

Die biologische Bedeutung eines basischen Proteins (BBSP) aus dem Seminalplasma des Rindes

The Biological Significance of a Basic Protein (BBSP) from the Seminalplasma
of the Bull

V. Gladigau und G. Ruhenstroth-Bauer

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für experimentelle Medizin, Martinsried bei München

(Z. Naturforsch. **29 c**, 257–260 [1974] ; eingegangen am 16. Februar 1974)

Biology, Seminalplasma, Bull, Basic Protein

1. The mean concentration of BBSP in the seminal bull plasma is 1.53 ± 0.30 mg/ml. This concentration decreases about 40% after 14 days storage at 4 °C.
2. There is only a small correlation between the concentration of BBSP in the seminalplasma and its fertilization capacity.
3. An artificial doubling of the normal BBSP concentration does not change the results of an artificial insemination.
4. The genital tract of bull has been investigated with immunofluorescent antibodies on the presence of BBSP. The results were negative.
5. Exprimed sperm from tail of epididymis didn't show fluorescence after treatment with correspondent antibodies. However washed ejaculated sperms had a distinct fluorescence in the middle piece. After incubation of washed sperms with BBSP containing seminal plasma the entire surface of the sperms showed an additional immunofluorescence.
6. From this it is concluded that BBSP develops or is concentrated in the middle piece of sperms during its stay in the head of the epididymis. During the ejaculation a portion of the sperms is destroyed and therefore BBSP enters the seminalplasma. The sperms contain on the whole surface strongly negatively charged groups especially neuraminic acids. The BBSP binds to these groups. So the electrophoretic mobility of ejaculated sperms is reduced.
7. The BBSP has a strong leukotactic activity. This is the probable reason for the phagocytotic activity of seminal plasma.

Im Seminalplasma des Rindes befindet sich ein stark basisches Protein (BBSP) * mit einem Molekulargewicht von etwa 46.000¹. Physikalische Untersuchungen haben ergeben, daß es keinen oder höchstens einen sehr geringen α -Helix-Anteil besitzt, dagegen Proteinen mit einer β -Struktur weitgehend ähnelt. Die Bruttozusammensetzung ergibt einen hohen Gehalt an Lysin und Arginin; insgesamt sind etwa $\frac{1}{5}$ aller Aminosäuren basisch. Weiterhin enthält es einen hohen Anteil an Serin, Cystin, Asparagin- und Glutaminsäure, beide hauptsächlich in der Amidform, jedoch kein Tryptophan und keinen Kohlenhydratanteil. Eine Endgruppenbestimmung ergab Lysin und Alanin zu etwa gleichen Anteilen.

Im folgenden soll über Versuche über die Herkunft und die biologische Bedeutung des BBSP berichtet werden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für experimentelle Medizin, D-8033 Martinsried b. München.

* In der unter ¹ zitierten Arbeit wurde dieses Protein CM-B genannt.

Methoden

Gewinnung von BBSP-Antisera und quantitative Bestimmung des BBSP

Kaninchen wurden nach einer modifizierten Methode von Kabat und Mayer² mit BBSP immunisiert, dessen Reinheit mittels Polyacrylgel-Elektrophorese geprüft worden war. Zur Immunisierung wurde es an Aluminiumhydroxid adsorbiert.

Immunisierungsschema:

Am 1. Tag:	
3 × 0,5 mg Protein an verschiedenen Stellen	s.c. oder i.m.
Am 8. Tag:	
2 × 1 mg Protein an anderen Stellen	s.c. oder i.m.
Am 15. Tag:	
2 × 1,5 mg Protein an anderen Stellen	s.c. oder i.m.
Am 22. Tag:	
2 × 2 mg Protein an anderen Stellen	s.c. oder i.m.
4 Wochen nach der letzten Injektion:	
Erneut 2 × 2 mg Protein	s.c. oder i.m.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Die Serumabnahme erfolgt frühestens 8 Tage nach der letzten Injektion.

Der Antikörpergehalt der gewonnenen Antiseren wurde folgendermaßen erhöht: Nach Zentrifugation des Kaninchenblutes wurde das überstehende Serum 1:1 mit aqua bidest. verdünnt und mit Ammoniumsulfat bis zu einer 40prozentigen Sättigung gefällt. Die ausgefällten Immunglobuline wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, 24 Stunden gegen aqua bidest. dialysiert und gefriergetrocknet.

Partigenplattentechnik

Entsprechend den Partigenplatten der Behring-Werke (Marburg/Lahn) wurden Agaroseplatten mit monospezifischem BBSP-Antiserum hergestellt. Mit einer Verdünnungsreihe des reinen BBSP wurden diese Platten auf ihre Antiserumwirkung kontrolliert und aufgrund der Hofbildung für quantitative Aussagen geeicht. Auf diese Weise waren quantitative Bestimmungen des BBSP bei Seminalplasmen verschiedener Bullen möglich. Die Proben wurden etwa 3 Stunden nach der Ejakulation aufgetragen. Ablesen der Platten erfolgte 48 Stunden später³. Eine immunoelektrophoretische Austestung des Antiserus ergab eine einzelne scharfe Bande mit BBSP, ein Ansatz mit Bullens seminalplasma jedoch noch eine weitere schwächere Bande um den Auftragungspunkt des Seminalplasmas. Die beiden Bandenbögen beim Seminalplasma gingen ohne Kreuzungspunkt ineinander über. Dies spricht gegen eine Verunreinigung des als Antigen verwendeten BBSP; möglicherweise enthält das Seminalplasma eine weitere Substanz in geringer Konzentration, die mit den BBSP-Antikörpern kreuzreagiert.

Untersuchungen über den Bildungsort des BBSP mittels Immunfluoreszenz

Die gefriergetrocknete Immunglobulinfraktion des anti-BBSP-Kaninchenserums wurde sowohl mit Rhodamin-B (Fa. E. Merck, Darmstadt) als auch mit FITC (Fa. Hyland-Travenol, München) fluorochromiert⁴. Danach erfolgte eine Überprüfung der Seren auf ungebundenes, fluoreszierendes Material⁵, wobei als Antigen-Antikörper-Serum Hühnererythrocyten und ein monospezifisches L.E.-Testserum (Fa. Hyland-Travenol, München) fungierte. Weder bei der Rhodaminfärbung noch bei der FITC-Färbung trat in diesem Modell eine nennenswerte Fluoreszenz auf.

In einer Untersuchungsreihe wurden periphere und zentrale Hodenschnitte, Schnitte vom Nebenhodenschwanz und -kopf, vom Samenleiter, Ausstriche vom Nebenhodenexprimat und Ejakulaten sowie Spermien vor und nach Inkubation mit

BBSP mit diesen fluorochromierten Antiseren auf Fluoreszenz hin untersucht.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden von gleichen Stellen histologische Präparate angefertigt, jedoch mit nicht-fluorochromiertem Antiserum inkubiert. Dann wurden diese Präparate mit einem spezifischen Anti-Kaninchen-IgG-Serum von Ziegen inkubiert, das in der mit FITC-fluorochromierten Form von der Fa. Hyland-Travenol (München) stammte.

Die *ATP-Bestimmungen* erfolgten mit Boehringer-ATP-Monotest⁶.

Untersuchung der Befruchtungswirkung von BBSP

10 ml eines Bullenejakulats wurden halbiert. Zu einem Teil wurden tropfenweise 5 ml Hanks-Lösung zugefügt, in der 20 mg reinen BBSP gelöst waren. Der andere Teil des Ejakulats wurde mit 5 ml reiner Hankslösung versetzt. Die Aufschwemmungen standen 20 min bei 20 °C und wurden dann mit der Tris-Verdünnerlösung so verdünnt, daß etwa $5 \cdot 10^7$ lebende Spermien im ml enthalten waren. Die Konzentration des BBSP in den Versuchsproben war auf diese Weise etwa verdoppelt. Bei der mikroskopischen Beobachtung zeigten die Versuchs- und Kontrollproben keinen Unterschied in der Spermienqualität. Die Proben wurden anschließend innerhalb 30–40 min auf 5 °C gekühlt und blieben bei dieser Temperatur etwa 6 Stunden stehen. Sie wurden dann auf –196 °C eingefroren. Aufgetaute Einzelproben zeigten hinsichtlich der Spermienqualität keine mikroskopisch faßbaren Unterschiede. Die Proben wurden innerhalb längstens 2 Monaten zur Insemination verwendet.

Untersuchung der leukotaktischen Wirkung von BBSP

Die leukotaktische Aktivität von BBSP wurde nach der Methode von Boyden⁷ untersucht. Menschliches Zitratblut wurde mittels isotonem Ammoniumchlorid hämolysiert, durch Zentrifugation wurden vitale Leukozyten gewonnen. Sie wurden mit zitratfreiem Serum des gleichen Spenders einmal gewaschen und in neuem Spenderserum in einer Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Leukozyten/ml resuspendiert. Die beiden Teile der Boydenkammer hatten ein Volumen von etwa je 0,5 cm³.

In den oberen Teil der Boydenkammer wurde die Leukozytensuspension gefüllt, im unteren Teil, der vom oberen durch ein Milliporefilter getrennt war, befand sich Spenderserum, in dem BBSP in verschiedenen Mengen gelöst war. Nach einer 2¹/₂stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Filter fixiert, gefärbt und die Zahl der einge-

drungenen Leukozyten/Filterfläche ausgezählt. Die Flächeneinheit bildete ein Gitternetz, das im Mikroskopokular eingesetzt war.

Ergebnisse

Bei 20 Bullen wurde die Konzentration des BBSP mittels des Partigenplattentests gemessen. Die mittlere Konzentration betrug 1,53 mg/ml mit einer Streuung von $\pm 0,30$ mg/ml. Ein Seminalplasma wurde bei 4 °C gelagert. Die Ausgangsproteinkonzentration von 1,38 mg/ml fiel innerhalb 10 Tagen auf 1,22 mg/ml ab und betrug nach 15 Tagen 0,93 mg/ml.

Bei den 20 Tieren wurde weiter untersucht, wie ihre Befruchtungsergebnisse im Jahresmittel mit der gefundenen Konzentration des BBSP im Seminalplasma korreliert. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,096.

In drei Fällen wurden die Konzentrationen des BBSP bei zwei kurz aufeinanderfolgenden Ejakulationen derselben Tiere gemessen. Sie waren im Rahmen der Fehlergenauigkeit gleich hoch.

Die Untersuchungen der histologischen Schnitte im Bereich des Bullengenitaltrakts mittels Immunfluoreszenz ergaben folgendes: Weder im Hoden noch im Nebenhodengewebe konnte BBSP nachgewiesen werden. Das gleiche gilt für die Anhangsdrüsen des Genitaltrakts. Auch die Versuche, BBSP aus diesen Organen zu extrahieren und mittels Partigenplatten nachzuweisen, schlugen fehl. Bei der letztgenannten Untersuchung wurden die Gewebshomogenate mittels Ultraschall erzeugt, durch Hochtourenzentrifugation ein partikelfreier Überstand gewonnen und dieser bei einer Proteinkonzentration von ungefähr 100 mg/ml untersucht.

Nebenhodenspermien, die durch Ausdrücken des angeschnittenen Nebenhodenschwanzes gewonnen worden waren, ergaben sowohl vor als auch nach Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung keine Fluoreszenz. Wurden solche Nebenhodenspermien jedoch mit BBSP inkubiert, konnte dieses über dem gesamten Spermium nachgewiesen werden. Wurden dagegen ejakulierte Spermien in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, so ließ sich im Mittelstück eine deutliche Fluoreszenz herbeiführen. Nach Inkubation ejakulierter Spermien mit BBSP wurde diese Mittelstücksfluoreszenz noch intensiviert, darüber hinaus ließ sich das Protein aber über dem ge-

samten Spermium nachweisen und entsprach damit exprimierten Nebenhodenspermien.

Es wurde untersucht, ob BBSP imstande ist, ATP zu binden. Hierfür wurde BBSP in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, 5 min bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert und die Menge freien ATP gemessen; das Ergebnis ist in Tab. I wiedergegeben. Eine gleiche Inkubation bei Zimmertemperatur während 30 min ergab nur eine geringe, eine einstündige Inkubation bei 4 °C keine Bindung. Die mit den analogen Testverfahren bestimmten Mengen an ADP und AMP waren gering; es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei der Verminderung des nachweisbaren ATP um eine Bindung des ATP an das BBSP und nicht um einen Abbau handelt.

Eingesetzte Menge BBSP	ATP	Wiedergefundene Menge ATP
—	0,40	0,32
—	0,20	0,20
—	0,10	0,11
—	0,05	0,07
—	0,025	0,03
0,5	0,4	0,10
0,5	0,2	0,04
0,5	0,1	0,02
0,5	0,05	0,00
0,5	0,025	0,00

Tab. I.
Bindungsfähigkeit von BBSP für ATP bei 37 °C.

Eingesetzte Menge BBSP	ATP	Wiedergefundene Menge ATP
1,0	0,30	0,22
0,5	0,30	0,27
0,25	0,30	0,27

Tab. II.
Bindungsfähigkeit von BBSP für ATP bei Zimmertemperatur.

Es wurde mit 6 Einzelejakulaten von 6 Bullen ein Vergleich bei insgesamt 427 Versuchsinseminationen mit erhöhtem BBSP-Gehalt und 438 Kontrollinseminationen mit dem natürlichen BBSP-Gehalt durchgeführt. Die Versuchsinseminationen ergaben bei der jeweilig ersten Insemination ein Befruchtungsergebnis von 67,4%, die Kontrollinseminationen von 65,1% der Rinder.

Die Untersuchung der leukotaktischen Aktivität von BBSP nach Boyden ergab das in Tab. III wiedergegebene Ergebnis: BBSP wirkt schon in geringen Konzentrationen deutlich leukotaktisch.

mg BBSP/Boyden- kammer	Leukozyten/cm ² Filterfläche	Tab. III. Ergebnis der Leukotaxisversuche mit BBSP.
1,0	395	
0,5	280	
0,25	129	
0	34	

Besprechung

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzversuche sowie die früheren elektrophoretischen Ergebnisse sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß das BBSP aus dem Mittelteil der Spermien stammt. Entweder entsteht es dort bei der Lagerung der Spermien im Nebenhodenhkopf oder aber es wird dort während dieses Zeitraums konzentriert. Das geht daraus hervor, daß sämtliche untersuchten Drüsen des Genitaltrakts sowie die Mittelstücke der Spermien, die aus dem Nebenhodenschwanz exprimiert werden, keine Immunfluoreszenz nach entsprechender Behandlung zeigen, während ejakulierte gewaschene Spermien eine deutliche Immunfluoreszenz im Mittelstück aufweisen. Der Gehalt an BBSP im Seminalplasma dürfte demnach aus den während der Ejakulation zerstörten⁸ Spermien stammen. Da die Spermien an ihrer Oberfläche stark negativ geladen sind, adsorbieren sie elektrostatisch das positiv geladene BBSP, so daß ungewaschene ejakulierte Spermien sowie solche, die nach der Waschung wieder mit Seminalplasma inkubiert wurden, über der gesamten Zelloberfläche zur Immunfluoreszenz gebracht werden können. Dabei kommt es zu einer Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit gewaschener Spermien nach Inkubation im Seminalplasma.

Die Untersuchungen brachten keinen Anhalt für die Annahme, daß das BBSP einen unmittelbaren Einfluß auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermien besitzt. Dagegen spricht der Befund, daß eine künstliche Erhöhung der BBSP-Konzentration auf etwa

das Doppelte der Norm zu keiner Änderung der Ergebnisse der künstlichen Insemination führt. Außerdem besteht nur eine geringe Gesamtkorrelation zwischen der Konzentration des BBSP in den untersuchten Bullenejakulaten und deren Befruchtungsergebnissen.

Es ist schon seit längerem bekannt, daß basische Proteine eine leukotaktische Wirkung haben⁸. Dies legte die Vermutung nahe, daß auch das BBSP eine solche Aktivität aufweist. Unsere Versuche zeigen, daß BBSP tatsächlich eine starke leukotaktische Aktivität besitzt, die in der Boydenanordnung nachgewiesen wurde. Die biologische Bedeutung dieser leukotaktischen Aktivität ist nicht klar. Einerseits könnte es sich um eine Abwehrreaktion gegen Infektionen bei der natürlichen Insemination handeln, andererseits wurde auch eine Phagozytose von Spermien durch neutrophile und mononukleäre Leukozyten in der Vagina bzw. Cervix⁹ beschrieben; die leukotaktische Aktivität des BBSP könnte für diese Phagozytose verantwortlich sein.

Das stark negativ geladene BBSP bindet aus elektrostatischen Gründen gelöstes ATP. Ob diese Bindung von spezifischer biologischer Bedeutung ist, ist jedoch zu bezweifeln.

Die reversible Ionenstärke-abhängige Assoziation des BBSP könnte vielleicht auch mit einer Beobachtung von Bangham¹⁰ über die Orientierung nicht gewaschener Widder- und Kaninchenspermien im elektrischen Feld in Beziehung stehen. Diese Spermien wandern ebenfalls alle zur Anode. Bei einer Ionenstärke von 0,145 wandern sie mit dem Schwanz voran (schwanzanodisch); eine gestufte Erniedrigung der Ionenstärke erhöht zunehmend den Anteil der kopfanodischen Zellen, bis zuletzt nur kopfanodische Spermien gefunden werden. Die Verminderung der Ionenstärke dürfte zu einer verstärkten Adsorption des BBSP an die stärker negativ geladene Schwanzportion der Spermien führen und dadurch die reversible Umkehrung der Orientierung der Zellen im elektrischen Feld verursachen.

¹ J. Forrester, R. Arnold u. G. Ruhenstroth-Bauer, *Europ. J. Biochem.* **11**, 341–346 [1969].

² E. A. Kabat, *Methods in Immunology and Immunochemistry* (ed. C. A. Williams u. M. C. Chase), **Bd. 1**, Acad. Press, New York 1967.

³ W. Becker, W. Rapp, H. G. Schwick u. K. Störko, *Z. klin. Chem.* **6**, 113–122 [1968].

⁴ J. E. Fothergill, *Fluorescent protein tracing*. (R. C. Nairn, ed.) 2. Ed., p. 4, Livingstone, London 1964.

⁵ K. Fischer u. E. Doraszewski, *Mschr. Kinderhk.* **113**, 175–176 [1964].

⁶ D. Jaworek, W. Gruber u. R. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, (R. U. Bergmeyer, ed.), **Bd. 2**, S. 2020, Chemie-Verlag, Weinheim 1970.

⁷ St. Boyden, *J. exp. Med.* **115**, 453–466 [1962].

⁸ M. Rabinovitch, *Phagocytosis. The engulfment stage*. *Seminar in hematology* **5**, 134–155 [1968].

⁹ D. L. Moyer, F. S. Rimdusit u. D. R. Mishell, *Obstetrics, Gynecol.* **15**, 813–840 [1970].

¹⁰ A. D. Bangham, *Proc. Roy. Soc. B* **155**, 292–305 [1961].