+ 2×FKS)
- 12,5 ml H₂O
- 12,5 ml 4% Baculovirus-Agarose (low melting)
- 150 µl einer 50 mg/ml X-Gal-Lösung (in DMF)

Der Mix wurde bei 47°C im Wasserbad flüssig gehalten. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit der Mixtur überschichtet, mit einem feuchten Papiertuch (5 mM EDTA) in Folie eingeschweißt und bei 27°C inkubiert. Nach 5 bis 6 Tagen wurden die rekombinanten Plaques aufgrund einer blauen Farbreaktion sichtbar. Die rekombinanten Plaques wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze ausgestanzt und in eine 12-Loch-Platte mit konfluenten Sf9-Zellen transferiert.

Die Platte wurde nun für 5 bis 7 Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Monolayer in der 12-Loch-Platte unter dem Inversionsmikroskop untersucht. Nur Überstände von Zellen, die keine Okklusionskörper gebildet hatten, wurden gesammelt (P-1-Virus Stock).

2.4.5 Herstellung eines viralen High Titer Stocks

20µl des P-1-Stocks wurden zu 2×10^6 Sf9-Zellen in 25 cm² Flaschen gegeben. Die Zellen wurden für 5 bis 10 Tage inkubiert oder bis 100 % der Zellen lysiert waren. So erhält man den P-2 Stock, der nun bereits einen hohen Titer besitzt. Dieser wurde nun verwendet, um den High Titer Stock zu generieren. Dieser wurde in mehreren 175 cm²-Flaschen generiert. Nach Lyse wurde der High Titer bei 4000 g zentrifugiert und der nun gelblich gefärbte, klare Überstand als High Titer Stock gesammelt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Abschließend wurde erneut ein Plaque Assay durchgeführt, um den Titer des High Titer Stocks in pfu/ml (pfu = plaque forming units) zu bestimmen. Anhand der im Handbuch mitgelieferten Formel kann dadurch das Volumen an Virus-Lösung errechnet werden, das zum Erreichen einer bestimmten MOI (Multiplicity Of Infection) nötig ist:

$$\frac{\text{MOI (pfu/Zelle)} \times \text{Zellzahl}}{\text{Virus-Titer (pfu/ml)}} = \text{ml Virus-Stammlösung für gewünschte MOI}$$

2.4.6 Expression des rekombinanten PDC-109 durch High FiveTM-Zellen

Bis zur Herstellung des High Titer Stocks wurden Sf9-Zellen verwendet. Für die Expression des rekombinanten Proteins wurden High FiveTM-Zellen eingesetzt. Diese Zelllinie ist der natürliche Wirt des AcMNPV (Davis, Trotter et al. 1992) und zeichnet sich durch eine 5- bis 10-fach höhere Expression von sezernierter Proteine aus verglichen mit Sf9-Zellen (Davis, Wickham et al. 1993). Zudem wachsen sie sehr gut in Serum-freiem Medium. Das Protein wurde bei einer MOI von 5 in 175 cm²-Flaschen exprimiert und die Überstände gesammelt.

2.4.7 Isolierung des rekombinant exprimierten Proteins

Das exprimierte PDC-109 wurde im Überstand erwartet. Zur Isolierung war es mit einem Hexa-His-Tag ausgestattet worden. Die Aufreinigung erfolgte über 1 ml HisTrap FF-Säulen von Amersham. Diese ist mit Ni²⁺ beladen, das mit hoher Affinität Oligo-Histidin-Peptide binden kann. Durch einen Überschuss an Imidazol können die gebundenen Proteine eluiert werden.

Zur Reinigung wurde die Säule zunächst mit 3 bis 5 Volumina Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde sie mit 5 Volumina Bindungspuffer (20mM Natriumphosphat, 0,5M NaCl, 20mM Imidazol, pH 7,4) äquilibriert. Anschließend wurde die Probe eingelassen und mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer gewaschen. Schließlich wurde das rekombinante Protein mit 5 Säulenvolumina Elutionspuffer (20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4) abgelöst. Die Probe wurde dialysiert und das rekombinante Protein durch SDS/Page und Western Blot nachgewiesen. Der Hexa-His-Tag wurde durch aktivierten Blutgerinnungsfaktor X vom Protein abgeschnitten.

3 Ergebnisse

„Das Gute für den Menschen ist die Tätigkeit der Seele aufgrund ihrer besonderen Befähigung, und wenn es mehrere solche Befähigungen gibt, nach der besten und vollkommensten; und dies außerdem noch das ganze Leben hindurch. Denn eine Schwalbe macht noch keinen Frühling, und auch nicht ein einziger Tag; so macht auch ein einziger Tag oder eine kurze Zeit niemanden glücklich oder selig.“

Aristoteles (Nikomachische Ethik)

3.1 Genexpression der PMCA in den Geschlechtsorganen des Bullen

3.1.1 Nachweis der Genexpression mittels RT-PCR

Bovine Organe

Um die Expression der unterschiedlichen PMCA-Isoformen in den Organen des Bullen zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde cDNA aus folgenden Geweben des Bullen eingesetzt: Hoden, Bläschendrüse, Caput epididymidis, Corpus epididymidis, Cauda epididymidis, Herz und Leber. Als Positivkontrolle wurde cDNA, gewonnen aus der RNA bovinen Gehirngewebes, eingesetzt.

Die Expression von PMCA1 konnte in allen analysierten bovinen Geweben nachgewiesen werden (Abb. 3.1 a). Die Expression der PMCA2 ist auf den bovinen Hoden beschränkt (Abb. 3.1 b). Eine schwache Expression von PMCA3 zeigt ausschließlich der Nebenhodenkopf (Abb.3.1 c). Die drei Banden entsprechen unterschiedlichen Spleiß-Varianten der PMCA3 (s.u.). Die Spleißvarianten betreffen den C-terminalen intrazellulären Anteil der Calcium-ATPase. In allen untersuchten bovinen Organen wird PMCA4 exprimiert (Abb. 3.1 d). Die drei vorhandenen Banden entsprechen verschiedenen Spleiß-Varianten der PMCA4. Die Spleißvarianten betreffen ebenfalls den C-terminalen Bereich der PMCA4. Zwischen Corpus epididymidis und Cauda epididymidis findet ein Switch der Spleiß-Varianten statt. So wird in Nebenhodenkopf- und körper vorwiegend die Isoform 4b generiert, während im Nebenhodenschwanz die Isoform 4a die vorwiegende Spleißvariante ist.

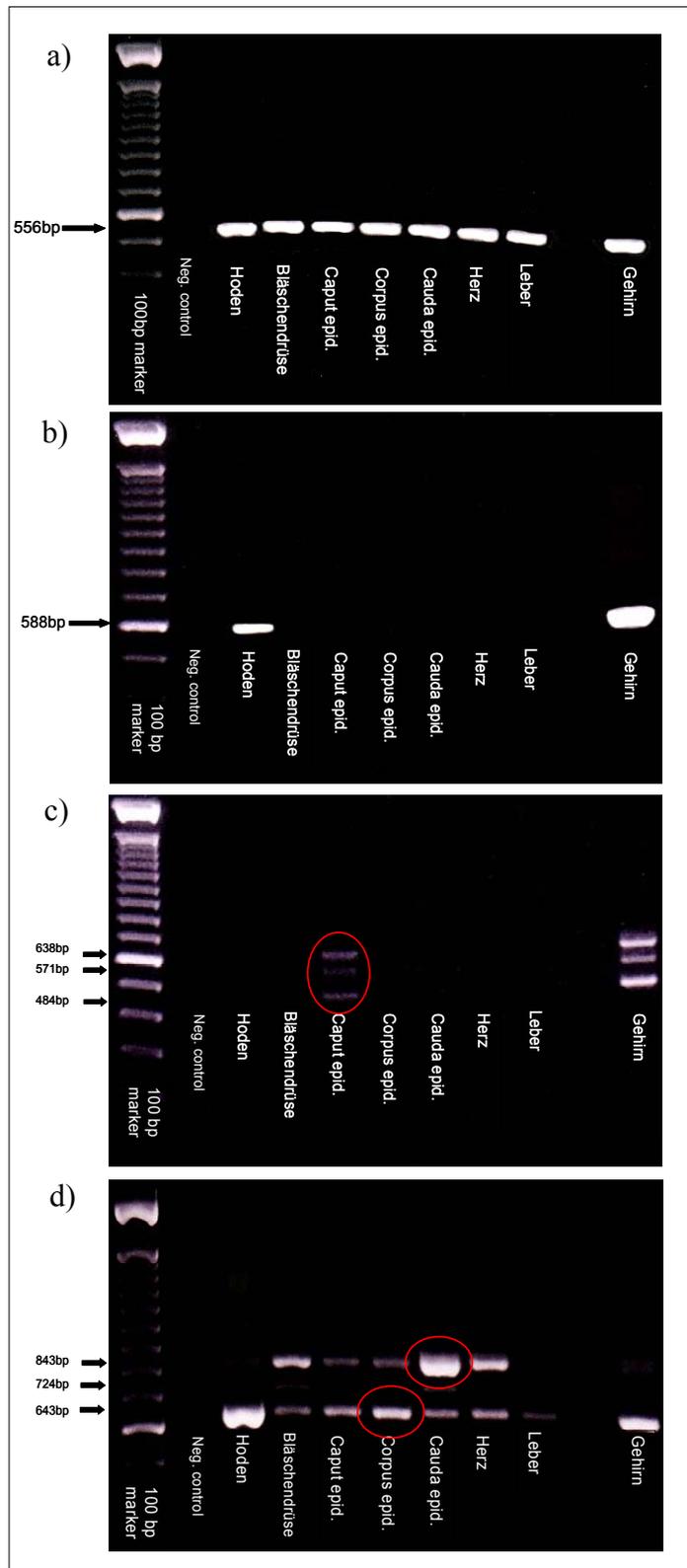


Abb. 3.1 RT-PCR der bovinen Organe. a) **PMCA1** Die PMCA Isoform 1 wird in allen untersuchten Organen exprimiert. b) **PMCA2** Neben der Positivkontrolle (Gehirn) zeigt nur das Hodengewebe eine positive Reaktion c) **PMCA3** Die PMCA3 wird ausschließlich im Nebenhodenkopf exprimiert. d) **PMCA4** Die PMCA Isoform 4 wird in allen untersuchten Organen exprimiert. Zwischen dem Körper des Nebenhodens und dem Nebenhodenschwanz findet ein Spleißvariantenwechsel von PMCA4b zu PMCA4a statt.

Die Expressionsergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst:

Tab. 3.1 Expression der PMCA-Isoformen 1 bis 4 in bovinen Organen

	Hoden	Gld. vesicalis	Caput epid.	Corpus epid.	Cauda epid.	Herz	Leber	Gehirn
PMCA1	++	++	++	++	++	++	++	++
PMCA2	+	-	-	-	-	-	-	++
PMCA3	-	-	+	-	-	-	-	+
PMCA4a	+	++	+	+	++	++	+	+
PMCA4b	++	+	+	+	+	+	+	++

Alle Fragmente wurden in den TOPO II Vektor (Invitrogen) einkloniert und durch die Firma MWG (Ebersbach) sequenziert. Ein Sequenzvergleich mit der Internet-Datenbank bestätigte, dass es sich bei allen Banden um jeweilige PMCA-Isoformen bzw. deren Spleißvarianten handelt.

Boviner Nebenhoden

Der Wechsel der Spleiß-Varianten der PMCA4 zwischen Corpus und Cauda epididymidis wurde genauer untersucht. Dazu wurde der Nebenhoden des Bullen in 19 etwa 1 bis 1,5 cm große Abschnitte zerlegt (Abb. 3.2) und die RNA aus diesen Abschnitten isoliert. Die RT-PCR wurde semiquantitativ durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden β -Aktin Primer eingesetzt (Abb.3.3).



Abb.3.2

Nebenhoden des Bullen. Die Abschnitte 1 bis 5 entsprechen dem Nebenhodenkopf, die Abschnitte 6 bis 17 dem Nebenhodenkörper und die Abschnitte 18 und 19 dem Nebenhodenschwanz. Insgesamt beträgt die Länge des bovinen Nebenhodens etwa 24cm.

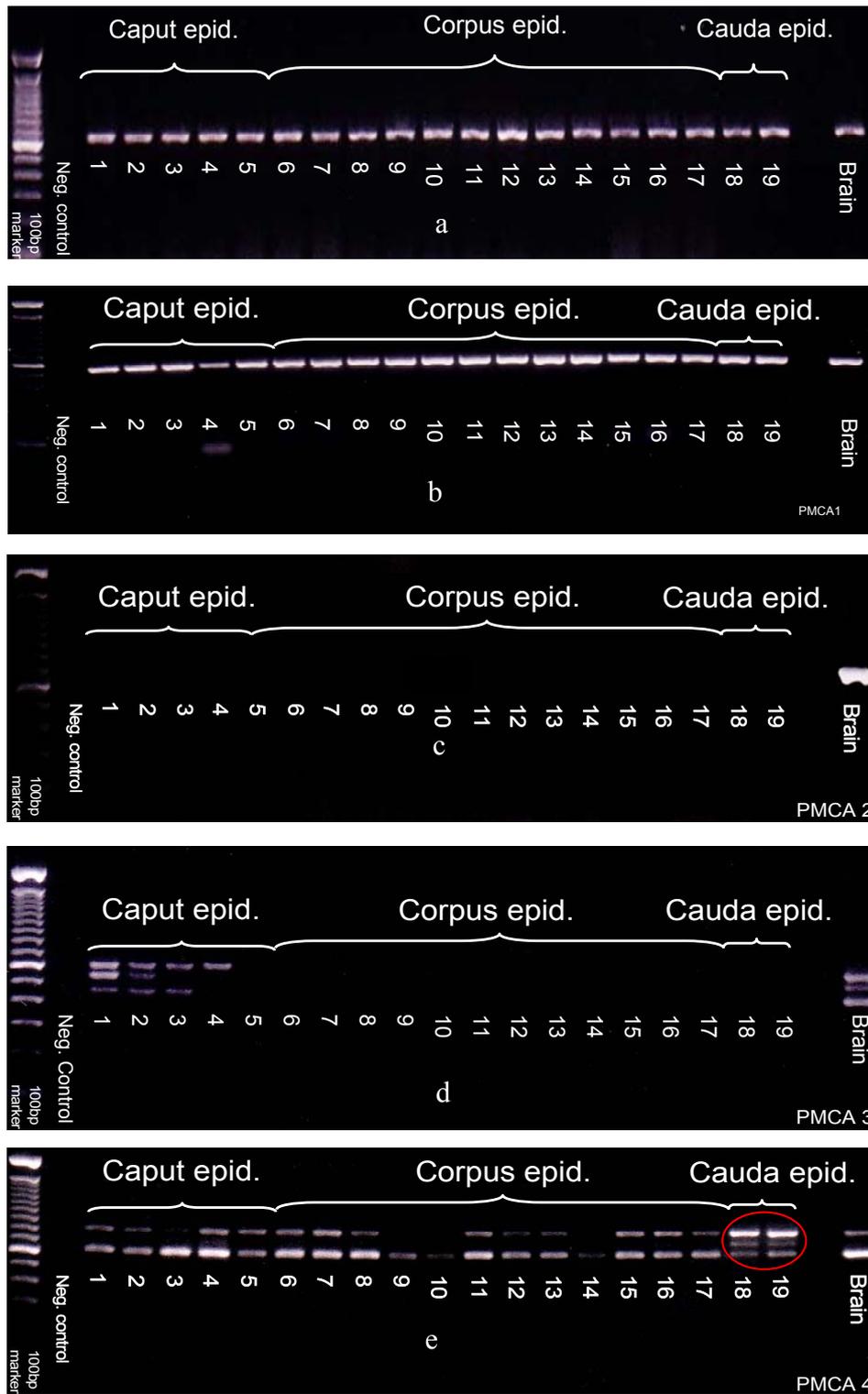


Abb.3.3

Semiquantitative PCR der PMCA-Isoformen 1 bis 4 im Nebenhoden des Bullen mittels β -Aktin

a) β -Aktin PCR b) PMCA1 wird in allen Anteilen des bovinen Nebenhodens exprimiert. c) PMCA2 wird im bovinen Nebenhoden nicht gebildet während d) PMCA3-Expression nur von Zellen des Nebenhodenkopfes exprimiert wird. e) PMCA4 wird in allen Anteilen des Nebenhodens exprimiert, allerdings findet ein Wechsel der Spleiß-Varianten zwischen Nebenhodenkopf und –schwanz statt (rote Ellipse).

Die Isoform 1 der PMCA wurde in allen Anteilen des bovinen Nebenhodens sowie in der Positivkontrolle Gehirn gleichmäßig exprimiert (Abb. 3.3 b). Eine Expression der PMCA2 wurde in den epididymalen cDNA's nicht gefunden (Abb. 3.3 c) und damit die vorherigen RT-PCR-Ergebnisse bestätigt. Die PMCA3-Expression ist auf Nebenhodenkopf beschränkt. Sowohl der Nebenhodenkörper, als auch der Nebenhodenschwanz exprimieren keine PMCA3 (Abb. 3.3 d). Die semiquantitative PCR der PMCA-Isoform 4 bestätigte das Ergebnis aus der Organ-PCR. Zwischen Fragment 17 und Fragment 18 findet ein Wechsel der Spleiß-Varianten statt, das entspricht anatomisch dem Übergang zwischen Nebenhodenkörper und Nebenhodenschwanz. Sowohl im Nebenhodenkopf als auch im Nebenhodenkörper ist die kleinere Spleiß-Variante 4b dominierend, während im Nebenhodenschwanz vor allem die größere der Spleiß-Varianten 4a gebildet wird. Auch die mittelgroße Spleiß-Variante, die in der PCR einem Fragment einer Größe von 724 bp entspricht, wird vorwiegend im Nebenhodenschwanz des Bullen gebildet (s. Abb. 3.3 e). Allerdings dürfte es sich bei dieser Bande, die durch Sequenzierung als PMCA4 cDNA identifiziert wurde, eher um ein Spleiß-Artefakt handeln.

3.1.2 Sequenzierung der PCR-Fragmente

Das PMCA1-Fragment hat eine Länge von 556bp. Die Isoform 2 der PMCA wird durch ein 588 bp großes Fragment repräsentiert. Die PMCA3 hat drei verschiedene Banden im Gel abgebildet. Diese wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und einkloniert. Insgesamt handelt es sich bei den drei Banden um unterschiedliche Spleißvarianten der PMCA3. Das kleinste der Fragmente hat eine Größe von 484 bp. Das mittlere Fragment ist 571 bp groß. Das größte Fragment schließlich hat eine Länge von 638 bp. Auch von der PMCA4 waren in einigen Geweben drei verschiedene RT-PCR – Banden im Agarosegel nachweisbar. Allerdings dürfte es sich bei der sehr schwach exprimierten mittleren Bande um ein Spleißprodukt handeln, das nicht in ein Protein übersetzt wird (Hammes, Oberdorf et al. 1994; Howard, Barley et al. 1994). Die Bedeutung dieser Variante ist vollkommen unklar.

Das kleinste Fragment der PMCA4-RT-PCR hatte eine Größe von 643 bp. Das nur schwach erkennbare mittlere Fragment war 724 bp groß. Das größte Fragment bestand aus 877 bp. Der Vergleich zeigte auch hier, dass es sich um die Isoform 4 handelte. Vergleiche der bovinen PMCA4- Sequenzen mit humanen Sequenzen ergaben, dass die kleinere Bande der Spleißvariante 4b und die größere Bande der Spleißvariante 4a entspricht.

Die Übereinstimmung mit der humanen PMCA beträgt für die bovine PMCA1 94% (ATP2B1: bp 3845 – 4388; GI:48255944), PMCA2 99% (ATP2B2: bp 4126 – 4701; GI:48255950), PMCA3 97% (ATP2B3:bp 3226 – 3695; GI:48255954) und die PMCA4 98% (ATP2B4: bp 3779 – 4409; GI:48255956).

3.1.3 Nachweis der Genexpression mittels In situ-Hybridisierung (ISH)

Boviner Hoden

PMCA 1 wird in Spermatogonien stark exprimiert. Die Expression in Spermatogenese-Zellen der folgenden Stadien und in den runden Spermatozyten ist etwas niedriger (Abb.3.4 a). Dargestellt ist jeweils auch die Negativkontrolle, die mit einer Sense-RNA-Sonde durchgeführt wurde. Auch die in den Paraffinschnitten des Hodens angeschnittenen Blutgefäßzellen und Bindegewebszellen sind positiv für PMCA 1.

PMCA 2 wird in Spermatogonien exprimiert. Auch spätere Zellen der Spermatogenese, vor allem Spermatozyten I, exprimieren PMCA 2 (Abb. 3.4 b). Die Antisense-Sonde der PMCA 3 zeigt im Hoden eine negative Reaktion (analog zur RT-PCR). PMCA 4 wird vornehmlich von Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung exprimiert. Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und Peritubulärzellen sind negativ (Abb. 3.4 c).

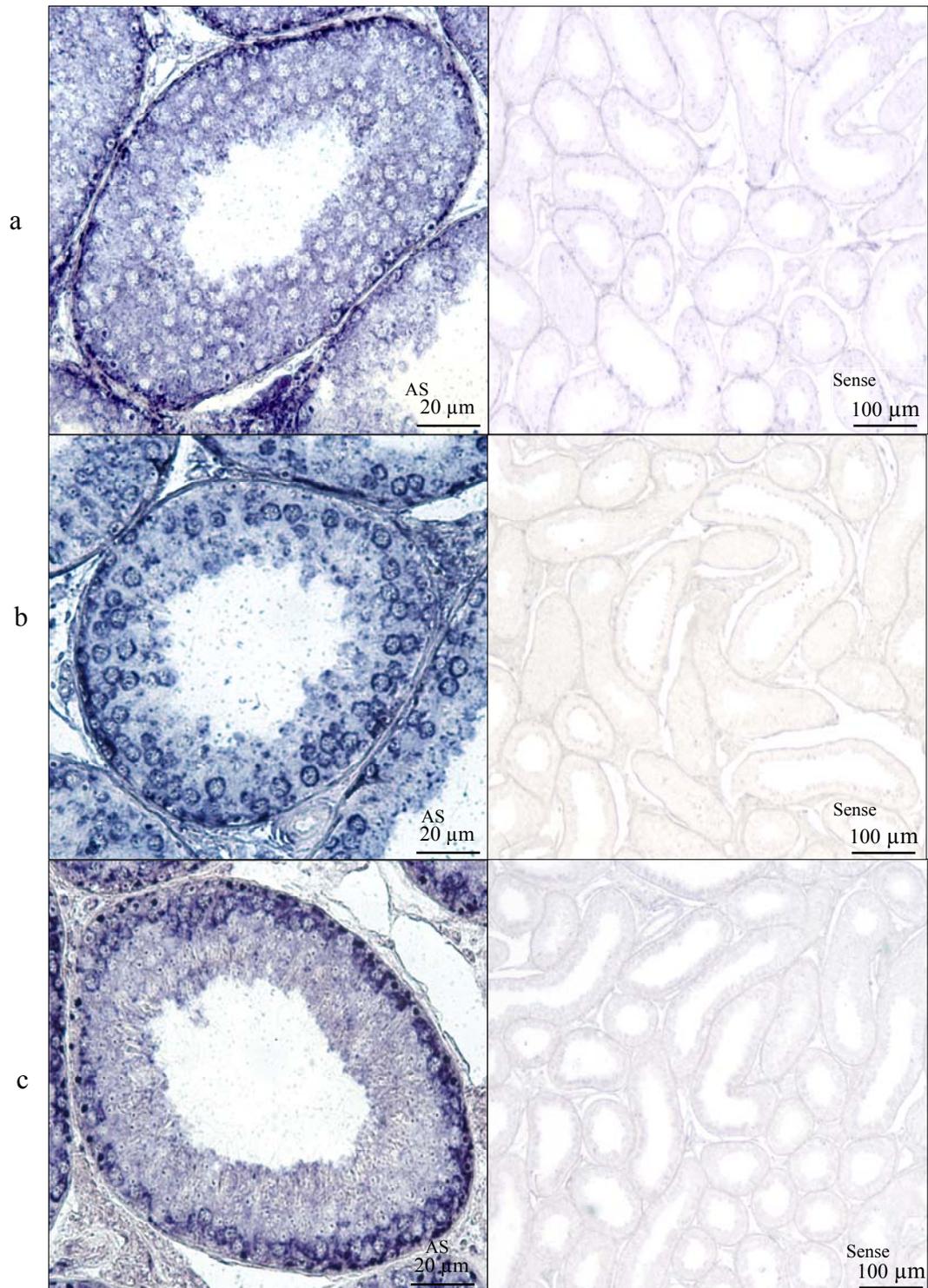


Abb.3.4 In situ-Hybridisierung der PMCA-Isoformen 1 bis 4 im bovinen Hoden
 a) Expression der PMCA1, besonders ausgeprägt in den Spermatogonien, auch spätere Spermatogenesestadien sind positiv b) PMCA2 wird vor allem von Spermatogonien und späteren Spermatogenesestadien exprimiert, c) PMCA4 wird vor allem von Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung exprimiert.
 Rechts dargestellt sind jeweils die Negativkontrollen mit den Sense-RNA Sonden
 Negativ war die PMCA3-Reaktion (nicht dargestellt)

Boviner Nebenhodenkopf

PMCA1 wird von den Tubulusepithelzellen des Nebenhodenkopfes exprimiert (Abb. 3.5 a). Auch die Blutgefäßzellen exprimieren PMCA 1 (nicht gezeigt). Die PMCA 2-Sonde war im Nebenhodenkopf negativ. Die PMCA3-Expression ist auf die Tubuli des Nebenhodenkopfes beschränkt (Abb. 3.5 b). PMCA4 wird vorwiegend in den basalen Zellen der Tubuli des Nebenhodenkopfes exprimiert (Abb. 3.5 c).

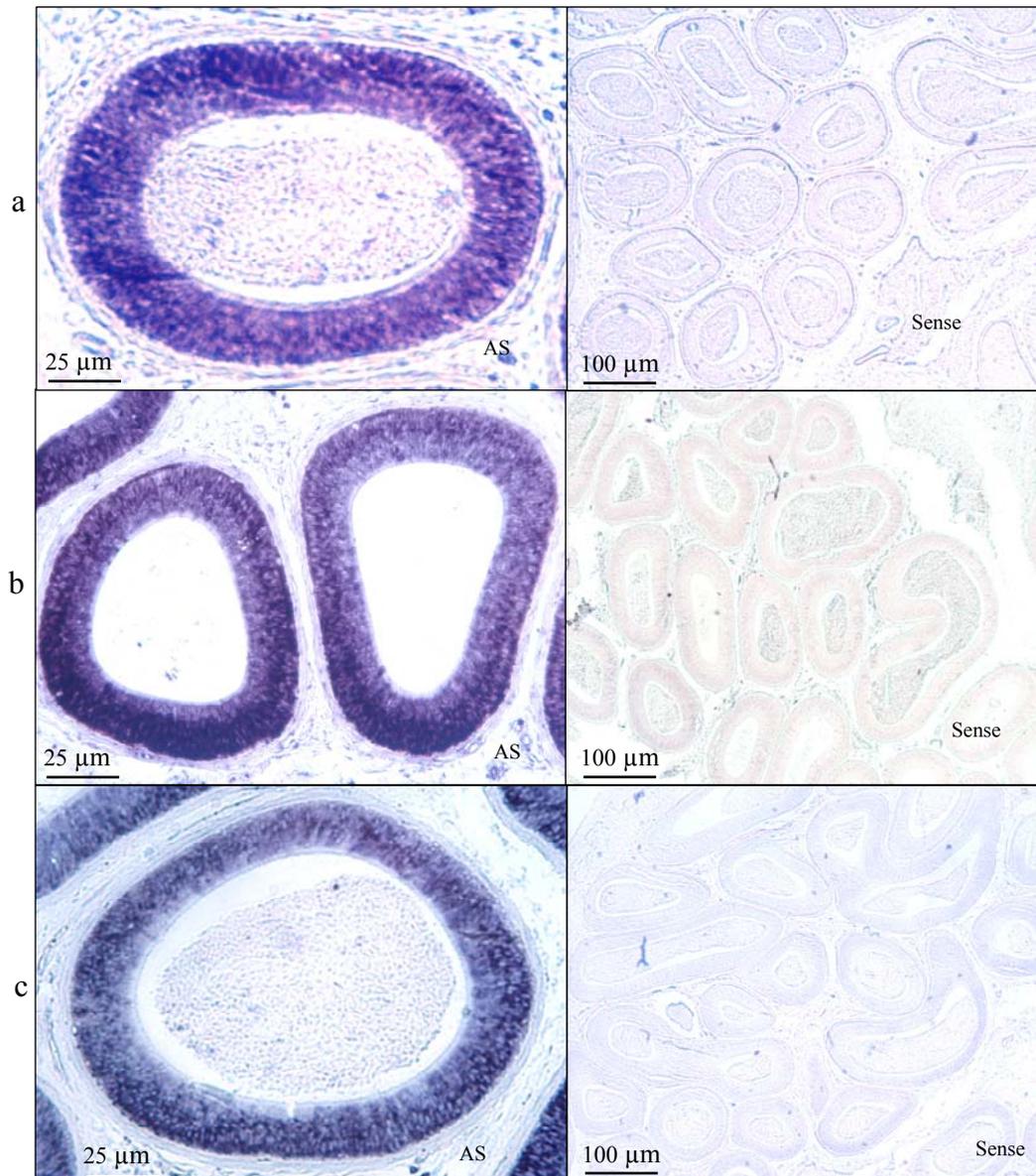


Abb.3.5 In situ-Hybridisierung der PMCA-Isoformen 1, 3 und 4 im bovinen Nebenhodenkopf
 a) Die PMCA1 wird von den Tubulusepithelzellen exprimiert, b) Die PMCA3 wird in den Tubulusepithelien exprimiert, c) Die PMCA4 wird von den basalen Tubulusepithelzellen exprimiert. Rechts dargestellt sind jeweils die Negativkontrollen mit den Sense-RNA Sonden. Negativ war die PMCA2-Reaktion (nicht dargestellt)

Boviner Nebenhodenkörper

PMCA1 wird in den Tubuluszellen des Nebenhodenkörpers exprimiert. Die intertubulären Bindegewebszellen (Peritubulärzellen) zeigen keine PMCA1-Expression (Abb. 3.6 a). Die Antisense-Sonden der PMCA2 und 3 führten im Nebenhodenkörper zu negativen Reaktionen (nicht gezeigt). PMCA 4 wird von den Tubulusepithelzellen des Nebenhodenkörpers exprimiert (Abb. 3.6 b).

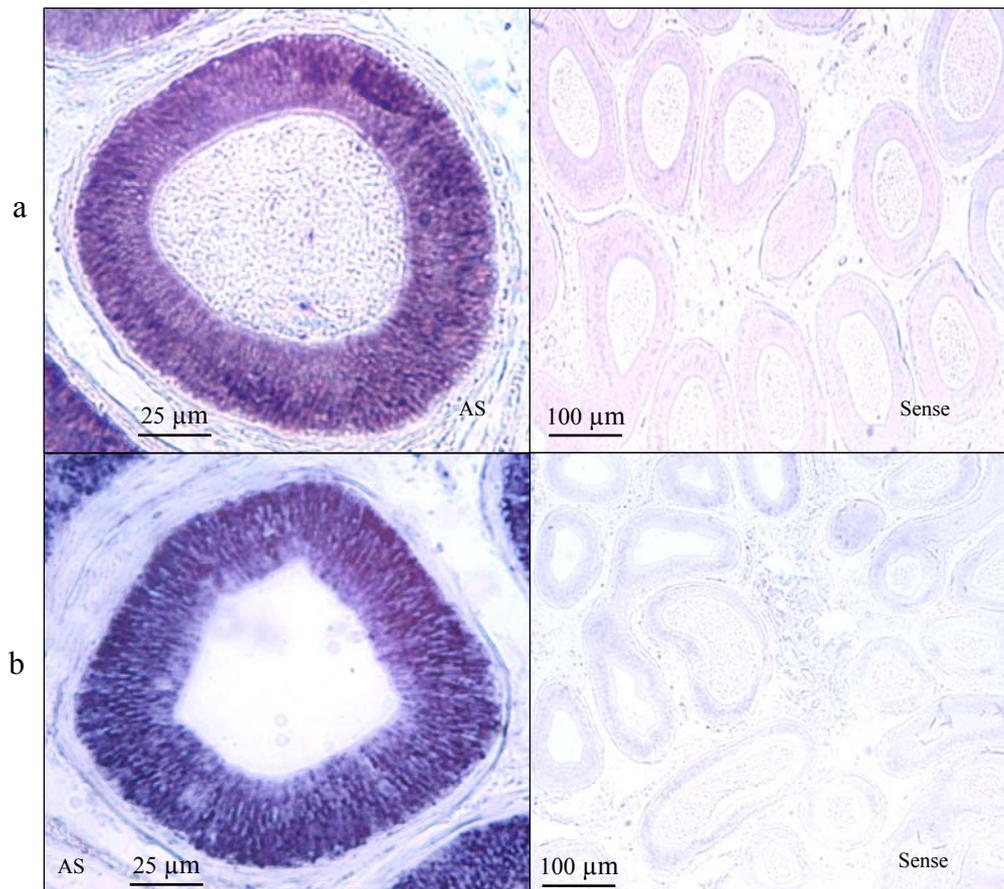


Abb.3.6 In situ-Hybridisierung der PMCA-Isoformen 1 und 4 im bovinen Corpus epididymidis a) Die PMCA1 wird von den Tubulusepithelzellen exprimiert, b) Die PMCA4 wird ebenfalls in den Tubulusepithelien exprimiert. Rechts dargestellt sind jeweils die Negativkontrollen mit den Sense-RNA Sonden. Negativ waren die PMCA2- und 3- Reaktion (nicht dargestellt)

Boviner Nebenhodenschwanz

PMCA1 wird von Tubuluszellen, Blutgefäßzellen und Bindegewebszellen des Nebenhodenschwanzes exprimiert (Abb. 3.7 a). PMCA4-mRNA konnte sowohl in basalen, als auch in apikalen Zellen der Tubuli des Nebenhodenschwanzes detektiert werden. (Abb. 3.7 b).

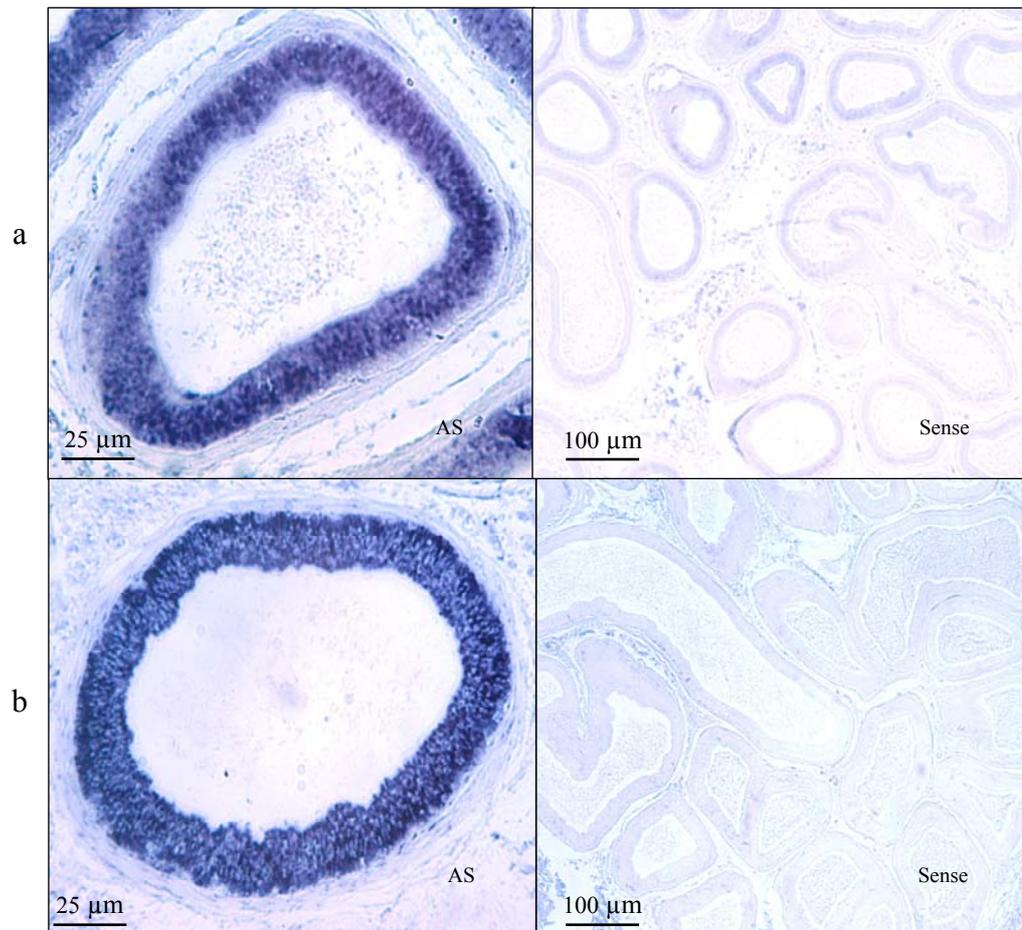


Abb.3.7 In situ-Hybridisierung der PMCA-Isoformen 1 und 4 in der bovinen Cauda epididymidis a) Die PMCA1 wird von den Tubulusepithelzellen exprimiert, b) Die PMCA4 wird ebenfalls in den Tubulusepithelien exprimiert. Rechts dargestellt sind jeweils die Negativkontrollen mit den Sense-RNA Sonden. Negativ waren die PMCA2- und 3- Reaktion (nicht dargestellt).

3.1.4 Klonierung der bovinen PMCA-Isoformen 1 und 4

Die Gesamtsequenzen der bovinen PMCA-Isoformen 1 und 4 waren zum Zeitpunkt des Versuchs unbekannt. Daher sollten beide Isoformen kloniert und die Sequenzen anschließend bestimmt werden. Dazu wurde die cDNA zunächst durch PCR amplifiziert. Die Banden einer Größe von etwa 4300 bp (PMCA 1) bzw. etwa 4000 bp (PMCA 4) wurden ausgeschnitten und eluiert (Abb. 3.8 und 3.9). Beide Fragmente wurden in den TOPO XL-Vektor inkloniert und mit dem Restriktionsenzym *ECO RI* verdaut (Abb. 3.10 und 3.11).

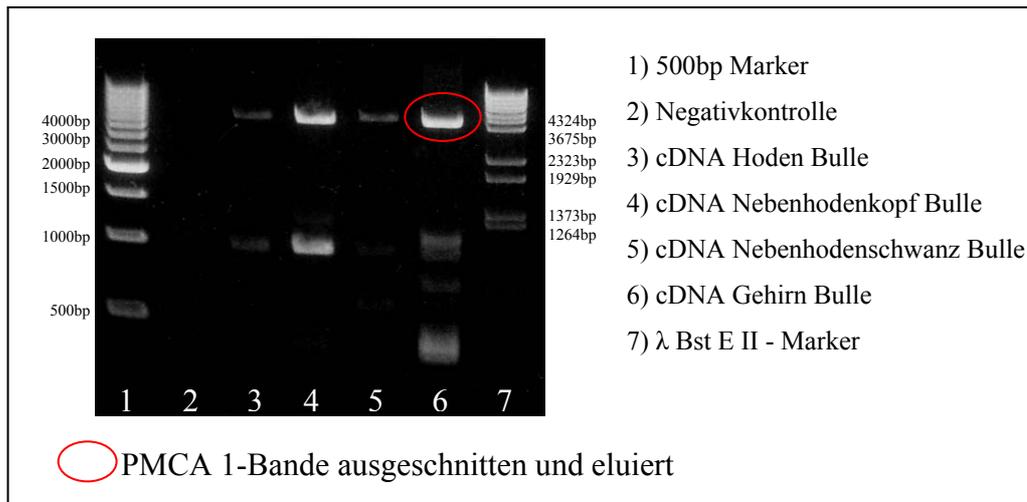


Abb.3.8 RT-PCR der Gesamt-PMCA 1. Die Bande einer Größe von etwa 4,3 kDa wurde ausgeschnitten und eluiert

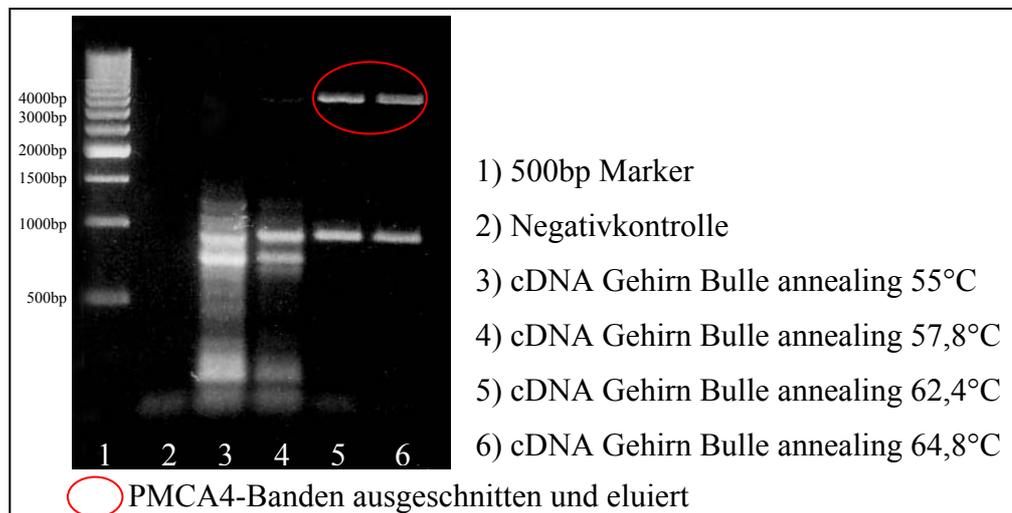


Abb.3.9 RT-PCR der Gesamt-PMCA 4. Die Bande einer Größe von etwa 4 kDa wurde ausgeschnitten und eluiert

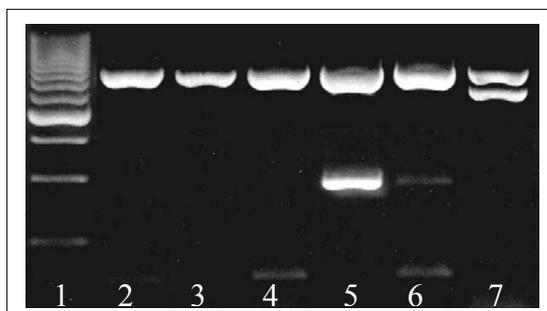


Abb.3.10 Eco RI-Verdau der einklonierten PMCA 1-Fragmente Tasche 1: 500bp Marker, Tasche 2 bis 7: Klone mit PMCA1-Fragmenten

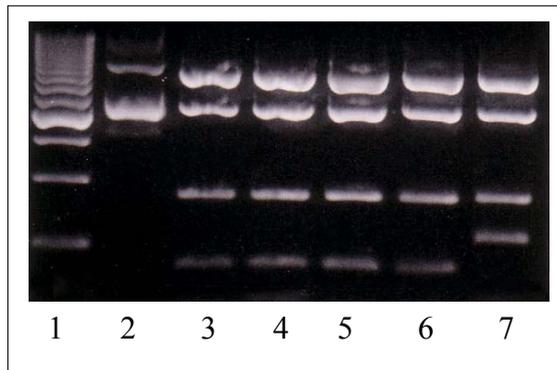


Abb.3.11 ECO RI-Verdau der einklonierten PMCA 4-Fragmente Tasche 1: 500bp Marker, Tasche 2 bis 6: Klone mit PMCA4b-Fragmenten, Tasche 7: Klon PMCA4b

Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass es sich bei den jeweiligen Banden um die cDNA der PMCA-Isoformen 1 resp. 4 handelt. Während sich die Klonierung der PMCA 4 cDNA als unkompliziert erwies, konnte die PMCA 1 cDNA nicht in einem Fragment kloniert werden (Abb. 3.10). Dieses Phänomen, i.e. die Unmöglichkeit der Einklonierung der PMCA Isoform 1 in Vektoren ist seit längerem bekannt und wurde von Prof. Carafoli und Prof. Strehler, zwei führenden Forschern auf dem Gebiet der PMCA, mündlich bestätigt.

Der PMCA 4 Klon 6 besitzt eine Länge von 3741 bp (Abb.3.12, 3.13). Die PMCA4 - Klone 2 bis 5 enthalten eine PMCA 4 Gesamt cDNA der Länge 3598 bp (Abb.3.14). Bei den Klonen handelt es sich um zwei unterschiedliche Spleiß-Varianten der PMCA 4 (ATP2B4 transcript variant 2 resp. ATP2B4 transcript variant 1, nach neuerer Nomenklatur PMCA4b resp. PMCA4a). Interessanterweise sind die beiden Spleißvarianten nicht nur im Bereich des Exons C unterschiedlich gespleißt, sondern auch im Bereich des weiter stromaufwärts gelegenen Exons A. Während die PMCA4a dieses Exon enthält, ist es bei der PMCA4b herausgespleißt. Die erste Variante wird daher als Isoform 4za bezeichnet, die letztere heißt PMCA4xb (Strehler and Zacharias 2001). Die Gesamtlänge der bovinen PMCA4za beträgt 1159 Aminosäuren. Damit ist sie um genau eine Aminosäure länger als die humane PMCA4za (1158 Aminosäuren). Die bovine PMCA4za zeigt mit der humanen PMCA4za eine Übereinstimmung von 90,8% (s. Abb.7.2, Anhang). Die Ähnlichkeit der bovinen mit der Ratten PMCA4za ist etwas geringer. Sie beträgt für die bovine PMCA4za 85,7%. Die Ratten PMCA4za ist auch mit 1157 Aminosäuren um zwei Aminosäuren kürzer als die bovine.

```

5' GGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTATAAGAGCTCATGACG
AACCCAACAGAACACACCTTGCCGTCCAACCTCGATACTTGAGAGCCGTGAAGGGGAGTTTGGCTGCACAGTATGGACCTG
AGGAAGCTGATGGAGCTGCGCTCAAGTGATGCAATAGACCAGATCAACGTCCACTACGGAGGAGTATGAACCTCTGCAGT
AGACTGAAAACCAACCCTGTGGAAGGCCTATCTGGGAACCTGCAGATCTGGAGAAACGTAACAAGTGTGGACAGAAC
TTGATTCGCCCAAAAAGCCCAAGACCTTCTAGAGTTAGTGTGGGAAGCCCTCCAGGATGTCACGCTCATCATCCTGGAG
ATTGCGGCCATCATCTCCCTGGTCTGTCTTCTACCGCCCCCGGGGGGAGAAAATGAACAGTGTGGTCTAGCCGCTACT
AGCCAGAGGACGAAGGGGAGGCGGAAGCTGGCTGGATTGAGGGTGCAGCCATCTTATTCTCGGTGATCATCGTCGTGCTC
GTGACCGCCTTCAATGACTGGAGCAAGGAGAAGCAATTCGGGGGCGCAGAACCCGATCGAAAAGGAGCAGAAATTCCTC
GTTATCCGGAATGGCCACATCATTAGCTCCCTGTGGCTGAGATTGTGGTGGGCGACATTGCCAAATCAAATACGGTGAC
CTGTGCCTGCAGATGGGATCCTGATCCAGGGCAACGATCTCAAGATTGATGAGAGTTCTCTGACTGGGAATCAGACCAT
GTCAAGAAGTCTTGGAGAGGGACCCCATGCTGCTCAGGGACCCATGTAATGGAAGTTCTGGACGAATGTTAGTGACG
GCTGTGGGTATCAACTCTCAGACTGGAATCATTTTTACCCTCTTGGGAGCCAGTGAGGGGGAAGAGGAAGAAGAAG
AAAGCAAAGACCCAAGATGGAGTGGCCTTGGAAATCCAGCCACTCAACAGCCAGGAGGGGATCGACAGTGAGAAAAGGAG
AAGAAGGCCGCAAGCTGCCCAAAAAGGAGAAGTCCGTGCTGCAGGGCAAGCTGACCCGCCTGGCTGTCCAGATTGGAAA
GCTGGTCTGATCATGTCTGCAATCACAGTTCTCATCCTGATTCTGTACTTGTGATCGACAACCTTTGTGATCCAGCGCAGA
CCGTGGCTGGCCGAGTGTACCCCATCTACGTCCAGTACTTTGTCAAGTTCTTCATCATCGCGCTACGGTGTGGTGGT
GCTGTGCCCGAGGGGCTGCCCTGGCCGTACCATCTCACTGGCTTACTCTGTGAAGAAAATGATGAAGGACAACAACCTG
GTGCGGCACTTGGACGCGTGTGAGACCATGGTAACGCCACAGCCATCTGCTCGGACAAGACGGGCACGCTGACCATGAAC
CGCATGTCTGTGGTGCAGGCTTACATTGGAGACACTCGTTACCATCAGATCCCAAGCCCTGATGACCTTGTGCCAAAGGTC
CTGGACCTTATTGTCAATGGCATTTCATCAACAGTGCCTACACCTTAAGATTCTGCCTCCGAGAGAGGGCGGCGCTG
CCCCGGCAGGTGGCAACAAGACCAGTGCGCCCTGCTGGGCTTCGTCCTGGACCTGAAGCAGGATTACCACGCCGTGCGC
AGCGAGGTGCCGAGGAGAAGCTTACAAAGTGTACACCTTCAACTCGGTGCGCAAGTCCATGAGCACGGTATCGAGAAG
CCGGCGGCGGCTACCGCATGTACAGCAAGGGTGCCTCCGAGATCATCCTGCGCAAGTGAATCGAATCCTGGACAAAAAG
GGGAGGCCGTGCCATTCAAGAATAAGGACCAGATGAGATGGTCCGCACCGTATCGAGCCCATGGCCTGTGAGGGGCTG
CGGACACTGTGATCGCTTACCGGATTTCAACGATGGAGAGCCCCGTGGGACAACGAGAGCGAGATCCTCACTGAGTTG
ACCTGTATCGCAGTGGTGGGCATCGAGGACCCCGTGCGCCGAGGTGCCAGAAGCTATTGCCAAATGCAAGCGAGCTGGC
ATCACTGTGAGGATGGTGACAGGGGACAACATCAACACAGCCCGTCCATCGCCACCAAGTGTGGCATCGTACTCCCGGG
GATGACTTTCTGTGCTTAGAAGGCAAGAATTCAATCGCCCTATCCGAAACGAGAAGGGCGAGGTAGAGCAGGAAAAGCTG
GACAAGATCTGGCCTAAGCTCCGAGTGTGGCGCGTCTTCCCCACTGACAAGCACACGCTGGTGAAGGCATCATCGAC
AGCACTGTGCGCGACCAGCGGCAGGTGGTGGCCGTACCGGCGACGGCACCAACGACGGCCCGGCTCTGAAGAAAGCAGAC
GTTGGTTTTGCCATGGGTATTGCAGGCACAGATGTGGCAAAGGAGGCCCTCCGACATCATCTAACAGACGACAACCTCACC
AGCATCGTGAAGGCGGTGATGTGGGGACGGAACGCTACGACAGCATCTCCAAGTTCTGCAGTTCAGCTACCGTCAAC
GTGGTGGCCGTGATCGTGGCCTTCACTGGAGCCTGCATACCCAGGATTCCCCACTGAAGGCCGTGCAGATGTTGTGGTT
AATCTAATCATGGACACCTTTGCCTCGCTGGCCCTGGCCACAGAGCCTCCTACAGACTCTTACTGAAAGCGCCGCCCTAC
GGCCGAATAAGCCTCTAATCTCGCGCACCATGATGAAGAACATCTGGGTACGCGCTTATCAGCTCACCGTATCTTT
TTCTTGTGTTTGGGGTGAAGAAATCTTTGACATTGACAGCGGGAGGAGCGCCTCTGCATTCTCCGCCAGCCAGCAC
TACACCATTTTTCAACACCTTCGTGCTCATGCAGCTTCAACGAAATCAACTCCCGAAGATCCACGGGAGAGGAAT
GTCTTCTCGGCATCTCCGCAATCTCATCTTCTGCTCAGTGGTGTGGGCACATTATCAGCCAGATCATCATCGTGGAA
TTCGGGGGCAAACCCTTCAAGTGCACGAAGCTCACCTGTCCAGTGGTTCTGGTGCCTTTCATTGGTATTGGAGAGCTG
CTGTGGGGCAGGTCAATTCACGATACCTACCAATCCCTGAAGTTCTGAAGGAGGCTGGGCATGGCACCACCAAGAG
GAGATCACCAAGGATGCTGAGGGGCTGGACGAAATCGACCATGCAGAGATGGAGCTGCGCCGAGGCCAGATCCTCTGGTTC
CGGGCCTGAACCGTATCCAGACTCAGATCGACGTAATTAACACATTCCAGACGGGAGCCTTTTTAAGGGAGTCTAAAG
CGCCAGACCATGGTCAACACCTTGATGTAAAACATGTTCTAGCTCATCTATGTAACAGTTGCACCAGTCAAATCTCCC
CCCACCACTTCTGTGCTGCTGTTTCTCTACTCTGGCAATCAAAGTGGTCAAAGCGTTCCATAGTTCCCTCCA
CGAAAGCATTAGAAACCAAGAACCAAACTCCATCCACAACCTCATGACCCACCTGAATTCACCATAGATGAGGAGGGG
CCACGAACACCACTCTGGATGAGCAAGAAGAGGAGATTTGAAAAGGTGCTAAGCCTGGGACTAAGACGTCTCACTGG
ATGGTGAAGTCACTCCA-3'

```

Abb. 3.12 cDNA-Sequenz der bovinen PMCA4za, Gesamtlänge 3741 bp; Rot dargestellt sind Start- und Stopcodon

```

G P L D A C S S G R Q C D G Y L Q N S P L Stop E L Met T N P T E
H T L P S N S I L E S R E G E F G C T V Met D L R K L Met E L R S
S D A I D Q I N V H Y G G V Met N L C S R L K T N P V E G L S G N
P A D L E K R K Q V F G Q N L I P P K K P K T F L E L V W E A L Q
D V T L I I L E I A A I I S L V L S F Y R P P G G E N E Q C G L A
V T S P E D E G E A E A G W I E G A A I L F S V I I V V L V T A F
N D W S K E K Q F R G P Q N R I E K E Q K F S V I R N G H I I Q L
P V A E I V V G D I A Q I K Y G D L L P A D G I L I Q G N D L K I
D E S S L T G E S D H V K K S L E R D P Met L L S G T H V Met E G
S G R Met V V T A V G I N S Q T G I I F T L L G A S E G E E E E K
K K K A K T Q D G V A L E I Q P L N S Q E G I D S E E K E K K A A
K L P K K E K S V L Q G K L T R L A V Q I G K A G L I Met S A I T
V L I L I L Y F V I D N F V I Q R R P W L A E C T P I Y V Q Y F V
K F F I I G V T V L V V A V P E G L P L A V T I S L A Y S V K K
Met Met K D N N L V R H L D A C E T Met G N A T A I C S D K T G T
L T Met N R Met S V V Q A Y I G D T R Y H Q I P S P D D L V P K V
L D L I V N G I S I N S A Y T S K I L P P E K E G G L P R Q V G N
K T E C A L L G F V S D L K Q D Y H A V R S E V P E E K L Y K V Y
T F N S V R K S Met S T V I E K P G G G Y R Met Y S K G A S E I I
L R K C N R I L D K K G E A V P F K N K D R D E Met V R T V I E P
Met A C E G L R T L C I A Y R D F N D G E P P W D N E S E I L T E
L T C I A V V G I E D P V R P E V P E A I A K C K R A G I T V R
Met V T G D N I N T A R A I A T K C G I V T P G D D F L C L E G K
E F N R L I R N E K G E V E Q E K L D K I W P K L R V L A R S S P
T D K H T L V K G I I D S T V G D Q R Q V V A V T G D G T N D G P
A L K K A D V G F A Met G I A G T D V A K E A S D I I L T D D N F
T S I V K A V Met W G R N V Y D S I S K F L Q F Q L T V N V V A V
I V A F T G A C I T Q D S P L K A V Q Met L W V N L I Met D T F A
S L A L A T E P P T D S L L K R R P Y G R N K P L I S R T Met Met
K N I L G H A V Y Q L T V I F F L V F A G E K F F D I D S G R R A
P L H S P P S Q H Y T I I F N T F V L Met Q L F N E I N S R K I H
G E R N V F S G I F R N L I F C S V V L G T F I S Q I I I V E F G
G K P F S C T K L T L S Q W F W C L F I G I G E L L W G Q V I S T
I P T Q S L K F L K E A G H G T T K E E I T K D A E G L D E I D H
A E Met E L R R G Q I L W F R G L N R I Q T Q I D V I N T F Q T G
A S F K G V L K R Q T Met G Q H L D V K H V P S S S Y V T V A P V
K S P P T T S V A A A V S S P T L G N Q S G Q S V P Stop F P P R
K H S E T Q E P K L H P Q L H D P P E F T I D E E G P R T P L L D
E Q E E E I L K R C L S L G L R R P H W Met V R S L

```

Abb.3.13 Aminosäuresequenz der bovinen PMCA4za, Gesamtlänge 1159 AS. **Met:** Startcodon, **Stop:** Stopcodon. Die AS-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Expsy (<http://ca.expsy.org/tools/dna.html>) aus den cDNA-Sequenzen übersetzt.

```

5' GGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTATAAGAGCTCATGACG
AACCCAACAGAACACACCTTGCCGTCCAACCTCGATACTTGAGAGCCGTGAAGGGGAGTTTGGCTGCACAGTGTGACCTG
AGGAAGCTGATGGAGCTGCGCTCAAGTGATGCAATAGACCAGATCAACGTCCACTACGGAGGAGTGATGAACCTCTGCAGT
AGACTGAAAACCAACCCTGTGGAAGGCCTATCTGGGAACCTGCAGATCTGGGAAACGTAACAAGTGTGGACAGAAC
TTGATTCGCCCAAAAAGCCCAAGACCTTCTTAGAGTTAGTGTGGGAAGCCCTCCAGGATGTCACGCCTCATCATCCTGGAG
ATTGCGGCCATCATCTCCCTGGTCTGTCTTCTACCGCCCCCGGGGGGAGAAAATGAACAGTGTGGTCTAGCCGCTCACT
AGCCCAGAGGACGAAGGGGAGCGGAAGCTGGCTGGATTGAGGGTGCAGCCATCTTATTCTCGGTGATCATCGTCGTGCTC
GTGACCGCCTTCAATGACTGGAGCAAGGAGAAGCAATTCGGGGGCTGCAGAACCCGATCGAAAAGGAGCAGAAAATTCCTC
GTTATCCGGAAATGGCCACATCATTAGCTCCCTGTGGCTGAGATTGTGGTGGGCGACATTGCCCAAATCAAATACGGTGAC
CTGCTGCCTGCAGATGGGATCCTGATCCAGGGCAACGATCTCAAGATTGATGAGAGTTCTCTGACTGGGGAATCAGACCAT
GTCAAGAAGTCTTGAGAGGGGACCCCATGCTGCTCAGGGACCCATGTAATGGAAGTTCTGGACGAATGGTAGTGACG
GCTGTGGGTATCAACTCTCAGACTGGAATCATTTTTACCCTCTTGGGAGCCAGTGAGGGGGAAGAGGAAGAAGAAGAA
AAAGGTAAAAAACAAGGAGTCCCTGAAAAATCGCAACAAAGCAAAGACCCAAAGATGGAGTGGCCTTGGAAATCCAGCCACTC
AACAGCCAGGAGGGGATCGACAGTGAAGAAAAGGAGAAGAAGGCCCAAGCTGCCAAAAGGAGAAGTCCGTGCTGCAG
GGCAAGCTGACCCGCTGGCTGTCCAGATTGGGAAAGCTGGTCTGATCATGTCTGCAATCACAGTTCTCATCTGATTCTG
TACTTCGTGATCGACAACCTTGTGATCCAGCGCAGACCGTGGTGGCCGAGTGACCCCATCTACGTCCAGTACTTTGTG
AAGTTCTTTCATCATCGCGTACGGTGTGGTGGTGGTGTGCCGAGGGGCTGCCCTGGCCGTACCCATCTCACTGGCT
TACTCTGTGAAGAAAATGATGAAGGACAACAACCTGGTGCAGCACTTGGACCGGTGTGAGACCATGGGCAACGCCACAGCC
ATCTGCTCGGACAAGACGGGCACGCTGACCATGAACCGATGTCTGTGGTGCAGGCTTACATTGGAGACACTCGTTACCAT
CAGATCCCAAGCCCTGATGACCTTGTGCCAAGGTCTGGACCTTATTGTCAATGGCATTTCATCAACAGTGCCACACC
TCTAAGATTCTGCCTCCGGAGAAGGAGGGCGGCCTGCCCGCAGGTGGGCAACAAGACCGAGTGCGCCCTGCTGGGCTTC
GTCTCGGACCTGAAGCAGGATTACCACGCGGTGCGCAGCGAGGTGCCCGAGGAGAAGCTCTACAAAGTGTACACCTTCAAC
TCGGTGCGAAGTCCATGAGCAGGTCATCGAGAAGCCGGGCGCGGCTACCGCATGTACAGCAAGGGTGCCTCCGAGATC
ATCTGCGCAAGTGAATCGAATCCTGGACAAAAGGGGGAGGCCGTGCCATTCAAGAATAAGGACCAGATGAGATGGTC
CGCACCGTCATCGAGCCATGGCTGTGAGGGGCTGCGGACACTCTGCATCGCTTACCGGGATTTCAACGATGGAGAGCCC
CCGTGGGACAACGAGAGCGGAGATCCTCACTGAGTTGACCTGTATCGCAGTGGTGGGCATCGAGGACCCCGTGCGCCGGAG
GTGCCAGAAGCTATTGCCAAATGCAAGCGAGCTGGCATACTGTCCAGGATGGTGACAGGGGACAACATCAACACAGCCGT
GCCATCGCCACCAAGTGTGGCATCGTGACTCCCGGGGATGACTTTCTGTGCTTAGAAGGCAAAGAATTCAATCGCCTCATC
CGAAACGAGAAGGGCGAGGTAGAGCAGGAAAAGCTGGACAAGATCTGGCCTAAGCTCCGAGTGTGGCGCGGTCTTCCCCC
ACTGACAAGCACACGCTGGTGAAGGCATCATCGACAGCACTGTCCGGCAGCAGCGGCAGGTGGTGGCCGTACCCGGCGAC
GGCACAACGACGGCCCGGCTCTGAAGAAAGCAGACGTTGGTTTTGCCATGGGTATTGCAGGCACAGATGTGGCAAAGGAG
GCCTCCGACATCATCTAACAGACGACAACCTCACCAGCATCGTAAGGCGGTGATGTGGGGACGGAACGCTACGACAGC
ATCTCCAAGTTCCTGCAGTTCAGCTCACCGTCAACGTGGTGGCCGTGATCGTGGCCTTCACTGGAGCCTGCATACCCAG
GATTCGCCACTGAAGCCGTGCAGATGTTGTGGTTAATCTAATTATGGACACCTTTCGCTCGCTGGCCCTGGCCACAGAG
CCTCCTACAGACTCTACTGAAGCGCCGGCCCTACGGCCGAATAAGCCTTAATCTCGCGCACCATGATGAAGAACATC
CTGGGTACGCGTCTATCAGCTCACCGTCATCTTTTTCTTGTGTTTGGGGTGAGAAATTTTGGACATTGACAGCGGG
AGGAGAGCGCCTCTGCATTCTCCGCCAGCCAGCACTACACCATTATTTTCAACACCTTCGTGCTCATGCAGTTCTTCAAC
GAAATCAACTCCGCAAGATCCACGGGAGAGGAATGTCTTCTCGGGCATCTTCCGCAATCTCATCTTCTGCTCAGTGGTG
TTGGGCACATTCATCAGCCAGATCATCATCGTGAATTCGGGGGCAAACCTTCAGTTGCACGAAGCTCACCTGTCCAG
TGTTTCTGGTGCCTTTCATTGGTATTGGAGAGCTGCTGTGGGGCCAGGTCAATTCACGATACCTACCCAATCCCTGAAG
TTCTGAAGGAGGCTGGGCATGGCACCACAAAGAGGAGATACCAAGGATGCTGAGGGGCTGGACGAAATCGACCATGCA
GAGATGGAGCTGCGCCGAGGCCAGATCCTCTGTTCCGGGGCTGAACCGTATCCAGACTCAGATCAAAGTGGTCAAAGCG
TTCCATAGTTCCCTCCACGAAAGCATTAGAAAACCAAGAACCAAACTCCATCCACAACCTCATGACCCACCCTGAATTC
ACCATAGATGAGGAGGGCCACGAACACCACTCCTGGATGAGCAAGAAGAGGAGATTTTTGAAAAGGTGTCTAAGCCTGGG
ACTAAGACGTCCTCACTGGATGGTGAAGTCACTCCA-3'

```

Abb. 3.14 cDNA-Sequenz der bovinen PMCA4xb (unvollständig), Gesamtlänge 3598 bp, Rot markiert ist Startcodon, das Stopcodon wurde nicht erreicht.

```

G P L D A C S S G R Q C D G Y L Q N S P L Stop E L Met T N P T E
H T L P S N S I L E S R E G E F G C T V Met D L R K L Met E L R S
S D A I D Q I N V H Y G G V Met N L C S R L K T N P V E G L S G N
P A D L E K R K Q V F G Q N L I P P K K P K T F L E L V W E A L Q
D V T L I I L E I A A I I S L V L S F Y R P P G G E N E Q C G L A
V T S P E D E G E A E A G W I E G A A I L F S V I I V V L V T A F
N D W S K E K Q F R G L Q N R I E K E Q K F S V I R N G H I I Q L
P V A E I V V G D I A Q I K Y G D L L P A D G I L I Q G N D L K I
D E S S L T G E S D H V K K S L E R D P Met L L S G T H V Met E G
S G R Met V V T A V G I N S Q T G I I F T L L G A S E G E E E E K
K K K G K K Q G V P E N R N K A K T Q D G V A L E I Q P L N S Q E
G I D S E E K E K K A A K L P K K E K S V L Q G K L T R L A V Q I
G K A G L I Met S A I T V L I L I L Y F V I D N F V I Q R R P W L
A E C T P I Y V Q Y F V K F F I I G V T V L V V A V P E G L P L A
V T I S L A Y S V K K Met Met K D N N L V R H L D A C E T Met G N
A T A I C S D K T G T L T Met N R Met S V V Q A Y I G D T R Y H Q
I P S P D D L V P K V L D L I V N G I S I N S A Y T S K I L P P E
K E G G L P R Q V G N K T E C A L L G F V S D L K Q D Y H A V R S
E V P E E K L Y K V Y T F N S V R K S Met S T V I E K P G G G Y R
Met Y S K G A S E I I L R K C N R I L D K K G E A V P F K N K D R
D E Met V R T V I E P Met A C E G L R T L C I A Y R D F N D G E P
P W D N E S E I L T E L T C I A V V G I E D P V R P E V P E A I A
K C K R A G I T V R Met V T G D N I N T A R A I A T K C G I V T P
G D D F L C L E G K E F N R L I R N E K G E V E Q E K L D K I W P
K L R V L A R S S P T D K H T L V K G I I D S T V G D Q R Q V V A
V T G D G T N D G P A L K K A D V G F A Met G I A G T D V A K E A
S D I I L T D D N F T S I V K A V Met W G R N V Y D S I S K F L Q
F Q L T V N V V A V I V A F T G A C I T Q D S P L K A V Q Met L W
V N L I Met D T F A S L A L A T E P P T D S L L K R R P Y G R N K
P L I S R T Met Met K N I L G H A V Y Q L T V I F F L V F A G E K
F F D I D S G R R A P L H S P P S Q H Y T I I F N T F V L Met Q F
F N E I N S R K I H G E R N V F S G I F R N L I F C S V V L G T F
I S Q I I I V E F G G K P F S C T K L T L S Q W F W C L F I G I G
E L L W G Q V I S T I P T Q S L K F L K E A G H G T T K E E I T K
D A E G L D E I D H A E Met E L R R G Q I L W F R G L N R I Q T Q
I K V V K A F H S S L H E S I Q K P K N Q N S I H N F Met T H P E
F T I D E E G P R T P L L D E Q E E E I F E K V S K P G T K T S S
L D G E V T P

```

Abb.3.15 Aminosäuresequenz der bovinen PMCA4xb, Gesamtlänge 1175 AS. **Met**: Startcodon, das Stopodon wurde nicht erreicht. Die AS-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) aus den cDNA-Sequenzen übersetzt.

Die Gesamtlänge der bovinen PMCA4xb beträgt vermutlich analog der humanen PMCA4xb etwa 1205 Aminosäuren. Da durch das Herausspleißen des C-Fragments mit einer Länge von 175bp ein Basenshift stattfindet, wird hier das Stopp-Codon nach stromabwärts verschoben. Dadurch lag unser Reverse-Primer stromaufwärts des Stopp-Codons. So endet die sequenzierte bovine PMCA4xb bei bereits 1175 Aminosäuren und ist damit um 30 Aminosäuren verkürzt im Vergleich zur humanen Sequenz. Die Identität zwischen boviner und humaner PMCA4xb liegt bei etwa 88% (s. Abb. 7.3, Anhang). Die Ähnlichkeit der bovinen mit der Ratten PMCA4xb ist etwas geringer und beträgt etwa 86%.

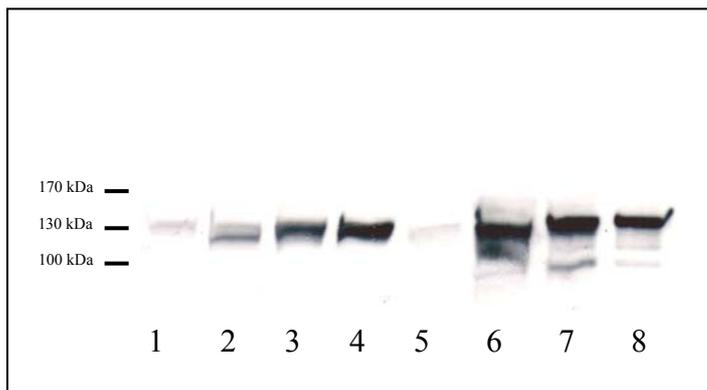
3.2 Proteinexpression und Lokalisation der PMCA in den Keimzellen und dem Nebenhoden des Bullen

3.2.1 Nachweis der PMCA mittels Western Blot Analyse

Beim Western Blot der PMCA waren die Ergebnisse in entscheidender Weise von der Qualität der Antikörper abhängig. So konnten für die beiden monoklonalen Antikörper JA9 und 5F10 (s.o.) gute Ergebnisse erzielt werden. Die PMCA1-Reaktion hingegen war sehr unspezifisch und nicht verwertbar. So ist bis heute kein guter Antikörper gegen die PMCA1 erhältlich. Auch die Versuche, bovine Proteine mit den polyklonalen Antikörpern gegen PMCA 2 und 3 zu detektieren, misslangen aufgrund der fehlenden Antikörperbindung an die bovine PMCA.

Pan-PMCA (monoklonaler Antikörper 5F10)

Alle eingesetzten Proben ergaben eine positive Reaktion mit dem Pan-PMCA-Antikörper 5F10 (Abb. 3.16). Eine starke Reaktion wurde in dem bovinen Gehirn sowie Herz gefunden. Geringere Mengen der PMCA fanden sich hingegen in Testis und Leber. In den Spermien, die aus dem Nebenhodenkopf beziehungsweise –schwanz gewonnen wurden fand sich Folgendes: Die prädominante PMCA-Bande lag in unterschiedlicher Höhe im Bereich von etwa 130 kDa.

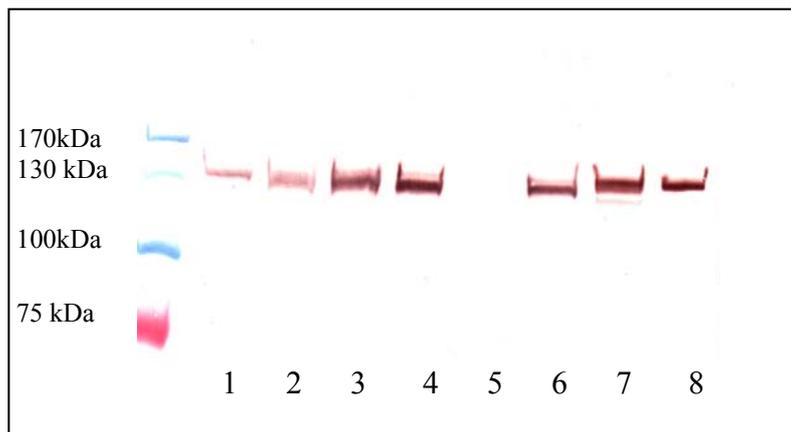
**Abb. 3.16**

Nachweis der PMCA mit dem Pan-PMCA-Antikörper 5F10. Bei etwa 125 – 135 werden alle PMCA-Isoformen der folgenden Gewebe dargestellt: 1 Testis, 2 Spermienmembranen Caput epididymidis, 3 Spermienmembranen Cauda epididymidis, 4 Herz, 5 Leber, 6 Gehirn

Als Positivkontrollen dienten die folgenden überexprimierten humanen Isoformen:
7 humane PMCA4a, 8 humane PMCA4b

PMCA4 (monoklonaler Antikörper JA9)

In allen untersuchten Organen wurde PMCA4 detektiert. Als Positivkontrolle dienten hier die von Prof. Strehler (Mayo Clinic, Rochester, USA) zur Verfügung gestellten humanen PMCA4- Spleißvarianten a und b aus SF9-Zellmembranen (s. Abschnitt Ca^{2+} -ATPase – Assay). Am geringsten ist die PMCA4-Konzentration in der bovinen Leber. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit der niedrigen Expression, die in der RT-PCR sichtbar wird (s.o.). Auch im Testis ist die PMCA4-Konzentration niedrig. Ähnliches gilt für die Spermienmembranen aus dem Nebenhodenkopf. In Nebenhodenschwanzspermien und insbesondere in Herz und Gehirn ist die PMCA4 in relativ hoher Konzentration vorhanden (Abb. 3.16).

**Abb. 3.17**

Nachweis der PMCA4 des Bullen mit dem PMCA4-Antikörper JA9. Bei etwa 130 kDa wird die PMCA4 der folgenden Gewebe dargestellt:

1 Testis, 2 Spermienmembranen von Spermien aus dem Caput epididymidis, 3 Spermienmembranen von Spermien aus der Cauda epididymidis, 4 Herz, 5 Leber, 6 Gehirn

Als Positivkontrollen dienten die folgenden überexprimierten humanen Isoformen: 7 humane PMCA4a, 8 humane PMCA4b

Interessanterweise war die Größe der PMCA4 zwischen Caput epididymidis und Cauda epididymidis unterschiedlich, erkennbar in Abb. 3.18, in dem lediglich boviner Hoden, sowie Membranen aus Nebenhodenkopf- und Nebenhodenschwanzspermien aufgetragen wurden. In diesem Blot sind die Proben länger im Gel gelaufen als im Blot von Abb.3.17, daher wird der Größenunterschied hier deutlich.

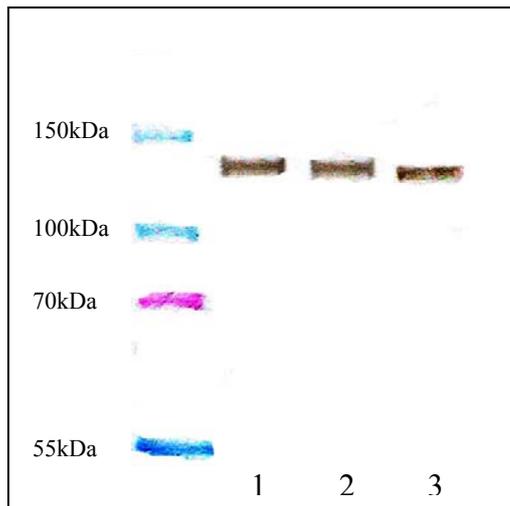
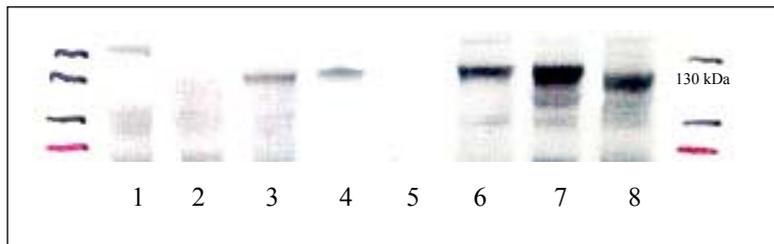


Abb. 3.18
Nachweis der PMCA4 mit dem PMCA4-Antikörper JA9. In dieser Abbildung ist der Größenunterschied zwischen der PMCA4 aus Testis (1) und Spermienmembranen von Spermien aus dem Caput epididymidis (2) im Vergleich zu Spermienmembranen aus der bovinen Cauda epididymidis (3) zu sehen. Es wurde ein anderer Marker als in den vorherigen und folgenden Abbildungen verwendet.

PMCA4a (eigener polyklonaler Antikörper gegen die Spleißvariante 4a)

Um zu klären, ob es sich bei dem Größenunterschied der PMCA4 aus den Spermienmembranen aus Caput und Cauda epididymidis um unterschiedliche Spleißvarianten der PMCA4 handelt, wurde ein Antikörper gegen die PMCA4a hergestellt. Der Western Blot mit diesem Antikörper belegte eindeutig, dass die PMCA4a nur in Spermien, die aus der Cauda epididymidis isoliert wurden, nicht aber in Spermien aus dem Caput epididymidis, in den Membranen vorkommt.

Die Spleißvariante 4a wird nicht im bovinen Hoden synthetisiert (Abb. 3.19). Dahingegen kommt sie sowohl im bovinen Gehirn, als auch in Leber und Herz vor. Als Kontrolle dienten in diesem Versuch die von Prof. Strehler (Mayo Clinic, Rochester, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellten SF9-Zellmembranen, die überexprimierte humane PMCA4a resp. überexprimierte PMCA4b enthielten. Dabei zeigt die genannte Abbildung, dass unser PMCA4a – Antikörper die humane PMCA4a anfärbt, die PMCA4b jedoch negativ ist.

**Abb. 3.19**

Western Blot des Bullen mit dem polyklonalen PMCA4a-Antikörper. Bei etwa 130kDa wird die PMCA4a der folgenden bovinen Gewebe dargestellt:

1 Testis und 2 Spermienmembranen von Spermien aus dem Caput epididymidis enthalten keine PMCA4a, in den Spermienmembranen von Spermien aus der Cauda epididymidis (3) kommt die PMCA4a vor. Als Positivkontrolle dient die überexprimierte humane Isoform PMCA4a (4), die humane PMCA4b ist negativ (5). 6 Gehirn, 7 Herz und 8 Leber sind positiv für PMCA4a

3.2.2 Nachweis der PMCA mittels Immunhistochemie (IHC)

Um zu überprüfen, in welchen Zellen die PMCA lokalisiert ist, wurden immunhistochemische Untersuchungen an bovinem Hoden und Nebenhoden angeschlossen.

Immunhistochemische Nachweise wurden mit den im Western-Blot verwendeten Antikörpern durchgeführt. Dazu zählten der monoklonale Pan-PMCA – Antikörper 5F10, der monoklonale PMCA4 – Antikörper JA9 und der polyklonale eigene Antikörper gegen die bovine PMCA4a.

Da die Qualität des kommerziell erhältlichen PMCA1 Antikörpers nicht ausreichend war (dies wurde auch im Labor von Prof. Strehler, in dem dieser Antikörper hergestellt wurde, bestätigt), wurden leider keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Die Reaktionen mit dem unspezifischen Anti-PMCA Antikörper (5F10) lassen indirekte Rückschlüsse über die anderen Isoformen zu.

3.2.2.1 Immunhistochemie: Pan - PMCA (5F10)

Boviner Hoden

Die PMCA kann sowohl in den Sertoli und Leydig Zellen, als auch in Zellen der Spermatogenese nachgewiesen werden. Eine deutliche Immunreaktion zeigt die Zellmembran der Spermatogonien und der Leptotän-Spermatozyten I- Ordnung. Bei den Sertoli-Zellen wird insbesondere die Zellmembran im Bereich der tight junctions der Blut-Hoden-Schranke kräftig markiert. Auch in Blutgefäßzellen kann die PMCA detektiert werden (Abb.3.20).

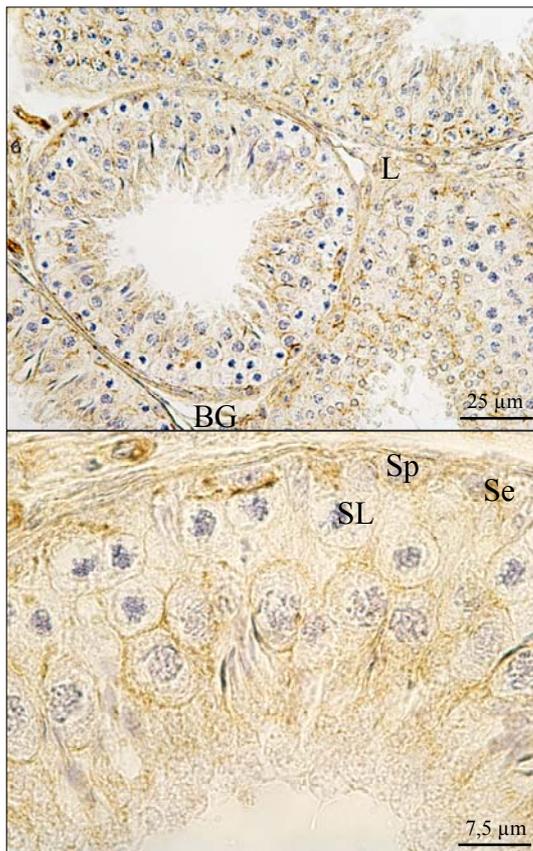


Abb. 3.20 Immunhistochemie des bovinen Testis mit dem Pan-PMCA-Antikörper 5F10. Sowohl Sertoli (Se)- als auch Leydig-Zellen (L) werden markiert. Stark positiv sind Spermatogonien und Leptotän-Spermatozyten I. Ordnung (SL). Auch Blutgefäßzellen (BG) zeigen eine Immunreaktion.

Boviner Nebenhodenkopf und Nebenhodenkörper

Das PMCA Signal ist in diesen beiden Abschnitten des Nebenhodens auf die Peritubulärzellen beschränkt. Die Epithelzellen zeigen allenfalls eine schwache Reaktion auf PMCA (Abb.3.21).



Abb.3.21 Immunhistochemie des bovinen Caput (links) und Corpus (rechts) epididymidis mit dem Pan-PMCA-Antikörper 5F10. Die Reaktion wird bevorzugt im Bereich der Peritubulärzellen (PT) beobachtet, die Epithelzellen der Tubuli (T) zeigen eine allenfalls schwache Reaktion

Boviner Nebenhodenschwanz

Im Gegensatz zu den vorangehenden Abschnitten des Nebenhodens konnte ein Pan-PMCA Signal sowohl in den Peritubulärzellen als auch in den Epithelzellen des Nebenhodenschwanzes nachgewiesen werden. Bevorzugt markiert sind dabei die lateralen Plasmamembranen der Hauptzellen, während die basalen Membranen schwächer reagieren. Auch Endothelzellen angeschnittener Blutgefäße zeigten eine positive Reaktion mit dem Pan-PMCA Antikörper (Abb.3.22).



Abb.3.22 Immunhistochemie der bovinen Cauda epididymidis mit dem Pan-PMCA-Antikörper 5F10. Sowohl Peritubulärzellen (PT) als auch Epithelzellen (T) des Nebenhodenschwanzes sind markiert.

3.2.2.2 Immunhistochemie: PMCA4

Boviner Hoden

Das PMCA4-Signal wurden bevorzugt die späteren Stadien der bovinen Spermatogenese detektiert. Das betrifft in erster Linie die runden und die elongierten Spermatiden. Auch interstielle Zellen, Endothelzellen, Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen zeigen ein positives PMCA4-Signal. Dahingegen sind die Spermatogonien negativ oder allenfalls sehr schwach positiv (Abb.3.23).

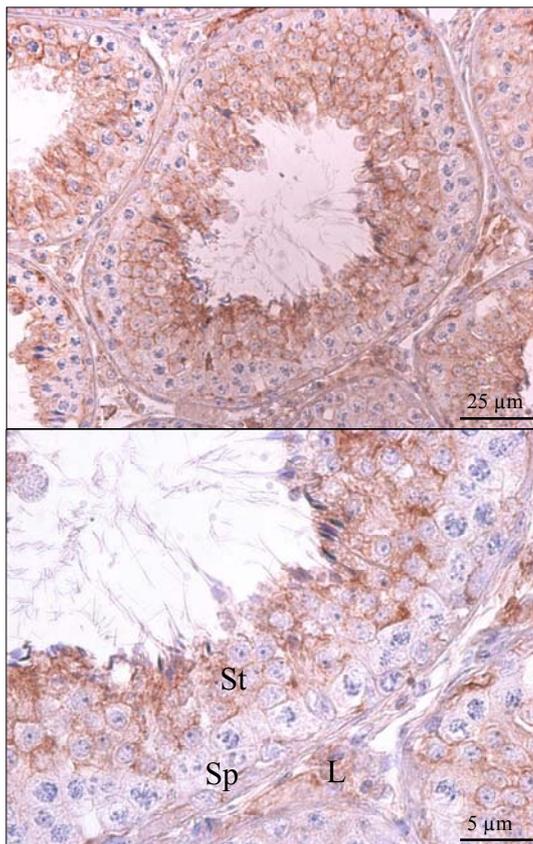


Abb.3.23 Immunhistochemie des bovinen Testis mit dem PMCA4-Antikörper JA9. Eine positive Reaktion zeigen in erster Linie runde und elongierte Spermatiden (St), Spermatogonien (Sp) sind allenfalls schwach positiv. Die Leydig-Zellen (L) zeigen eine positive Reaktion für PMCA4

Boviner Nebenhodenkopf und Nebenhodenkörper

Analog zu der Reaktion mit dem Pan-PMCA-Antikörper 5F10 färbt auch der monoklonale PMCA4-Antikörper bevorzugt den Bereich der Peritubulärzellen. Die Epithelzellen von Caput und Corpus epididymidis des Bullen zeigen eine lediglich sehr schwache Reaktion (Abb. 3.24).

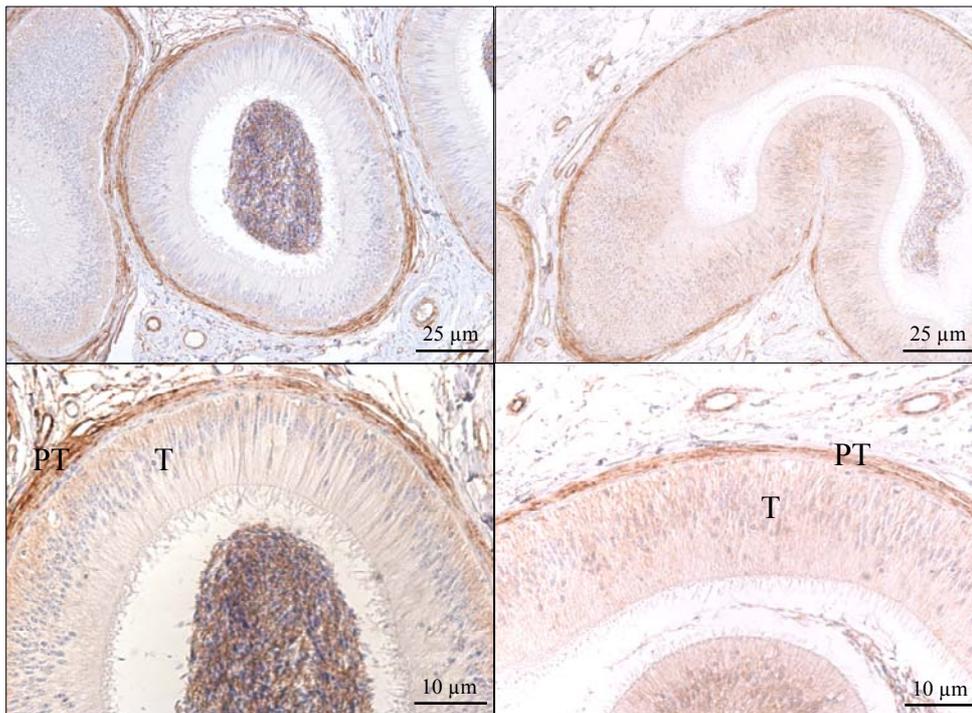


Abb.3.24 Immunhistochemie des bovinen Caput (links) und Corpus (rechts) epididymidis mit dem PMCA4-Antikörper JA9. Eine positive Reaktion findet sich primär im Bereich der Peritubulärzellen (PT). Die Zellen des Tubulus (T) sind in den basalen Bereichen schwach positiv.

Boviner Nebenhodenschwanz

Im Gegensatz zu Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz des Bullen besitzen die Epithelzellen des Nebenhodenschwanzes zu einem relativ hohen Anteil PMCA4 im Bereich ihre basolateralen Membran (Abb.3.25). Dahingegen sind die Peritubulärzellen schwächer angefärbt (Abb.3.25).

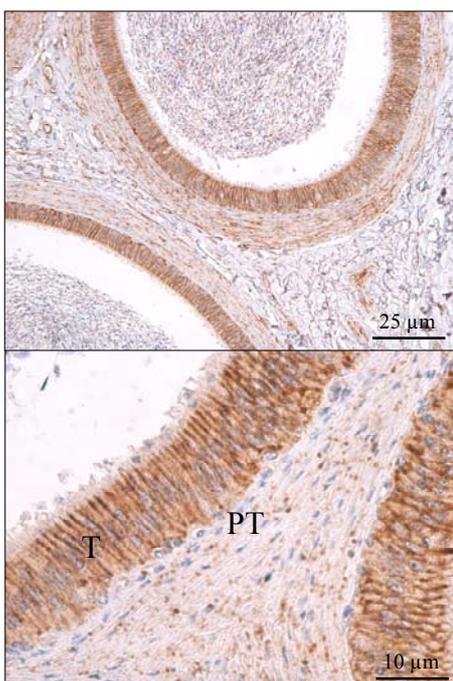


Abb.3.25 Immunhistochemie der bovinen Cauda epididymidis mit dem PMCA4-Antikörper JA9. Die basalen Abschnitte des Epithels sind deutlich positiv (T), die Peritubulärzellen (PT) sind schwächer angefärbt.

3.2.2.3 Immunhistochemie: PMCA4a

Boviner Hoden

Die PMCA-Isoform 4a konnte im bovinen Testis nicht nachgewiesen werden (Abb.3.26).

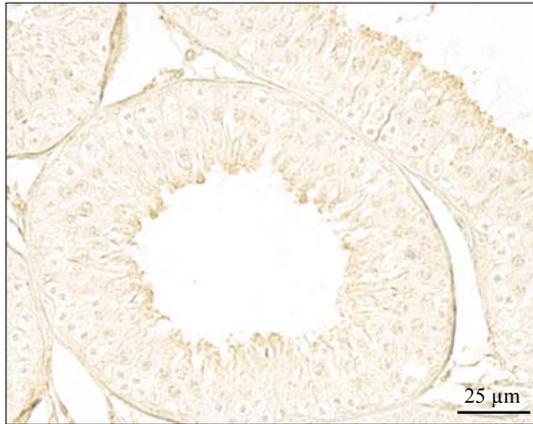


Abb.3.26 Immunhistochemie des bovinen Testis mit dem PMCA4a-Antikörper. Der Antikörper ruft im Bereich des Hodens keine Reaktion hervor.

Boviner Nebenhodenkopf und Nebenhodenkörper

Auch in Nebenhodenkopf wurde keine PMCA4a nachgewiesen (Abb. 3.27).

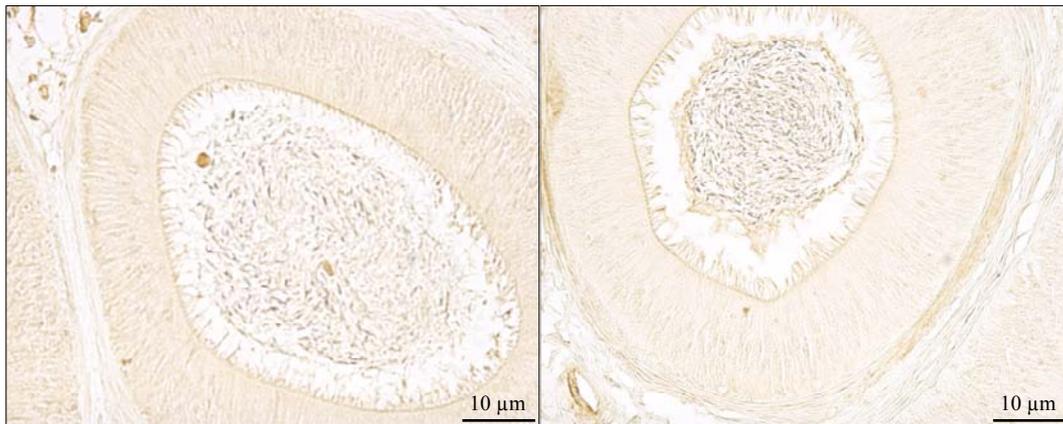


Abb.3.27 Auch die Immunhistochemie des bovinen Caput epididymidis mit dem PMCA4a-Antikörper ist negativ.

Boviner Nebenhodenschwanz

Mit dem von uns etablierten Spleißvarianten-Antikörper gegen die Isoform 4a der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase ergab ein positives Signal im Bereich der apikalen Membran der Epithelzellen des Nebenhodenschwanzes (Abb. 3.28). Dabei reagiert exakt der Abschnitt des Epithels positiv, der bei der Reaktion mit dem JA9-Antikörper gegen die PMCA4 negativ bleibt.

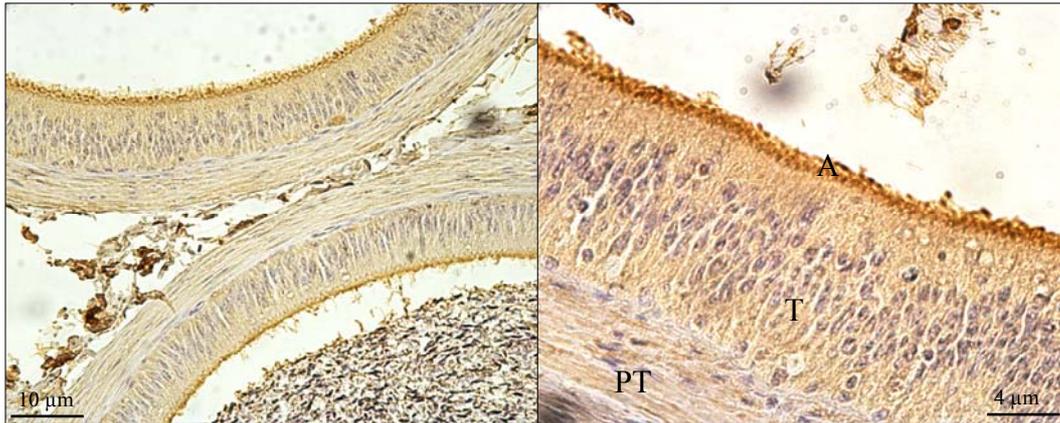


Abb.3.28 Immunhistochemie des bovinen Cauda epididymidis mit dem PMCA4a-Antikörper. Ausgeprägt ist die Reaktion im Bereich der apikalen Membran des Nebenhodenschwanzepithels (A). Peritubulärzellen (PT) und basale Abschnitte der Tubuli (T) sind allenfalls schwach positiv.

3.3 Interaktion der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase mit dem Bläschendrüsensprotein PDC-109

3.3.1 Calcium-ATPase Test – Einfluss von PDC-109 auf die Aktivität der humanen PMCA-Isoformen 2a, 4a und 4b

In der Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie der Mayo Clinic Rochester (Prof. Dr. E. Strehler) wurde der Einfluss von PDC-109 auf die Aktivität der Calcium ATPase der Plasmamembran untersucht. Dazu wurde ein vor dem Verfassen dieser Arbeit etablierter Test mit überexprimierter PMCA in Sf9-Zellmembranen durchgeführt.

Bei den überexprimierten PMCA-Isoformen handelte es sich um die humane PMCA 4a, 4b und 2a. Der Einfluss von PDC-109 wurde anhand kinetischer Messreihen ermittelt. Dazu wurde das PDC-109 in aufsteigenden Mengen zum Ansatz hinzugefügt. Die Umrechnung der Absorption in ATPase-Aktivität wurde anhand der Formel

$$\text{ATPase-Aktivität} = \frac{\text{Steigung} \times 60 \times 0,5 \times 10^{-3} \times 10^6}{11000 \text{ M}^{-1} \times 5 \times 10^{-3} \times \text{Protein (mg/ml)}}$$

durchgeführt.

Dabei entspricht die 60 der Umwandlung von Sekunden in Minuten, 0,5 entspricht dem eingesetzten Volumen (in ml), 10^{-3} ist der Umrechnung ml in l geschuldet, 10^6 der Umrechnung mol in μmol . Im Nenner erscheint 11000M^{-1} als Absorptionskonstante des MESG, 5×10^{-3} dem Volumen des PMCA-Proteins und letztlich wurde auch die Konzentration des eingesetzten Proteins in die Berechnung eingeschlossen.

Insgesamt ergab sich, dass alle untersuchten PMCA-Isoformen in ihrer Aktivität durch steigende Konzentrationen von PDC-109 gehemmt wurden. Ein Vergleich der Hemmungs-Kinetiken ergab jedoch unterschiedliche K_i -Werte für die drei Isoformen (s.Tab. 3.2). Den stärksten hemmenden Effekt übt das PDC-109 auf die hPMCA4b aus. Bei allen Isoformen war nach Zugabe von etwa $50\mu\text{g}$ PDC-109 auf ein Testvolumen von $500\mu\text{l}$ die Aktivität der PMCA um mehr als 90% reduziert. Da Calmodulin der stärkste Aktivator der PMCA ist (s.o.) wurden die Assays sowohl mit als auch ohne Zugabe von Calmodulin durchgeführt, um zu sehen, ob ein qualitativer Unterschied in der Hemmungskinetik durch PDC-109 beobachtet wird oder nicht.

TAB. 3.2 K_i der hPMCA Isoformen 4a, 4b und 2a		
Isoform	Calmodulin eingesetzt?	K_i
hPMCA4a	nein	8,8
hPMCA4a	ja	10,6
hPMCA4b	nein	15,2
hPMCA4b	ja	16,6
hPMCA2a	nein	22,72

In Abbildung 3.29 ist der hemmende Effekt auf alle untersuchten hPMCA-Isoformen dargestellt. Man erkennt eine deutliche Abnahme der ATPase-Aktivität durch die Zugabe von PDC-109.

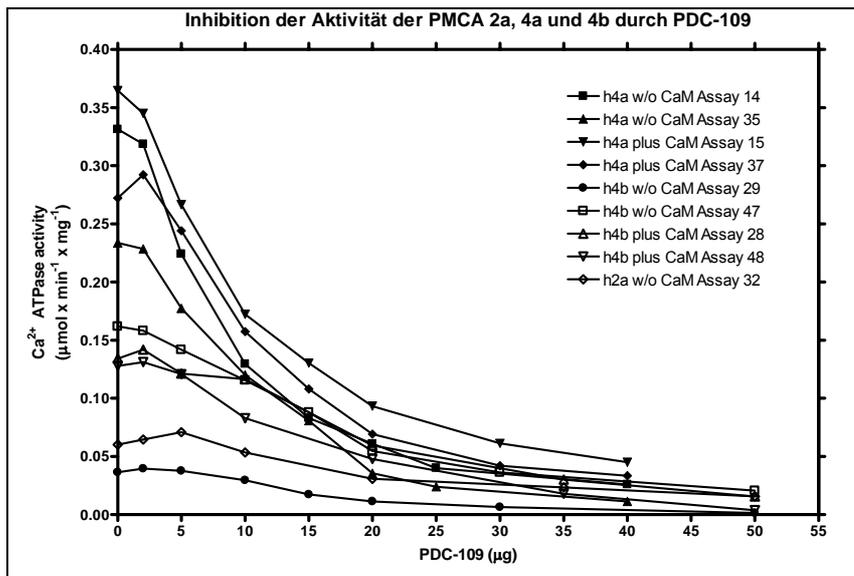


Abb.3.29 Hemmender Einfluss von PDC-109 auf die humanen PMCA-Isoformen 4a, 4b und 2a. h = human, w/o = ohne, CaM = Calmodulin

In Abb. 3.30 ist die Abnahme der Aktivität aller untersuchten PMCA-Isoformen in Prozent der Ausgangsaktivität (i.e. nach Calciumzugabe) dargestellt. Da diese Form der Darstellung weniger von der Ausgangsaktivität der PMCA abhängig ist, verdeutlicht sie den inhibitorischen Effekt des PDC-109 noch eindrucksvoller.

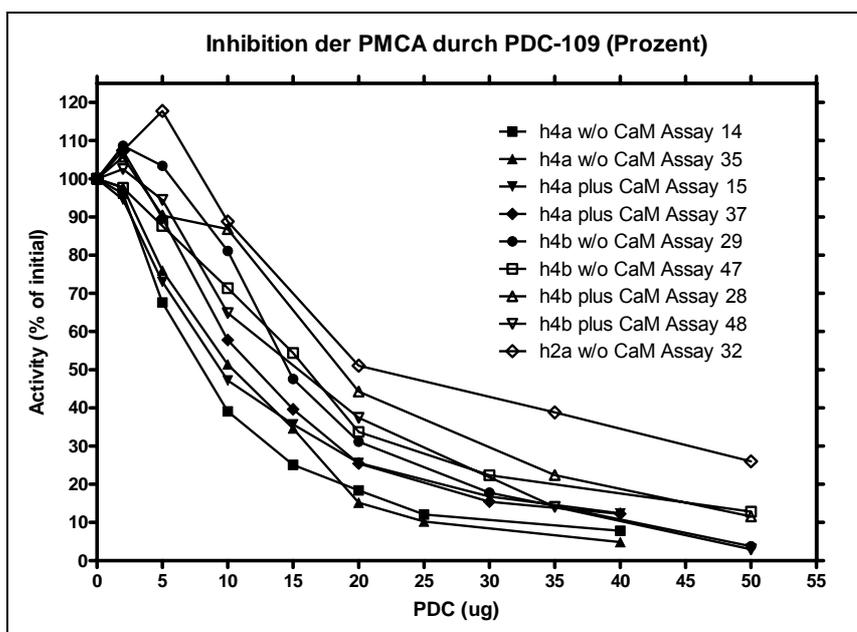


Abb.3.30 Hemmender Einfluss von PDC-109 auf die humanen PMCA-Isoformen 4a, 4b und 2a.

Abb. 3.31 zeigt die Hemmung der hPMCA4a im Vergleich zur Isoform 4b. In Abb. 3.32 ist dieser Vergleich wiederum prozentual dargestellt.

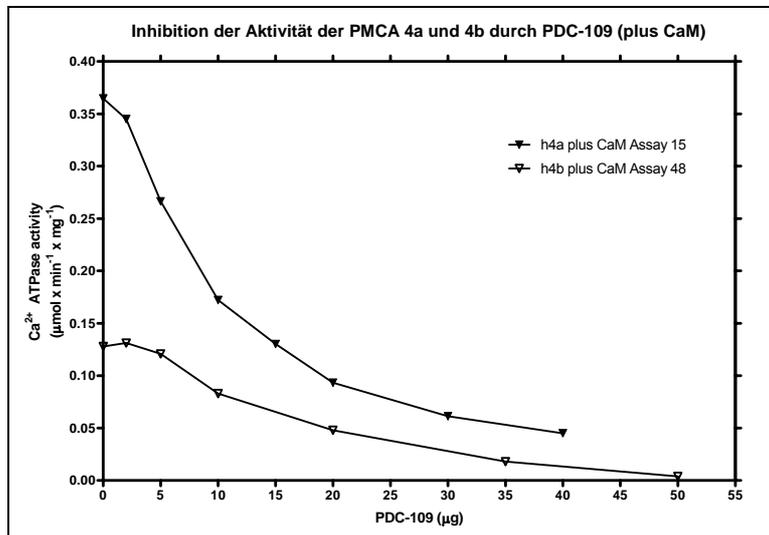


Abb.3.31 Vergleich des hemmenden Einflusses von PDC-109 auf die humanen PMCA-Isoformen 4a versus 4b

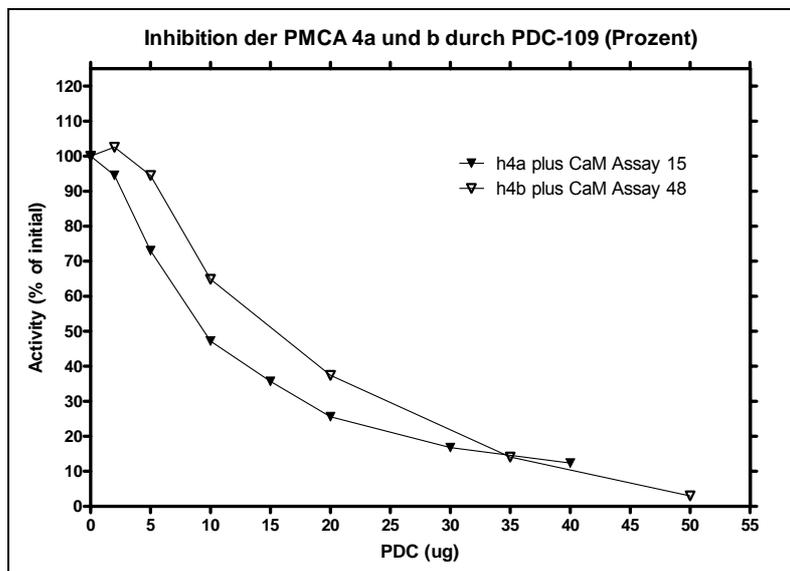


Abb.3.32 Prozentualer Vergleich des hemmenden Einflusses von PDC-109 auf die humanen PMCA-Isoformen 4a versus 4b

3.3.2 Site directed mutagenesis

Um der Frage nachzugehen, ob die Interaktion der PMCA mit dem PDC-109 direkt stattfindet, oder indirekt durch Phospholipide der Plasmamembran, sollten die entscheidenden Tryptophanreste des PDC-109 (s.u.) mutiert werden. Die Bindung von PDC-109 an das Phospholipid Phosphatidylcholin wird über eine sog. π -kationische Interaktion vermittelt. Ich danke an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Röhm, Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg für diesen Hinweis und die methodische Beratung. Die Interaktion findet zwischen der quartären Ammoniumstruktur des Cholins und einem Kern-Tryptophanrest des PDC-109 statt (s.o.). Er wird durch Wasserstoffbrücken der Hydroxylgruppen von zwei Tyrosinresten mit der Phosphatgruppe des Phospholipids stabilisiert. PDC-109 besitzt zwei Module, über die die Interaktion mit Phosphatidylcholin stattfindet. Modul 1 wird durch die Aminosäuren Y30, W47, Y57, Modul 2 durch die Aminosäure Y75, W93, Y100 gebildet. Durch Mutagenese wurden die Kern-Tryptophanreste verändert.

Es wurden zwei Mutanten hergestellt, die statt der Tryptophanreste 47 und 93 jeweils Phenylalaninreste (Mut W47F, W93F) bzw. Histinreste enthalten (Mut W47H, W93H) (Abb. 2.4). Die Effizienz der Mutagenese wurde durch Sequenzierung der mutierten Konstrukte bestätigt (Abb. 3.34, 3.35). Auch zufällige Mutationen in anderen Bereichen der PDC-109-cDNA wurden dadurch ausgeschlossen.

Query	1	GATCAGGACGAAGGTGTTTCTACTGAACCTACCCAAGACGGTCCTGCTGAATTACCTGAA	60
Sbjct	322	GATCAGGACGAAGGTGTTTCTACTGAACCTACCCAAGACGGTCCTGCTGAATTACCTGAA	263
Query	61	GACGAAGAATGCGTTTTTCCCATTCGCTCTATAGAAACAGAAAGCATTGACTGCACAGTG	120
Sbjct	262	GACGAAGAATGCGTTTTTCCCATTCGCTCTATAGAAACAGAAAGCATTGACTGCACAGTG	203
Query	121	CATGGTTCCTTATTCCCGTGGTGTTCCTCGATGCAGACTATGTAGGAAGATGGAAATAC	180
Sbjct	202	CATGGTTCCTTATTCCCGCACTGTTCCTCGATGCAGACTATGTAGGAAGATGGAAATAC	143
Query	181	TGTGCTCAGAGAGACTATGCTAAATGTGTCTTCCCTTTATCTATGGAGGCAAGAAATAT	240
Sbjct	142	TGTGCTCAGAGAGACTATGCTAAATGTGTCTTCCCTTTATCTATGGAGGCAAGAAATAT	83
Query	241	GAGACTTGCACAAAAATTGGGAGTATGTGGATGTCTTGGTGTCTCACTCTCCAAACTAC	300
Sbjct	82	GAGACTTGCACAAAAATTGGGAGTATGTGGATGTCTCACTGTCTCACTCTCCAAACTAC	23
Query	301	GACAAGGACAGAGCT	315
Sbjct	22	GACAAGGACAGAGCT	8

Abb. 3.35 Sequenzierungsergebnis der Mutante W47H,W93H (untere Sequenz = Sbjct). Das Sequenzierungsergebnis wurde gegen die cDNA Sequenz von PDC-109 (obere Sequenz = Query).

3.3.3 Western Blot des rekombinant exprimierten PDC-109

Zum Nachweis der PDC-109-Synthese im rekombinanten Insektenzell-System (s.u.) wurde der Western Blot verwendet. Das Protein mit (His)₆-tag im N-terminalen Bereich wurde zuvor über eine Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Blot zeigt, dass nur im Eluat rekombinantes PDC-109 vorkommt (Abb.3.15). Die Doppelbande entspricht der glykosylierten resp. nicht-glykosylierten Form des PDC-109 mit einem MG von etwa 12.5 kDa. Leider konnte keine für einen Ca²⁺-ATPase Test (s. 1.3.4) ausreichende Menge des rekombinanten PDC-109 gewonnen werden.

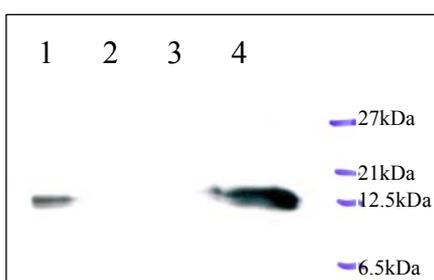


Abb.3.36 Western Blot des rekombinanten und nativen PDC-109

- 1 Rekombinantes PDC-109
- 2 Waschpuffer, der nach Auftragen des Eluats auf die Säulen gegeben wurde
- 3 Durchfluss nach Auftragen des Eluats auf die Säulen, der Großteil des rekombinanten Proteins war an die Säulen gebunden
- 4 aus der Bläschendrüse des Bullen aufgereinigtes, natives PDC-109, das als Kontrolle diente

4 Diskussion

4.1 Expression und Lokalisation der PMCA in den Keimzellen und im Nebenhoden des Bullen

Obwohl der PMCA eine entscheidende Bedeutung im Calciumhaushalt der Zelle zukommt, wurde bis heute keine Krankheit beschrieben, die durch eine veränderte Funktion einer der PMCA-Isoformen hervorgerufen wird.

Erkenntnisse konnten in letzter Zeit dennoch durch das Studium an PMCA-Knock-Out Mäusen gewonnen werden. Ein Verlust der PMCA1 führt zur embryonalen Letalität (Okunade, Miller et al. 2004; Prasad, Okunade et al. 2004). Mäuse mit einem homozygoten Verlust der PMCA2 sind taub und haben eine Gleichgewichtsstörung (Kozel, Friedman et al. 1998). Auch die heterozygote PMCA 2 KO-Maus zeigt eine eingeschränkte Hörfähigkeit (Kozel, Davis et al. 2002). Obwohl PMCA4 knockout Mäuse äußerlich normal erscheinen, sind die Mäuse infertil. Ursächlich ist eine Hypomotilität der Spermien, ihre Spermatogenese und ihr Fortpflanzungsverhalten sind unbeeinträchtigt (Okunade, Miller et al. 2004; Schuh, Cartwright et al. 2004). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten weiterhin, dass der Motilitätsapparat der Spermienchwänze unbeeinträchtigt erschien, gleichzeitig zeigte sich jedoch eine erhöhte Inzidenz mitochondrialer Kondensation als Zeichen eines Calcium – Overloads (Okunade, Miller et al. 2004).

Durch RT-PCR und Western Blot konnte gezeigt werden, dass PMCA4 die vorherrschende Isoform im Testis der Maus ist und über 90% der PMCA-Proteine in Spermien ausmacht (Okunade, Miller et al. 2004). Die PMCA4 ist im Hauptstück des Spermienchwanzes lokalisiert (Okunade, Miller et al. 2004; Schuh, Cartwright et al. 2004), ebenso wie CatSper, der wichtige Calciumkanal in der Spermienmembran (Ren, Navarro et al. 2001). Auch ein Knock-Out dieses Enzyms führt interessanterweise zu männlicher Infertilität, hervorgerufen durch die Unmöglichkeit, die Spermien in einen hyperaktiven Zustand zu versetzen (Ren, Navarro et al. 2001).

Insgesamt könnte die Co-Lokalisation des zentralen Calcium-Influx und –Efflux Systems die optimale Regulation der Calciumkonzentration um das Axonem ermöglichen. Gleichzeitig könnte das Mitochondrium vor exzessiven Calcium-Konzentrationen geschützt werden (Prasad, Okunade et al. 2004).

Um zu untersuchen, welche die vorherrschende PMCA-Isoform in den Geschlechtsorganen des Bullen ist, wurde in dieser Arbeit zunächst RT-PCR an bovinen Testes und Epididymides durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass im bovinen Hoden die PMCA-Isoformen 1, 2 und 4 exprimiert werden. Dies wurde auch durch die *in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden bestätigt. Die Spermatogonien weisen dabei ein stärkeres mRNA-Signal auf als die späteren Spermatogenese Stadien. Auch die Immunhistochemie bestätigte das Vorhandensein der PMCA im Hoden. Eine positive Reaktion wurde dort durch den Pan-PMCA Antikörper 5F10 hervorgerufen. Dabei waren die Reaktionen in späteren Stadien der Spermatogenese deutlicher als in den Spermatogonien, was mit dem natürlichen Ablauf der Spermatogenese und der Proteinbildung und Reifung in Einklang steht. Eine Differenzierung des Pan-PMCA-Signals war nicht möglich, da nur der Antikörper gegen humane PMCA4 mit bovinen Organen kreuzreagiert, nicht aber die Antikörper gegen humane PMCA1 resp. humane PMCA2. Die Immunhistochemie mit dem PMCA4-Antikörper JA9 zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster wie die Pan-PMCA Reaktion. Die identifizierte PMCA-Lokalisation und –Expression deckt sich mit der PMCA-Verteilung die im Rattenhoden beobachtet wurde (Wilhelm, Brandenburger et al. 2008). Da der polyklonale Antikörper gegen die Isoform 4a im Hoden keine Reaktion zeigte, dürfte in diesem Gewebe die PMCA4b die vorwiegende Isoform sein.

Im Nebenhoden war das Expressionssignal weitaus vielfältiger. Die PMCA1 ist in allen Abschnitten des Nebenhodens exprimiert, die Isoform 2 der PMCA wird hingegen im Nebenhoden des Bullen nicht gebildet. Von der PMCA3 wird bisher angenommen, dass sie primär von neuronalen Zellen exprimiert wird (Stahl, Eakin et al. 1992; Stauffer, Guerini et al. 1997). Wir konnten allerdings auch eine Expression, beschränkt auf den Nebenhodenkopf, detektieren.

Ob diese Expression allerdings auch auf die Proteinebene durchschlägt, konnte aufgrund eines fehlenden bullenspezifischen Antikörpers nicht gezeigt werden. Am interessantesten war das Expressions- und Verteilungsmuster der PMCA4 im bovinen Nebenhoden. In der PCR zeigten sich drei unterschiedliche Banden, die allesamt unterschiedlichen Spleißvarianten der PMCA4 entsprechen. Dabei konnte die mittlere Bande, die das schwächste Signal in der PCR erzeugte, keiner Spleißvariante zugeordnet werden. In der Literatur konnte auch kein vergleichbares Ergebnis gefunden werden. Nach Meinung von Professor Strehler (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) handelt es sich hier am wahrscheinlichsten um ein blindes Produkt, welches nicht in ein Protein übersetzt wird (persönliche Mitteilung). Bei den anderen beiden Banden handelt es sich um die beiden Spleißvarianten PMCA4a und 4b. Dabei ändert sich das Expressionsmuster von der Nebenhodenkörperregion zum Nebenhodenschwanz abrupt. Sowohl im Nebenhodenkopf als auch im Nebenhodenkörper ist die kleinere Spleiß-Variante 4b dominierend, während im Nebhodenschwanz vor allem die größere Spleiß-Variante, die PMCA4a gebildet wird. Die Isoform 4b bildet in der PCR die kleinere Bande ab, da ihr das Exon C durch alternatives Spleißen im Vergleich zur Isoform 4a fehlt. Da durch das Spleißen jedoch der Leserahmen verschoben wird, stellt die PMCA4b das größere Protein (Strehler and Zacharias 2001). Um das Vorhandensein der PMCA4 in Spermien aus unterschiedlichen Nebenhodenabschnitten des Bullen zu untersuchen, wurden Western-Blot Analysen aus Spermienmembranen und Hodengewebe mit den Antikörpern gegen Pan-PMCA, PMCA4 und gegen die Spleißvariante PMCA4a angeschlossen. Die Größe der humanen PMCA1 beträgt etwa 139 kDa. Die PMCA4a ist etwa 128 kDa groß, die Größe der PMCA4b liegt bei etwa 133 kDa (Carafoli 1992; Caride, Filoteo et al. 1996; Strehler and Zacharias 2001). Im Western-Blot mit dem Pan-PMCA Antikörper 5F10 stellen sich unterschiedliche Banden zwischen Nebenhodenkopf-Spermienmembranen und den isolierten Membranen aus dem Nebenhodenschwanz dar. Im Nebenhodenkopf wurde eine kleinere Bande als im Nebhodenschwanz nachgewiesen. Dies beruht vermutlich darauf, dass auch andere Isoformen als die PMCA4 durch den Pan-PMCA-Antikörper detektiert werden.

Der PMCA4-Western Blot zeigt, dargestellt durch den monoklonalen Antikörper JA9, dass die PMCA aus Spermienmembranen der Nebenhodenschwanz-Spermien und Nebenhodenschwanz-Spermien unterschiedlich groß ist. Entscheidend war der Western-Blot mit dem polyklonalen Antikörper gegen die bovine PMCA4a. Ein positives Signal lieferte lediglich die Membranpräparation der Nebenhodenschwanzspermien, während die Nebenhodenschwanzspermien keine PMCA4a in ihrer Membran besitzen. Die Western Blot-Untersuchungen mit Membranpräparationen aus Hodengewebe bestätigen zudem die immunhistochemischen Ergebnisse, dass im bovinen Testis die PMCA4a nicht gebildet wird.

Andere Erklärungsmöglichkeiten für den abrupten Größenwechsel der PMCA4 wären zum einen, dass die Spermien-PMCA4b während ihres Transports durch Proteolyse verkleinert würde. Allerdings wurde eine solche Proteolyse der PMCA bisher nicht in der Literatur beschrieben. Zum anderen könnte das Verhalten der Banden im Western Blot auch dadurch zustande kommen, dass die PMCA4b in der Spermienmembran während des epididymalen Transports dephosphoryliert wird. Auch dies wurde jedoch nicht in der Literatur beschrieben. Beide Möglichkeiten würden zudem nicht erklären warum die Membranpräparation der Nebenhodenschwanzspermien ein Signal im Western Blot mit dem AK gegen PMCA4a zeigen.

Um Erkenntnisse über die Lokalisation der PMCA im Keimepithel und dem Nebenhoden des Bullen zu gewinnen, wurden immunhistochemische Untersuchungen angeschlossen. Sowohl der Pan-PMCA-Antikörper als auch der PMCA4-Antikörper reagieren im Nebenhodenschwanz und -körper bevorzugt mit Peritubulärzellen. Dahingegen zeigen im Bereich des Nebenhodenschwanzes vor allem die basolateralen Membranen des Epithels eine positive Reaktion. Die Färbung mit dem von uns hergestellten Antikörper gegen die PMCA4a des Bullen ergab jedoch lediglich ein Signal im Nebenhodenschwanz des Bullen.

Dort wurde eine Lokalisation der PMCA4a am apikalen Pol und den Abschnürungen in diesem Bereich, den sog. Epididymosomen oder Aposomen gezeigt. Die Isoform 4a wurde im Bereich der apikalen Membran detektiert. Warum der JA9-Antikörper die apikal lokalisierte PMCA4a nicht darstellt bleibt unklar. Eigentlich handelt es sich um einen Antikörper gegen alle Spleißvarianten der PMCA4 und dementsprechend müsste er auch die PMCA4a erkennen (Caride, Filoteo et al. 1996; Filoteo, Elwess et al. 1997). Offensichtlich scheint der JA9-Antikörper jedoch die Variante 4b besser zu detektieren als die PMCA4a. Dies könnte in erster Linie mit der unterschiedlichen dreidimensionalen Struktur dieser beiden unterschiedlichen Spleißvarianten zusammenhängen. Diese Eigenschaft des Antikörpers JA9 wurde in der Literatur noch nicht beschrieben, was dadurch erklärt werden kann, dass bisher kein Antikörper gegen die Spleißvariante 4a publiziert wurde. Die apikale Lokalisation von PMCA4a im Epithel des Nebenhodenschwanzes könnte auf eine Übertragung der PMCA4a auf bovine Spermien hindeuten und wird im Abschnitt 4.2 diskutiert.

Die Hauptaufgabe des Nebenhodenschwanzes besteht nach aktueller Literatur in der Speicherung der Spermien. Nebenhodenkopf und –körper hingegen sind stärker als der Nebenhodenschwanz an der Reifung von Spermien beteiligt (Cooper 1995; Cooper 1996). Wahrscheinlich verlangen diese unterschiedlichen Aufgaben verschiedene Mechanismen der Calciumregulation im bovinen Nebenhoden.

Eine konzentrierte basolaterale Verteilung der PMCA4 wurde in anderen resorptiven Geweben wie Darm und distale Nierentubuli gezeigt (Friedman and Gesek 1995; Hoenderop, Dardenne et al. 2002; Larsson and Nemere 2002). In sekretorischem Epithel wie den Azinuszellen des Pankreas, Speicheldrüsenzellen oder der Koagulationsdrüse der Ratte ist die PMCA vorwiegend am apikalen Pol lokalisiert (Belan, Gerasimenko et al. 1996; Lee, Xu et al. 1997; Post, Wiche et al. 2001). Auch in der Brustdrüse des Menschen ist die PMCA (Isoform 2) apikal lokalisiert (VanHouten and Wysolmerski 2007). Der Nebenhoden kombiniert resorptive und sekretorischen Funktionen (Cooper 1999).

Die Verteilung der PMCA4 insbesondere im Nebenhodenschwanz des Bullen lässt vermuten, dass die PMCA4 essentiell am transzellulären Calciumtransport beteiligt ist.

Das stärkere PMCA4-Signal in den Peritubulärzellen im Vergleich zu den Epithelzellen des Nebenhodenkopfes- und -körpers widerspricht scheinbar den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung. Dort war das PMCA4-Signal in den Epithelzellen stärker als in den Peritubulärzellen nachweisbar. Erklärt wird dies am ehesten durch die unterschiedlichen Teilungsaktivitäten dieser Zelltypen. Während die Peritubulärzellen langlebige Zellen sind und dementsprechend einen relativ niedrigen mRNA-Gehalt besitzen, verhält sich die bei den epididymalen Epithelzellen genau umgekehrt (Francavilla, De Martino et al. 1983). Die Isoform 4a wurde im Bereich der apikalen Membran detektiert. Der monoklonale PMCA4-Antikörper JA9 färbt die basolateralen Abschnitte im Nebenhodenschwanzepithel an.

Im Nebenhoden der Ratte ist die PMCA4 in den basolateralen Plasmamembranen des Caput epididymidis lokalisiert. Im Corpus und der Cauda epididymidis der Ratte ist die PMCA4 nur im Bereich der Peritubulärzellen nachweisbar. Auch ein Unterschied zwischen den beiden Spleißvarianten PMCA4a und 4b wird auf RNA-Ebene im Bereich des Nebenhodens der Ratte nicht beobachtet (Wilhelm, Brandenburger et al. 2008). Somit scheint das Ergebnis dieser Arbeit nicht auf alle Säugstierspezies übertragbar zu sein. Für den Menschen liegen zu diesem Thema noch keine Arbeiten vor.

Die Expression der PMCA-Isoformen in den bovinen Organen Herz, Leber und Gehirn, decken sich mit den in der Literatur vorhandenen Daten (Strehler and Zacharias 2001). So kommen im Zentralnervensystem des Bullen alle 4 PMCA-Isoformen vor. Sowohl im Herz als auch in der Leber werden hingegen nur die ubiquitären Isoformen 1 und 4 exprimiert. Insbesondere in der Leber ist der Proteingehalt der PMCA niedrig.

Über die funktionale Spezifität der unterschiedlichen PMCA-Isoformen und auch ihrer vielen Spleißvarianten ist bisher wenig bekannt. Vermutlich hängt sie mit dem unterschiedlichen Calciumbedarf der Gewebe und dem jeweiligen Zellzyklus zusammen. In überexprimierten Zellen konnten Domi et al. zeigen, dass die ubiquitären PMCA-Isoformen 1 und 4 weniger effektiv bei der Beseitigung intrazellulärer Calcium-Peaks waren, als die Isoformen 2 und 3 (Domi, Di Leva et al. 2007).

Ein Nachweis der Lokalisation der PMCA4 in der Spermienmembran des Bullen wurde mehrfach versucht. Leider lieferte die Immunzytochemie mit den bekannten PMCA-Antikörpern sehr divergente und damit letztlich nicht verwertbare Ergebnisse. In Zukunft werden diese aber hoffentlich gewonnen werden können.

4.2 Der apokrine Sekretionsmechanismus und seine mögliche Bedeutung für die Ausstattung boviner Spermien mit der PMCA-Isoform 4

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass bovine Keimzellen originär im Hoden mit der PMCA4b ausgestattet werden und diese Spleißvariante auch noch in Nebenhodenschwanz-Spermien nachzuweisen ist. Interessanterweise haben die Untersuchungen aber klar belegt, dass die vorherrschende Spleißvariante in Nebenhodenschwanz-Spermien die PMCA4a ist. Die entscheidende Frage ist demnach, wie es zu diesem Spleißvariantenwechsel kommt. Eine Möglichkeit der Erklärung dieses Wechsels könnte die Übertragung von Membranvesikeln mit PMCA4a auf die Nebenhodenschwanzspermien im Sinne eines apokrinen Sekretionsmechanismus sein.

Bei allen Säugetierspezies finden beim Transport der Spermien durch den Nebenhoden Reifungsprozesse statt, die für die spätere Befruchtung der Eizelle essentiell sind. Tatsächlich bildet und sezerniert das Epithel des Nebenhodens unter dem Einfluss von Androgenen zahlreiche Proteine (Hermo, Oko et al. 1994).

Zwischen diesen Proteinen und der Spermienoberfläche finden Interaktionen statt, die für die spätere Funktionalität der Spermien unerlässlich sind (Holland, Harlos et al. 1987; Jones 1998). Einige dieser Proteine werden als integrale Membranproteine in die Spermienmembran integriert (Yeung, Cooper et al. 1998).

So konnte gezeigt werden, dass GPI-Anker-Proteine, die assoziiert mit Membranvesikeln des Nebenhodens sind, übertragen werden, indem die gesamten Vesikel in die Membran integriert werden (Kirchhoff and Hale 1996). Diese können dann eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit der Zona pellucida innehaben, so wie etwa das Protein P26h des Hamsters (Berube and Sullivan 1994). Auch bei anderen Spezies wie der Maus (Begin, Berube et al. 1995), dem Menschen (Boue, Berube et al. 1994) und dem Bullen konnten solche Proteine identifiziert werden. Es trägt beim Bullen den Namen P25b und ist ein GPI-Ankerprotein (Lessard, Parent et al. 2000). Häufig sind die Proteine mit Vesikeln im Bereich des Nebenhodens oder der humanen Prostata assoziiert.

Die Membranvesikel des Nebenhodens werden Epididymosomen genannt (Lindahl, Tagesson et al. 1987; Legare, Berube et al. 1999). Wegen ihrer Ähnlichkeit zu humanen Prostatosomen (s.u.) werden die Epididymosomen auch als Prostatome-like Particles (PLPs) bezeichnet (Frenette and Sullivan 2001).

Die genauen Mechanismen der Epididymosomen-Spermatozoen-Interaktion sind insgesamt wenig untersucht und wenig verstanden. Die Arbeitsgruppe um Robert Sullivan hat die Interaktion zwischen den epididymalen Spermien und den Epididymosomen in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei konnten sie zeigen, dass mehrere verwandte Proteine von den Epididymosomen auf die Spermienmembran übertragen werden, allerdings konnte die Identität dieser Proteine bisher nicht geklärt werden (Frenette, Lessard et al. 2002). Interessanterweise interagieren Epididymosomen aus verschiedenen Nebenhodenabschnitten auch unterschiedlich mit den Spermatozoen (Sullivan, Frenette et al. 2007).

Insgesamt ist der Proteintransfer von Epididymosomen auf Spermien abhängig von der Übertragungsdauer, dem pH-Wert, der Temperatur und zudem ist er effektiver in der Anwesenheit von Zink. Einige der Proteine werden in sogenannte Lipid Raft-Domänen der Epididymosomen abgesondert und selektiv auf Raft-Domänen der Spermien-Plasmamembran übertragen (Sullivan, Frenette et al. 2007). Die Epididymosomen spielen somit eine wichtige Rolle bei der Spermienreifung während des epididymalen Transports.

Beschrieben sind auch Interaktionen von Vesikeln der humanen Prostata mit Spermien. Diese Vesikel werden als Prostatosomen bezeichnet. Prostatosomen sind multivesikuläre Partikel, die erstmals in den 1980er Jahren als Bestandteil des humanen Ejakulats beschrieben wurden (Ronquist and Brody 1985). Es wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die mit Prostatosomen assoziiert resp. in sie integriert sind. Dazu zählen die 5'-Nukleotidase (Fabiani and Ronquist 1993; Aumuller, Renneberg et al. 1997), Neutrale Endopeptidase (Renneberg, Albrecht et al. 2001), Alkalische Phosphatase (Fabiani and Ronquist 1995), Aminopeptidase N (Laurell, Weiber et al. 1982) und auch die PMCA (Ronquist, Brody et al. 1978).

Der Arbeitsgruppe um Arienti ist es gelungen, die humanen Prostatosomen mit Spermien bei saurem pH zu fusionieren (Arienti, Carlini et al. 1997). Sie leiteten aus dieser Übertragung eine mögliche Schutzfunktion der Prostatosomen gegenüber dem später auf die Spermien treffenden sauren pH-Milieu ab. Die Membranzusammensetzung der Prostatosomen unterscheidet sich deutlich von der Zusammensetzung der Spermienmembran. In der Prostatosomenmembran kann das Cholesterol:Phospholipid-Verhältnis bis zu 2:1 betragen, dabei stellt Sphingomyelin das häufigste Phospholipid dar (Arvidson, Ronquist et al. 1989). Die Spermienmembran enthält dagegen nur geringe Mengen Cholesterol und die Haupt-Phospholipide sind Phosphatidylcholin und -ethanolamin. Daher nimmt der Cholesterolgehalt in der Spermienmembran durch die Fusion mit Prostatosomen zu, die Fluidität der Membran nimmt deutlich ab (Carlini, Palmerini et al. 1997).

Ob die PMCA 4a beim Transport durch den Nebenhodenschwanz auf die bovinen Spermien übertragen wird, ist eine der zentralen Fragen dieser Arbeit. Einige Evidenz spricht für diese Theorie. Zum einen findet zwischen dem Nebenhodenkörper und dem Epithel des bovinen Nebenhodenschwanzes ein Expressionswechsel von der PMCA4b zur Spleißvariante 4a statt (Abb. 3.4). Zum anderen ist es gelungen, die PMCA4a im Nebenhodenschwanz des Bullen erstmals als Protein am apikalen Zellpol der Epithelzellen zu detektieren (Abb. 3.28). Sie wird von diesen offensichtlich in die Membran der bovinen Epididymosomen integriert und könnte dann von diesen auf die Nebenhodenschwanz-Spermien übertragen werden. Allerdings ist der Spleißvarianten-Wechsel im Nebenhoden und den Nebenhoden-Spermien allein kein Beweis für eine Übertragung der PMCA4a auf die bovinen Spermien.

Eine genaue Untersuchung des Übertragungsmechanismus wird Gegenstand zukünftiger Studien sein. So schließt sich die Frage an, ob lediglich einzelne Membranfragmente im Bereich des Spermischwanzes oder -kopfes ausgetauscht oder integriert werden, oder ob es sich um einen Austausch gesamter Membranen und Abbau der alten Membran handelt.

4.3 Identifizierung der bovinen PMCA4-Spleißvarianten a und b und Vergleich der Sequenzen mit denen anderer Säugetierspezies

Über die Expression der Plasmamembran-gebundenen Ca^{2+} -ATPase im Bullen ist wenig bekannt. Die Expression aller vier PMCA-Isoformen in dem Linsenepithel des Bullen wurde 2000 gezeigt (Bian, Zeng et al. 2000).

Mandal et al. konnten die PMCA 2006 aus der glatten Muskulatur der Bronchialarterien des Bullen aufreinigen und rekonstituieren (Mandal, Das et al. 2006). Yamagishi et al. zeigten die Expression der PMCA1 und 4 im bovinen Duodenum (Yamagishi, Miyazaki et al. 2006). Eine Untersuchung zur Expression von PMCA2 und 4 im Euter der Kuh legten Prapong et al. 2005 vor (Prapong, Reinhardt et al. 2005).

Die Gesamtsequenz der bovinen PMCA1 wurde 2002 publiziert (Santos, Schoffemeer et al. 2002). Die kodierende Region der bovinen PMCA1 hat eine 95%-ige Identität mit der humanen PMCA1 (Santos, Schoffemeer et al. 2002). Das vorhergesagte Protein hat eine Identität von 98% mit der humanen PMCA1 (Santos, Schoffemeer et al. 2002). Insbesondere die funktionellen und regulatorischen Untereinheiten des Proteins scheinen dabei hochkonserviert (Verma, Filoteo et al. 1988).

Die Sequenzen der übrigen bovinen PMCA-Isoformen waren bis dahin allenfalls fragmentarisch bekannt. In dieser Arbeit werden die Gesamtsequenzen der PMCA4a und 4b erstmalig kloniert und sequenziert. Auf DNA-Ebene besitzt die bovine PMCA4a aus dem Nebenhoden eine 88%-ige Übereinstimmung mit der humanen Sequenz, für die bovine Isoform 4b liegt die Übereinstimmung bei 89% (Brandt, Neve et al. 1992). Auf Proteinebene beträgt die Ähnlichkeit zwischen boviner und humaner PMCA4a sogar beinahe 91%, für die Isoform 4b liegt die Übereinstimmung bei 89% (Howard, Legon et al. 1993). Auch der Sequenzvergleich der bovinen PMCA4a und b mit den Sequenzen anderer Säugetierspezies ergab große Ähnlichkeiten. Sie beträgt auf DNA-Ebene für die Isoform 4a im Vergleich zum Hund 90% (Abramowitz, Aydemir-Koksoy et al. 2000), der Ratte 83% (Howard, Legon et al. 1993; Keeton, Burk et al. 1993) und der Maus 82% (De Jaegere, Wuytack et al. 1993). Für die bovine PMCA4b sieht der Vergleich wie folgt aus:

Hund 90% (Abramowitz, Aydemir-Koksoy et al. 2000), Ratte 83% (Howard, Legon et al. 1993; Keeton, Burk et al. 1993) und Maus 83% (De Jaegere, Wuytack et al. 1993). Die PMCA4 scheint damit bei den Säugetieren hochkonserviert, ähnlich wie dies bereits für die PMCA1 bekannt ist.

Aufgrund der gelungenen Klonierung und Sequenzierung der beiden PMCA4-Spleißvarianten a und b war es möglich, einen Antikörper gegen die Spleißvariante 4a herzustellen.

4.4 Die physiologische Bedeutung der PMCA4-Spleißvarianten a und b in bovinen Spermien

Die Frage, die es zu beantworten gilt ist, warum Spermien aus dem Nebenhodenkopf mit der PMCA4b und Spermien aus dem Nebenhodenschwanz mit der PMCA4a ausgestattet sind und welche funktionellen Konsequenzen sich möglicherweise daraus ableiten lassen.

Im Ruhezustand besitzt die PMCA eine geringe Ca^{2+} -Affinität mit einer Michaelis-Menten-Konstante von $K_m > 10\mu\text{M}$. So wäre sie bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration inaktiv. Jedoch beeinflussen verschiedene Metaboliten und Interaktionspartner ihre Ca^{2+} -Affinität.

Der am längsten bekannte Interaktionspartner der PMCA ist Calmodulin (Jarrett and Penniston 1978). Die etwa 30 Aminosäuren lange Calmodulin-Bindungsstelle befindet sich C-terminal (James, Maeda et al. 1988). (Enyedi, Vorherr et al. 1989) (Abb. 1.3). Herrschen in der Umgebung der PMCA niedrige Calciumkonzentrationen ($< 50 - 100\text{nM}$), dann befindet sich die PMCA in einem auto-inhibierten Zustand. Dazu lagert sich der C-Terminus an die erste und zweite intrazelluläre Schleife der Pumpe an (Falchetto, Vorherr et al. 1992) und verhindert dadurch die Bindung von Calcium. Bei niedrigem intrazellulärem Calciumgehalt ist das Calmodulin inaktiv. Erst nach Bindung von mindestens zwei Ca^{2+} -Ionen wird es zu Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert. Das Ca^{2+} -Calmodulin ist in der Lage, die PMCA-Inhibition aufzuheben und damit die hochaffine Ca^{2+} -Bindungsstelle freizulegen. Interessanterweise hat das alternative Spleißen in der C-terminalen Region einen direkten Einfluss auf Calmodulin-Bindung (Penniston and Enyedi 1998; Strehler and Zacharias 2001). So hat die PMCA-Isoform 2b die höchste Affinität zu Calmodulin ($K_D \sim 2 \text{ nM}$), gefolgt von PMCA2a und 4b ($K_D \sim 5-10 \text{ nM}$) und schließlich PMCA 4a ($K_D \sim 50 \text{ nM}$) (Elwess, Filoteo et al. 1997; Caride, Elwess et al. 1999). Ist ein Threoninrest (Thr 1102) in der Calmodulin-Bindungsstelle phosphoryliert, so ist die Interaktion des Calmodulins zur PMCA geschwächt (Hofmann, Anagli et al. 1994). Diese Phosphorylierung verringert die Aktivität der PMCA-Isoform 4 (Enyedi, Verma et al. 1996).

Die beiden PMCA-Spleißvarianten 4a und 4b unterscheiden sich demnach in dem Mechanismus der Calmodulin-Bindung und damit in der Kinetik ihrer Aktivierung (Caride, Filoteo et al. 2007). So wird die PMCA4a etwa doppelt so stark durch Calmodulin aktiviert wie die Spleißvariante 4b, obwohl ihre Calmodulin-Affinität niedriger ist als die der PMCA4b (Brini, Coletto et al. 2003). Auch die Inaktivierung der PMCA4a nach Calmodulin-Entfernung ist sehr viel schneller als bei der PMCA4b (Caride, Filoteo et al. 2007). Da nach unseren Ergebnissen die Ausstattung der bovinen Spermien im Nebenhodenschwanz mit PMCA4a wahrscheinlich ist, so könnte durch den Spleißvariantenwechsel ein erhöhter Calciumturnover ermöglicht werden. Dieser könnte eine wichtige Voraussetzung für die Versetzung des Spermiums in den hyperaktivierten Zustand sein.

Abgesehen von Calmodulin sind zahlreiche weitere Faktoren an der Regulation der PMCA beteiligt. So ist der C-Terminus reich an Serin und Threoninresten, deren freie OH-Gruppen Ziel der Proteinkinasen A und C sind (Enyedi, Verma et al. 1996; Enyedi, Elwess et al. 1997; Zylinska, Guerini et al. 1998). Die Phosphorylierung von Tyrosin 1176 der PMCA4b führt zur Inaktivierung des Enzyms in humanen Thrombozyten (Zabe and Dean 2001). Außerdem sind saure Phospholipide in der Lage, die PMCA zu aktivieren (Niggli, Adunyah et al. 1981; Enyedi, Flura et al. 1987; Papp, Sarkadi et al. 1989; Brodin, Falchetto et al. 1992). Die Behandlung mit C-terminalen Proteasen wie Trypsin oder Calpain verringern ebenso die K_m wie die Dimerisierung und Oligomerisierung in der carboxyterminalen Domäne der PMCA (James, Vorherr et al. 1989; Wang, Roufogalis et al. 1990). Weiterhin unterliegt die PMCA-Genexpression der hormonellen Kontrolle (Kuo, Wang et al. 1991). Sowohl der PKC-Aktivatoren Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als auch ein cAMP Analogon stimulierten die Expression der PMCA1 in Aorta-Zellen der Ratte (Kuo, Wang et al. 1991). Auch Angiotensin II erhöht den mRNA-Gehalt dieser Zellen (Kuo, Wang et al. 1991).

Die intestinale PMCA-Expression wird durch Calcitriol, das aktive Vitamin D-Hormon gesteigert (Zelinski, Sykes et al. 1991). Zudem haben volatile Anästhetika einen Einfluss auf die Funktion der PMCA (Franks, Horn et al. 1995; Lopez, Zelent et al. 2000). Das die PMCA umgebende Phospholipid-Milieu spielt schließlich auch eine nicht unerhebliche funktionelle Rolle. So wird die PMCA durch saure Phospholipide wie Phosphatidylserin und Phosphatidyl-Inositolphosphate stimuliert (Niggli, Adunyah et al. 1981; Choquette, Hakim et al. 1984; Missiaen, Raeymaekers et al. 1989). Schließlich benötigt PMCA in den meisten Organen Mg^{2+} als Cofaktor (Robinson 1976; Carafoli and Crompton 1978; Niggli, Penniston et al. 1979). Bei all diesen Faktoren ist es aber nach aktueller Literatur nicht bekannt, ob sich die „a“ und „b“ Spleißvarianten unterschiedlich verhalten, sodass hier keine funktionelle Schlussfolgerung für die unterschiedliche Ausstattung der Nebenhodenspermien getroffen werden kann.

Die PMCA ist mit weiteren Proteinen assoziiert (Abb. 1.7) (Ruknudin and Lakatta 2007). Von der Isoform 4b ist bekannt, dass sie ein Konsensus-Motiv für die Interaktion mit PDZ-Domäne Proteinen besitzt. Diese Interaktion ist nach heutigem Stand auf die „b“ Spleißvarianten beschränkt. Über das Konsensus-Motiv kann die PMCA4b mit mehreren Proteinen aus der Familie der membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) interagieren. Die MAGUKs wirken als Gerüst für die Bildung von Komplexen, die Membranproteine und Signalwege miteinander verknüpfen (Kim, DeMarco et al. 1998). Auch das Synapse-assoziierte Protein (SAP) interagiert mit der PMCA 4b und 2b über PDZ-Domänen (DeMarco and Strehler 2001). In Gehirn- und Nierengewebe konnte eine Assoziation zwischen PMCA4b und der Calcium-Calmodulin abhängigen Serin-Proteinkinase (CASK) gezeigt werden (Schuh, Uldrijan et al. 2003). Ob und welche funktionelle Bedeutung eine mögliche Interaktion der PMCA4b mit PDZ-Domäne Proteinen in Nebenhodenkopf-Spermien hat kann zum heutigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Auch der Tumor-Suppression Ras-assoziierte Faktor 1 (RASSF1) (Armesilla, Williams et al. 2004) und NO-Synthase sind mit PMCA verbunden (Schuh, Uldrijan et al. 2001).

Mit Syntrophin und neuronaler NO-Synthase bildet die PMCA zudem einen Komplex, der an Dystrophin und schließlich Aktin gebunden sein könnte (Williams, Armesilla et al. 2006). Auch hier ist es nicht bekannt, ob sich die Bindung bei den „a“ und „b“ Spleißvarianten unterscheidet.

Zusammenfassend ist die funktionelle Interpretation des Spleißvarianten-Wechels zwischen Nebenhodenkörper und –schwanz von der Variante 4b mit der Fähigkeit an PDZ-Proteine zu binden zu der PMCA 4a die stärker durch Calmodulin aktiviert wird schwierig. Der Wechsel könnte aber auch ohne Bedeutung für die Spermienreifung und die Funktionalität der Spermien sein und der Spezialisierung der Zellen des Nebenhodenschwanzes Rechnung tragen. Warum die Spermien im Hoden zunächst mit der PMCA4b ausgestattet werden und im Nebenhoden dann ein Wechsel zur PMCA4a stattfindet wird Inhalt zukünftiger Forschung sein.

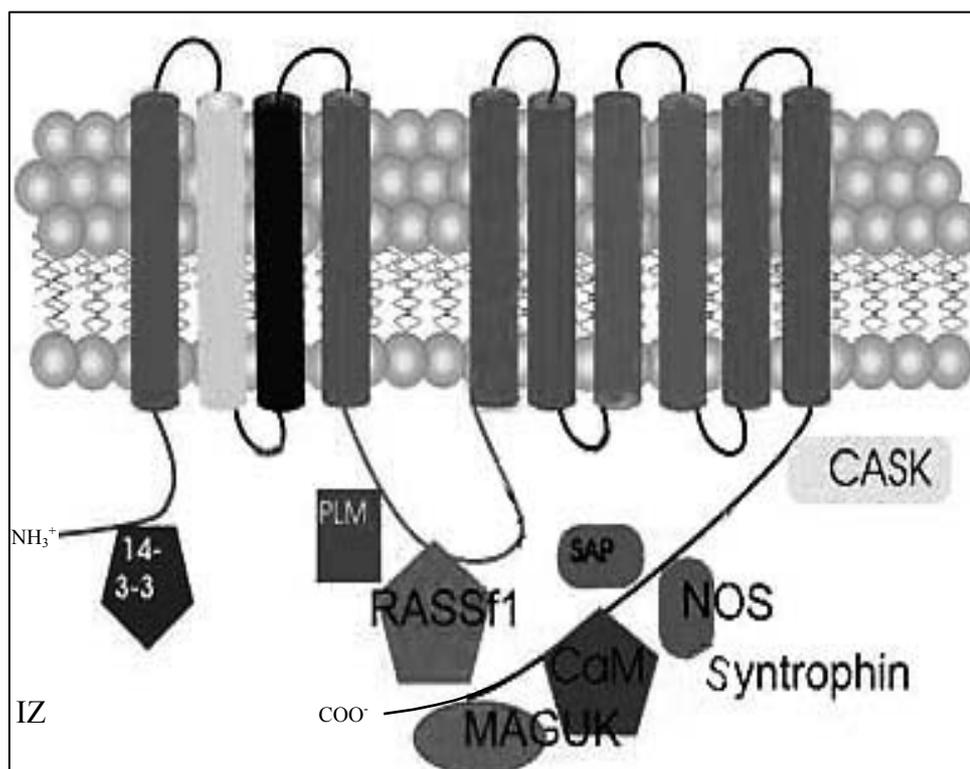


Abb. 4.1 PMCA-assoziierte Proteine, die Positionen sind in manchen Fällen vermutet (nach Ruknudin und Lakatta 2007)
 Abkürzungen: CaM: Calmodulin; CASK: Calcium-Calmodulin abhängige Serin-Proteinkinase; IZ: intrazellulär; MAGUK: membranassoziierte Guanylatkinase; NOS: NO-Synthase; RASSf1: Tumor-Suppression Ras-assoziierte Faktor 1; PLM: Phospholipid-Methylierung; 14-3-3: aus einer Familie regulatorischer Proteine

4.5 Interaktion von PDC-109 mit der PMCA

PDC-109 ist in der Lage mit Phospholipiden, Herparin und anderen Partnern zu interagieren. Es bindet an das Mittelstück boviner Spermien. Immunelektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsregion unterhalb der Plasmamembran befindet (Aumuller, Vesper et al. 1988). Durch die PDC-109-Bindung wird die Spermienmotilität gesteigert. Unter anderem beruht diese Motilitätssteigerung möglicherweise auf einer Aktivitätssteigerung von Ca^{2+} -ATPasen der Spermienplasmamembran (Sanchez-Luengo, Aumuller et al. 2004). Dabei ist der stimulatorische Effekt auf Spermien, die aus der Cauda epididymidis isoliert werden, sehr viel stärker ausgeprägt, als der Effekt auf Spermien aus Caput oder Corpus epididymidis (Sanchez-Luengo, Aumuller et al. 2004).

Bei einem Aufenthalt im Labor von Professor Strehler in Rochester, USA, wurde mit einem dort etablierten Test (Caride, Filoteo et al. 2007), der spezifisch für die PMCA ist, der Einfluss von PDC-109 auf die humane PMCA untersucht. Die dort erzielten Ergebnisse belegen klar, dass die humane PMCA durch PDC-109 gehemmt wird. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu den oben zitierten Ergebnissen von Sanchez et al.. Dazu ist aber anzumerken, dass es sich um verschiedene Aktivitätsassays handelt und bei den Tests unterschiedliches Ausgangsmaterial benutzt wurde.

Sanchez et al. haben für ihre Untersuchungen einen Ca^{2+} -ATPase Test eingesetzt, der von der Arbeitsgruppe um Professor Sen etabliert wurde (Sikdar, Ganguly et al. 1991). Dieser Assay ist nicht spezifisch für die PMCA, sondern allgemein für Ca^{2+} -abhängige-ATPasen. Es ist daher möglich, dass es sich bei den damals stimulierten Ca^{2+} -ATPasen (Sanchez et al.) nicht um die PMCA sondern um andere Ca^{2+} -ATPasen, die in den Spermienmembranen vorkommen, handelt. Dass in dem von Professor Sen publizierten Assay andere Ca^{2+} -ATPasen als die PMCA gemessen werden, wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die PMCA bei der in diesem Test verwandten CaCl_2 -Endkonzentration von 4 mM bereits zu über 90% gehemmt wird eigene Daten, bisher nicht publiziert, (Kratje, Garrahan et al. 1985).

Unsere spätere Schlussfolgerung, dass es sich bei der durch PDC-109 stimulierten Ca^{2+} -ATPase in Spermien um die PMCA handelt (Triphan, Aumuller et al. 2007), fußte auf der Tatsache, dass der PMCA in Spermien für die Calciumclearance die Hauptbedeutung zukommt und andere Ca^{2+} -ATPasen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Aufgrund der neuen aktuellen Ergebnisse muss diese Schlussfolgerung kritisch hinterfragt werden.

Gleichzeitig muss aber ebenso kritisch für den in der aktuellen Arbeit angewandten PMCA Assay angemerkt werden, dass humane, in Insektenzellen rekombinat hergestellte PMCA und nicht die bovine Spermienform eingesetzt wurde. Sanchez et al. konnten zeigen, dass der stimulierende Effekt von PDC-109 auf die Ca^{2+} -ATPasen zwar nicht speziesspezifisch, aber organspezifisch war, also nur auf Spermien zutraf. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Sequenzhomologie zwischen humaner und boviner PMCA4 könnte demnach davon ausgegangen werden, dass sich die an humaner PMCA erzielten Ergebnisse auf den Bullen übertragen lassen. Da es sich aber bei Spermien und Insektenzellen sozusagen um unterschiedliche „Organe“ handelt, kann nach den Daten von Sanchez et al nicht davon ausgegangen werden, dass Ca^{2+} -ATPasen die in anderen Membranen als Spermien lokalisiert sind durch PDC-109 moduliert werden. Ein Grund könnte in der unterschiedlichen Membranzusammensetzung zwischen Spermien und den Insektenzellen liegen. Wie sich speziell die PMCA in bovinen Spermien verhält kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht beurteilt werden.

Ein endgültiger Beweis der Hemmung oder Stimulierung der bovinen Spermien-PMCA durch PDC-109 steht somit noch aus. Zum Nachweis muss der in dieser Arbeit benutzte PMCA-Assay mit boviner PMCA durchgeführt werden, die aus bovinen Spermien isoliert wurde.

Über die physiologische Funktion einer Inhibition darf spekuliert werden. So könnte die Hemmung der PMCA zu einer längerfristig erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Spermium führen, was wiederum eine entscheidende Bedeutung für die Motilität der bovinen Spermien haben könnte. Andererseits hemmt das PDC-109 neben der PMCA auch die Na^+/K^+ -ATPase.

Bei der Hemmung der PMCA dürfte es sich daher um einen unspezifischen Effekt handeln, der in erster Linie auf der Desintegration der Spermienmembran beruhen dürfte (Tannert, Kurz et al. 2007). Die Frage nach dem Sinn einer Inhibition, wo doch die PMCA4-knockout Mäuse aufgrund einer Spermien-Hypomotilität infertil sind, bleibt zurzeit unbeantwortet.

Sicherlich wirft dieses Problem spannende Fragen auf, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben und die in der Zukunft zu beantworten sein werden.

5 Zusammenfassung

Der für viele vitale Prozesse essentielle Calciumgradient zwischen dem Intrazellulärraum und dem Extrazellulärraum ($[Ca^{2+}]_{IZ} = 10^{-7}$ M, $[Ca^{2+}]_{EZ} = 10^{-3}$ M) wird durch eine Vielzahl von Transportsystemen aufrechterhalten.

Ein zentrales dieser Enzyme ist die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran (PMCA). Strukturell ist die PMCA ein etwa 130 kDa großes Membranprotein mit 10 Transmembransegmenten. Von der PMCA existieren bei den Säugetieren 4 unterschiedliche Isoformen, durch alternatives Spleißen können aus diesen 4 Isoformen mehr als 30 Spleißvarianten entstehen. Über die funktionellen Unterschiede dieser Spleißvarianten ist bis heute nur wenig bekannt. Während die PMCA-Isoformen 1 und 4 ubiquitär vorkommen, sind die Isoformen 2 und 3 bisher nur im Gehirn und wenigen anderen Geweben nachgewiesen worden. Durch PMCA Knockout-Mäuse konnten in den letzten Jahren interessante Erkenntnisse über die Funktionalität der PMCA gewonnen werden. So führt ein Verlust der PMCA1 zur embryonalen Letalität. Mäuse mit einem homozygoten Verlust der PMCA2 sind taub und haben eine Gleichgewichtsstörung. Obwohl PMCA4 knockout Mäuse äußerlich normal erscheinen, sind die Mäuse infertil. Ursächlich ist eine Hypomotilität der Spermien, während ihre Spermatogenese und ihr Fortpflanzungsverhalten unbeeinträchtigt erscheinen.

In dieser Arbeit wurden die Expression sowie die Lokalisation der PMCA-Isoformen in den Geschlechtsorganen des Bullen untersucht. Es fand sich, dass die Isoform 1 sowohl im bovinen Hoden, als auch in der Bläschendrüse und den drei Nebenhodenabschnitten Caput, Corpus und Cauda epididymidis exprimiert wird. Eine Expression der PMCA2 fand sich lediglich im bovinen Hoden, die Expression der PMCA3 war auf den Nebenhodenkopf beschränkt. Die PMCA4 wird in allen untersuchten Organen exprimiert. Allerdings findet ein Spleißvarianten-Wechsel zwischen dem Nebenhodenkörper und dem Nebenhodenschwanz von der PMCA4b zur Spleißvariante 4a statt, der in dieser Arbeit genauer untersucht wurde. Die Sequenz der bovinen PMCA4 war nicht bekannt. Die beiden PMCA4 Spleißvarianten wurden deshalb kloniert und sequenziert, wodurch es möglich war, einen bullenspezifischen Antikörper gegen PMCA4a herzustellen. Der selbst hergestellte Antikörper gegen die PMCA4a führte in der Immunhistochemie lediglich im Bereich des Nebenhodenschwanzes

zu einer positiven Reaktion. Er färbte dort den apikalen Pol der Epithelzellen und bläschenartige Abschnürungen dieser Zellen – die sogenannten Epididymosomen an. Im Western Blot konnten mithilfe des PMCA4a-Antikörpers Hinweise dafür gefunden werden, dass die PMCA4a während der Nebenhodenschwanzpassage auf die bovinen Spermien übertragen wird, da nur Membranen aus Spermien, die aus dem Nebenhodenschwanz isoliert wurden, die PMCA4a in ihrer Membran besitzen. In Membranen der Nebenhodenkopfspermien und im bovinen Testis konnte die PMCA4a hingegen nicht detektiert werden. Der Mechanismus der Sekretabgabe in Form von apikalen Vesikeln wird seit längerer Zeit postuliert und von verschiedenen Gruppen als apokriner Sekretionsmechanismus bezeichnet.

In einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit eine Interaktion zwischen der PMCA und dem bovinen Bläschendrüsensprotein PDC-109 stattfindet, das an das Mittelstück boviner Spermien bindet. PDC-109 ist das quantitativ wichtigste Protein der Bläschendrüse des Bullen. Über zwei Fibronectin-Typ 2-ähnliche Domänen kann das PDC-109 mit Phosphatidylcholin, Heparin u.a. Molekülen interagieren. *In vitro* versetzt das PDC-109 die bovinen Spermien in einen Zustand der Hypermotilität. Durch einen Assay, der überexprimierte humane PMCA verwendet, konnte gezeigt werden, dass die PMCA-Isoformen 2 und 4 durch das PDC-109 gehemmt werden. Die Hemmung ist also nicht Isoform-spezifisch. Da auch die Na^+/K^+ -ATPase durch PDC-109 gehemmt wird, dürfte es sich bei der Hemmung eher um einen generellen Membran-desintegrierenden Effekt des PDC-109 handeln. Zugleich wurden im Rahmen dieser Arbeit Mutanten des PDC-109 hergestellt, deren Effekt auf die PMCA im Rahmen zukünftiger Studien zu untersuchen sein wird.

Diese Arbeit liefert somit starke Hinweise dafür, dass die PMCA4a durch apokrine Sekretion im Bereich des Nebenhodenschwanzes auf bovine Spermien übertragen wird. Zum anderen wird ein hemmender Effekt des Bläschendrüsensproteins PDC-109 auf die PMCA dargestellt.

Damit werden zwei wesentliche neue Funktionsprinzipien des Nebenhodens dokumentiert.

6 Literaturverzeichnis

1. Abramowitz, J., A. Aydemir-Koksoy, et al. (2000). "Expression of plasma membrane calcium ATPases in phenotypically distinct canine vascular smooth muscle cells." *J Mol Cell Cardiol* **32**(5): 777-89.
2. Adamo, H. P., A. F. Rega, et al. (1990). "The E2 in equilibrium E1 transition of the Ca²⁺-ATPase from plasma membranes studied by phosphorylation." *J Biol Chem* **265**(7): 3789-92.
3. Arienti, G., E. Carlini, et al. (1997). "Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH." *J Membr Biol* **155**(1): 89-94.
4. Armesilla, A. L., J. C. Williams, et al. (2004). "Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1)." *J Biol Chem* **279**(30): 31318-28.
5. Arvidson, G., G. Ronquist, et al. (1989). "Human prostatic membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering." *Biochim Biophys Acta* **984**(2): 167-73.
6. Aumuller, G., H. Renneberg, et al. (1997). "The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function." *Adv Exp Med Biol* **424**: 193-219.
7. Aumuller, G. and K. H. Scheit (1987). "Immunohistochemistry of secretory proteins in the bull seminal vesicle." *J Anat* **150**: 43-8.
8. Aumuller, G., M. Vesper, et al. (1988). "Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa." *Cell Tissue Res* **252**(2): 377-84.
9. Aumuller, G., B. Wilhelm, et al. (1999). "Apocrine secretion--fact or artifact?" *Ann Anat* **181**(5): 437-46.
10. Axelsen, K. B. and M. G. Palmgren (1998). "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily." *J Mol Evol* **46**(1): 84-101.
11. Bachs, O. and E. Carafoli (1987). "Calmodulin and calmodulin-binding proteins in liver cell nuclei." *J Biol Chem* **262**(22): 10786-90.
12. Begin, S., B. Berube, et al. (1995). "Comparative immunoreactivity of mouse and hamster sperm proteins recognized by an anti-P26h hamster sperm protein." *Mol Reprod Dev* **41**(2): 249-56.
13. Belan, P. V., O. V. Gerasimenko, et al. (1996). "Localization of Ca²⁺ extrusion sites in pancreatic acinar cells." *J Biol Chem* **271**(13): 7615-9.
14. Berube, B. and R. Sullivan (1994). "Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein." *Biol Reprod* **51**(6): 1255-63.
15. Bian, L., J. Zeng, et al. (2000). "Plasma membrane calcium ATPase gene expression in bovine lens epithelium." *Ophthalmic Res* **32**(2-3): 100-5.
16. Borke, J. L., J. Minami, et al. (1987). "Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells." *J Clin Invest* **80**(5): 1225-31.
17. Boue, F., B. Berube, et al. (1994). "Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein." *Biol Reprod* **51**(4): 577-87.
18. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
19. Brandenburger, T. and T. Bajorat (2006). *Fallbuch Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart.
20. Brandt, P., E. Ibrahim, et al. (1992). "Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca(2+)-pumping ATPase isoform PMCA2." *Genomics* **14**(2): 484-7.
21. Brandt, P., R. L. Neve, et al. (1992). "Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels." *J Biol Chem* **267**(7): 4376-85.
22. Brini, M., L. Coletto, et al. (2003). "A comparative functional analysis of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in intact cells." *J Biol Chem* **278**(27): 24500-8.
23. Brodin, P., R. Falchetto, et al. (1992). "Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump." *Eur J Biochem* **204**(2): 939-46.
24. Burk, S. E. and G. E. Shull (1992). "Structure of the rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. Skeletal muscle-specific splicing results in a plasma membrane Ca(2+)-ATPase with a novel calmodulin-binding domain." *J Biol Chem* **267**(27): 19683-90.
25. Calvete, J. J., K. Mann, et al. (1996). "The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma." *FEBS Lett* **399**(1-2): 147-52.
26. Calvete, J. J., K. Mann, et al. (1995). "Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities." *Biochem J* **310** (Pt 2): 615-22.

27. Calvete, J. J., M. Raida, et al. (1997). "Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1." *FEBS Lett* **407**(2): 201-6.
28. Calvete, J. J., M. Raida, et al. (1994). "Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa." *FEBS Lett* **350**(2-3): 203-6.
29. Calvete, J. J., M. Reinert, et al. (1995). "Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins." *J Chromatogr A* **711**(1): 167-73.
30. Carafoli, E. (1991). "Calcium pump of the plasma membrane." *Physiol Rev* **71**(1): 129-53.
31. Carafoli, E. (1992). "The Ca²⁺ pump of the plasma membrane." *J Biol Chem* **267**(4): 2115-8.
32. Carafoli, E. (1992). "P-type ATPases. Introduction." *J Bioenerg Biomembr* **24**(3): 245-7.
33. Carafoli, E. (1994). "Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme." *Faseb J* **8**(13): 993-1002.
34. Carafoli, E. (2003). "The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(4): 326-32.
35. Carafoli, E. and M. Brini (2000). "Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport." *Curr Opin Chem Biol* **4**(2): 152-61.
36. Carafoli, E. and M. Crompton (1978). "The regulation of intracellular calcium by mitochondria." *Ann N Y Acad Sci* **307**: 269-84.
37. Caride, A. J., N. L. Elwess, et al. (1999). "The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca(2+) pump is slow and is changed by alternative splicing." *J Biol Chem* **274**(49): 35227-32.
38. Caride, A. J., A. G. Filoteo, et al. (1996). "Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies." *Biochem J* **316** (Pt 1): 353-9.
39. Caride, A. J., A. G. Filoteo, et al. (2007). "The plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4a differs from isoform 4b in the mechanism of calmodulin binding and activation kinetics. Implications for Ca²⁺ signaling." *J Biol Chem*.
40. Carlini, E., C. A. Palmerini, et al. (1997). "Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity." *Arch Biochem Biophys* **343**(1): 6-12.
41. Cechova, D., V. Jonakova, et al. (1979). "Isolation of acidic acrosin isoinhibitors (BUSI I A, BUSI IB1 and BUSI I B2) from bull seminal plasma." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **360**(12): 1759-66.
42. Cechova, D., V. Jonakova, et al. (1979). "Isolation of basic acrosin inhibitor from bull seminal plasma (BUSI II)." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **360**(12): 1753-8.
43. Chandonnet, L., K. D. Roberts, et al. (1990). "Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma." *Mol Reprod Dev* **26**(4): 313-8.
44. Choquette, D., G. Hakim, et al. (1984). "Regulation of plasma membrane Ca²⁺ ATPases by lipids of the phosphatidylinositol cycle." *Biochem Biophys Res Commun* **125**(3): 908-15.
45. Cooper, T. G. (1995). "Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation." *Adv Exp Med Biol* **377**: 87-101.
46. Cooper, T. G. (1996). "Epididymis and sperm function." *Andrologia* **28 Suppl 1**: 57-9.
47. Cooper, T. G., Ed. (1999). *Epididymis*. Encyclopedia of reproduction. San Diego, Academic Press.
48. Davis, T. R., K. M. Trotter, et al. (1992). "Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion." *Biotechnology (N Y)* **10**(10): 1148-50.
49. Davis, T. R., T. J. Wickham, et al. (1993). "Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **29A**(5): 388-90.
50. De Jaegere, S., F. Wuytack, et al. (1993). "Alternative processing of the gene transcripts encoding a plasma-membrane and a sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump during differentiation of BC3H1 muscle cells." *Biochim Biophys Acta* **1173**(2): 188-94.
51. De Jaegere, S., F. Wuytack, et al. (1990). "Molecular cloning and sequencing of the plasma-membrane Ca²⁺ pump of pig smooth muscle." *Biochem J* **271**(3): 655-60.
52. DeMarco, S. J. and E. E. Strehler (2001). "Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins." *J Biol Chem* **276**(24): 21594-600.
53. Desnoyers, L. and P. Manjunath (1992). "Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid." *J Biol Chem* **267**(14): 10149-55.
54. Domi, T., F. Di Leva, et al. (2007). "Functional specificity of PMCA isoforms?" *Ann N Y Acad Sci* **1099**: 237-46.

55. Elwess, N. L., A. G. Filoteo, et al. (1997). "Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺." *J Biol Chem* **272**(29): 17981-6.
56. Enyedi, A., N. L. Elwess, et al. (1997). "Protein kinase C phosphorylates the "a" forms of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin." *J Biol Chem* **272**(44): 27525-8.
57. Enyedi, A., M. Flura, et al. (1987). "The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently." *J Biol Chem* **262**(13): 6425-30.
58. Enyedi, A., A. K. Verma, et al. (1996). "Protein kinase C activates the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain." *J Biol Chem* **271**(50): 32461-7.
59. Enyedi, A., T. Vorherr, et al. (1989). "The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump." *J Biol Chem* **264**(21): 12313-21.
60. Esch, F. S., N. C. Ling, et al. (1983). "Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma." *Biochem Biophys Res Commun* **113**(3): 861-7.
61. Fabiani, R. and G. Ronquist (1993). "Characteristics of membrane-bound 5'-nucleotidase on human prostasomes." *Clin Chim Acta* **216**(1-2): 175-82.
62. Fabiani, R. and G. Ronquist (1995). "Association of some hydrolytic enzymes with the prostatic membrane and their differential responses to detergent and PIPLC treatment." *Prostate* **27**(2): 95-101.
63. Falchetto, R., T. Vorherr, et al. (1992). "The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme." *Protein Sci* **1**(12): 1613-21.
64. Filoteo, A. G., N. L. Elwess, et al. (1997). "Plasma membrane Ca²⁺ pump in rat brain. Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies." *J Biol Chem* **272**(38): 23741-7.
65. Fini, C., C. A. Palmerini, et al. (1990). "5'-nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein." *Biochim Biophys Acta* **1038**(1): 18-22.
66. Francavilla, S., C. De Martino, et al. (1983). "Ultrastructural and immunohistochemical studies of rat epididymis." *Cell Tissue Res* **233**(3): 523-37.
67. Franks, J. J., J. L. Horn, et al. (1995). "Stable inhibition of brain synaptic plasma membrane calcium ATPase in rats anesthetized with halothane." *Anesthesiology* **82**(1): 118-28.
68. Frenette, G., C. Lessard, et al. (2002). "Selected proteins of "prostatic-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull." *Biol Reprod* **67**(1): 308-13.
69. Frenette, G. and R. Sullivan (2001). "Prostatic-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface." *Mol Reprod Dev* **59**(1): 115-21.
70. Friedman, P. A. and F. A. Gesek (1995). "Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation." *Physiol Rev* **75**(3): 429-71.
71. Gasset, M., L. Magdaleno, et al. (2000). "Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109." *Arch Biochem Biophys* **374**(2): 241-7.
72. Graham, R. C., Jr. and M. J. Karnovsky (1966). "The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique." *J Histochem Cytochem* **14**(4): 291-302.
73. Gwathmey, T. M., G. G. Igotz, et al. (2003). "PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir." *Biol Reprod* **69**(3): 809-15.
74. Haendler, B., I. Toda, et al. (1999). "Expression of transcripts for cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) in the murine lacrimal gland." *J Cell Physiol* **178**(3): 371-8.
75. Hammes, A., S. Oberdorf, et al. (1994). "Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca(2+)-ATPase." *Faseb J* **8**(6): 428-35.
76. Hermo, L., R. Oko, et al. (1994). "Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation." *Int Rev Cytol* **154**: 106-89.
77. Hilfiker, H., M. A. Strehler-Page, et al. (1993). "Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1." *J Biol Chem* **268**(26): 19717-25.
78. Hoenderop, J. G., O. Dardenne, et al. (2002). "Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase knockout mice." *Faseb J* **16**(11): 1398-406.
79. Hofmann, F., J. Anagli, et al. (1994). "Phosphorylation of the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump by protein kinase C reduces its interaction with calmodulin and with its pump receptor site." *J Biol Chem* **269**(39): 24298-303.
80. Holland, S. K., K. Harlos, et al. (1987). "Deriving the generic structure of the fibronectin type II domain from the prothrombin Kringle 1 crystal structure." *Embo J* **6**(7): 1875-80.

81. Howard, A., N. F. Barley, et al. (1994). "Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver." *Biochem J* **303** (Pt 1): 275-9.
82. Howard, A., S. Legon, et al. (1992). "Plasma membrane calcium pump expression in human placenta and small intestine." *Biochem Biophys Res Commun* **183**(2): 499-505.
83. Howard, A., S. Legon, et al. (1993). "Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms." *Am J Physiol* **265**(5 Pt 1): G917-25.
84. James, P., M. Maeda, et al. (1988). "Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes." *J Biol Chem* **263**(6): 2905-10.
85. James, P., T. Vorherr, et al. (1989). "Modulation of erythrocyte Ca²⁺-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain." *J Biol Chem* **264**(14): 8289-96.
86. Jarrett, H. W. and J. T. Penniston (1978). "Purification of the Ca²⁺-stimulated ATPase activator from human erythrocytes. Its membership in the class of Ca²⁺-binding modulator proteins." *J Biol Chem* **253**(13): 4676-82.
87. Jones, R. (1998). "Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis." *J Reprod Fertil Suppl* **53**: 73-84.
88. Keeton, T. P., S. E. Burk, et al. (1993). "Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4." *J Biol Chem* **268**(4): 2740-8.
89. Keeton, T. P. and G. E. Shull (1995). "Primary structure of rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A." *Biochem J* **306** (Pt 3): 779-85.
90. Khan, I. and A. K. Grover (1991). "Expression of cyclic-nucleotide-sensitive and -insensitive isoforms of the plasma membrane Ca²⁺ pump in smooth muscle and other tissues." *Biochem J* **277** (Pt 2): 345-9.
91. Kim, E., S. J. DeMarco, et al. (1998). "Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains." *J Biol Chem* **273**(3): 1591-5.
92. Kirchhoff, C. and G. Hale (1996). "Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation." *Mol Hum Reprod* **2**(3): 177-84.
93. Klammt, C., F. Lohr, et al. (2004). "High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins." *Eur J Biochem* **271**(3): 568-80.
94. Klammt, C., D. Schwarz, et al. (2007). "Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale." *Methods Mol Biol* **375**: 57-78.
95. Klammt, C., D. Schwarz, et al. (2006). "Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein." *Febs J* **273**(18): 4141-53.
96. König, M., G. Aumüller, et al. (1985). "Fine structure and protein biosynthesis of the rat seminal vesicles under experimental conditions." *Andrologia* **17**(1): 54-63.
97. Königshoff, M. and T. Brandenburger (2007). *Kurzlehrbuch Biochemie, 2. Auflage*, Thieme.
98. Kozel, P. J., R. R. Davis, et al. (2002). "Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice." *Hear Res* **164**(1-2): 231-9.
99. Kozel, P. J., R. A. Friedman, et al. (1998). "Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2." *J Biol Chem* **273**(30): 18693-6.
100. Kratje, R. B., P. J. Garrahan, et al. (1985). "Two modes of inhibition of the Ca²⁺ pump in red cells by Ca²⁺." *Biochim Biophys Acta* **816**(2): 365-78.
101. Kuo, T. H., K. K. Wang, et al. (1991). "Phorbol ester induces both gene expression and phosphorylation of the plasma membrane Ca²⁺ pump." *J Biol Chem* **266**(4): 2520-5.
102. Kuroda, K., H. Geyer, et al. (1990). "The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector." *Virology* **174**(2): 418-29.
103. Lane, M., I. Therien, et al. (1999). "Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms." *Biol Reprod* **60**(1): 169-75.
104. Larsson, D. and I. Nemere (2002). "Vectorial Transcellular Calcium Transport in Intestine: Integration of Current Models." *J Biomed Biotechnol* **2**(3): 117-119.
105. Latif, F., F. M. Duh, et al. (1993). "von Hippel-Lindau syndrome: cloning and identification of the plasma membrane Ca(++)-transporting ATPase isoform 2 gene that resides in the von Hippel-Lindau gene region." *Cancer Res* **53**(4): 861-7.
106. Laurell, C. B., H. Weiber, et al. (1982). "A zinc-dependent peptidase in prostatic organelles present in seminal plasma." *Clin Chim Acta* **126**(2): 161-70.
107. Lee, M. G., X. Xu, et al. (1997). "Polarized expression of Ca²⁺ pumps in pancreatic and salivary gland cells. Role in initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves." *J Biol Chem* **272**(25): 15771-6.
108. Legare, C., B. Berube, et al. (1999). "Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein." *Mol Reprod Dev* **52**(2): 225-33.

109. Lessard, C., S. Parent, et al. (2000). "Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b." *J Androl* **21**(5): 700-7.
110. Liebich, H. G. (2003). "Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis."
111. Lindahl, M., C. Tagesson, et al. (1987). "Phospholipase A2 activity in prostasomes from human seminal plasma." *Urol Int* **42**(5): 385-9.
112. Lopez, M. M., B. Zelent, et al. (2000). "Effects of volatile anesthetic on the Ca²⁺-ATPase activation by dimerization. Distance-dependent quenching analysis and fluorescence energy transfer studies." *Eur J Biochem* **267**(11): 3345-50.
113. Lushington, G. H., A. Zaidi, et al. (2005). "Theoretically predicted structures of plasma membrane Ca(2+)-ATPase and their susceptibilities to oxidation." *J Mol Graph Model* **24**(3): 175-85.
114. Mandal, A., S. Das, et al. (2006). "Solubilization, purification and reconstitution of Ca(2+)-ATPase from bovine pulmonary artery smooth muscle microsomes by different detergents: preservation of native structure and function of the enzyme by DHPC." *Biochim Biophys Acta* **1760**(1): 20-31.
115. Manjunath, P., V. Nauc, et al. (2002). "Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk." *Biol Reprod* **67**(4): 1250-8.
116. Missiaen, L., L. Raeymaekers, et al. (1989). "Role of arginine residues in the stimulation of the smooth-muscle plasma-membrane Ca²⁺ pump by negatively charged phospholipids." *Biochem J* **264**(2): 609-12.
117. Miyamoto, C., G. E. Smith, et al. (1985). "Production of human c-myc protein in insect cells infected with a baculovirus expression vector." *Mol Cell Biol* **5**(10): 2860-5.
118. Moreau, R., P. G. Frank, et al. (1999). "Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux." *Biochim Biophys Acta* **1438**(1): 38-46.
119. Muller, P., K. R. Erlemann, et al. (1998). "Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles." *Eur Biophys J* **27**(1): 33-41.
120. Muller, P., A. Greube, et al. (2002). "Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids." *Eur Biophys J* **31**(6): 438-47.
121. Nickel, R., A. Schummer, et al. (2003). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Gesamtausgabe, 5 Bde.*
122. Niggli, V., E. S. Adunyah, et al. (1981). "Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺ - ATPase." *J Biol Chem* **256**(16): 8588-92.
123. Niggli, V., E. S. Adunyah, et al. (1981). "Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids." *J Biol Chem* **256**(1): 395-401.
124. Niggli, V., J. T. Penniston, et al. (1979). "Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column." *J Biol Chem* **254**(20): 9955-8.
125. Okunade, G. W., M. L. Miller, et al. (2004). "Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4." *J Biol Chem* **279**(32): 33742-50.
126. Olson, S., M. G. Wang, et al. (1991). "Localization of two genes encoding plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPases to human chromosomes 1q25-32 and 12q21-23." *Genomics* **9**(4): 629-41.
127. Palmgren, M. G. and K. B. Axelsen (1998). "Evolution of P-type ATPases." *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2): 37-45.
128. Papp, B., B. Sarkadi, et al. (1989). "Functional domains of the in situ red cell membrane calcium pump revealed by proteolysis and monoclonal antibodies. Possible sites for regulation by calpain and acidic lipids." *J Biol Chem* **264**(8): 4577-82.
129. Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, et al. (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." *Biol Reprod* **38**(5): 1171-80.
130. Paszty, K., T. Kovacs, et al. (1998). "Expression of hPMCA4b, the major form of the plasma membrane calcium pump in megakaryoblastoid cells is greatly reduced in mature human platelets." *Cell Calcium* **24**(2): 129-35.
131. Pedersen, P. L. (2005). "Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 349-57.
132. Penniston, J. T. and A. Enyedi (1998). "Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump." *J Membr Biol* **165**(2): 101-9.
133. Plucienniczak, G., A. Jagiello, et al. (1999). "Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma." *Mol Reprod Dev* **52**(3): 303-9.

134. Post, H., R. Wiche, et al. (2001). "Identification of membrane proteins in epithelial cells of the rat coagulating gland." *Biol Chem* **382** (Suppl): 117.
135. Prapong, S., T. A. Reinhardt, et al. (2005). "Short communication: Ca²⁺-adenosine triphosphatase protein expression in the mammary gland of periparturient cows." *J Dairy Sci* **88**(5): 1741-4.
136. Prasad, V., G. W. Okunade, et al. (2004). "Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(4): 1192-203.
137. Ramakrishnan, M., V. Anbazhagan, et al. (2001). "Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy." *Biophys J* **81**(4): 2215-25.
138. Reinhardt, T. A., A. G. Filoteo, et al. (2000). "Ca²⁺-ATPase protein expression in mammary tissue." *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(5): C1595-602.
139. Ren, D., B. Navarro, et al. (2001). "A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility." *Nature* **413**(6856): 603-9.
140. Renneberg, H., M. Albrecht, et al. (2001). "Identification and characterization of neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11) from human prostasomes--localization in prostatic tissue and cell lines." *Prostate* **46**(3): 173-83.
141. Robinson, J. D. (1976). "(Ca + Mg)-stimulated ATPase activity of a rat brain microsomal preparation." *Arch Biochem Biophys* **176**(1): 366-74.
142. Romero, A., P. F. Varela, et al. (1997). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of bovine seminal plasma PDC-109, a protein composed of two fibronectin type II domains." *Proteins* **28**(3): 454-6.
143. Ronquist, G. and I. Brody (1985). "The prostatesome: its secretion and function in man." *Biochim Biophys Acta* **822**(2): 203-18.
144. Ronquist, G., I. Brody, et al. (1978). "An Mg²⁺ and Ca²⁺-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I." *Andrologia* **10**(4): 261-72.
145. Ruknudin, A. M. and E. G. Lakatta (2007). "The regulation of the Na/Ca exchanger and plasmalemmal Ca²⁺ ATPase by other proteins." *Ann N Y Acad Sci* **1099**: 86-102.
146. Saalmann, A., S. Munz, et al. (2001). "Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules." *Mol Reprod Dev* **58**(1): 88-100.
147. Salois, D., M. Menard, et al. (1999). "Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma." *Biol Reprod* **61**(1): 288-97.
148. Sanchez-Luengo, S., G. Aumuller, et al. (2004). "Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase." *J Androl* **25**(2): 234-44.
149. Santos, R. L., J. A. Schoffemeer, et al. (2002). "Salmonella serotype Typhimurium infection of bovine Peyer's patches down-regulates plasma membrane calcium-transporting ATPase expression." *J Infect Dis* **186**(3): 372-8.
150. Schatzmann, H. J. (1966). "ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells." *Experientia* **22**(6): 364-5.
151. Scheit, K. H., M. Kemme, et al. (1988). "The major protein of bull seminal plasma: biosynthesis and biological function." *Biosci Rep* **8**(6): 589-608.
152. Schuh, K., E. J. Cartwright, et al. (2004). "Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility." *J Biol Chem* **279**(27): 28220-6.
153. Schuh, K., S. Uldrijan, et al. (2003). "Interaction of the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b/CI with the Ca²⁺/calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK." *J Biol Chem* **278**(11): 9778-83.
154. Schuh, K., S. Uldrijan, et al. (2001). "The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I." *J Cell Biol* **155**(2): 201-5.
155. Seidah, N. G., P. Manjunath, et al. (1987). "Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin." *Biochem J* **243**(1): 195-203.
156. Shivaji, S. (1988). "Seminalplasmin: a protein with many biological properties." *Biosci Rep* **8**(6): 609-18.
157. Shivaji, S., V. Rukmini, et al. (1989). "Localization of bovine seminal plasma RNA-A BS1, on the surface of bovine spermatozoa." *Cell Mol Biol* **35**(3): 285-91.
158. Shull, G. E. and J. Greeb (1988). "Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases." *J Biol Chem* **263**(18): 8646-57.
159. Sikdar, R., U. Ganguly, et al. (1991). "Biochemical characterization of a calcium ion stimulated-ATPase from goat spermatozoa." *Mol Cell Biochem* **103**(2): 121-30.

160. Smith, G. E., M. D. Summers, et al. (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector." *Mol Cell Biol* **3**(12): 2156-65.
161. Stahl, W. L., T. J. Eakin, et al. (1992). "Plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization." *Brain Res Mol Brain Res* **16**(3-4): 223-31.
162. Stauffer, T. P., D. Guerini, et al. (1995). "Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies." *J Biol Chem* **270**(20): 12184-90.
163. Stauffer, T. P., D. Guerini, et al. (1997). "Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain." *Brain Res* **748**(1-2): 21-9.
164. Stauffer, T. P., H. Hilfiker, et al. (1993). "Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes." *J Biol Chem* **268**(34): 25993-6003.
165. Sternberger, L. A., P. H. Hardy, Jr., et al. (1970). "The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes." *J Histochem Cytochem* **18**(5): 315-33.
166. Strehler, E. E. (1991). "Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca²⁺ pumps." *J Membr Biol* **120**(1): 1-15.
167. Strehler, E. E., M. A. Strehler-Page, et al. (1989). "mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 6908-12.
168. Strehler, E. E. and D. A. Zacharias (2001). "Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps." *Physiol Rev* **81**(1): 21-50.
169. Sullivan, R., G. Frenette, et al. (2007). "Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit." *Asian J Androl* **9**(4): 483-91.
170. Summers, M. D. and G. E. Smith (1978). "Baculovirus structural polypeptides." *Virology* **84**(2): 390-402.
171. Tamblyn, T. M. (1983). "A bovine seminal plasma inhibitor of actin-stimulated myosin adenosine triphosphatase." *Biol Reprod* **29**(3): 725-32.
172. Tannert, A., A. Kurz, et al. (2007). "The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet." *Eur Biophys J* **36**(4-5): 461-75.
173. Therien, I., G. Bleau, et al. (1995). "Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin." *Biol Reprod* **52**(6): 1372-9.
174. Therien, I., R. Moreau, et al. (1998). "Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm." *Biol Reprod* **59**(4): 768-76.
175. Therien, I., S. Soubeyrand, et al. (1997). "Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein." *Biol Reprod* **57**(5): 1080-8.
176. Thomas, C. J., V. Anbazhagan, et al. (2003). "Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study." *Biophys J* **84**(5): 3037-44.
177. Topfer-Petersen, E., A. Romero, et al. (1998). "Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives." *Andrologia* **30**(4-5): 217-24.
178. Triphan, J., G. Aumuller, et al. (2007). "Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa." *Eur J Cell Biol* **86**(5): 265-73.
179. Tulsiani, D. R., A. Abou-Haila, et al. (1998). "The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization." *Exp Cell Res* **240**(2): 151-64.
180. VanHouten, J. N. and J. J. Wysolmerski (2007). "Transcellular calcium transport in mammary epithelial cells." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**(4): 223-35.
181. Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, et al. (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)." *In Vitro* **13**(4): 213-7.
182. Verma, A. K., A. G. Filoteo, et al. (1988). "Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump." *J Biol Chem* **263**(28): 14152-9.
183. Villemure, M., C. Lazure, et al. (2003). "Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma." *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 39.
184. Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, et al. (1998). "The molecular basis of sperm capacitation." *J Androl* **19**(2): 242-8.
185. Wagner, R., S. Liedtke, et al. (1996). "Elongation of the N-glycans of fowl plague virus hemagglutinin expressed in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells by coexpression of human beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I." *Glycobiology* **6**(2): 165-75.
186. Wah, D. A., C. Fernandez-Tornero, et al. (2002). "Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex." *Structure (Camb)* **10**(4): 505-14.

187. Wang, K. K., B. D. Roufogalis, et al. (1991). "Structure--function relationship of the human erythrocyte plasma membrane Ca(2+)-ATPase revealed by V8 protease treatment." *Biochem J* **279** (Pt 2): 537-44.
188. Wang, K. K., B. D. Roufogalis, et al. (1990). "Calpain I activates Ca²⁺ transport by the human erythrocyte plasma membrane calcium pump." *Adv Exp Med Biol* **269**: 175-80.
189. Wickham, T. J. and G. R. Nemerow (1993). "Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system." *Biotechnol Prog* **9**(1): 25-30.
190. Wilhelm, B., T. Brandenburger, et al. (2008). "Expression and localization of PMCA4 in rat testis and epididymis." *Histochem Cell Biol* **129**(3): 331-43.
191. Wilhelm, B., C. Keppler, et al. (1998). "Cytoplasmic carbonic anhydrase II of rat coagulating gland is secreted via the apocrine export mode." *J Histochem Cytochem* **46**(4): 505-11.
192. Williams, J. C., A. L. Armesilla, et al. (2006). "The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex." *J Biol Chem* **281**(33): 23341-8.
193. Yamagishi, N., M. Miyazaki, et al. (2006). "The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum." *Vet J* **171**(2): 363-6.
194. Yeung, C. H., T. G. Cooper, et al. (1998). "Epididymal secretion of CD52 as measured in human seminal plasma by a fluorescence immunoassay." *Mol Hum Reprod* **4**(5): 447-51.
195. Yu, B., Y. Zhao, et al. (2003). "The inhibitory effect of BSP-A1/-A2 on protein kinase C and tyrosine protein kinase." *Cell Biochem Funct* **21**(2): 183-8.
196. Zabe, M. and W. L. Dean (2001). "Plasma membrane Ca(2+)-ATPase associates with the cytoskeleton in activated platelets through a PDZ-binding domain." *J Biol Chem* **276**(18): 14704-9.
197. Zacharias, D. A., S. J. Dalrymple, et al. (1995). "Transcript distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms and splice variants in the human brain." *Brain Res Mol Brain Res* **28**(2): 263-72.
198. Zelinski, J. M., D. E. Sykes, et al. (1991). "The effect of vitamin D on rat intestinal plasma membrane CA-pump mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* **179**(2): 749-55.
199. Zylinska, L., D. Guerini, et al. (1998). "Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca²⁺-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus." *Biochim Biophys Acta* **1448**(1): 99-108.

7 Anhang

7.1 Vektorkarten

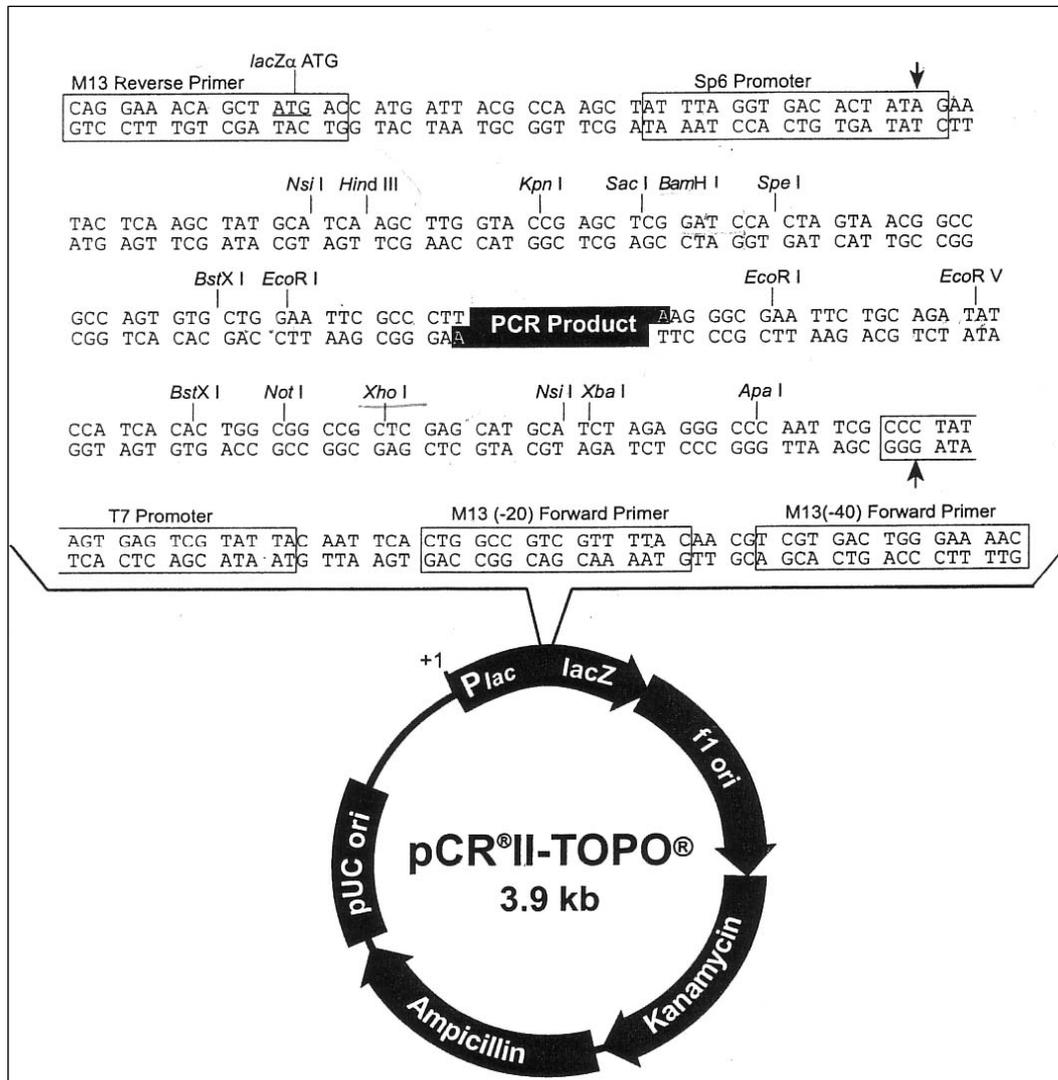


Abb. 7.1.a Vektorkarte TOPO II[®] (Invitrogen)

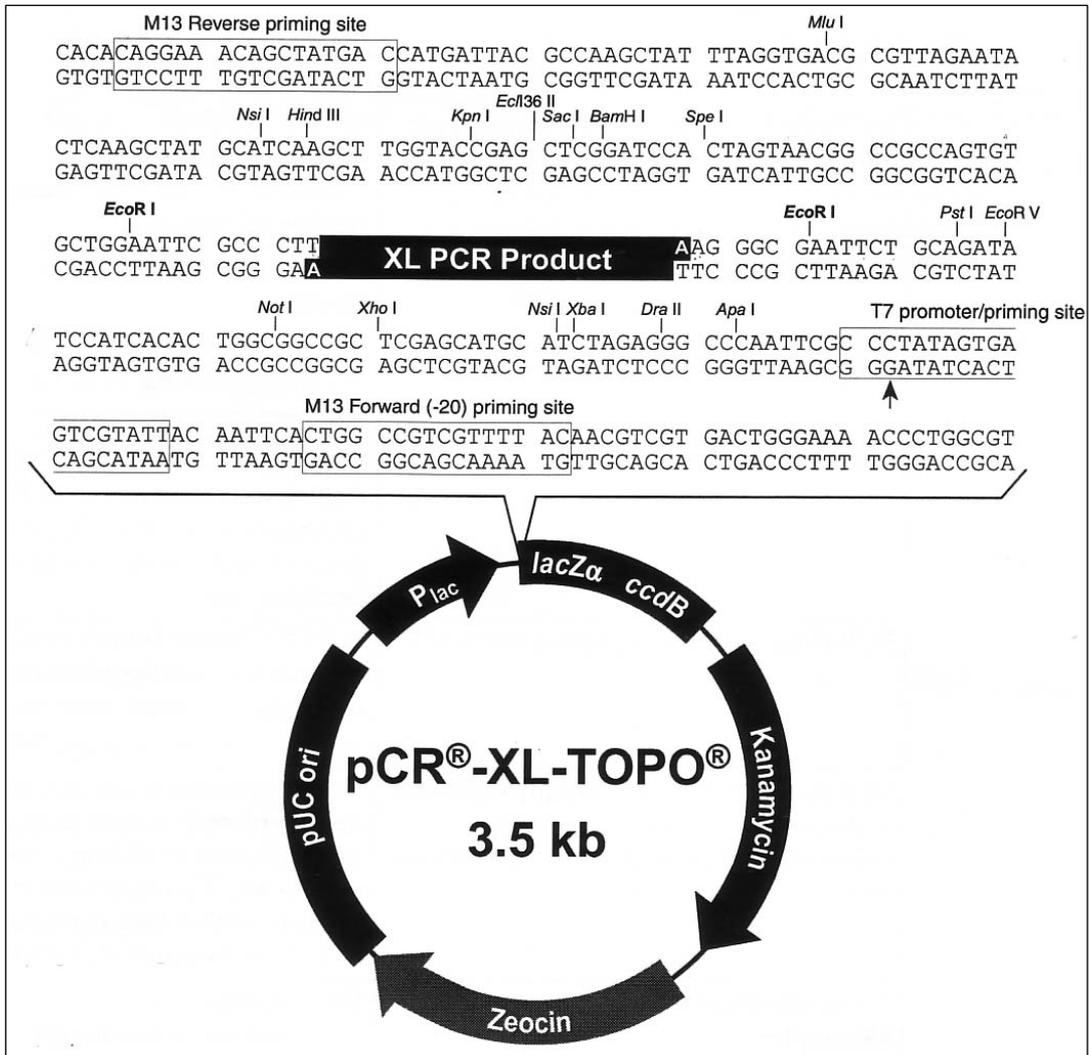


Abb. 7.1.b Vektorkarte TOPO XL[®] (Invitrogen)

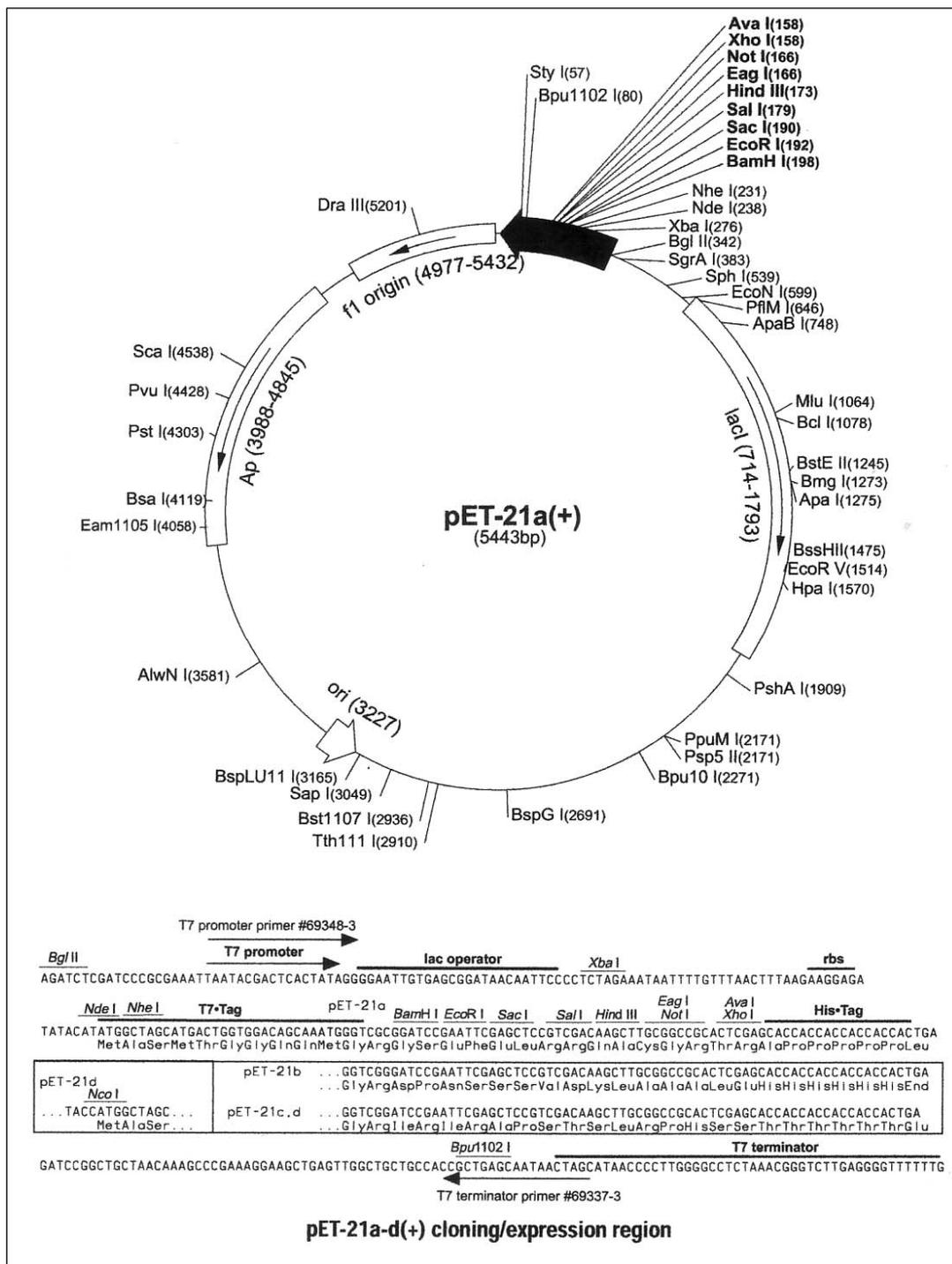


Abb.7.1.c Vektorkarte pET-21a® (Novagen)

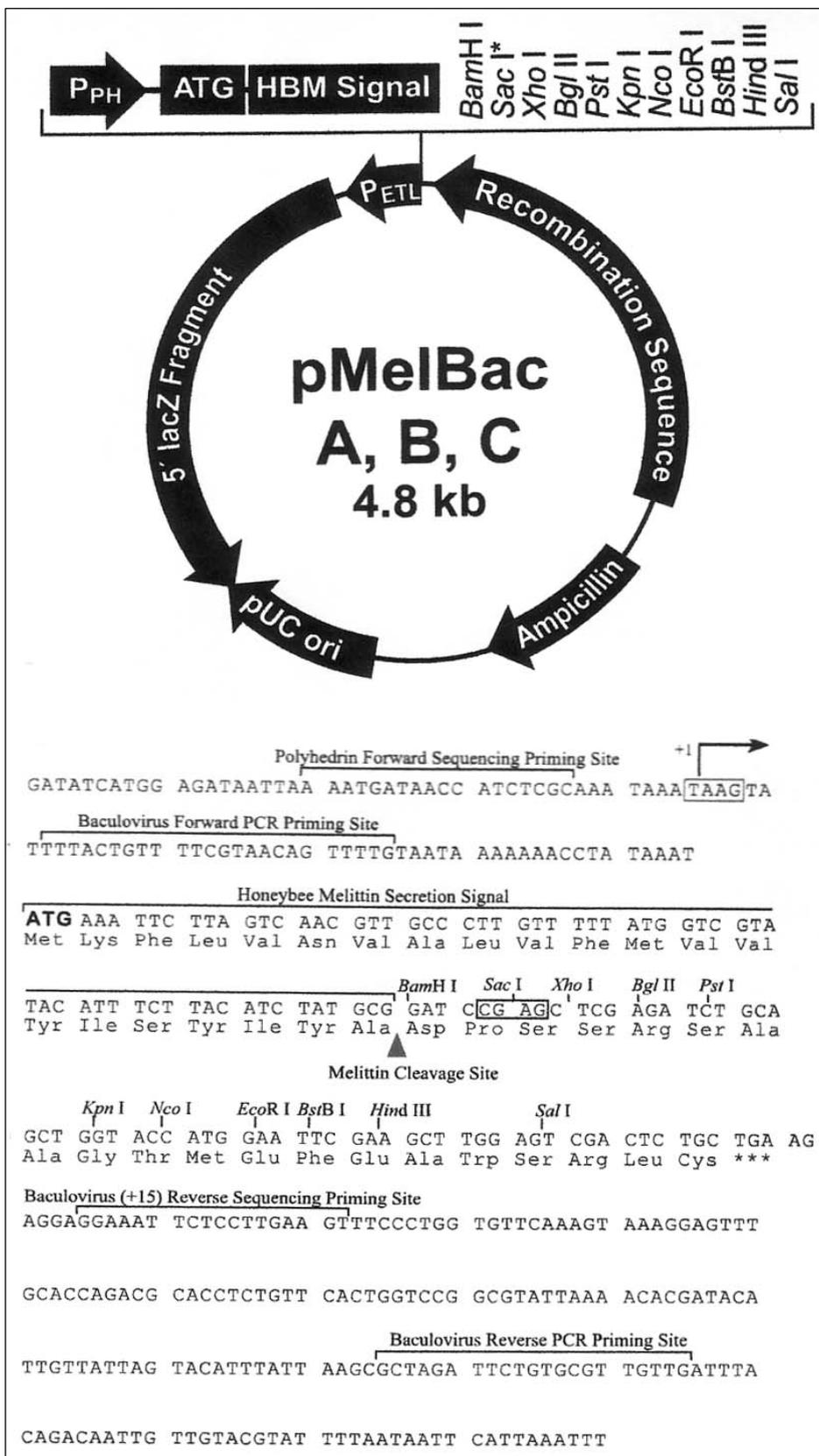


Abb.7.1.d Vektorkarte pMelBac® (invitrogen)

7.2 Gesamtsequenzen der PMCA4a und PMCA4b

bov4za	1159 aa vs.					
hum4za	10	20	30	40	50	60
bov4za	MTNPFTEHTLPSNSILESRSEGEFGCTVMDLRKLMELRSSDAIDQINVHYGGVNLCSRLKT					
hum4za	MTNPSDRVLPANSAESREGEFGCTVMDLRKLMELRSSDALQTQINVHYGGVNLCSRLKT					
bov4za	NPVEGLSGNPADLEKRRKQVFGNLIPLPKPKTFLELWWEALQDVTLIILEIAAIIISLVLS					
hum4za	SPVEGLSGNPADLEKRRQVFGHNVIPPKPKTFLELWWEALQDVTLIILEIAAIIISLVLS					
bov4za	FYRPPGEGENEQCGLAVTSPDEGEAEAGIIEGAALFSVIVVLVTFNDSKEKQFRGP					
hum4za	FYRPAEENEELCQQVATTPEDENEAQAGIIEGAALFSVIVVLVTFNDSKEKQFRGL					
bov4za	QNRIEKQKFSVIRNGHIQLPVAEIVVGDIAQIKYGDLLPADGILIQNDKIDESSLT					
hum4za	QCRIEKQKFSIIRNGLIQLPVAEIVVGDIAQIKYGDLLPADGILIQNDKIDESSLT					
bov4za	GESDHVKKSLERDPMLLSGTHVMEGSGRMVTVAVGINSQGLIFTLGASEGEEKMKK					
hum4za	GESDHVKKSLDKDPMLLSGTHVMEGSGRMVTVAVGINSQGLIITLLGVNDEGEKMKK					
bov4za	AKTQDGVALEIQPLNSQEGIDSEKKAALPKKESVQLQKLRFLAVQIGKAGLMSA					
hum4za	AKTQDGVALEIQPLNSQEGIDNEKDKAVKVPKESVQLQKLRFLAVQIGKAGLMSA					
bov4za	ITVLLILVYFIDNFIQRFPWLAECTPIYVQVFFKPIIGVTVLWVAVPEGLPLAVTIS					
hum4za	LTVPILLYVYFIDNFIINRRPWLPECTPIYVQVFFKPIIGVTVLWVAVPEGLPLAVTIS					
bov4za	LAYSVKRMMKDNLRHLDACETMGNATAICSDKTGLTMNRMSVVQAYIGDTRYHQIPS					
hum4za	LAYSVKRMMKDNLRHLDACETMGNATAICSDKTGLTMNRMTVVQAYIGGIHYRQIPS					
bov4za	PDDLVPKVLDLIVNGISINSAYTSKILPPEKEGGLPRQVGNKTECALLGFVSDLKQDYHA					
hum4za	PDVFLPKVLDLIVNGISINSAYTSKILPPEKEGGLPRQVGNKTECALLGFVTDLKQDYHA					
bov4za	VRSEVPEEKLYKVTYFNSVRKSMSTVIEKPGGGYRMYSGASEILLRKNRILDKGGEAV					
hum4za	VRNEVPEEKLYKVTYFNSVRKSMSTVIRNPGGGYRMYSGASEILLRKNRILDRKGEAV					
bov4za	PFKNKDRDVMRTVLEPMACEGLRTELCIAYRDFDNDGPPWDNESEILTELTCIAVVGIED					
hum4za	PFKNKDRDVMRTVLEPMACDGLRTELCIAYRDFDTPSPWDNESEILTELTCIAVVGIED					
bov4za	FVREVPDAIAKCKRAGITVRMVTGDNINARAIAATKCGILTPGDDFLCLEGKFNRLIR					
hum4za	FVREVPDAIAKCKQAGITVRMVTGDNINARAIAATKCGILTPGDDFLCLEGKFNRLIR					
bov4za	NEGGEVQEKLDKIPKLRVLRSSPTDKHTLVKGIIDSTVGDQRQVAVTGDGTNDGPA					
hum4za	NEGGEVQEKLDKIPKLRVLRSSPTDKHTLVKGIIDSTVGEHRQVAVTGDGTNDGPA					
bov4za	LKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDILITDNDFTSIVKAVMGRNVYDSISKFLQFQLTNVN					
hum4za	LKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDILITDNDFTSIVKAVMGRNVYDSISKFLQFQLTNVN					
bov4za	VAVIVAPTACITQDSPLKAVQMLWNLIMDTFASLALATEPPTSELLKRRPYGRNKPLI					
hum4za	VAVIVAPTACITQDSPLKAVQMLWNLIMDTFASLALATEPPTSELLKRRPYGRNKPLI					
bov4za	SRTMMKNILGHAVYQLTVIFPILVFAGEKFFIDSGRRAPLHSPSPQHYTIFNTEFLMQL					
hum4za	SRTMMKNILGHAFYQLTVIFILVFAGEKFFIDSGRRAPLHSPSPQHYTIFNTEFLMQL					
bov4za	FNEINSRKIHGERNVFSGIFRNLIFCSVVLGTFISQIIVFEGGKPFSCCTKLSQWFWC					
hum4za	FNEINSRKIHGERNVFSGIYRNIIFCSVVLGTFIQIIVFEGGKPFSCCTKLSQWLMC					
bov4za	LFIGIGELLWQQVISTIPTQSLKFLKEAGHTTKEEITKDAEGLDEIDHAEMELRQQLI					
hum4za	LFIGIGELLWQQFISALPTRSLKFLKEAGHTTKEEITKDAEGLDEIDHAEMELRQQLI					
bov4za	WFRGLNRIQTQIDVINTFQTGASFKGVLRQTMQGHLDVHVPSSSVTVVAVPKSSPTTS					
hum4za	WFRGLNRIQTQIDVINTFQTGASFKGVLRQTMQGHLDVHVPSSSVTVVAVPKSSPTTS					
bov4za	VAAVSSPTLGNQSQSVP					
hum4za	VPA-VSSPDMGNQSQSVP					

Abb.7.2

Vergleich der bovinen PMCA4za mit der humanen PMCA4za auf Aminosäureebene. Die Identität beträgt 90,8%.

bov 4b	1175 aa vs.					
hum 4bx	1205 aa					
	10	20	30	40	50	60
bov 4bx	MTNPTEHTLPSNSILLESRRGEFGCTVMDLRKLMELRSSDAIDQINHYGGVGNLCSRLKT					
hum 4bx	MTNPDDRVLFPANMAESRRGEFGCTVMDLRKLMELRSSDALTQINHYGGVGNLCSRLKT					
	70	80	90	100	110	120
bov 4bx	NPVEGLSGNPADLEKRRQVFGQNLIPPKKPKTFLVWEALQDVTLLILIAAIIISLWLS					
hum 4bx	SPVEGLSGNPADLEKRRQVFGHNVIPPKKPKTFLVWEALQDVTLLILIAAIIISLWLS					
	130	140	150	160	170	180
bov 4bx	FYRPPGGENEQCCLAVTSPDEGEAEAGWIEGAAILFSVIIVLVLTAFNDWSKEKQFRGL					
hum 4bx	FYRPAGEENELCCQVATTPEDENEAQAQWIEGAAILFSVIIVLVLTAFNDWSKEKQFRGL					
	190	200	210	220	230	240
bov 4bx	QNRIEKQKFSVIRNGHIIQLPVAEIVVGDIAQKYVGDLLPADGLIQGNDLKIDESSLT					
hum 4bx	QCRIEQEQKFSIIRNGQLQLPVAEIVVGDIAQKYVGDLLPADGLIQGNDLKIDESSLT					
	250	260	270	280	290	300
bov 4bx	GESDHVKSLEKDFMLLSGTHVMEGSGRMVTVAVGINSQTGIIIFLLGASGESEKSKK					
hum 4bx	GESDHVKSLEKDFMLLSGTHVMEGSGRMVTVAVGNSQTGIIIFLLGASGESEKSKK					
	310	320	330	340	350	360
bov 4bx	GKKQGVPEENRKAQTQDQVALEIQPLNSQEGIDSEKKAALPKKESVVLQKLTFLA					
hum 4bx	GKKQGVPEENRKAQTQDQVALEIQPLNSQEGIDSEKKAALPKKESVVLQKLTFLA					
	370	380	390	400	410	420
bov 4bx	VQIGKAGLIMSATVLLILYFVIDNPFVQRPPWLABCTPIYVQVFKFFIIGVTVLVA					
hum 4bx	VQIGKAGLIMSALTVPVLLILYFVIDNPFVQRPPWLABCTPIYVQVFKFFIIGVTVLVA					
	430	440	450	460	470	480
bov 4bx	VPEGLPLAVTISLAYSVKMMKDNVLRHLDACETMGNATAICSDKTGTITMNRMSVQA					
hum 4bx	VPEGLPLAVTISLAYSVKMMKDNVLRHLDACETMGNATAICSDKTGTITMNRMTVQA					
	490	500	510	520	530	540
bov 4bx	YIGDTRYHQIPSPDDLVPKLDLIVNGISINSAYTSKILPPEKEGGLPROVGNKTECALL					
hum 4bx	YIGGIHYRQIPSPDVPKLDLIVNGISINSAYTSKILPPEKEGGLPROVGNKTECALL					
	550	560	570	580	590	600
bov 4bx	GFVSDLKQDYHVRSEVPEEKLYKVTYFNSVRKSMSTVIEKPGGGVRYMYSKGASEILRK					
hum 4bx	GFVTDLKQDYQAVRNEVPEEKLYKVTYFNSVRKSMSTVIRNPNNGGFRMYMYSKGASEILRK					
	610	620	630	640	650	660
bov 4bx	CNRILDKKGEAVPFKNKDRDMDVTVIEPMACEGLRTLCIAYRDFDDEPPWDNESEILT					
hum 4bx	CNRILDRKGEAVPFKNKDRDMDVTVIEPMACDGLRTICIAAYRDFDDEPPWDNESEILT					
	670	680	690	700	710	720
bov 4bx	ELTICIAVVGIEDPVRPEVPEAIACKKAGITVVMVTGDNINTARAIAIKCGIIVTGDDFL					
hum 4bx	ELTICIAVVGIEDPVRPEVPEAIACKKAGITVVMVTGDNINTARAIAIKCGIIVTGDDFL					
	730	740	750	760	770	780
bov 4bx	CLEGEFNRILIRNEKGEVQEKLDKLPKLRVLRSSPTDKHTLVKGIIDSTVGDQRQVV					
hum 4bx	CLEGEFNRILIRNEKGEVQEKLDKLPKLRVLRSSPTDKHTLVKGIIDSTVGEHRQVV					
	790	800	810	820	830	840
bov 4bx	AVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDAKEASDILTDNFTSIVKAVMNGRNVDSI					
hum 4bx	AVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDAKEASDILTDNFTSIVKAVMNGRNVDSI					
	850	860	870	880	890	900
bov 4bx	SKFLQQLTVNVAVIVAFVFTGACITQDSPLKAVQMLVNLIMDTFASLALATEPPTSELL					
hum 4bx	SKFLQQLTVNVAVIVAFVFTGACITQDSPLKAVQMLVNLIMDTFASLALATEPPTSELL					
	910	920	930	940	950	960
bov 4bx	KRRPYGRNKPLISRTMMKNILGHAFVQLTVIFLVPAGEKFFDIDSGRRKAPLHSPSQHY					
hum 4bx	KRRPYGRNKPLISRTMMKNILGHAFVQLTVIFLVPAGEKFFDIDSGRRKAPLHSPSQHY					
	970	980	990	1000	1010	1020
bov 4bx	TIIFNTFVLMQPFNEINSRKHGERNVPSGIFMFLPFCVVVLGTFISQIIVFEGGKPPS					
hum 4bx	TIVNTFVLMQLFNEINSRKHGKKNVPSGIYFNIPFCVVVLGTFIQIIVFVFGGKPPS					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
bov 4bx	CTKLTLSQWFCLFIGIGELLWQVISTIPTQSLKFLKEAGHGTTKEEITKDAEGLDEID					
hum 4bx	CTSLSLSQWLCLFIGIGELLWQVISAIPTRSLKFLKEAGHGTTKEEITKDAEGLDEID					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
bov 4bx	HAEMELRRGQILWFRGLNRIQTQIKVVKAFHSSSLHESIQKPKNQNSIHNFMTHPEPTIDE					
hum 4bx	HAEMELRRGQILWFRGLNRIQTQIKVVKAFHSSSLHESIQKPKNQNSIHNFMTHPEPTIDE					
	1150	1160	1170			
bov 4bx	EGPRTPLLDQEEIEFKVSKPGTKTSSSLDGEVTP-----					
hum 4bx	ELPRTPLLDSEENPDKAKFGTRVLLLDGEVTPYANTNNVDCNQVLPQSDSSLSQ					
	1180	1190	1200			
bov 4bx	----					
hum 4bx	LETSV					

Abb.7.3
 Vergleich der bovinen PMCA4xb mit der humanen PMCA4xb auf Aminosäureebene. Die Identität beträgt 88%.

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Aumüller und Frau PD Dr. Beate Wilhelm für die freundliche Überlassung des Themas, ihre Betreuung, die praktische Hilfe und das immer freundliche und offene Arbeitsklima.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Aumüller und Seitz, die mir ihre Unterstützung zuteil werden ließen: Herrn Dr. Andreas Doll, Herrn PD Dr. Georg Lüers, Frau Dr. Heidi Post, Herrn Prof. Dr. Jürgen Seitz, Herrn Prof. Dr. Gunther Wennemuth, Frau Irmgard Dammshäuser, Herrn Michael Dreher, Frau Wega-Maria Gutschank, Frau Anne Henkeler, Frau Gudrun Hoffbauer, Herrn Gerhard Jennemann, Frau Claudia Keppler, Frau Gabriella Nicholls und Frau Elke Völk-Badouin.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern und Freunden für alle Unterstützung, die sie mir während des gesamten Zeitraums dieser Arbeit gegeben haben.

7.4 Verzeichnis der Akademischen Lehrer

in Marburg:

Herr Prof. Dr. Gerhard Aumüller, Frau PD Dr. Beate Wilhelm, Herr Prof. Dr. Jürgen Seitz, Herr Prof. Dr. Thomas Gudermann, Herr PD Dr. Lutz Konrad, Herr Prof. Dr. Walter Krause, Herr PD Dr. Georg Lüers, Herr Prof. Dr. Klaus Heinrich Röhm, Herr PD Dr. Gunther Wennemuth,

desweiteren die folgenden Damen und Herren Professoren und Privatdozenten:

Albert, Anlauf, Arnold, Barth, Basler, Battmann, Baum, Becker, Behr, Bernstein, Bertallanfy, Beyer, Bien, Bolm, Boudriot, Büch, Cetin, Czubayko, Daut, Deichert, Diedrich, Dietz, Donner-Banzhoff, Duda, Feuser, Funck, von Garell, Geks, Gemsa, Gerdes, Görg, Görg, Gotthardt, Gotzen, Grimm, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Hasilik, Havemann, Helwig-Rolig, Herzum, Höffken, Hörle, Hörsch, Holst, Jones, Jungclas, Kajdan, Kann, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kuni, Lang, Leonhardt, Lill, Lippert, Lohoff, Löffler, Lorenz, Mandrek, Martin, Mennel, Meyer, Miko, Mittag, Möller, Moll, Moosdorf, Mronga, Müller, Müller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Printz, Preis, Radsack, Renz, Ramaswamy, Remschmidt, Richter, Ritter, Ritter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schäfer, Schepelmann, Schmidt, Schmitt, Schneider, Schu, Schunk, Schwarz, Schwella, Seitz, Seyberth, Sommer, Steiniger, Stein, Stief, Stiletto, Storck, Sure, Tebbe, Theisen, Vogelmeier, Vogt, Voigt, Wagner, Wagner, Wahl, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Winter, Wissner, Wulf, Zeiler, Zielke, Zimmermann.

in Giessen:

Herr Prof. Dr. Andreas Meinhardt, Herrn Prof. Dr. Bernd Hoffmann, Frau Dr. Chistiane Pfarrer, Frau PD Dr. vet. Elvira Hinsch, Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Hinsch, Herr PD Dr. Klaus Steger, Herr Prof. Dr. Martin Bergmann, Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser, Herr PD Dr. Uwe Lang, Herr Prof. Dr. Dr. Wolf-Bernhard Schill, Herr Prof. Dr. Wolfgang Weidner.

in Kassel:

Prof. Dr. Martin Konermann, PD Dr. Johannes Heimbucher

in Hamburg:

Frau Prof. Dr. Christiane Kirchhoff

in den USA:

Mayo Clinic, Rochester: Herr Prof. Emanuel Strehler, PhD, Herr Ariel Caride, PhD

UC San Francisco: Prof. Ronald Miller, MD, PhD, Prof. George Gregory, MD, Prof. Thoha Pham, MD, Prof. David Lee, MD, Prof. Dr. Christian Apfel, MD, Prof. Marek Bzrezinski, MD, Prof. Dr. Jens Krombach, MD