

# Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs) in bovinen Spermatozoen

Yvonne Krause  
geb. Wagner

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2007

© 2007 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-939902-60-7

Verlag: DVG Service GmbH  
Frankfurter Straße 89  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der  
Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. G. Schuler

und

aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuerin: Prof. Dr. E. Hinsch

# Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs) in bovinen Spermatozoen

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Yvonne Krause  
geb. Wagner  
Tierärztin aus Wissen a. d. Sieg

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. G. Schuler  
Prof. Dr. E. Hinsch

Tag der Disputation: 08.11.2007

meinen Eltern  
und  
Gerhard





## Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AKAP	A-Kinase Anchoring Protein
Aqua dest.	destilliertes, demineralisiertes Wasser
AS	Antiserum
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDS	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-S
H/C	Hydroxyapatit/Celite
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
<i>n</i>	Anzahl der durchgeführten Experimente
ODF	Outer dense fibers, Mantelfasern
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PHS	Protease- und Phosphatasehemmstoffe
PI	Präimmunserum
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylendiamid
Tris	Tetra-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
ZP3	Zona pellucida Protein 3

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Das Spermatozoon	8
1.1.1	Spermatogenese und Spermiogenese	8
1.1.2	Morphologischer Aufbau des Spermatozoons	9
1.1.3	Epididymale Spermatozoenreifung	11
1.2	Physiologie der Fertilisation	13
1.2.1	Kapazitation	13
1.2.2	Akrosomale Reaktion	14
1.2.3	Die Fusion von Spermatozoon und Oozyte	15
1.3	Die Bedeutung von posttranslationalen Proteinmodifikationen	17
1.4	Die Bedeutung der Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs)	18
1.4.1	Vorkommen und Funktionen von VDACs	18
1.4.2	VDACs in Spermatozoen	21
1.4.3	Regulation von VDACs	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>24</b>
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.2	Eingesetzte Antikörper	27
2.3	Medien und Lösungen	28
2.4	Verwendete Kits	30
2.5	Geräte	31
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	32
3.1.1	Epididymale Spermatozoen	32
3.1.2	Ejakulierte Spermatozoen	33
3.2	Gewinnung und immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen	34
3.2.1	Extraktion boviner Spermatozoenproteine	34
3.2.2	Reinigung der VDAC Subtypen aus Proteinextrakten boviner Spermatozoen	37
3.2.3	Proteinpräzipitation	38
3.2.4	Proteinbestimmung	39
3.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
3.2.6	Western Blot	40
3.2.7	Immunbiochemische Identifizierung von VDAC Subtypen durch das Chemilumineszenzverfahren	40
3.2.8	Massenspektrometrische Analyse der gereinigten VDAC Proteine	41
3.2.9	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von VDAC Subtypen in bovinen Spermatozoen	42
3.3	Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung in bovinen Spermatozoen während der Nebenhodenpassage	42

3.3.1	Immunbiochemische Identifizierung phosphorylierter Spermatozoenproteine	42
3.3.2	Immunzytochemische Identifizierung phosphorylierter Spermatozoenproteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz	43
3.3.3	Anfärbung von Phosphoproteinen in Polyacrylamidgelen	43
3.3.4	Affinitätschromatografische Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Proteine	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	Nachweis der VDAC Subtypen in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen	46
4.1.1	Extraktion und Anreicherung der VDAC Subtypen	46
4.1.2	Immunoblot mit bovinen Spermatozoenproteinen	50
4.1.3	Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteinextrakte	55
4.1.4	Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC in bovinen Spermatozoen	57
4.2	Proteinphosphorylierung in bovinen Spermatozoen während der Nebenhodenpassage und in ejakulierten Spermatozoen	61
4.2.1	Immunbiochemischer Nachweis phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoen	61
4.2.2	Immunzytochemischer Nachweis phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoen	66
4.2.3	Affinitätschromatografische Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Spermatozoenproteine	70
4.3	Nachweis von phosphorylierten VDAC Proteinen in H/C gereinigten bovinen Spermatozoenextrakten	78
4.3.1	Phosphoproteinspezifische Färbung der H/C gereinigten VDAC Proteine	78
4.3.2	Immunbiochemischer Nachweis von phosphorylierten VDAC Proteinen	80
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
5.1	Nachweis und Lokalisation der VDAC Subtypen in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen	83
5.2	Phosphorylierung boviner Spermatozoenproteine während der Nebenhodenpassage	90
5.3	Phosphorylierung der VDAC Proteine	94
5.4	Abschließende Betrachtung	99
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>116</b>
9.1	Danksagung	116
9.2	Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit	117

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Spermatozoon

### 1.1.1 Spermatogenese und Spermio-genese

Die Spermatogenese, d.h. die Entwicklung der Spermatozoen aus Spermatogonien (Stammzellen), setzt mit Beginn der Geschlechtsreife im Keimepithel der Tubuli seminiferi des Hodens ein. Die Gesamtdauer der Spermatogenese ist spezie-sabhängig und dauert beim Bullen etwa 54 Tage (Rüsse und Sinowatz, 1991). Während der Spermatogenese durchlaufen die Keimzellen **drei Entwicklungsphasen** (Eddy, 1998; Steger, 2001).

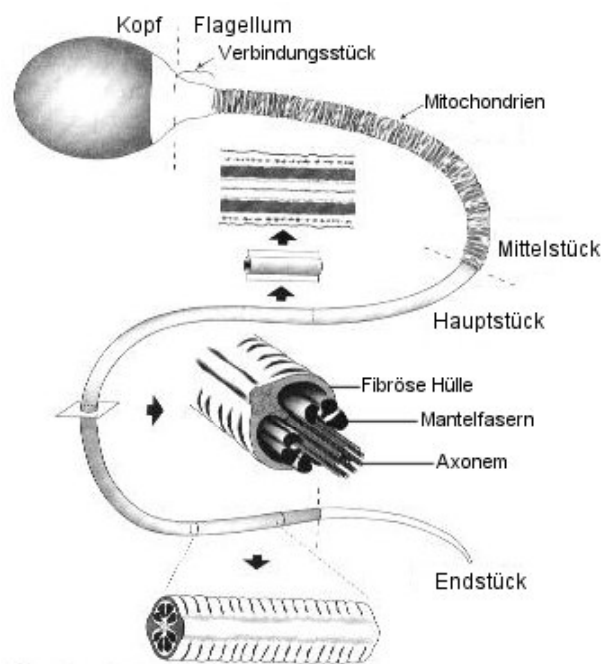
In der **mitotischen Vermehrungsphase** teilen sich die Spermatogonien und differenzieren sich zu primären Spermatozyten. Diese durchlaufen eine Wachstumsphase, in deren Verlauf sich ihr DNA Gehalt verdoppelt. Während der sich anschließenden **meiotischen Vermehrungsphase** entstehen aus einer primären Spermatozyte (4c DNA) in der ersten Reifeteilung zwei sekundäre Spermatozyten (2c DNA). Aus den beiden sekundären Spermatozyten entstehen bei der zweiten Reifeteilung schließlich vier runde Spermatiden (1c DNA). Die noch unreifen Spermatiden teilen sich nicht mehr und durchlaufen eine **Differenzierungsphase**, die auch Spermio-genese genannt wird. Dabei differenzieren sich die runden Spermatiden zu elongierten Spermatozoen. Während der Spermio-genese erfolgt im Zellkern die Kondensation der DNA, indem Histone durch cysteinreiche DNA-bindende Proteine (Protamine) ersetzt werden. Auf diese Weise wird eine Komprimierung des genetischen Materials auf engstem Raum ermöglicht. Die Gentranskription kommt ab diesem Stadium zum Stillstand (Steger, 2001). Parallel zur Kondensation des Zellkerns bilden sich das Akrosom aus dem Golgi-Apparat und das Flagellum aus dem distalen Zentriol aus (de Kretser und Kerr, 1994).

Die Differenzierung von Spermatogonien in reife Spermatozoen geschieht nicht zufällig, sondern in gut definierten zellulären Assoziationen, die sich nacheinander zeitlich folgen. Anhand von diesen zellulären Assoziationen (Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden in verschiedenen Entwicklungsstufen) kann die Spermatogenese in Entwicklungsstadien unterteilt werden. Eine komplette Abfolge dieser Entwicklungsstadien wird als Keimepithelzyklus bezeichnet. Beim Bullen sind 12 Spermatogenesestadien (I-XII) beschrieben, die auf morphologischen Veränderungen des Akrosoms und des Zellkerns basieren. Die Spermatiden werden dabei 14 Entwicklungsstufen zugeordnet, wobei Zellen der Entwicklungsstufen 1-7 als runde Spermatiden und die der Stufen 8-14 als elongierte Spermatiden bezeichnet werden (Berndston und Desjardins, 1974).

### 1.1.2 Morphologischer Aufbau des Spermatozoons

Das Spermatozoon ist eine frei bewegliche Zelle und besteht aus Kopf und Schwanz (Abbildung 1). Der Kopf bildet die Hauptmasse und besitzt beim Rind eine Größe von ca.  $8\mu\text{m} \times 4,5\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  (Rüsse und Sinowatz, 1991). Die Kopfform weist speziesspezifische Unterschiede auf. Während der Kopf z.B. beim Rind flach oval geformt ist, ist er bei Maus und Ratte hakenförmig gestaltet. Hauptbestandteil des Kopfes ist der Zellkern mit einem haploiden Chromosomensatz und stark kondensiertem Chromatin, der von einer Kernmembran umgeben ist. Im vorderen Kopfbereich ist das Akrosom (griechisch akron, Spitze) lokalisiert. Es stellt ein mit proteolytischen Enzymen angefülltes Hohlorganell dar, das durch eine innere akrosomale Membran (Abgrenzung zur Kernmembran) und eine äußere akrosomale Membran (Abgrenzung zur Plasmamembran) gebildet wird. Während der Akrosomreaktion verschmelzen die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran des Spermatozoons. Es kommt zur Freisetzung der im Akrosom enthaltenen Enzyme (Eddy und O'Brien, 1994; Saling *et al.*, 1979).

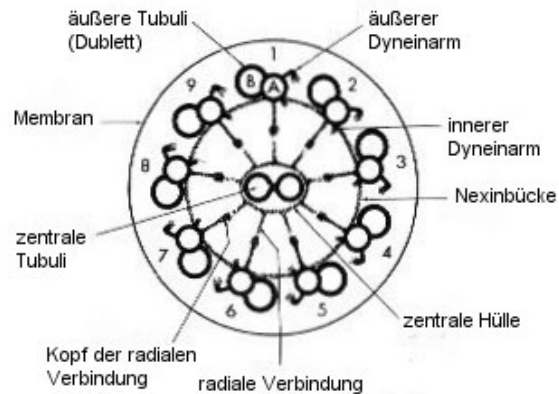
Die Beweglichkeit der männlichen Gameten ist eine Voraussetzung für die Befruchtung. Der Spermatozoenschwanz enthält die für den Energiestoffwechsel und die Bewegung zuständigen Strukturen. Er setzt sich zusammen aus dem Verbindungsstück (connecting piece), dem Mittelstück, dem Hauptstück und dem Endstück und ist beim Rind etwa  $63\mu\text{m}$  lang (Rüsse und Sinowatz, 1991).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Säugerspermatozoons (nach Eddy, 2006).

Das kurze Verbindungsstück verbindet den Kopf mit dem Mittelstück des Schwanzes und enthält den Streifenkörper, der zur Verankerung der Mantelfasern (outer dense fibers, ODF) und des Axonems dient.

Das zentral gelegene Axonem durchzieht den Schwanz vom Mittelstück bis zum Endstück (Abbildung 2). Es besteht aus zwei zentralen Mikrotubuli, die von neun Doppeltubuli umgeben werden. Dadurch weist das Axonem im Querschnitt ein 9+2 Muster auf, das ubiquitär in Flagellen und Zilien aller Spezies vorkommt (Inaba, 2003). Die Doppeltubuli bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, welche helikal angeordnet sind und paarige Röhren bilden (Subtubulus A und B). Der Subtubulus A des einen Tubuluspaares ist dabei über zwei Dyneinarme, einer ATPase, mit dem Subtubulus B des anderen Tubuluspaares verbunden (Fawcett, 1975). Chemische Energie in Form von ATP wird hier durch Konformationsänderungen der Dyneinarme, durch die ein Aneinandergleiten der Mikrotubulidupletts ermöglicht wird, in kinetische Energie umgewandelt. Da das gesamte Tubulussystem durch Radiärspeichen und Nexinbrücken zusammengehalten wird, führt das Gleiten der Mikrotubuli zu einer Krümmung des Flagellums und erzeugt im schnellen Ablauf den charakteristischen Flagellenschlag, der das Spermatozoon vorantreibt (Warner und Mitchell, 1980).



**Abbildung 2:** Querschnitt durch das Axonem eines Spermatozoons (nach Fawcett, 1975).

Peripher werden die Doppeltubuli von jeweils einer Mantelfaser begleitet. Die Mantelfasern sind spezifisch für Spermatozoen. Es handelt sich dabei um neun elektronendichte Fasern, von denen jede über das Verbindungsstück am Kopf inseriert (Lindemann, 1996). Je nach Spezies sind die Mantelfasern unterschiedlich lang und nehmen nach distal in ihrem Durchmesser ab. In bovinen Spermatozoen nehmen sie bis zu 60% der Länge des

Hauptstückes ein (Eddy und O'Brien, 1994). Neben einer passiv-elastischen Funktion der ODF während der Bewegung (Baltz *et al.*, 1990), konnte mittels computerunterstützter Simulation gezeigt werden, dass die ODF durch ihre Anordnung im Spermatozoenschwanz auch die mikrotubuläre Bewegung unterstützen können (Lindemann, 1996). Je nach Spezies bestehen die ODF aus mindestens 14 Polypeptiden mit apparenten Molekularmassen von etwa 11-87 kDa (Henkel *et al.*, 1992; Oko, 1988). In SDS-unlöslichen, aber Urea-löslichen Bestandteilen der ODF konnten Cytokeratine nachgewiesen werden (Hinsch *et al.*, 2003).

Die für den Energiestoffwechsel des Spermatozoons verantwortlichen Mitochondrien liegen helikal gewunden im Mittelstück des Flagellums. Sie erzeugen die notwendige Energie in Form von ATP, die für die Bewegung der Mikrotubuli benötigt wird.

Das Hauptstück stellt den größten Anteil des Flagellums dar. In diesem Bereich werden das Axonem und die Mantelfasern von der fibrösen Hülle umgeben (Rüsse und Sinowatz, 1991). Diese Hülle tritt ausnahmslos bei Säugern und einigen Vögeln auf und besteht aus zwei längs verlaufenden Säulen, die durch Querrippen miteinander verbunden sind (Eddy und O'Brien, 1994). Studien an infertilen Männern deuten darauf hin, dass die fibröse Hülle durch Modulation der Biegsamkeit und der Form des Flagellums eine mechanische Rolle bei der Flagellenfunktion einnimmt. Patienten mit einer Dysplasie der fibrösen Hülle hatten Spermien mit kurzen, starren und unbeweglichen Flagellen sowie einer hypertrophen und unorganisierten fibrösen Hülle (Rawe *et al.*, 2001). Neben dieser mechanischen Funktion scheint die fibröse Hülle eine indirekte Rolle bei der Signaltransduktion des Spermatozoons zu spielen. In den letzten Jahren konnten einige Proteine nachgewiesen werden, die mit der fibrösen Hülle assoziiert sind. Ein Beispiel sind die AKAP Proteine, die in der fibrösen Hülle von Mauspermien nachgewiesen werden konnten (Carrera *et al.*, 1994; Vijayaraghavan *et al.*, 1999). Diese Proteine dienen als Bindungsstelle für die Proteinkinase A, welche ein wesentliches Enzym des cAMP-Signaltransduktionsweges ist. Der cAMP-Weg scheint eine Rolle bei der Reifung, Motilitätsentwicklung, Kapazitation, Hyperaktivierung und Akrosomreaktion des Spermatozoons zu spielen (Eddy *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Zusammenhänge wird angenommen, dass die fibröse Hülle neben der mechanischen Funktion eine wesentliche Rolle bei den biochemischen Abläufen im Spermatozoon einnimmt.

### **1.1.3 Epididymale Spermatozoenreifung**

Spermatozoen, die den Hoden verlassen, sind zwar hoch differenzierte Zellen, dennoch fehlt ihnen die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung und zur Bindung an die Zona pellucida der Oozyte und somit die Fähigkeit, eine normale Befruchtungskaskade anzustoßen (Yanagimachi, 1994). Diese Fähigkeiten erwerben die Spermatozoen erst

posttestikulär während eines Reifungsprozesses im Verlauf ihrer mehrtägigen Passage durch den Nebenhoden und der Kapazitation (Yanagimachi, 1994). Makroskopisch wird der Nebenhoden in drei Regionen unterteilt, die als Caput epididymidis (Nebenhodenkopf), Corpus epididymidis (Nebenhodenkörper) und Cauda epididymidis (Nebenhodenschwanz) bezeichnet werden. Er setzt sich aus einem aufgekäuerten Gangsystem zusammen, dessen Wandauskleidung von einem zweireihigen, hochprismatischen Epithel gebildet wird (Liebig, 1993). Das Nebenhodenepithel ist androgenabhängig und besitzt sowohl sekretorische als auch resorptive Funktionen (Dacheux *et al.*, 2003; Dacheux *et al.*, 2005). Die Wechselwirkungen der Nebenhodensekrete mit den Samenzellen stellen einen wesentlichen Teil der Spermienreifung dar.

Eine der zentralen Veränderungen der Spermatozoen während der Reifung im Epididymis ist, wie bereits schon erwähnt, die Erlangung der Motilität. Testikuläre Spermatozoen sind entweder bewegungsunfähig oder allenfalls schwach beweglich, wenn sie in physiologischer Natriumchloridlösung inkubiert werden. Ausgereifte Spermatozoen aus der Cauda epididymidis beginnen sich dagegen aktiv vorwärts zu bewegen (Yanagimachi, 1994).

Die Unfähigkeit der testikulären Spermatozoen zur Bewegung begründet sich zumindest zum Teil in der Unreife der Plasmamembran (Yanagimachi, 1994). Diese unterliegt während der Reifung im Nebenhoden einigen Modifikationen wie z.B. Veränderungen der Lektinbindungskapazität, Zunahme der negativen Oberflächenladung und Anstieg des Lipid- und Cholesteringehalts (Eddy und O'Brien, 1994). Des Weiteren ändert sich die Protein- und Glykoproteinzusammensetzung der Plasmamembran. Bestimmte, bereits im Hoden angelegte Oberflächenstrukturen (Antigene) gehen verloren, werden modifiziert oder maskiert und durchlaufen eine limitierte Exo- oder Endoproteolyse, so dass neue Peptidomänen entstehen (Kirchhoff und Ivell, 1995; Olson *et al.*, 1987; Toshimori, 2003; Yanagimachi, 1994).

Neben der Plasmamembran unterliegen auch andere Spermatozoenstrukturen epididymalen Reifungsvorgängen. Experimente mit demembranierten testikulären Spermatozoen zeigten, dass diese nicht so schnell auf die Zugabe von ATP/cAMP reagierten wie demembranierte reife Spermatozoen. Dies lässt vermuten, dass einige feine Veränderungen wie z.B. Modifikationen der Dynein-ATPase, während der epididymalen Reifung stattfinden und zur Erlangung der Motilität beitragen (Yanagimachi, 1994).

Im Bereich der Mantelfasern und der fibrösen Hülle des Flagellums bilden sich während der Nebenhodenpassage Disulfidgruppen aus, was zu einer Zunahme der Rigidität des Flagellums führt (Bedford und Calvin, 1974). Bei der Ratte kommt es parallel zur Abnahme der freien Sulfhydrylgruppen auch zu einer Reduktion des Zinkgehaltes der Spermatozoen (Calvin *et al.*, 1975). Auch beim Bullen konnte ein sinkender Zinkgehalt während der epididymalen Reifung gezeigt werden (Henkel *et al.*, 2003). Es wird ein enger Zusammenhang zwischen der Ausbildung der Disulfidgruppen, der Zinkreduktion im Flagellum und der



Entwicklung der Progressivmotilität während der Nebenhodenreifung gesehen (Henkel *et al.*, 1999). Neben diesen Zusammenhängen existiert eine Vielzahl anderer Faktoren, die an der Aktivierung und Regulation von Spermatozoenfunktionen beteiligt sind. Eine Hypothese, wie alle diese Faktoren zusammenwirken, ist bisher nicht bekannt. Ein bedeutender „second messenger“ dabei scheint allerdings cAMP zu sein. In eukaryotischen Zellen stimuliert cAMP die Proteinphosphorylierung durch Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Hoskins *et al.* wiesen dieses Enzym in bovinen Spermatozoen nach und beobachteten einen signifikanten Anstieg des cAMP Gehaltes während der Nebenhodenpassage (Hoskins *et al.*, 1974). Unreife bovine Spermatozoen, des Caput epididymidis wurden *in vitro* durch Inkubation der Spermatozoen in einem Medium bestehend aus cAMP, Phosphodiesterasehemmern (PDIs) und bovinem Seminalplasma motil (Hoskins *et al.*, 1975). Die alleinige Zugabe von PDIs oder Seminalplasma führte nicht zur Vorwärtsbewegung der Spermatozoen. Daher vermuten die Autoren, dass ein Anstieg des intrazellulären cAMP Gehaltes ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der Spermatozoenmotilität ist. Basierend auf diesen Beobachtungen entstand die Hypothese, dass während der Nebenhodenpassage der Phosphorylierungsstatus von Spermatozoenproteinen ein denkbarer Mechanismus ist, durch den die Motilität reguliert sein könnte (Huang und Vijayaraghavan, 2004; Jassim *et al.*, 1991; Seligman *et al.*, 2004; Somanath *et al.*, 2004). In einer kürzlich publizierten Studie wurde die Tyrosinphosphorylierung während der testikulären und epididymalen Reifung von Maus-spermatozoen untersucht (Lin *et al.*, 2006). Ihre Ergebnisse zeigten, dass die cAMP induzierte Phosphorylierung erst dann einsetzte, sobald die Spermatozoen den Nebenhoden erreicht hatten. Weiterhin beobachteten sie im Verlauf der Nebenhodenpassage einen stetigen Anstieg der Phosphorylierung im Mittelstück und im Hauptstück des Flagellums. Die Proteinphosphorylierung scheint daher eine entscheidende Rolle für die Spermatozoenreifung zu spielen.

## **1.2 Physiologie der Fertilisation**

### **1.2.1 Kapazitation**

Während der Passage durch den Nebenhoden erlangen die Spermatozoen ihre progressive Motilität. Sie sind jedoch unmittelbar nach der Ejakulation noch nicht in der Lage, an die Oozyte zu binden und diese zu befruchten. Erst im weiblichen Genitaltrakt erlangen die Spermatozoen durch physiologische Induktoren, wie Bikarbonat, Progesteron und Glykoproteine ihre vollständige Befruchtungsfähigkeit (Evans und Florman, 2002; Yanagimachi, 1994). Dieser Reifungsprozess ist reversibel und wird als Kapazitation bezeichnet (Austin,

1967; Chang, 1951; Chang, 1955). Nur kapazitierte Spermatozoen sind in der Lage, an die Zona pellucida der Oozyte zu binden (Abou-Haila und Tulsiani, 2000). Die Dauer der Kapazitation variiert je nach Spezies zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden (Yanagimachi, 1994). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Kapazitation auch *in vitro* erfolgen kann, wenn epididymale bzw. ejakulierte Spermatozoen in definierten Medien inkubiert werden. Diese Kapazitationsmedien enthalten in den meisten Fällen Energiesubstrate wie Pyruvat, Lactat und Glucose, üblicherweise Serumalbumin als Proteinquelle, sowie  $\text{NaHCO}_3$  und  $\text{Ca}^{2+}$  (Darszon *et al.*, 2006; Nagdas *et al.*, 1992; Nagdas *et al.*, 2005; Visconti *et al.*, 2002). Der genaue Ablauf der Kapazitation auf molekularer Ebene ist bis heute noch nicht völlig geklärt (van Gestel *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass die Proteinphosphorylierung, vor allem von Proteinen des Flagellums, ein wichtiger Faktor für die Aktivierung der Motilität und die Motilitätsveränderungen im Zuge der Kapazitation ist (Geraci und Giudice, 2006; Morisawa, 1994; Urner und Sakkas, 2003; Yanagimachi, 1994).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Kapazitation unter anderem zur Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase kommt, die zur Phosphorylierung von Tyrosinresten funktionell relevanter Proteine führt (Visconti *et al.*, 1995a; Visconti *et al.*, 1995b). Dabei war der Anstieg der Phosphorylierung abhängig von Serumalbumin,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Neben einem Anstieg der Proteinphosphorylierung verändert sich während der Kapazitation die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran. Ein Anstieg der Fluidität der Plasmamembran führt zunächst zu einer Verschiebung des Cholesterins in die apikale Region des Kopfes und schließlich zu einem Cholesterin-Efflux (Flesch *et al.*, 2001). Des Weiteren findet die Reorganisation von Phospholipiden statt. Dabei werden endogene Aminophospholipide an der Oberfläche der Plasmamembran exponiert (Gadella und Harrison, 2002). Im porzinen System konnte gezeigt werden, dass Bikarbonat, ein physiologischer Effektor der Kapazitation, zu einem cAMP Anstieg führt (Harrison und Miller, 2000). Der cAMP Anstieg löst, so die Hypothese der Autoren, eine Phosphorylierungskaskade aus, in deren Folge es zu Veränderungen der Lipidstruktur der Plasmamembran kommt. Daher wird ein Zusammenhang zwischen der Proteinphosphorylierung und den Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran im Verlauf der Kapazitation vermutet.

### **1.2.2 Akrosomale Reaktion**

Nach Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida der Oozyte findet die akrosomale Reaktion statt. Die Akrosomreaktion ist ein exozytotischer Prozess, bei dem die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran des Spermatozoons miteinander verschmelzen und es zur Freisetzung des akrosomalen Inhaltes kommt (Kaji und Kudo, 2004). Dieser unterstützt das Durchdringen des Spermatozoon durch die Zona pellucida (Darszon *et al.*,

2006; Yanagimachi, 1994). *In vitro* Studien zeigen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  essentiell für die akrosomale Reaktion ist (Darszon *et al.*, 2001). Das ZP3-Protein wird allgemein als physiologischer Induktor der Akrosomreaktion anerkannt (Darszon *et al.*, 2006; Patrat *et al.*, 2000). Als „Rezeptor“ für das ZP3-Protein werden speziesabhängig verschiedene Proteine auf Seiten des Spermatozoons diskutiert (Foster, 1997; Geraci und Giudice, 2006; Sinowatz *et al.*, 1998; Snell und White, 1996). Durch die Bindung von Spermatozoon und Oozyte wird eine G-Protein gesteuerte Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig verschiedene intrazelluläre Proteine, wie beispielweise die Adenylatzyklase, Proteinkinase, Tyrosinkinase oder die Phospholipase aktiviert und letztlich zur Exozytose der im Akrosom enthaltenen Enzyme führt (Abou-Haila und Tulsiani, 2000).

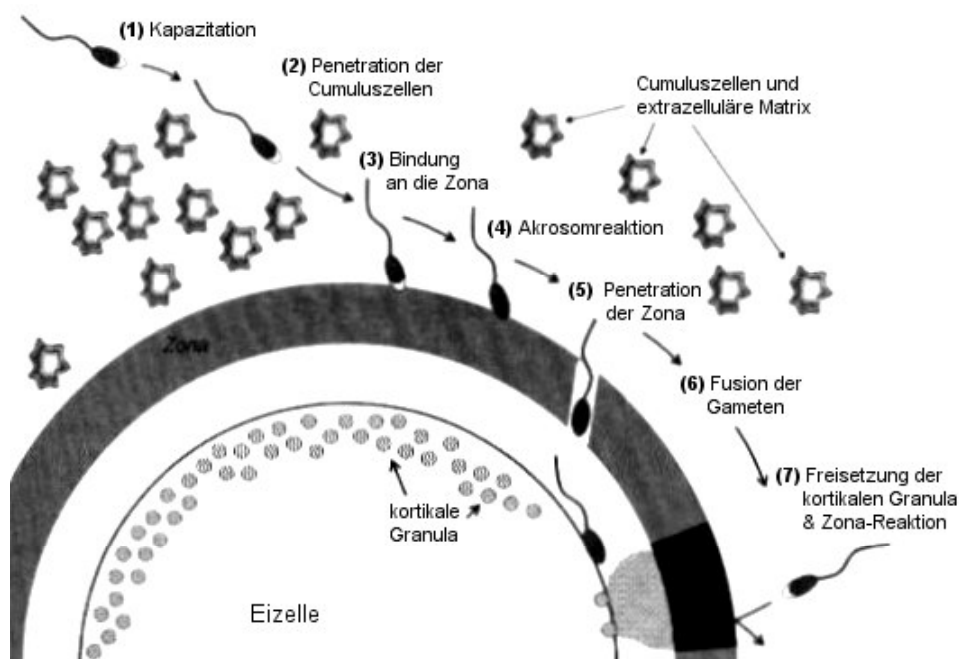
### 1.2.3 Die Fusion von Spermatozoon und Oozyte

Die Fertilisation stellt bei Säugetieren das Ergebnis komplexer Interaktionen von Spermatozoon und Oozyte dar. Dabei muss das Spermatozoon den weiblichen Genitaltrakt bis zur Eileiterampulle, dem Ort der Befruchtung, durchwandern. Bevor es zur Fusion mit der Oozyte kommt, müssen die Kumuluszellschicht und die Zona pellucida, die die Oozyte umgeben, durchdrungen werden.

Der Vorgang der Fertilisation ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Das Spermatozoon bewegt sich aktiv zur Oozyte hin **(1)** und penetriert die Kumuluszellschicht **(2)**. Anschließend folgt die feste Bindung des Spermatozoons an die die Oozyte umgebende Zona pellucida **(3)**. Die Bindung an die Zona pellucida induziert die Akrosomreaktion **(4)**. Akrosomreagierte Spermatozoen sind im weiteren Verlauf in der Lage, die Zona pellucida zu penetrieren **(5)** und an die Plasmamembran der Oozyte zu binden (Primakoff und Myles, 2002; Yanagimachi, 1994). Anschließend kommt es zur Verschmelzung der Spermatozoonmembran und dem Plasmalemm der Oozyte **(6)**. Dabei spielen wahrscheinlich Spermatozoenproteine der ADAM-Familie, die in der Plasmamembran des Spermatozoons lokalisiert sind, eine entscheidende Rolle (Evans und Florman, 2002). Es handelt sich hierbei um transmembranäre Proteine, die eine Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne besitzen (A Disintegrin And Metalloprotease). Zu ihnen zählen Fertilin- $\alpha$  (ADAM1), Fertilin- $\beta$  (ADAM2) und Cyritlestin (ADAM3). Vor allem Fertilin- $\beta$  scheint eine Rolle während der Fusion von Spermatozoon und Oozyte zu spielen. Durch Einsatz von Antikörpern gegen die Disintegrin-Domäne des Fertilin- $\beta$  oder durch Fertilin- $\beta$  Peptide gelang es, die Fusion der beiden Gameten erfolgreich zu verhindern (Mwethera *et al.*, 1999; Primakoff *et al.*, 1987). In Studien mit männlichen Fertilin- $\beta$  und Cyritlestin knock out Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Bindungsfähigkeit der Spermatozoen an die Plasmamembran der Oozyte stark reduziert war

(Cho *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2001). Als Rezeptor für ADAM Proteine dienen vermutlich Integrine des Oolemm (Evans und Florman, 2002). Neben den Proteinen der ADAM-Familie berichtet eine kürzlich publizierte Studie über ein Spermatozoenprotein, benannt nach der japanischen Schreinanlage Izumo, welches für die Fusion von Spermatozoon und Oozyte wesentlich zu sein scheint. Izumo defiziente Mäuse produzierten normal aussehende Spermatozoen, die zwar *in vitro* die Zona pellucida penetrieren konnten aber nicht in der Lage waren, mit der Oozyte zu fusionieren (Inoue *et al.*, 2005). Das in der Oozytenmembran lokalisierte Protein CD9 dient vermutlich zusammen mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Proteinen als Interaktionspartner für Izumo (Schultz und Williams, 2005).

Durch die Verschmelzung beider Gameten wird eine Reihe von biochemischen Reaktionen ausgelöst, die die Penetration und Fusion weiterer Spermatozoen (Polyspermie) verhindern. Durch einen noch ungeklärten Mechanismus kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Modifikation des Oolemm („Plasmamembranblock“), die eine weitere Spermatozoenbindung verhindert (Horvath *et al.*, 1993; Sengoku *et al.*, 1995). Neben dem „Plasmamembranblock“ bewirkt die Freisetzung kortikaler Granula aus der Eizelle (7) eine Verhärtung der Zona pellucida („Zona-hardening“), so dass diese nicht mehr von weiteren Spermatozoen penetriert werden kann (Barros und Yanagimachi, 1971). Die Fusion von Spermatozoon und Oozyte führt zur Aktivierung der Oozyte. Darunter versteht man die Exozytose der kortikalen Granula, die Vollendung der Meiose, die Bildung des weiblichen Vorkerns und die DNA-Synthese in den Vorkernen der fusionierten Gameten (Tsaadon *et al.*, 2006; Yanagimachi, 1994). Das Endprodukt einer erfolgreichen Fertilisation ist die diploide Zygote, die durch die Verschmelzung der männlichen und weiblichen Vorkerne (Konjugation) entstanden ist.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Fertilisation (nach Florman und Ducibella, 2006).

### 1.3 Die Bedeutung von posttranslationalen Proteinmodifikationen

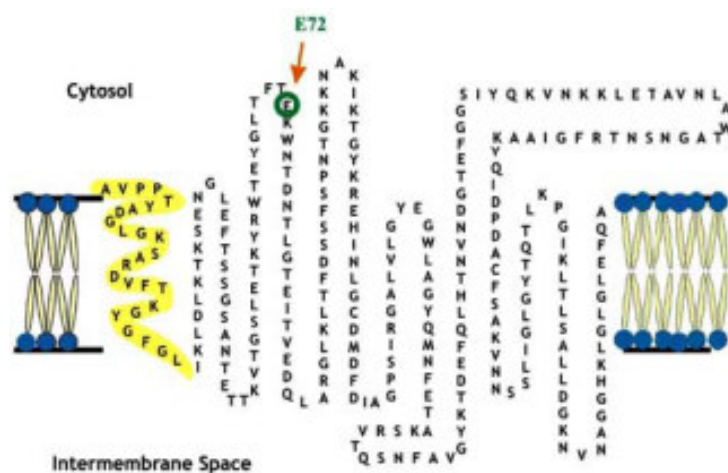
Während der epididymalen Reifung erlangen Spermatozoen durch biochemische Veränderungen ihre volle funktionelle Kompetenz (siehe 1.1.3). Ein wichtiger Aspekt des Reifungsprozesses ist, dass sämtliche Veränderungen der Spermien nicht auf der Neusynthese von Proteinen beruhen, sondern auf posttranslationale Modifikationen bereits bestehender Proteine zurückzuführen sind (Baker *et al.*, 2005; Urner und Sakkas, 2003). Als posttranslationale Modifikationen bezeichnet man die chemischen Veränderungen, die nach der Translation der mRNA an einem Protein vorgenommen werden und somit nicht auf DNA Ebene determiniert sind. Es sind mehr als 500 verschiedene posttranslationale Modifikationen bekannt (Westermann und Wittmann-Liebold, 2003). Häufig sind Proteine an den Seitenketten der Aminosäuren in Form von Phosphorylierungen, Alkylierungen, Acetylierungen oder Glykosylierungen modifiziert. Auch die Verkürzung eines Vorläuferpolypeptids durch proteolytische Spaltung oder die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Cysteine zählen zu den posttranslationalen Modifikationen. Die Mechanismen der Reaktionen sind sehr unterschiedlich und reichen von einfachen enzymatischen Reaktionen bis zu komplizierten mehrstufigen chemischen Reaktionen. Posttranslationale Modifikationen sind für die biologische Aktivität der meisten Proteine äußerst wichtig, denn durch sie erhalten viele Proteine erst ihre biologisch aktive Konformation. Von besonderer Bedeutung für eine Vielzahl von Regulationsprozessen, wie z.B. für die Steuerung des Stoffwechsels oder die Signaltransduktion, sind Phosphorylierungen an Proteinen, Proteinkomplexen und Enzymen (Westermann und Wittmann-Liebold, 2003).

In Spermatozoen verschiedener Spezies ist die Proteinphosphorylierung assoziiert mit der Kapazitation und der Akrosomreaktion (Baker *et al.*, 2003; Carrera *et al.*, 1996; Si und Okuno, 1999). Dabei führt die Stimulation einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A zur Phosphorylierung der Tyrosinreste bestimmter Schlüsselproteine (Ficarro *et al.*, 2003). In Säugerspermatozoen konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen während der Spermatozoenreifung im Nebenhoden zunimmt (Jassim *et al.*, 1991; Seligman *et al.*, 2004). Kürzlich publizierte Daten wiesen die Phosphorylierung eines 55 kDa Proteins während der Nebenhodenpassage nach, die in direktem Zusammenhang mit einem Anstieg der Motilität stand (Somanath *et al.*, 2004).

## 1.4 Die Bedeutung der Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs)

### 1.4.1 Vorkommen und Funktionen von VDACs

Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) oder Porin ist ein 30-36 kDa großes transmembranäres Kanalprotein mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (Blachly-Dyson und Forte, 2001), das erstmals 1976 in der äußeren mitochondrialen Membran von *Paramecium aurelia* entdeckt wurde (Schein *et al.*, 1976). Bisher ist die Tertiärstruktur von VDAC noch nicht genau bekannt. Durch Computerberechnungen der primären Aminosäuresequenz entstand ein 3-D Modell der VDAC Struktur. Es wird angenommen, dass VDAC aus einer  $\alpha$ -Helix und 13,16 oder 19 transmembranären  $\beta$ -Faltblättern besteht (Blachly-Dyson und Forte, 2001; Casadio *et al.*, 2002; Colombini, 2004). Abbildung 4 zeigt ein aktuelles Modell zur Topologie des VDAC Proteins in der Mitochondrienmembran.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der vermuteten Topologie des VDAC Proteins in der Mitochondrienmembran (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2006).

Der Name VDAC beruht auf der Eigenschaft des Kanals in Abhängigkeit des Membranpotentials seine Leitfähigkeit zu verändern. Zur Charakterisierung der Kanaleigenschaften wurden *in vitro* Experimente mit künstlichen Lipiddoppelmembranen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Kanal bei niedrigen Spannungen ( $\sim 10\text{mV}$ ) am weitesten geöffnet ist. In diesem Zustand ist der Kanal leicht anionenselektiv (2:1 Präferenz für  $\text{Cl}^-$  gegenüber  $\text{K}^+$ ) und Metabolite wie ATP, ADP, Malat und Pyruvat können passieren. Bei Spannungen über  $20\text{mV}$  nimmt die Leitfähigkeit ab, und der Kanal ist kationenselektiv (Benz und Brdiczka, 1992; Blachly-Dyson und Forte, 2001; Rostovtseva und Colombini, 1996). Da

der Kanal in Abhängigkeit seines Öffnungszustandes *in vitro* deutliche Permeabilitätsunterschiede für mitochondriale Metabolite zeigt, wird angenommen, dass VDAC eine entscheidende Rolle beim Stoffaustausch an der äußeren mitochondrialen Membran spielt. Weitere biochemische Studien konnten zeigen, dass VDAC an der Bildung von Proteinkomplexen beteiligt ist. Einige Enzyme, wie z.B. Hexo-, Gluko-, Glycerin- und Kreatinkinase sind an der äußeren mitochondrialen Membran mit VDAC assoziiert (Adams *et al.*, 1991; Beutner *et al.*, 1998; Ostlund *et al.*, 1983).

Dass VDAC nicht nur in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, sondern auch in der Plasmamembran von Eukaryotenzellen, wiesen Thinner *et al.*, (1989) in humanen transformierten B-Lymphozyten nach. Neuere Studien bestätigten die Lokalisation von VDAC in der Plasmamembran. Die Arbeitsgruppe von Bathori *et al.* (1999) konnte VDAC in Caveolae, welche aus Ratten- und Rindergehirnzellen sowie Lungengewebe des Hundes isoliert wurden, nachweisen. Caveolae sind spezialisierte, cholesterin- und sphingolipidreiche Regionen der Plasmamembran mit vielen integralen Membranproteinen sowie einem hohen Anteil an Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankern (GPI-Anker). Man nimmt an, dass diese Region wichtig ist für die Signaltransduktion, die Transzytose und den Cholesterintransport (Bathori *et al.*, 2000). In der Plasmamembran von humanen Endothelzellen konnte VDAC ebenfalls nachgewiesen werden und ist dort vermutlich ein Rezeptor für Plasminogen Kringle 5 (Gonzalez-Gronow *et al.*, 2003). Kürzlich publizierte Daten berichten über VDAC als Kanal im sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskelzellen, wo es wahrscheinlich als Transporter für  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP und andere Metabolite dient (Shoshan-Barmatz und Israelson, 2005). Eine Assoziation von VDAC mit Bestandteilen des Zytoskeletts wie MAP2 (microtubule associated protein 2), der Dynein-Leichtkette und G-Aktin wird ebenfalls diskutiert (Linden und Karlsson, 1996; Roman *et al.*, 2006; Schwarzer *et al.*, 2002).

Bei Mensch, Ratte und Maus sind drei verschiedene VDAC Gene, die für drei Isoformen (VDAC1, 2 und 3) codieren, beschrieben (Blachly-Dyson *et al.*, 1993; Sampson *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass jede Isoform eine unterschiedliche physiologische Funktion erfüllt. Xu *et al.* (1999) führten elektrophysiologische Untersuchungen mit Maus-VDAC1, 2, und 3 Isoformen durch, die in einem Hefestamm exprimiert wurden, dem das VDAC Gen fehlte. Während VDAC1 und VDAC2 sich einfach in die künstliche Phospholipidmembran einbringen ließen und Poren formten, war VDAC3 nur schwer in die Membran zu integrieren und wies keine eindeutigen porenformenden Eigenschaften auf. VDAC1 und VDAC2 zeigten normale Öffnungsaktivität, wobei VDAC2 womöglich in einer zweiten Form mit einer geringeren Leitfähigkeit und Selektivität bestehen könnte. Den unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der VDAC Isoformen konnten bisher keine klaren physiologischen Funktionen zugeordnet werden. Daher kann nur vermutet werden, dass jede Isoform eine unterschiedliche physiologische Rolle einnimmt (Xu *et al.*, 1999).

Andere Untersuchungen zur physiologischen Funktion der VDAC Proteine wurden mit VDAC defizienten Zellen durchgeführt. Wu *et al.* (1999) zeigten in ihrer Studie mit embryonalen Stammzellen von Mäusen, denen jeweils eine VDAC Isoform fehlte, dass die Zellen lebensfähig waren, aber einen 30% geringeren Sauerstoffverbrauch aufwiesen als der Wildtyp. Ebenso war bei den VDAC1 und VDAC2 defizienten Zellen die Cytochrom *c* Oxydase Aktivität reduziert. Eine Erklärung hierfür könnte eine verringerte Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran für kleinere Metabolite, die für die oxidative Phosphorylierung notwendig sind, sein (Wu *et al.*, 1999). Zellen, denen mehr als eine VDAC Isoform fehlte, waren nicht lebensfähig, weshalb die Autoren vermuten, dass sich die verschiedenen VDAC Isoformen nur teilweise ergänzen können und jede Isoform eine bestimmte funktionelle Rolle erfüllt.

Weitere Studien zur Funktion der VDAC Isoformen wurden mit VDAC1 und VDAC3 defizienten Mäusen durchgeführt (Anflous *et al.*, 2001; Sampson *et al.*, 2001; Weeber *et al.*, 2002). VDAC1 defiziente Mäuse waren lebensfähig und fertil, aber die Anzahl der Nachkommen war deutlich geringer als beim Wildtyp. Die Autoren führen dies auf eine erhöhte embryonale Letalität zurück (Anflous und Craigen, 2004). Weiterhin zeigten VDAC1 defiziente Mäuse eine reduzierte mitochondriale Permeabilität im Skelettmuskel (Anflous *et al.*, 2001). Strukturelle Veränderungen im Flagellum der Spermatozoen von VDAC3 defizienten Mäusen führten zur Infertilität (Sampson *et al.*, 2001). Bei doppelt defizienten Mäusen (VDAC1/3) war neben einer erhöhten embryonalen Letalität eine deutliche Wachstumsretardierung zu beobachten (Weeber *et al.*, 2002). VDAC1, VDAC3 und VDAC1/3 defiziente Mäuse zeigten auch Defekte im Lernverhalten und in der Plastizität der Synapsen. Da die Effekte dieser Defizite bei beiden Isoformen unterschiedlich waren, wird vermutet, dass VDAC1 und VDAC3 unterschiedliche Rollen bei der zerebralen Funktion einnehmen (Weeber *et al.*, 2002).

VDAC2 spielt vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Apoptose, indem es mit dem proapoptotischen Protein Bak interagiert und dadurch dessen Aktivierung verhindert (Cheng *et al.*, 2003). Die proapoptotischen Moleküle Bax und Bak sind für den mitochondrialen Weg der Apoptose notwendig. Aktiviertes, oligomerisiertes Bax oder Bak bewirkt eine Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran, wodurch es unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom *c* kommt. Cytochrom *c* löst eine Caspase-Kaskade aus und setzt dadurch die Apoptose der Zelle in Gang. In ihrer Studie konnten Cheng *et al.* (2003) zeigen, dass VDAC2 mit Bak interagiert. VDAC2 defiziente Zellen zeigten eine verstärkte Bak-Oligomerisation und eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose. Bei VDAC1 defizienten Zellen konnte keine Interaktion zwischen VDAC1 und Bak festgestellt werden und die Zellen waren auch nicht besonders anfällig für Apoptose. Eine Interaktion von VDAC2 mit Bax konnte ausge-



geschlossen werden. Die Untersuchungen zeigten, dass VDAC2 die Aktivität von Bak reguliert und stellt somit eine Verbindung zwischen der Mitochondrienphysiologie und dem Signalweg der Apoptose dar (Cheng *et al.*, 2003).

#### 1.4.2 VDACs in Spermatozoen

Über das Vorkommen von VDAC in Spermatozoen ist bisher wenig bekannt. Hinsch *et al.* (2001) konnten durch immunhistochemische Untersuchungen an bovinen Hoden VDAC1 Protein in Sertolizellen und VDAC2 Protein in Spermatozyten, Spermatischen und Spermatozoen nachweisen. Des Weiteren wurden VDAC2 und VDAC3 Proteine in reifen bovinen Spermatozoen nachgewiesen, wo sie wahrscheinlich mit den ODF des Flagellums assoziiert sind (Hinsch *et al.*, 2004). Eine neue Studie zur Lokalisation von VDAC2 in *Drosophila melanogaster* zeigt, dass VDAC2 in Spermatozoen dieser Spezies ebenfalls im Flagellum lokalisiert ist (Guarino *et al.*, 2006). Welche Funktion VDAC in Spermatozoen hat, ist bisher noch nicht genau bekannt. Untersuchungen mit VDAC3 defizienten Mäusen zeigten, dass die männlichen Tiere aufgrund von strukturellen Defekten des Mikrotubulussystems im Flagellum infertil waren. Die Tiere zeigten bei normaler Spermatozoenkonzentration eine verringerte Spermatozoenmotilität. Ansonsten waren keine weiteren gesundheitlichen Beeinträchtigungen festzustellen (Sampson *et al.*, 2001). Neueste Studien der Arbeitsgruppe Hinsch zeigen, dass VDAC, insbesondere VDAC2, für die morphologische Integrität des Akrosoms von großer Bedeutung zu sein scheint (Triphan *et al.*, 2007). Nach vierstündiger Inkubation mit affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern wurde ein im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höherer Anteil an Spermatozoen mit Verlust der akrosomalen Kappe festgestellt. Die Akrosomreaktion ist eine fundamentale Voraussetzung für die erfolgreiche Befruchtung der Oozyte. Da bisher noch keine eindeutigen Hinweise für eine Beteiligung der VDAC Proteine am physiologischen Ablauf der Akrosomreaktion vorliegen, wird in dieser Studie jedoch nicht von akrosomreagierten Spermatozoen gesprochen, sondern von einem Verlust des Akrosoms. Dennoch kann ein Einfluss von VDAC auf die Akrosomreaktion nicht ausgeschlossen werden (Asmarinah, 2002). Sie stellt in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass VDAC ein Kandidat für den Cl<sup>-</sup>-Kanal in einem postulierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor/Cl<sup>-</sup>-Kanal Komplex sein könnte, denn in somatischen Zellen (neuronalen Zellen) wurden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und der Cl<sup>-</sup>-Kanal VDAC co-purifiziert (Bureau *et al.*, 1992). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor/Cl<sup>-</sup>-Kanal Komplex ist wahrscheinlich am Progesteron induzierten Ca<sup>2+</sup> Einstrom beteiligt, da GABA in dosisabhängiger Weise die Akrosomreaktion humaner Spermatozoen induziert (Calogero *et al.*, 1999). Mitochondriales VDAC spielt eine wesentliche Rolle beim Ca<sup>2+</sup> Efflux aus den Mitochondrien in das Zytosol und ist daher wichtig für die Ca<sup>2+</sup> Homöostase der Zelle (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2006). In Spermatozoen wird das Akrosom

---

als intrazellulärer Calciumspeicher diskutiert (De Blas *et al.*, 2002; Herrick *et al.*, 2005). Die Akrosomreaktion wird durch einen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in das Zytosol getriggert, wobei verschiedene, in Spermatozoen bereits beschriebene, Calciumkanäle involviert sein sollen (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006; Yanagimachi, 1994). Ein weiterer Kandidat, der am  $\text{Ca}^{2+}$  Transport zwischen Akrosom und Zytoplasma beteiligt sein könnte, wäre VDAC (Triphan *et al.* 2007).

### 1.4.3 Regulation von VDACs

Bisher wurde in verschiedenen Studien darüber berichtet, auf welche Art und Weise VDAC reguliert sein könnte. Vander Heiden *et al.* (2001) vermuten, dass im Anschluss an ein apoptotisches Signal das anti-apoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> den Metabolitenfluss an der äußeren mitochondrialen Membran aufrecht erhält, indem es ein Schließen des VDAC Kanals verhindert. Kürzlich publizierte Daten zeigen, dass Plasminogen Kringle 5 in Experimenten an künstlichen Lipiddoppelmembran zu einer partiellen Schließung von VDAC führt (Banerjee und Ghosh, 2004). Weiterhin ist bekannt, dass Glutamat und NADH ebenfalls mit VDAC interagieren und ein Schließen des VDAC Kanals fördern (Gincel *et al.*, 2000; Zizi *et al.*, 1994).

Neueste Studien deuten darauf hin, dass VDAC durch Phosphorylierung reguliert sein könnte (Liberatori *et al.*, 2004; Pastorino *et al.*, 2005). Auf welchem Weg die Phosphorylierung von VDAC erfolgt, ist noch unklar. Bera *et al.* (1995) isolierten VDAC aus Leberzell-mitochondrien der Ratte. Es gelang ihnen, VDAC *in vitro* durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A zu phosphorylieren, weshalb sie vermuten, dass VDAC auch *in vivo* ein Zielprotein der PKA ist (Bera *et al.*, 1995). Eine kürzlich publizierte Studie zeigt, dass VDAC1 *in vitro* durch die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Threonin-phosphoryliert wird und dadurch eine Bindung von VDAC1 an Hexokinase II verhindert ist (Pastorino *et al.*, 2005).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnten VDAC2 und VDAC3 in Extrakten aus bovinen ODF nachgewiesen werden (Hinsch *et al.*, 2001; Hinsch *et al.*, 2004). Sampson *et al.* (2001) gehen davon aus, dass VDAC wichtig ist für die Spermatozoenfunktion. Männliche VDAC3 defiziente Mäuse waren lebensfähig, aber infertil. Sie zeigten bei normaler Spermatozoenkonzentration eine verringerte Spermatozoenmotilität, was auf strukturelle Defekte im Flagellum zurückzuführen war (Sampson *et al.*, 2001). Aufbauend auf den bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war das Ziel dieser Arbeit, weitere Informationen über die Lokalisation, Funktion und Regulation von VDAC Proteinen in bovinen Spermatozoen zu erhalten. Speziell sollten posttranslationale Modifikationen von VDAC in bovinen Spermatozoen während der Nebenhodenpassage am Beispiel der Tyrosin- und Threoninphosphorylierung untersucht werden. Dazu sollten VDAC Proteine zunächst in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen lokalisiert und extrahiert werden. Die Untersuchungen zur Phosphorylierung der VDAC Proteine sollten mittels immunbiochemischer Methoden aus Gesamtproteinextrakten epididymaler und ejakulierter Spermatozoen sowie mit angereicherten VDAC Proteinen durchgeführt werden. Mit Hilfe der Immunzytochemie sollten Veränderungen in der Proteinphosphorylierung während der Spermatozoenreifung dargestellt werden.

Es wurden folgende konkrete Arbeitsziele festgelegt:

- 1) Untersuchungen zur Lokalisation von VDAC1, 2, und 3 in bovinen Spermatozoen während der Nebenhodenpassage im Vergleich zu ejakulierten Spermatozoen mit Hilfe der Immunzytochemie. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob die VDAC Subtypen in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorzufinden sind.
- 2) Biochemischer Nachweis der VDAC Proteine in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen.
- 3) Reinigung und Anreicherung der VDAC Proteine aus den Gesamtproteinextrakten boviner epididymaler und ejakulierter Spermatozoen.
- 4) Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand boviner Spermatozoenproteine, insbesondere der VDAC Proteine, während der Nebenhodenpassage mittels biochemischer und immunzytochemischer Methoden.
- 5) Affinitätschromatografische Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Proteine.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

#### **Amersham Biosciences, Freiburg**

Nitrozellulosemembran

#### **Baxter GmbH, Unterschleißheim**

Aqua ad iniectabilia

#### **Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA**

Falcon® Zentrifugenröhrchen 15ml; 50ml

#### **BioRad, München**

Acrylamid/Bis 30% Lösung

Abstandhalter für Gelelektrophoreseplatten

Ammoniumpersulfat

β-Mercaptoethanol

Hydroxyapatit

Precision Plus Protein™ Standard (Dual Color)

Temed (N,N,N,N-Tetramethyldiamin)

#### **Eppendorf, Hamburg**

Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl

#### **Euroclone, Wetherby, West York, U.K.**

Fettfreies Milchpulver

#### **Fluka, Taufkirchen**

LDAO

#### **Fuji, Düsseldorf**

Röntgenfilme Fuji Super RX-100

Röntgenfilmkassette

#### **Invitrogen, Paisley, U.K.**

Simply Blue Safe Stain

**Kalensee, Gießen**

Zählkammer nach Neubauer

**Menzel-Gläser, Braunschweig**

Deckgläser

Objektträger

**Merck, Darmstadt**

Aceton

di-Natriumhydrogenphosphat

Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat

Calciumchlorid

EDTA

Essigsäure

Glycerin

Isopropanol

Kaliumdihydrogenphosphat

Magnesiumchlorid

Natriumacetat

Natronlauge

Salzsäure

Tris

**Molecular Probes, Eugene, USA**

Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain

DAPI

**PFM Produkte für Medizin AG, Köln**

Feather® Einmalskalpell

**Plano, Wetzlar**

Citifluor®

**Riedel-de Haën, Seelze**

Ethanol

Methanol

Paraformaldehyd

**Roth, Karlsruhe**

Acetonitril

Celite

Glycin

Natriumchlorid

**Sigma, Taufkirchen**

Benzamidin

Bovines Serumalbumin

Bromphenolblau

Chloroform, minimum, 99%

PMSF

Ponceau S

Natrium Orthovanadat

Teleostgelatine

Tween 20

**Serva, Heidelberg**

Triton X-100

## 2.2 Eingesetzte Antikörper

### Anti-VDAC Antikörper

In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurden Subtyp spezifische anti-VDAC Antikörper in Kaninchen erzeugt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Peptidsequenzen, die zur Antikörperherstellung verwendet wurden. Die als Antigen verwendeten Peptidsequenzen zur Generierung von AS P6 (anti-VDAC1) und AS P45 (anti-VDAC2) wiesen eine Sequenzhomologie von jeweils 100% in Mensch, Ratte, Schwein, Kaninchen, Maus und Rind auf. Die Peptidsequenz zur Generierung von AS P31 war zu 90% homolog in den genannten Spezies (Hinsch *et al.*, 2004).

**Tabelle 1:** Als Antigen verwendete VDAC Peptidsequenzen.

Protein	Antiserum	Sequenz	Peptidbezeichnung
VDAC1	AS P6	GHKLGLEFQA	1b
VDAC2	AS P45	YQLDPTASISAK	H1
VDAC3	AS P31	SVFNKGYGFM	H4
VDAC1,2,3	AS P <sub>common</sub>	GHKVGLGFEL	3-2

### Weitere Antikörper

Monoklonaler Maus anti-Phosphothreonin Antikörper, Zymed Laboratories, Californien, USA

Monoklonaler Maus anti-Phosphotyrosin Antikörper, Klon 4G10, Biomol, Hamburg

Maus IgG<sub>2a</sub>, Serotec, Oxford, UK

Maus IgG<sub>2b</sub>, Sigma, Taufkirchen

anti-Kaninchen IgG-FITC konjugiert, Sigma, Taufkirchen

anti-Maus IgG-Peroxidase konjugiert, Sigma, Taufkirchen

anti-Maus IgG-FITC konjugiert, Sigma, Taufkirchen

## 2.3 Medien und Lösungen

### Entfärbelösung für die Phosphoprotein Färbung

50ml 1M Natriumacetat

750ml Aqua dest.

200ml Acetonitril

### Chromalaunlösung zur Objektträgerbeschichtung

0,5% w/v Gelatine

0,05% w/v Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat

100ml Aqua dest.

### 4x Tris/SDS

6,05g Tris-Base in 40ml Aqua dest., pH 6,8

Aqua dest. hinzufügen bis 100ml

0,4g SDS

### Fixierlösung für die Phosphoprotein Färbung

50% v/v Methanol

10% v/v Essigsäure

50% v/v Aqua dest.

### Geltrocknungslösung

20% v/v Ethanol

10% v/v Glycerin

70% v/v Aqua dest.

### Laufpuffer für die Gelelektrophorese, pH 8,3

192mM Glycin

25mM Tris

0,1% w/v SDS

### LDAO Extraktionspuffer, pH 7,4

50mM Tris

2% v/v LDAO



**Methacarn-Fixierlösung**

60% v/v Methanol  
30% v/v Chloroform  
10% v/v Essigsäure 100% (Eisessig)

**PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,4**

120mM NaCl  
10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Probenpuffer für die Protein Gel-Elektrophorese**

**(Laemmlipuffer 6x konzentriert, pH 6,8)**

7ml 4x Tris/SDS  
3ml Glycerin  
1g SDS  
1,2mg Bromphenolblau  
Aqua dest. bis 10ml hinzufügen

**Sammelgel 6%ig**

500µl 30% Acrylamidlösung  
625µl Sammelgelpuffer  
25µl 10% SDS  
1,35ml Aqua ad iniectabilia  
12,5µl 10% w/v Ammoniumpersulfatlösung  
2,5µl TEMED

**Sammelgelpuffer, pH 6,8**

0,5M Tris-HCl

**Stripping-Puffer, pH 6,7**

100mM β-Mercaptoethanol  
2% w/v SDS  
62,5mM Tris-HCl

### **Trenngel 12%ig**

2ml 30% Acrylamidlösung  
1,25ml Trenngelpuffer  
500µl 10% SDS  
1,7ml Aqua ad iniectabilia  
25µl 10% w/v Ammoniumpersulfatlösung  
2,5µl TEMED

### **Trenngelpuffer, pH 8,8**

1,5M Tris-HCl

### **T-TBS (Tween-Tris buffered saline, pH 7,5)**

10mM Tris  
100mM NaCl  
0,1% v/v Tween 20

### **Triton X-100 Extraktionspuffer (pH 7,4)**

50mM Tris-HCl  
150mM NaCl  
1mM CaCl<sub>2</sub>  
1mM MgCl<sub>2</sub>  
1mM KCl  
0,2% v/v Triton X-100 bzw. 2% v/v Triton X-100

## **2.4 Verwendete Kits**

### **Amersham Biosciences**

ECL Western blotting detection Reagent  
PlusOne 2-D Quant Kit

### **Calbiochem**

Non-Interfering Protein Assay Kit

### **Qiagen**

Phospho-Protein Purification Kit

## 2.5 Geräte

### **Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz**

Vortex Genie 2

### **BioRad, München**

Gelkammer Mini Protean II <sup>TM</sup>

Mini Trans Blot <sup>TM</sup>

### **Calimatic Sefi Med, Tel Aviv, Israel**

Makler Zählkammer

### **Fisher Scientific, Schwerte**

Digital pH-Meter accumet® AR20

### **Heraeus, Hanau**

Minifuge, Sepatech, Rotor BS4402/A

Biofuge, fresco

### **Janke & Kunkel, Staufen**

IKA-Schüttler MTS 4

IKAMAGR RET-Magnetrührer

IKA-Combimag RCT

### **LTF Labortechnik, Wasserburg**

UV-Transilluminator 365/254nm

### **Nikon, Düsseldorf**

Mikroskop Optiphot2

### **Millipore, Eschborn**

Wasseraufbereiter

### **Tecan, Crailsheim**

ELISA-Reader Sunrise

### **Zeiss, Frankfurt**

Axioskop2 mot plus mit Fotoeinheit AxioCamMRc

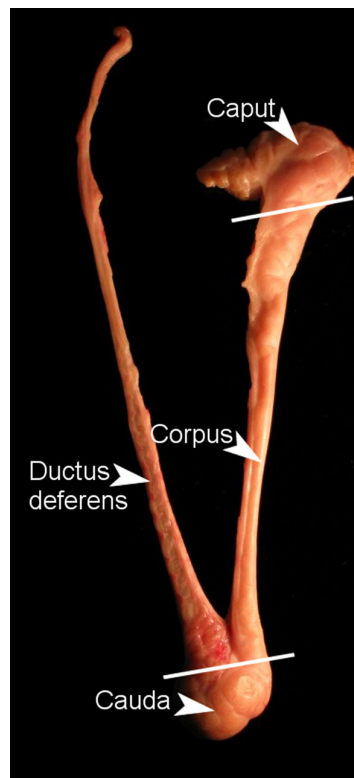
### **3 Methoden**

#### **3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Für die Untersuchungen wurden bovine Spermatozoen aus frischem Ejakulat und isolierte Spermatozoen des Nebenhodens (Caput, Corpus und Cauda epididymidis) verwendet.

##### **3.1.1 Epididymale Spermatozoen**

Die epididymalen Spermatozoen wurden aus bovinen Nebenhoden von geschlechtsreifen Bullen (verschiedene Rassen, ca. 15-24 Monate alt) am Gießener Schlachthof gewonnen. In der Regel wurden 4-6 Hoden von unterschiedlichen Tieren ausgewählt und die Spermatozoen daraus gewonnen. Die Hoden wurden nach der Gewinnung umgehend zum Labor transportiert und innerhalb von zwei Stunden verarbeitet. Der Nebenhoden wurde vom Hoden getrennt und von Fett- und Bindegewebe sowie Blutgefäßen freipräpariert. Anschließend wurden die drei Nebenhodenabschnitte Caput, Corpus und Cauda epididymidis (Abbildung 5) voneinander separiert. Spermatozoen aus der Cauda epididymidis wurden durch retrogrades Spülen des Ductus deferens mit 5ml PBS gewonnen. Corpus und Caput epididymidis wurden in ca. 0,5 x 0,5 x 0,5cm große Gewebestücke zerkleinert und die Spermatozoen anschließend wie folgt isoliert: Die Gewebestücke wurden in getrennte Petrischalen mit 15ml PBS, pH 7,4, überführt und zur Sedimentation der isolierten Spermatozoen eine halbe Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Entfernung der Gewebestücke wurde die Spermien suspension in ein 45ml Plastikröhrchen überführt und zweimal für 5min bei 700xg bei RT in PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das die Spermatozoen enthaltende Sediment in 2ml PBS resuspendiert. Die so gewonnene Spermatozoensuspension wurde für nachfolgende immunzytochemische Untersuchungen oder für eine Proteinextraktion verwendet.



**Abbildung 5:** Isolierter boviner Nebenhoden mit Ductus deferens.

### 3.1.2 Ejakulierte Spermatozoen

Die ejakulierten Spermatozoen stammten von zwei geschlechtsreifen Bullen (Holstein-Frisian, 18 bis 24 Monate alt) der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie mit tierärztlicher Ambulanz, Fachbereich Veterinärmedizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen und wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Absamung der Bullen erfolgte mittels einer künstlichen Vagina. Zur Entfernung des Seminalplasmas wurde das Ejakulat zweimal für 5min bei 700xg und RT in PBS gewaschen. Das erhaltene Sediment wurde, wie bereits unter Punkt 3.1.1 beschrieben, resuspendiert und ebenfalls für die Immunzytochemie oder für die Proteinextraktion verwendet.

## **3.2 Gewinnung und immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen**

### **3.2.1 Extraktion boviner Spermatozoenproteine**

Zur Extraktion boviner Spermatozoenproteine wurden in PBS, pH 7,4 gewaschene ejakulierte und epididymale Spermatozoen verwendet (Hinsch *et al.*, 2003). Die zu untersuchenden Proteine wurden mit Detergenzien aus dem Membranverband herausgelöst. Detergenzien bilden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in wässrigen Lösungen Mizellen. Die hydrophoben Seitenketten lagern sich bevorzugt an die unpolaren Bereiche der Proteine und schirmen so die hydrophoben (membrandurchspannenden) Anteile des Proteins vom Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel ab. Untersuchungen von De Pinto *et al.* (1989) zur Löslichkeit von VDAC in verschiedenen Detergenzien ergaben, dass VDAC Proteine sehr gut löslich in Triton X-100 und Lauryldimethylaminoxid sind und die Fähigkeit zur Porenbildung in künstlichen Lipiddoppelmembranen bei Verwendung dieser Detergenzien erhalten bleibt.

Beide Extraktionsmethoden kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Es wurden mehrere Proteinextrakte (n=10) aus Ejakulaten und den jeweiligen Nebenhodenabschnitten, Caput epididymidis, Corpus epididymidis und Cauda epididymidis, gewonnen und entsprechend zusammengeführt. Die zusammengeführten Extrakte dienten als Ausgangsmaterial für nachfolgende Experimente.

#### **Extraktion mit Triton X-100 (TX-100)**

##### **Waschen der Spermatozoen mit PBS-NaCl**

Zunächst wurde die Gesamtzellzahl der gewaschenen Spermatozoen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden die Spermatozoen in PBS + 0,6M NaCl, pH 7,4 mit einer Endkonzentration von  $200 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und nach Zugabe von Protease- und Phosphatasehemmstoffen (finale Konzentration: 1mM EDTA, 10mM Benzamidin, 2mM DTT, 0,2mM PMSF, 100mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 1h unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde bei  $6000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 30min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment (Spermatozoen) bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### Präinkubation mit 0,2% Triton X-100

Die in PBS-NaCl gewaschenen Spermatozoen (Sediment), wurden bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,2% TX-100 Puffer sowie Protease- und Phosphatasehemmstoffen (finale Konzentration: 1mM EDTA, 10mM Benzamidin, 2mM DTT, 0,2mM PMSF, 100mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) resuspendiert ( $300 \times 10^6$  Zellen/ml). Die Suspension wurde dann für 1h auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 6000xg und 4°C für 30min zentrifugiert. Der 0,2% TX-100 Überstand (gelöste Proteine) und das Sediment wurde bis zur weiteren Verwendung getrennt bei -20°C aufbewahrt.

### 2% Triton X-100 Extraktion

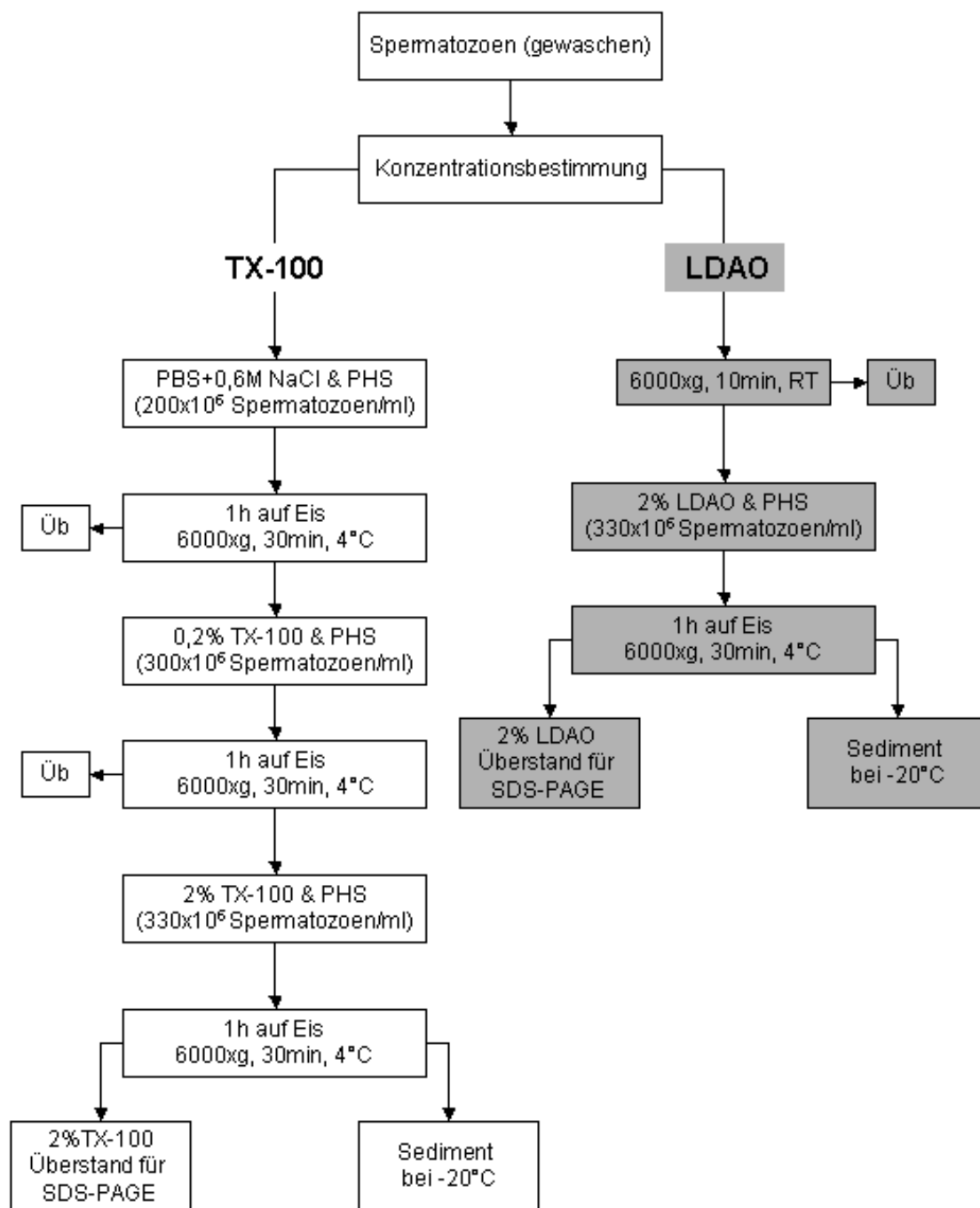
Das nach der 0,2% TX-100 Extraktion verbliebene Sediment wurde zur weiteren Proteinextraktion bei RT aufgetaut und in 2% Triton X-100 Extraktionspuffer sowie Protease- und Phosphatasehemmstoffen (finale Konzentration: 1mM EDTA, 10mM Benzamidin, 2mM DTT, 0,2mM PMSF, 100mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) mit einer Konzentration von  $330 \times 10^6$  Spermatozoen/ml aufgenommen. Nach erfolgter einstündiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 6000xg bei 4°C für 30min, wurden der Überstand und das Sediment getrennt bis zum Einsatz in nachfolgende Versuche bei -20°C eingefroren.

In Abbildung 6 sind die einzelnen Schritte der TX-100 Extraktion als Übersicht dargestellt.

### Extraktion mit Lauryldimethylaminoxid (LDAO)

Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl der Spermatozoen in einer Neubauer-Zählkammer, wurde die Spermatozoensuspension einmal 10min bei 6000xg zentrifugiert, um den PBS Puffer zu entfernen. Im Gegensatz zur 2% TX-100 Extraktion war es bei der LDAO Extraktion nicht notwendig, die Spermatozoen mit NaCl vorzubehandeln. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Sediment direkt in 2% LDAO Extraktionspuffer sowie Protease- und Phosphatasehemmstoffen (finale Konzentration: 1mM EDTA, 10mM Benzamidin, 2mM DTT, 0,2mM PMSF, 100mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) mit einer Konzentration von  $330 \times 10^6$  Spermatozoen/ml Extraktionspuffer resuspendiert. Nach erfolgter einstündiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 6000xg bei 4°C für 30min wurden der Überstand und das Sediment separiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der LDAO Extraktion.



**Abbildung 6:** Extraktion boviner Spermatozoenproteine. **Links:** Extraktion mit TX-100. **Rechts:** LDAO Extraktion. Üb = Überstand.

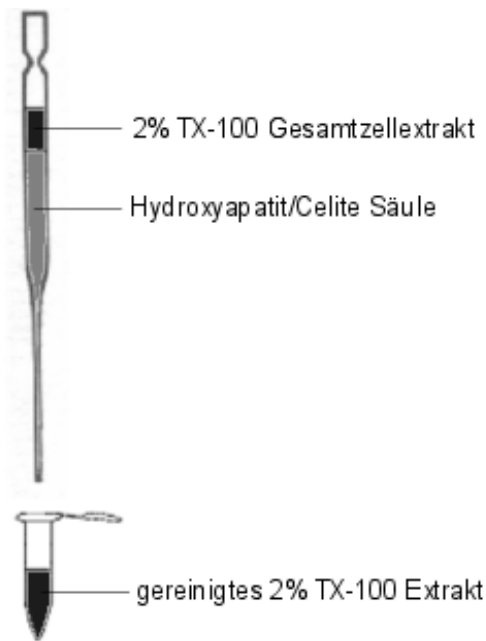


### 3.2.2 Reinigung der VDAC Subtypen aus Proteinextrakten boviner Spermatozoen

Zur Charakterisierung der in den Spermatozoenextrakten enthaltenen VDAC Subtypen erfolgte eine Aufreinigung der VDAC Proteine über Hydroxyapatit/Celite Säulen (De Pinto *et al.*, 1987; De Pinto *et al.*, 1989a). Normalerweise binden basische Proteine bei der Hydroxyapatit/Celite Chromatografie über ihre Aminogruppen durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negative Oberfläche des Hydroxyapatits. Saure Proteine bilden über ihre Carboxylgruppen Komplexbindungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$  des Hydroxyapatits. Gebundene Proteine werden durch einen Phosphatpuffer eluiert. VDAC Proteine, die mit TX-100 extrahiert werden, formen große Membranlipid-Detergenz-Protein Mizellen. Dadurch erfolgt keine Bindung der VDAC Proteine an die Hydroxyapatit/Celite Säule, und so können sie, getrennt von anderen Proteinen, in der Durchflussfraktion gewonnen werden (De Pinto *et al.*, 1989).

Zur Herstellung der Säulen wurden Glaspasteurpipetten (0,5 x 14cm) mit 600mg Hydroxyapatit/Celite Pulver (2:1 w/w) befüllt. Die fertigen Säulen wurden in eine Stativklemme gespannt und in ein Maxicoldlab mit einer Temperatur von 4°C verbracht. Je 500µl des 2% TX-100 Proteinextrakts ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen) wurden mit 500µl 2% TX-100 Extraktionspuffer in einem Eppendorfgefäß gemischt und die gesamte Probe (1ml) auf die Säule aufgetragen. Nachdem das Säulenmaterial innerhalb von ein bis zwei Minuten den Proteinextrakt aufgenommen hatte, wurde zur Elution 2% TX-100 Extraktionspuffer auf die Säule aufgetragen, bis 1ml Eluat aufgefangen wurde. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. In Abbildung 7 ist die Proteinreinigung schematisch dargestellt.

Die Reinigung des 2% LDAO Extrakts erfolgte vom Prinzip her wie die zuvor beschriebene Reinigung des 2% TX-100 Extraktes. Vorversuche ergaben, dass der Durchlauf eines zweiten Säulenvolumens 2% LDAO Extraktionspuffers notwendig war, um die VDAC Proteine aus der mit 2% LDAO Extrakt beladenen Säule zu eluieren. Nach der Gewinnung des ersten Eluats (1ml), wurde ein weiterer Milliliter 2% LDAO Extraktionspuffer auf die Säule gegeben, das „zweite“ Eluat (1ml) aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Proteinreinigung.

### 3.2.3 Proteinpräzipitation

Die über die Hydroxyapatit/Celite Säulen gereinigten Proteine wurden vor einer gelelektrophoretischen Auftrennung mit Aceton oder mit 10% (v/v) Trichloressigsäure präzipitiert.

#### Acetonfällung

Für die Acetonfällung wurden bis zu 1ml Probe mit 9ml eiskaltem Aceton (-20°C) in einem Glasröhrchen intensiv gemischt und bei 6000xg und 4°C für 30min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das verbliebene Sediment getrocknet und in Probenpuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen.

#### Trichloressigsäurefällung

Proteine, die in Lösungen mit höherem Salzgehalt vorlagen, wurden mit 10% Trichloressigsäure gefällt. Dazu wurden 100µl der Probe mit 100µl 10% Trichloressigsäure in einem Eppendorfgefäß vermischt und für 20min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 15min bei 13000xg. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem verbliebenen Sediment wurden 200µl 99% (v/v) Ethanol (-20°C) hinzugefügt. Nach zwei

Minuten wurde das Ethanol verworfen und 200µl Aceton (-20°C) hinzugegeben, um verbliebene Trichloressigsäurereste zu entfernen. Die Probe wurde in Aceton für 30min auf -20°C abgekühlt und anschließend 5min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment getrocknet und abschließend in Laemmli Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen.

### 3.2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte dem „Non-Interfering Protein Assay“ Kit der Firma Calbiochem und dem „PlusOne 2-D Quant“ Kit der Firma Amersham nach Angaben der Hersteller. Die Reaktion der Kits basiert auf der Komplexbildung von Proteinen mit Kupferionen in alkalischen Lösungen (Biuret-Reaktion). Ungebundene Kupferionen werden mit einem Farbreagenz gemessen. Dabei ist die Farbintensität der Lösung umgekehrt proportional zur Proteinmenge: je mehr Protein in der Probe vorhanden ist, umso geringer ist die Farbintensität der Lösung. Die Detektion ungebundener Kupferionen erfolgte mit einem ELISA-Reader (Tecan) bei 480nm. Als Eichprotein wurde ein BSA Standard verwendet.

Als weiteres Protokoll zur Proteinbestimmung wurde der BioRad Protein Assay Kit nach der Methode von Bradford, (1976) eingesetzt.

### 3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der extrahierten Spermatozoenproteine nach deren Molekularmassen, wurde eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Verwendet wurden 0,75mm dicke Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 12% für das Trenngel und 6% für das Sammelgel. Nach erfolgter Polymerisation der Gele wurden die in 20µl Probenpuffer aufgenommenen Proteine (2% TX-100 Extrakt: 25x10<sup>6</sup> Spermatozoen/Spur; H/C 2% TX-100: 165x10<sup>6</sup> Spermatozoen/Spur; 2% LDAO Extrakt: 30µg Spermatozoenprotein/Spur) sowie 5µl „Precision Plus Protein Standard™“ (BioRad) als Molekularmassenmarker mit einer Hamilton-Spritze auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Mini Protean II System der Firma BioRad bei RT mit einer konstanten Spannung von 200V für ca. 45min. Im Anschluss daran wurden die Gele entweder in einem Western Blot eingesetzt oder zur Darstellung der Proteinbanden über Nacht mit dem Farbstoff Coomassie-Blau (SimplyBlue™ SafeStain, Invitrogen) gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte ebenfalls über Nacht in Aqua dest. bei RT. Nach der Dokumentation der mit Coomassie-Blau gefärbten Gele wurden diese für 1min in Geltrocknungslösung gelegt, in Kunststoffolie verpackt, luftgetrocknet und aufbewahrt.

### 3.2.6 Western Blot

Die in der SDS-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen getrennten Proteine wurden im sich anschließenden Western Blot in einer BioRad Blotkammer auf Nitrozellulosemembranen elektrotransferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Elektrotransfer erfolgte für 1,5h bei RT mit einer Spannung von 70V. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und 5min mit Ponceau S gefärbt. Nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit Aqua dest. konnte durch Rotfärbung der Proteinbanden der Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran überprüft werden. Als weitere Kontrolle des regelrechten Proteintransfers wurde das verwendete Gel, wie bereits beschrieben, mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Nitrozellulosemembranen wurden anschließend zur immunbiochemischen Identifizierung der Proteine verwendet.

### 3.2.7 Immunbiochemische Identifizierung von VDAC Subtypen durch das Chemilumineszenzverfahren

Zur immunbiochemischen Identifizierung der VDAC Subtypen in den Spermatozoenproteinextrakten und deren gereinigten Proteinfractionen wurden die Nitrozellulosemembranen mit anti-VDAC Antikörpern inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, erfolgte eine einstündige Präinkubation der Membranen in T-TBS mit 5% (v/v) Teleostgelatine. Im Anschluss daran wurden die Membranen 1h mit anti-VDAC Antiseren inkubiert (AS P6 1:100, AS P31 1:100, AS P45 1:500 in T-TBS + 3% (w/v) Milchpulver). Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für jeweils 5min in T-TBS entfernt. Als „Zweitantikörper“ wurde mit Peroxidase konjugiertes Protein A der Firma BioRad (1:3000 in T-TBS + 3% Milchpulver) eingesetzt. Die Membranen wurden mit dem Zweitantikörper 30min inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Zweitantikörper wurden die Nitrozellulosemembranen fünf Mal für jeweils 10min in T-TBS gewaschen. Alle Inkubationen und Waschvorgänge erfolgten unter leichtem Schütteln bei RT. Zum Nachweis spezifisch gebundener Antikörper wurden die Nitrozellulosemembranen mit ECL (enhanced chemiluminescence) der Firma Amersham nach Herstellerangaben 1min überschichtet und anschließend in Klarsichtfolie verpackt. Nach Auflegen der Röntgenfilme auf die Klarsichtfolie wurden die Filme in einer Röntgenfilmkassette belichtet, anschließend entwickelt und fixiert.

Um die Spezifität der Immunreaktion zu überprüfen, wurden die Antiseren mit den Peptiden, die als Antigen verwendet wurden, präinkubiert. Dazu wurden von den Antiseren Verdünnungen hergestellt (AS P6 1:100, AS P31 1:100, AS P45 1:500) und mit 15µg Peptid/ml Antikörperverdünnung für 1h bei RT inkubiert (Tabelle 1). Anschließend wurden die prä-

inkubierten Antiseren 5min bei 13000xg zentrifugiert und der Überstand im Immunoblot, wie bereits beschrieben, eingesetzt. Zum Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen erfolgten als weitere Kontrollen die Substitution des Erstantikörpers mit 3% Milchpulver und die Substitution der Antiseren mit den entsprechenden Präimmunseren.

#### Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Durch die Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran konnte dieselbe Membran wiederholt verwendet werden. Hierzu wurde die Membran 30min bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert. Dieser Puffer enthält als Detergenz 2% SDS und als reduzierende Substanz 100mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, die zur Ablösung gebundener Erst- und Zweitantikörper führen. Zur Überprüfung des erfolgreichen Aufhebens der Antigen-Antikörper-Bindung wurde die Membran nach zweimaligem Waschen für 10min in T-TBS erneut mit ECL überschichtet und für 30min ein Röntgenfilm aufgelegt. Waren keine Immunreaktionen mehr nachweisbar, konnte die Nitrozellulosemembran in weiteren Versuchen eingesetzt werden.

### **3.2.8 Massenspektrometrische Analyse der gereinigten VDAC Proteine**

Die über Hydroxyapatit/Celite Säulen gereinigten Proteine wurde durch MALDI-TOF-MS analysiert. Dazu wurden die H/C gereinigten 2% TX-100 Proteinextrakte einer SDS-PAGE unterzogen und das Gel zur Darstellung der Proteinbanden mit Coomassie-Blau gefärbt.

Das gefärbte Gel wurde zur MALDI-TOF-MS Analyse der Peptidfragmentmassen der Firma ChromaTec, Greifswald zugeschickt. Die gefundenen Peptidmassen werden als „peptide mass fingerprint“ (PMF) bezeichnet. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch den Vergleich des PMF mit Peptidmassen, die sich theoretisch bei einem Verdau der Proteinsequenzen, die in den Datenbanken gespeichert sind, ergeben würden. Die Proteinidentifikation der ChromaTec Daten wurde mit Mascot (<http://www.matrix-science.com>) durchgeführt. Mascot verwendet bei der Suche einen so genannten Mowse Score. Mit dem Mowse Score wird die Qualität der Übereinstimmung zwischen dem PMF und den Peptidsequenzen in der Datenbank angegeben. Für jede Suche wird die Signifikanzgrenze in Form des Mowse Scores angegeben, den ein Protein erreichen sollte, um für eine positive Identifikation infrage zu kommen.

### **3.2.9 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von VDAC Subtypen in bovinen Spermatozoen**

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden Spermatozoen aus den einzelnen Nebenhodenabschnitten und aus Ejakulat verwendet (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Nach Ermittlung der Gesamtkonzentration der Spermatozoen in einer Neubauer-Zählkammer, wurde eine Suspension mit einer Endkonzentration von ca.  $30 \times 10^6$  Zellen/ml PBS, pH 7,4 hergestellt. Anschließend wurde diese Spermatozoensuspension zum Zellaufschluss in einem Eppendorfgefäß dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 38°C wieder aufgetaut. Jeweils 10µl der Suspension wurden auf Chromalaun beschichtete Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und für 3min in Methacarn fixiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger zweimal für 5min in PBS, pH 7,4 gewaschen. Nachdem die Spermatozoen 5min in PBS mit 0,1% TX-100 permeabilisiert wurden, folgte eine Präinkubation in einer 1% BSA/PBS-Lösung bei RT, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Daran schloss sich die Inkubation der Spermatozoen mit dem Erstantikörper für 1h bei RT in einer feuchten Kammer an. Die Antiseren AS P31 (anti-VDAC3) und AS P45 (anti-VDAC2) und die entsprechenden Präimmunseren wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen für 5min in PBS folgte die Inkubation der Spermatozoenausstriche mit 1:200 verdünntem FITC konjugierten anti-Kaninchen IgG (Sigma) als Zweitantikörper für 30min im Dunkeln bei RT ebenfalls in einer feuchten Kammer. Alle verwendeten Antikörper wurden in einer 1% BSA/PBS-Lösung verdünnt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Spermatozoen zur Kernfärbung mit DAPI, welches 1:36000 in PBS verdünnt wurde, für 5min in einer dunklen feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden ein weiteres Mal, wie bereits beschrieben, gewaschen, die Zellausstriche mit Citifluor® eingedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop2 mot plus, Zeiss) ausgewertet.

### **3.3 Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung in bovinen Spermatozoen während der Nebenhodenpassage**

#### **3.3.1 Immunbiochemische Identifizierung phosphorylierter Spermatozoenproteine**

Zur immunbiochemischen Identifizierung phosphorylierter Spermatozoenproteine wurden Immunoblots mit den 2% TX-100 Gesamtproteinextrakten ( $25 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur) und mit den über Hydroxyapatit/Celite Säulen gereinigten 2% TX-100 Extrakten ( $165 \times 10^6$

Spermatozoen/Spur) durchgeführt. Im Unterschied zu den unter 3.2.7 beschriebenen Versuchsbedingungen, erfolgte die Präinkubation der Membranen und die Antikörperverdünnung in T-TBS + 1% BSA. Als Erstantikörper wurden ein monoklonaler Maus IgG<sub>2bK</sub> anti-Phosphotyrosin Antikörper (Klon 4G10, Biomol) mit einer Verdünnung von 1:1000 und ein monoklonaler Maus IgG<sub>2aK</sub> anti-Phosphothreonin Antikörper (Zymed) mit einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Die Negativkontrollen, Mausimmunglobuline der Isotypen IgG<sub>2bK</sub> und IgG<sub>2aK</sub>, wurden in gleicher Konzentration wie die verwendeten Erstantikörper eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde Peroxidase markiertes anti-Maus IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:3000 angewendet. Die Antikörperbindung wurde durch das Chemilumineszenzverfahren nachgewiesen.

Neben den oben genannten Kontrollen wurde zur weiteren Validierung der Antikörperspezifität der anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 mit 1mM o-phospho-DL-Tyrosin für 1h präinkubiert, bevor er im Immunoblot eingesetzt wurde.

### **3.3.2 Immunzytochemische Identifizierung phosphorylierter Spermatozoenproteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz**

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Proteinphosphorylierung während der Nebenhodentpassage verändert, wurden immunzytochemische Untersuchungen mit epididymalen und ejakulierten Spermatozoen durchgeführt. Der Versuchsablauf erfolgte wie unter 3.2.9 beschrieben mit dem Unterschied, dass die Spermatozoenausstriche nicht mit Methacarn sondern für 10min in 1% (w/v) Paraformaldehydlösung fixiert wurden. Als Erstantikörper wurden der monoklonale Maus IgG<sub>2bK</sub> anti-Phosphotyrosin Antikörper (Klon 4G10, Biomol) mit einer Verdünnung von 1:25 und der monoklonale Maus IgG<sub>2aK</sub> anti-Phosphothreonin Antikörper (Zymed) mit einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Maus-Immunglobuline der Isotypen IgG<sub>2bK</sub> und IgG<sub>2aK</sub>, in gleicher Konzentration wie die verwendeten Erstantikörper, dienten als Negativkontrollen. FITC markiertes anti-Maus IgG (Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:32 als Zweitantikörper eingesetzt.

### **3.3.3 Anfärbung von Phosphoproteinen in Polyacrylamidgelen**

Als weitere Methoden zum Nachweis von phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteinen wurden die Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese mit dem „Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Stain“ der Firma Molecular Probes behandelt. Das Färbemittel Pro-Q® Diamond ist ein fluoreszierender Farbstoff, der Tyrosin-, Serin- und Threoninreste direkt im

Gel detektiert. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz abhängig von der Anzahl der Phosphatgruppen des jeweiligen Proteins. Als Kontrolle diente der „Peppermint Stick Standard“ (Molecular Probes), der während der Elektrophorese in zwei phosphorylierte und vier unphosphorylierte Proteine aufgetrennt wurde.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese in 100ml Fixierlösung für 30min fixiert. Nach erfolgtem Wechsel der Fixierlösung wurde das Gel ein weiteres Mal über Nacht fixiert. Es folgten drei Waschschriffe für jeweils 10min in Aqua dest.. Im Anschluss daran wurde das Gel in 100ml Pro-Q® Diamond-Lösung für 90min lichtgeschützt gefärbt. Danach wurde das Gel insgesamt drei Mal lichtgeschützt für jeweils 30min in 200ml Entfärbelösung entfärbt. Nach zweimaligem Waschen für 5min wurden gefärbte Banden mit einem UV-Transilluminator (LTF Labortechnik, Wasserburg) bei einer Wellenlänge von 365nm dargestellt und mit einer Digitalkamera des Typs Canon G3 (Canon GmbH, Krefeld) fotografiert. Alle Fixier-, Färbe- und Waschschriffe erfolgten bei RT unter vorsichtigem Schütteln.

Nach der Pro-Q® Diamond Färbung wurde das Gel zur Darstellung aller Proteinbanden, wie unter 3.2.5 beschrieben, mit dem Farbstoff Coomassie-Blau gefärbt und anschließend fotografiert.

### **3.3.4 Affinitätschromatografische Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Proteine**

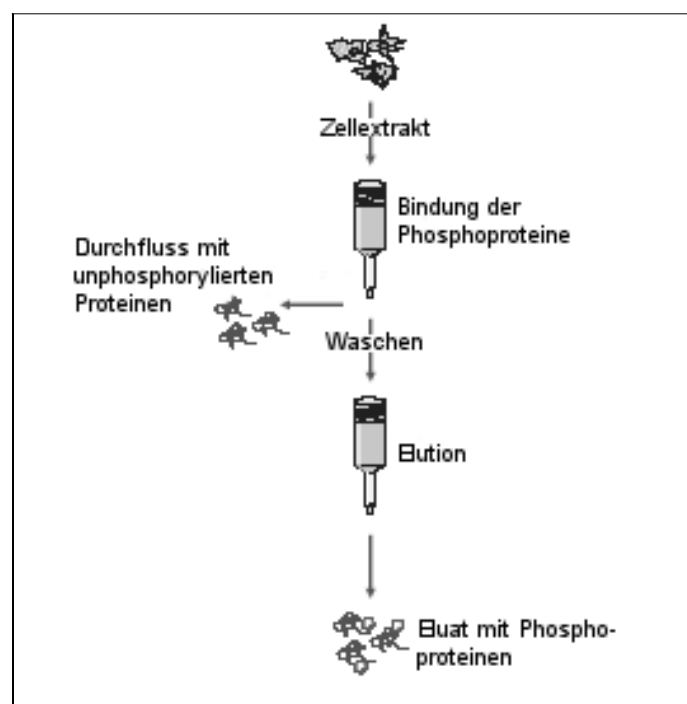
Um phosphorylierte Proteine aus den Gesamtproteinextrakten anzureichern, wurden Extrakte aus den Nebenhodenabschnitten und aus Ejakulat mit dem „PhosphoProtein Purification Kit“ der Firma Qiagen behandelt. Das Prinzip des Kits beruht auf der affinitätschromatografischen Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Proteine aus einem Proteingemisch (Abbildung 8). Die Phosphatgruppen phosphorylierter Proteine binden an die Säulenmatrix, während nicht phosphorylierte Proteine die Säule durchlaufen und als „Flow-through“-Fraktion gesammelt werden. Nach einem Waschschriff werden gebundene Phosphoproteine mit „PhosphoProtein Elution Buffer“ eluiert.

Da das Kit für TX-100 haltige Proteinextrakte ungeeignet ist, wurden 2% LDAO Proteinextrakte (siehe 3.2.1) aus bovinen Nebenhodenabschnitten und Ejakulat verwendet. Auf die Zugabe des Phosphatasehemmstoffs Natriumorthovanadat wurde bei der Proteinextraktion verzichtet, da dieser die Bindung von Phosphoproteinen an die Säulenmatrix behindert. Nach erfolgter Proteinbestimmung wurde der Proteingehalt der Extrakte durch Verdünnung mit „PhosphoProtein Lysis Buffer“ auf 0,1mg/ml angeglichen. Die verdünnten Extrakte wurden jeweils auf eine gebrauchsfertige Säule gebracht (Caput- 1,97mg, Corpus- 1,74mg, Cauda- 1,47mg und Ejakulatextrakt 647µg Protein) und die Durchflüsse als „Flow-through“ Fraktionen gesammelt. Die Säulen wurden dann mit 6ml „PhosphoProtein Lysis Buffer“



gewaschen. Im Anschluss daran wurden gebundene Phosphoproteine in fünf aufeinander folgenden Schritten durch Zugabe von jeweils 500µl „PhosphoProtein Elution Buffer“ eluiert und gesammelt.

Die Proteine der verdünnten Extrakte, der „Flow-through“ Fraktionen und der Eluate wurden mit Trichloressigsäure gefällt, in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend ein Immunoblot mit dem anti-VDAC Antikörper AS P<sub>common</sub>, anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin Antikörpern durchgeführt.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der affinitätschromatografischen Trennung von Phosphoproteinen aus Proteingemischen (PhosphoProtein Purification Handbook 12/2002, Firma Qiagen).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der VDAC Subtypen in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen

#### 4.1.1 Extraktion und Anreicherung der VDAC Subtypen

Der Nachweis von VDAC Subtypen in Proteinextrakten epididymaler und ejakulierter Spermatozoen erfolgte in 2% TX-100- sowie 2% LDAO Gesamtzellproteinextraktionen. Ein Teil des gewonnenen Gesamtproteins wurde zur Reinigung und Anreicherung der VDAC Subtypen auf eine Hydroxyapatit/Celite (H/C) Säule gegeben. Zur vergleichbaren elektrophoretischen Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE wurde zunächst eine Proteinbestimmung der Extrakte durchgeführt. Trotz unterschiedlicher Protokolle (siehe 3.2.4) war eine exakte Proteinbestimmung der 2% TX-100 Extrakte nicht möglich, da die Meßwerte der Kontrollprobe (2% TX-100 Puffer) stets höher waren als die der 2% TX-100 Extrakte (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die entsprechenden 2% TX-100 Extrakte nach definierter Zellzahl auf die Gele aufgetragen. Die 2% LDAO Extrakte wurden nach Proteinmenge (Proteinbestimmung mittels „Non-Interfering Protein Assay“, Calbiochem) aufgetragen. Zur Darstellung der aufgetrennten Banden wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt.

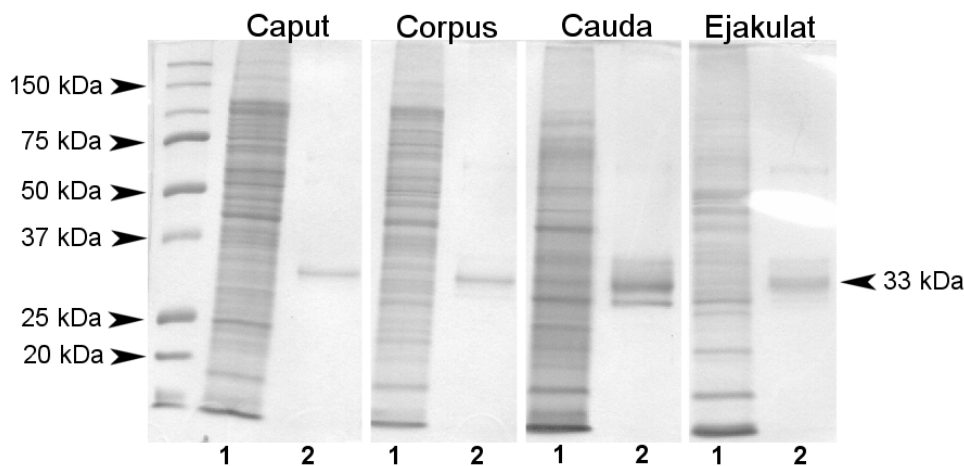
#### 2% TX-100 Extrakt

Das Ergebnis einer 2% TX-100 Extraktion (Gesamtzellextrakt) von insgesamt drei Versuchen und der sich anschließenden H/C Reinigung ist exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt. Zur Charakterisierung der Gesamtzellextrakte wurde von jeder Probe der 2% TX-100 Extrakt von  $25 \times 10^6$  Spermatozoen pro Spur aufgetragen (Spuren Nr. 1) und von den H/C gereinigten Extrakten (Spuren Nr. 2) jeweils  $165 \times 10^6$  Spermatozoen pro Spur.

Obwohl für jede Probe von der gleichen Anzahl Spermatozoen ausgegangen wurde, schien die Gesamtproteinmenge, die aus epididymalen Spermatozoen (Abbildung 9 Caput, Corpus, Cauda epididymidis, Spur 1) extrahiert wurde, größer als die extrahierte Proteinmenge aus ejakulierten Spermatozoen (Abbildung 9, Ejakulat, Spur 1). Innerhalb der einzelnen Nebenhodenabschnitte war die extrahierte Proteinmenge, trotz gleicher Menge des Ausgangsmaterials, aus Spermatozoen des Corpus epididymidis geringer, als aus denen des Caput und Cauda epididymidis. Des Weiteren variierte das Bandenmuster des aufgetrennten Totalextraktes in den verschiedenen Nebenhodenabschnitten. Im Gesamtextrakt der Spermatozoen aus Caput und Corpus epididymidis (Caputextrakt, Corpusextrakt) traten im Molekularmassenbereich zwischen 40 und 120 kDa sehr viele, deutlich gefärbte Banden auf

(Abbildung 9, Caput & Corpus, Spur 1). Im Vergleich dazu nahmen die Bandenzahl und die Farbintensität der Banden im Molekularmassenbereich von 20 bis 40 kDa ab. Im Spermatozoenextrakt des Cauda epididymidis (Caudaextrakt) fand sich ein umgekehrtes Proteinmuster. Hier waren im Vergleich zu den Spermatozoenextrakten aus Caput und Corpus epididymidis im Molekularmassenbereich zwischen 40 und 120 kDa die Bandenzahl geringer und die Farbintensität der Banden schwächer. Im Molekularmassenbereich von 25 bis 37 kDa hingegen nahmen sowohl die Bandenzahl, als auch die Farbintensität zu (Abbildung 9, Cauda, Spur 1). Weiterhin waren im Molekularmassenbereich zwischen 25 und 37 kDa in Extrakten aus Spermatozoen des Cauda epididymidis und ejakulierten Spermatozoen (Ejakulatextrakt) einige prominente Proteinbanden sichtbar, die in den Caput- und Corpusextrakten fehlten (Abbildung 9, Caput, Corpus, Cauda, Ejakulat, Spur 1).

Bei den gereinigten Extrakten ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur) trat in allen Proben eine deutliche Proteinbande im Bereich von 33 kDa auf (Abbildung 9, Caput, Corpus, Cauda und Ejakulat, Spur 2). Neben dieser Bande wurden im gereinigten Caudaextrakt und Ejakulatextrakt zusätzlich noch zwei weitere Banden im Bereich von 36 und 32 kDa durch die Coomassie-Blau Färbung dargestellt, wobei die Farbintensität im Caudaextrakt deutlich höher war als im Ejakulatextrakt.

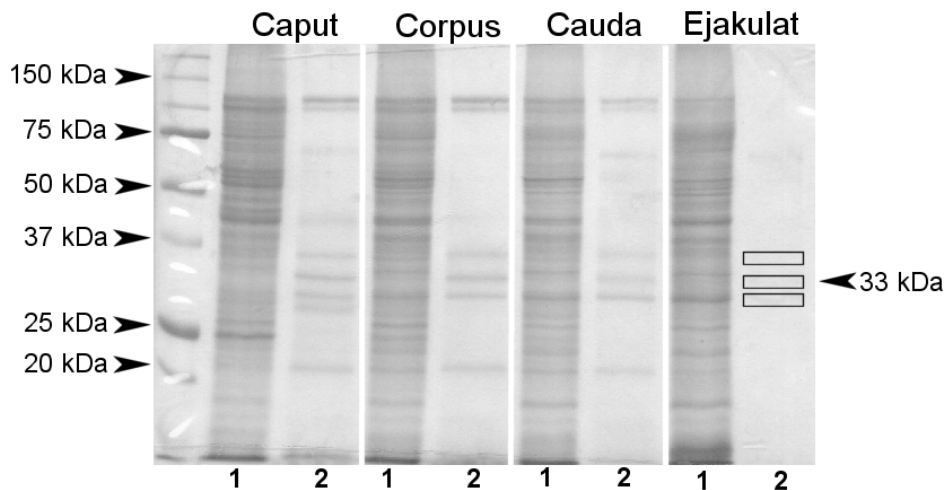


**Abbildung 9:** Exemplarische Darstellung einer Coomassie-Blau Färbung elektrophoretisch aufgetrennter epididymaler und ejakulierter Spermatozoenproteine. **1:** 2% TX-100 Gesamtproteinextrakt von jeweils  $25 \times 10^6$  Spermatozoen. **2:** H/C Reinigung des Gesamtproteinextrakts (2% TX-100 Extrakt von jeweils  $165 \times 10^6$  Spermatozoen). Links dargestellt sind die Molekularmassen des mitgeführten Standards. Caput= Caput epididymidis, Corpus= Corpus epididymidis, Cauda= Cauda epididymidis, Ejakulat= frisch ejakulierte Spermatozoen.

### 2% LDAO Extrakt

Die elektrophoretische Auftrennung boviner Spermatozoenproteine nach einer 2% LDAO Extraktion und anschließender Coomassie-Blau Färbung ist exemplarisch in Abbildung 10 gezeigt (n=3). Spur 1 präsentiert das Proteinbandenmuster des 2% LDAO Gesamtprotein-extrakts, Spur 2 zeigt die Proteinbanden nach der Reinigung von 500µl Gesamtextrakt über die Hydroxyapatit/Celite Säule (H/C Extrakt). Vom Gesamtextrakt und dem gereinigten H/C Extrakt wurden jeweils 30µg Protein/Spur aufgetragen. Auch hier waren innerhalb der verschiedenen Gesamtextraktionen leichte Unterschiede im Proteinmuster vor allem im Molekularmassenbereich von 15 bis 31 kDa und von 50 bis 100 kDa festzustellen (Abbildung 10, jeweils Spur 1). Besonders auffällig waren die Unterschiede bei einer 25 kDa Bande, die im Caputextrakt sehr deutlich gefärbt war, im Corpus- und Caudaextrakt immer schwächer wurde und im Ejakulatrextrakt kaum noch sichtbar war. Umgekehrt dazu verhielt sich das Färbemuster einer Proteinbande bei etwa 31 kDa. Diese war im Caputextrakt relativ schwach dargestellt, trat im Corpus- und Caudaextrakt immer deutlicher hervor und war im Ejakulatrextrakt am stärksten ausgeprägt.

Die aus den 2% LDAO Gesamtextrakten über eine Hydroxyapatit/Celite Säule gereinigten Extrakte demonstriert Abbildung 10, Spur 2. In den Nebenhodenextrakten konnten deutliche Banden bei apparenten Molekularmassen von etwa 20, 32, 33, 36, 105 und 110 kDa identifiziert werden (Abbildung 10, Caput, Corpus und Cauda, Spur 2). Des Weiteren trat im Caputextrakt eine ca. 30 kDa Bande auf, die in den übrigen Extrakten fehlte. Im Ejakulatrextrakt waren drei sehr schwach gefärbte Proteinbanden bei apparenten Molekularmassen von 32, 33 und 36 kDa festzustellen (Abbildung 10, Ejakulat Spur 2, schwer darstellbar, durch Kästchen markiert). Zwei weitere, ebenfalls kaum sichtbare Banden befanden sich bei etwa 62 und 70 kDa in allen Extrakten.



**Abbildung 10:** Exemplarische Darstellung einer Coomassie-Blau Färbung elektrophoretisch aufgetrennter epididymaler und ejakulierter Spermatozoenproteine. **1:** 2% LDAO Gesamtproteinextrakt (je 30µg Protein/Spur). **2:** H/C Reinigung des Gesamtproteinextrakts (je 30µg Protein/Spur). Schwach darstellbare Banden sind mit einem Rahmen markiert. Links dargestellt sind die Molekularmassen des mitgeführten Standards. Caput= Caput epididymidis, Corpus= Corpus epididymidis, Cauda= Cauda epididymidis, Ejakulat= frisch ejakulierte Spermatozoen.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der 2% TX-100 und der 2% LDAO Gesamtzell-extraktionen, dass sich die Bandenmuster der extrahierten Proteine während der Nebenhodenpassage bis hin zu ejakulierten Spermatozoen veränderten. Weiterhin konnte bei den 2% TX-100 Gesamtzellextrakten festgestellt werden, dass die extrahierbare Proteinmenge aus epididymalen Spermatozoen größer erschien als aus ejakulierten Spermatozoen und auch innerhalb der Nebenhodenabschnitte variierte.

Bei den gereinigten Extrakten war auffällig, dass der gereinigte 2% LDAO Extrakt deutlich mehr Proteinbanden im Molekularmassenbereich von etwa 20, 40, 60, 70 und 100 kDa aufwies als der gereinigte 2% TX-100 Extrakt. Aus diesem Grund erfolgten weitere H/C Reinigungen mit 2% TX-100 Extrakten.

### 4.1.2 Immunoblot mit bovinen Spermatozoenproteinen

Die 2% TX-100 Extraktion, der H/C gereinigte 2% TX-100 Extrakt sowie die 2% LDAO Extraktion boviner Spermatozoenproteine wurden zum Nachweis der VDAC Subtypen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in einem Immunoblot untersucht.

In vorangegangenen Arbeiten konnte die Spezifität der anti-VDAC Antikörper für VDAC1, VDAC2 und VDAC3 Subtypen in Immunoblots mit rekombinanten VDAC Proteinen gezeigt werden (Hinsch *et al.*, 2004). Alle drei anti-VDAC Antikörper wurden in Immunoblots mit Proteinextrakten aus epididymalen und ejakulierten Spermatozoen eingesetzt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Immunoblots mit den anti-VDAC2 und anti-VDAC3 Antiseren dargestellt. Endgültige Resultate für VDAC1 liegen zurzeit noch nicht vor.

#### 2% Triton X-100

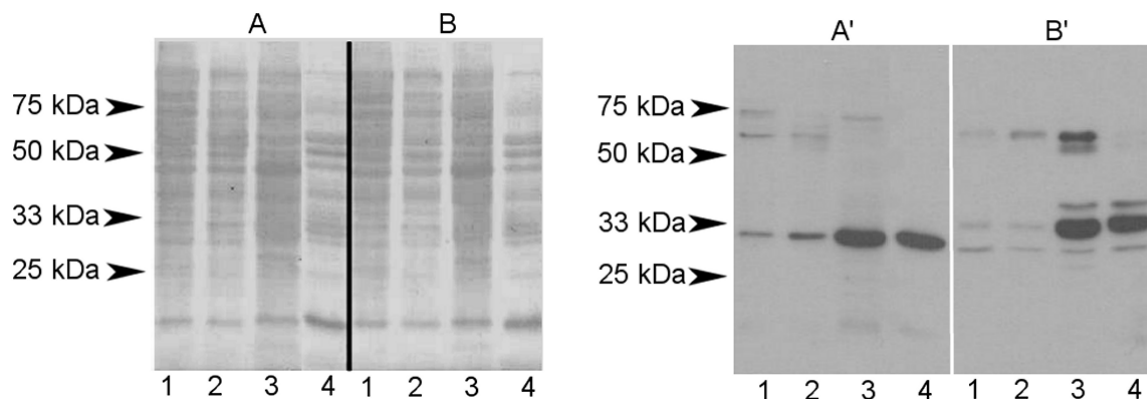
Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Ergebnisse des Immunoblots mit bovinen 2% TX-100 Gesamtextrakten ( $25 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur) von insgesamt fünf durchgeführten Experimenten. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde zunächst zur Darstellung des regelrechten Elektrotransfers eine Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S vorgenommen (Abbildung 11, A und B). Die Ponceau S Färbung zeigte, dass sich die extrahierte Proteinmenge innerhalb der Nebenhodenabschnitte trotz gleicher Zellzahl unterschied und im Ejakulatrextrakt geringer war als in Extrakten aus dem Nebenhoden. Sie bestätigte somit die Ergebnisse der Coomassie-Blau Färbung (s. 4.1.1).

Im Anschluss an die Ponceau S Färbung erfolgte ein Immunoblot mit dem anti-VDAC3 Antiserum (AS) P31 und dem anti-VDAC2 AS P45 (Abbildung 11, A' und B').

Das AS P31 detektierte in allen vier Extrakten (1: Caput, 2: Corpus, 3: Cauda, 4: Ejakulat) ein Polypeptid mit einer apparenten Molekularmasse von etwa 32 kDa (Abbildung 11A', Spuren 1-4). Die Antigen-Antikörperreaktion stellte sich im Caput- und Corpusextrakt als eine gut fokussierte Bande dar, wobei eine leichte Intensitätszunahme im Corpusextrakt zu verzeichnen war (Abbildung 11A', Spuren 1 und 2). Im Cauda- und Ejakulatrextrakt trat diese Markierung in Form einer nicht mehr so gut fokussierten breiteren Bande noch deutlicher hervor (Abbildung 11A', Spuren 3 und 4). Weitere, schwach reagierende Banden waren im Caput- Corpus- und Caudaextrakt zwischen 50 und 75 kDa festzustellen (Abbildung 11A', Spuren 1-3).

Abbildung 11B' zeigt den Einsatz des anti-VDAC2 Antiserums P45. Es konnte in allen Extrakten eine Immunreaktion im Bereich von ca. 33 kDa nachgewiesen werden. Die markierte Bande war im Caput- und Corpusextrakt (Abbildung 11B' Spuren 1 und 2) sehr schmal und von geringerer Farbintensität als im Cauda- und Ejakulatrextrakt (Abbildung 11B', Spuren 3 und 4). Hier war die 33 kDa Bande deutlich markiert und auffallend breiter als im

Caput- und Corpusextrakt. Im Cauda- und Ejakulatextrakt zeigte sich eine weitere schmale Proteinbande bei etwa 36 kDa. Eine schwach immunreaktive Bande bei ca. 30 kDa trat in allen Gesamtzellextrakten auf (Abbildung 11B', Spuren 1-4). Auch im Bereich zwischen 50 und 60 kDa zeichneten sich in Caput- Corpus- und Caudaextrakt sowie im Ejakulatextrakt unterschiedlich stark reagierende Proteinbanden ab (Abbildung 11B', Spuren 1-4).



**Abbildung 11:** Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen in epididymalen und ejakulierten bovinen Spermatozoenextrakten. Pro Spur wurde ein 2% TX-100 Extrakt aus jeweils  $25 \times 10^6$  Zellen aufgetragen, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Zur Darstellung der transferierten Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit Ponceau S gefärbt (**A** und **B**) und anschließend mit den anti-VDAC3 Antikörpern AS P31 (**A'**, 1:100 verdünnt) und anti-VDAC2 Antikörpern AS P45 (**B'**, 1:500 verdünnt) inkubiert. Als „Zweitantikörper“ diente Peroxidase gekoppeltes Protein A (1:3000). Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen. Spermatozoenextrakt aus **1:** Caput epididymidis, **2:** Corpus epididymidis **3:** Cauda epididymidis und **4:** frischem Ejakulat.

Um die Spezifität der Immunreaktion zu überprüfen, wurden die anti-VDAC Antikörper vor der Immunreaktion 1h lang mit  $15 \mu\text{g/ml}$  des korrespondierenden synthetischen Peptids prä-adsorbiert (nicht gezeigt). Nach dem sich anschließenden Immunoblot-Verfahren konnte für das AS P31 im Molekularmassenbereich von 32 kDa eine vollständige Blockierung der Antikörperbindung an ihr Antigen und für das AS P45 in den Bereichen von 33, 36 und 60 kDa ebenfalls eine vollständige bzw. eine eindeutig verminderte Immunreaktion beobachtet werden. Proteinbanden, die trotz vorheriger Peptid-Blockierung im Bereich von 30, 50 und 75 kDa sichtbar waren, wurden als unspezifisch angesehen. Die Immunreaktionen der anti-

VDAC Antiseren konnten im Molekularmassenbereich zwischen 32 bis 36 kDa und bei etwa 60 kDa mit synthetischen Peptiden blockiert bzw. deutlich abgeschwächt werden und wurden daher als spezifisch bewertet.

#### Hydroxyapatit/Celite gereinigte 2% Triton X-100 Extrakte

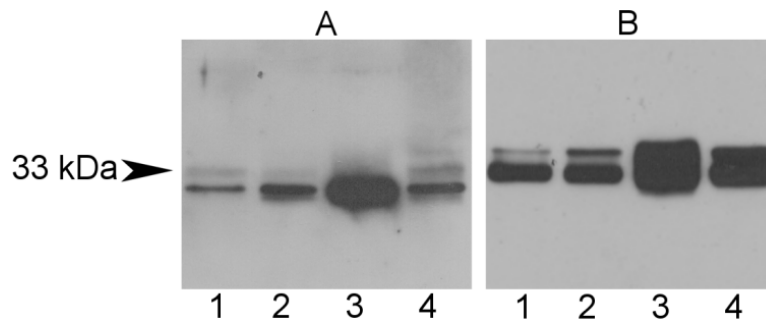
Die Immunreaktion der anti-VDAC Antiseren mit gereinigtem 2% TX-100 Caput-, Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt aus jeweils  $165 \times 10^6$  Spermatozoen ist in Abbildung 12 exemplarisch dargestellt. Vor Inkubation der Membran mit den Antiseren wurde wiederum eine Ponceau S Färbung vorgenommen. Es folgte ein Immunoblot mit AS P31 in einer Verdünnung von 1:100 (Abbildung 12A) und AS P45 in einer Verdünnung 1:500 (Abbildung 12B). Insgesamt wurden drei Versuche durchgeführt.

Nach der Ponceau S Färbung (nicht gezeigt) war in allen Extrakten eine prominente Bande im Bereich von 33 kDa sichtbar, deren Intensität im Cauda- und Ejakulatextrakt etwas stärker war als in den Extrakten aus Caput und Corpus. Weiterhin zeigten sich im Caudaextrakt deutliche Banden bei etwa 32 und 36 kDa, die in den übrigen Extrakten nur sehr schwach ausgeprägt waren.

Im Immunoblot detektierte AS P31 in allen Extrakten ein Protein im Bereich von 32 kDa (Abbildung 12A, Spuren 1-4), dessen Erscheinung besonders intensiv im Caudaextrakt ausgeprägt war (Abbildung 12A Spur 3). Zu einer deutlich schwächeren Reaktion in allen Extrakten kam es zusätzlich im Molekularmassenbereich von 33 kDa.

Im Anschluss an den Immunoblot mit dem AS P31 wurde dieselbe Membran, ohne Entfernen der bereits gebundenen Antikörper, nochmals einem Immunoblot mit dem anti-VDAC2 Antiserum P45 unterzogen (Abbildung 12B). Das Antiserum reagierte in allen Extrakten mit zwei Banden im Bereich von 33 und 36 kDa, wobei sich die Bande bei 33 kDa als wesentlich stärker ausgeprägt darstellte als nach Inkubation mit dem AS P31. Nach Einsatz des AS P45 trat im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem AS P31 zusätzlich eine 36 kDa Bande auf. Sie war im Caputextrakt (Abbildung 12B Spur 1) relativ schwach ausgeprägt, nahm an Stärke und Intensität im Corpusextrakt (Abbildung 12B Spur 2) zu und war im Cauda- und Ejakulatextrakt (Abbildung 12B Spuren 3 und 4) so intensiv markiert, dass die Markierung mit der 33 kDa Bande verschmolz. Die zuvor durch das AS P31 detektierte 32 kDa Bande konnte nach Verwendung des AS P45 nicht mehr nachgewiesen werden.





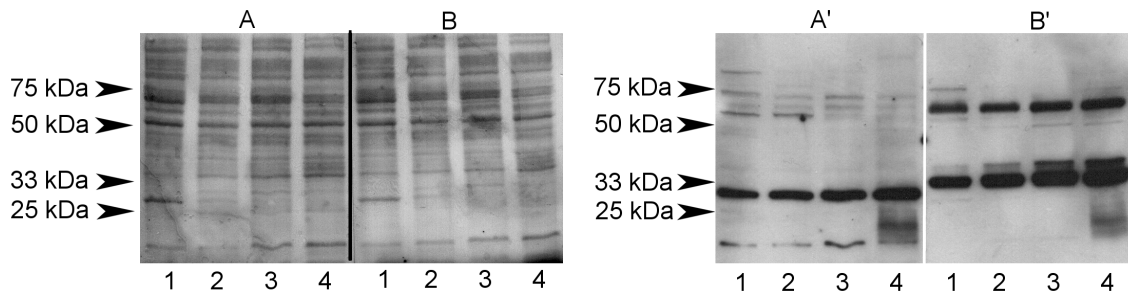
**Abbildung 12:** Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen in H/C gereinigten 2% TX-100 Extrakten aus bovinen Nebenhodenspermatozoen und ejakulierten Spermatozoen. Je 1ml der gereinigten H/C Extrakte ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen) wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membran wurde anschließend nacheinander mit dem anti-VDAC3 Antiserum P31 (**A**, 1:100 verdünnt) und dem anti-VDAC2 Antiserum P45 (**B**, 1:500 verdünnt) inkubiert. Als „Zweitantikörper“ diente Peroxidase gekoppeltes Protein A (1:3000 verdünnt). Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen. Spermatozoenextrakt aus **1**: Caput epididymidis; **2**: Corpus epididymidis; **3**: Cauda epididymidis; **4**: frischem Ejakulat.

### 2% LDAO Extrakte

In Abbildung 13 ist die Immunreaktion (A' und B') der anti-VDAC Antiseren mit den 2% LDAO Proteinextrakten ( $30 \mu\text{g}$  Protein/Spur) aus bovinen epididymalen und ejakulierten Spermatozoen und die dazugehörige Ponceaufärbung (A und B) beispielhaft dargestellt ( $n=5$ ). Die Ponceau S Färbung zeigte, dass von allen Zellextrakten annähernd gleiche Mengen Protein pro Spur aufgetragen wurden.

Das AS P31 detektierte im Caput-, Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt eine deutliche Bande bei etwa 32 kDa, die in allen Extrakten von nahezu gleicher Intensität war (Abbildung 13A', Spuren 1-4). Die Reaktionen des Antikörpers mit einigen Proteinen im Molekularmassenbereich über 55 kDa und von etwa 20 kDa in allen Extrakten sowie zwischen 20 und 25 kDa im Ejakulatextrakt waren, verglichen mit den deutlich positiven Markierungen bei 32 kDa, nur sehr schwach ausgeprägt. Abbildung 13B' zeigt die Immunreaktion des AS P45. Hier trat in allen Extrakten eine sehr starke immunreaktive Bande im Bereich von 33 kDa auf. Darüber hinaus konnte bei etwa 36 kDa eine weitere Bande dargestellt werden, deren Intensität im Caput- und Corpusextrakt relativ schwach ausgeprägt war und im Cauda- und Ejakulatextrakt deutlich zunahm (Abbildung 13B', Spuren 1-4). Zusätzlich detektierte das AS P45 in allen 4 Extrakten eine klar begrenzte Proteinbande mit gleicher Intensität von ca. 60 kDa. Schwache Reaktionen oberhalb und unterhalb der 60 kDa Bande waren in allen

Extrakten zu beobachten. Die Reaktion des AS P45 mit Proteinen des Ejakulatextraktes zwischen 20 und 25 kDa fiel im Vergleich zu den Immunreaktionen bei 33, 36 und 60 kDa deutlich schwächer aus (Abbildung 13B', Spur 4).

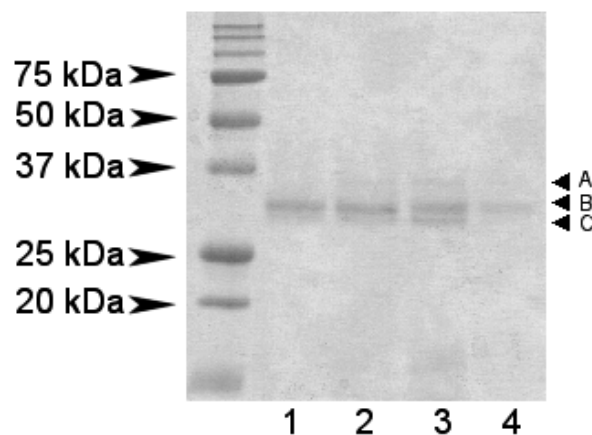


**Abbildung 13:** Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen in epididymalen und ejakulierten bovinen Spermatozoenextrakten. Pro Spur wurden 30µg der 2% LDAO Extrakte aufgetragen, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Zur Darstellung der transferierten Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit Ponceau S gefärbt (**A** und **B**) und anschließend mit dem anti-VDAC3 Antiserum P31 (**A'**, 1:100 verdünnt) und dem anti-VDAC2 Antiserum P45 (**B'**, 1:500 verdünnt) inkubiert. Als „Zweitantikörper“ diente Peroxidase gekoppeltes Protein A (1:3000 verdünnt). Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen. Spermatozoenextrakt aus: **1:** Caput epididymidis; **2:** Corpus epididymidis; **3:** Cauda epididymidis; **4:** ejakulierten Spermatozoen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der immunbiochemischen Untersuchungen, dass durch die Antiseren P31 (anti-VDAC3) und P45 (anti-VDAC2) sowohl VDAC3 als auch VDAC2 Proteine in 2% TX-100 und 2% LDAO Proteinextrakten aus bovinen Spermatozoen des Caput, Corpus und Cauda epididymidis sowie aus ejakulierten Spermatozoen nachzuweisen waren. Auch in H/C gereinigten 2% TX-100 Extrakten konnten durch das Chemilumineszenzverfahren VDAC3 und VDAC2 Proteine eindeutig detektiert werden.

### 4.1.3 Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteinextrakte

Zur Verifizierung der immunbiochemischen Untersuchungsergebnisse wurde als weitere Methode die MALDI-TOF-MS Analyse (siehe 3.2.8) angewendet. Dazu wurden die H/C gereinigten 2% TX-100 Proben einer SDS-PAGE unterzogen und das Gel zur Darstellung der Proteinbanden mit Coomassie-Blau gefärbt (Abbildung 14). In den H/C gereinigten Spermatozoenextrakten aus Caput epididymidis (Spur 1), Corpus epididymidis (Spur 2), Cauda epididymidis, (Spur 3) und ejakulierten Spermatozoen (Spur 4) waren drei Banden in Bereichen von 36, 33 und 32 kDa (A, B, C) angefärbt. Das gefärbte Gel wurde zur MALDI-TOF-MS Analyse der Peptidfragmentmassen der Firma ChromaTec, Greifswald zugeschickt.



**Abbildung 14:** Coomassie-Blau Färbung elektrophoretisch aufgetrennter epididymaler und ejakulierter Spermatozoenproteine. Die mit 2% TX-100 extrahierten Proteine wurden über eine Hydroxyapatit/Celite Säule gereinigt. **1:** Caputextrakt, **2:** Corpusextrakt, **3:** Caudaextrakt, **4:** Zellextrakt aus ejakulierten Spermatozoen. Rechts: Molekularmassen der sichtbaren Banden 36 kDa (**A**), 33 kDa (**B**), 32 kDa (**C**). Links: Molekularmassen des mitgeführten Proteinstandards.

Eine Übersicht der MALDI-TOF-MS zeigt Tabelle 2. Eindeutig als VDAC2 Protein identifiziert werden konnten die PMF's (peptide mass fingerprints) der 36 kDa Banden im Spermatozoenextrakt aus Caput und Corpus epididymidis (Abbildung 14, 1A und 2A) sowie die PMF's der 33 kDa Banden im Zellextrakt aus Corpus epididymidis, Cauda epididymidis und Ejakulat (Abbildung 14, 2-4B). VDAC2 Protein wurde auch als möglicher Kandidat zum PMF der 33 kDa Bande im Caputextrakt sowie zum PMF der 36 kDa Bande im Caudaextrakt in der

Datenbank gefunden, allerdings war der dazugehörige Mowse Score nicht signifikant (Abbildung 14, 1B; 3A).

VDAC3 Protein könnte möglicherweise den PMF's der 32 kDa Banden im Extrakt aus Caput und Cauda epididymidis zugeordnet werden (Abbildung 14, 1C; 3C). Eine eindeutige Aussage kann hierzu aber nicht getroffen werden, da der jeweilige Mowse Score nicht signifikant war.

Insgesamt konnten durch die MALDI-TOF-MS Analyse (n=4) die Ergebnisse des Immunoblots größtenteils bestätigt werden.

**Tabelle 2:** Proteinidentifikation mithilfe der Mascot Datenbanksuche.

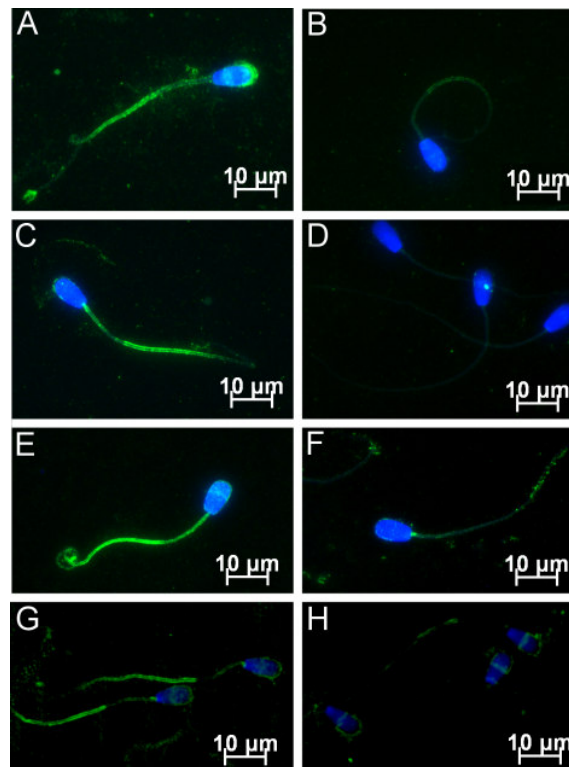
H/C gereinigter 2% TX-Extrakt boviner Spermatozoen	Bandenbezeichnung/ Molekulargewicht	Signifikanzgrenze für Mowse Score (p<0,05)	Mowse Score des Proteins	Protein
Caput epididymidis	1 A/ 36 kDa	51	99	VDAC2
	1 B/ 33 kDa	51	41	VDAC2
	1 C/ 32 kDa	51	24	VDAC3
Corpus epididymidis	2 A/ 36 kDa	51	74	VDAC2
	2 B/ 33 kDa	52	112	VDAC2
	2 C/ 32 kDa	keine Identifizierung möglich		
Cauda epididymidis	3 A/ 36 kDa	52	35	VDAC2
	3 B/ 33 kDa	48	117	VDAC2
	3 C/ 32 kDa	52	29	VDAC3
ejakulierte Spermatozoen	4 A/ 36 kDa	keine Identifizierung möglich		
	4 B/ 33 kDa	50	51	VDAC2
	4 C/ 32 kDa	keine Identifizierung möglich		

Grau hervorgehoben: Nicht signifikante Mowse Scores.

#### **4.1.4 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC in bovinen Spermatozoen**

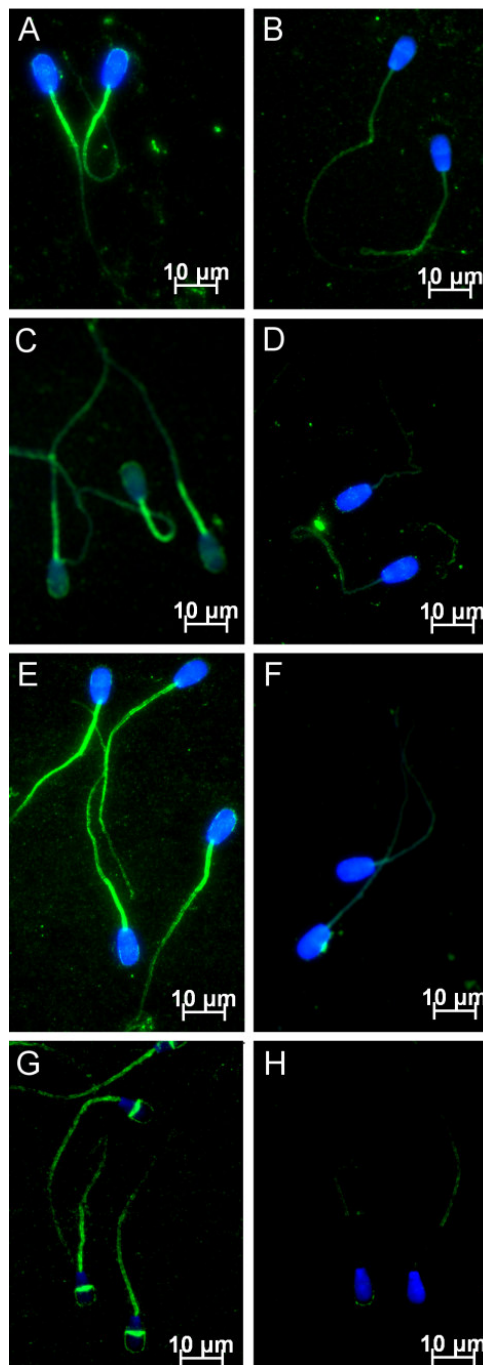
Als weitere Methode zum Nachweis von VDAC Subtypen in bovinen Spermatozoen und deren Lokalisation wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Für diese Untersuchungen wurden bovine Spermatozoen aus dem Nebenhoden und aus Ejakulat, die mit Methacarn vorbehandelt wurden, verwendet. Der Nachweis einer spezifischen Antikörperbindung erfolgte mit FITC markiertem anti-Kaninchen IgG (Sigma). Insgesamt wurden jeweils fünf Experimente durchgeführt.

In Abbildung 15 ist der immunfluoreszenzoptische Nachweis von VDAC3 in Spermatozoen aus Caput epididymidis (A), Corpus epididymidis (C) und Cauda epididymidis (E) sowie aus frischem Ejakulat (G) mit Hilfe des AS P31 (Verdünnung 1:50) beispielhaft gezeigt. Als Negativkontrolle wurde das Präimmunserum P31 (Verdünnung 1:50) eingesetzt (Abbildung 15B, D, F und H). Nach der Inkubation der Spermatozoenausstriche mit AS P31 konnte eine deutlichen Fluoreszenz im Bereich des Spermatozoenhauptstücks beobachtet werden. Die Intensität der Fluoreszenz nahm während der Nebenhodenpassage, von Caput bis Cauda epididymidis, leicht zu (Abbildung 15A, C, E). Auch im Bereich des Mittelstücks war eine im Verlauf der Nebenhodenpassage leicht zunehmende Markierung zu beobachten, die aber wesentlich schwächer ausfiel als im Hauptstück. In ejakulierten Spermatozoen wurde ebenfalls eine Antigen-Antikörper-Reaktion im Mittelstück und im Hauptstück des Spermatozoenschwanzes detektiert, wobei die Fluoreszenz im Mittelstück im Vergleich zu den epididymalen Spermatozoen schwächer ausgeprägt war. Im akrosomalen Bereich des Kopfes trat in Spermatozoen des Caput epididymidis eine positive Immunreaktion auf, die sich als halbmondförmige Struktur darstellte (Abbildung 15A). Bei Spermatozoen aus Corpus und Cauda epididymidis sowie ejakulierten Spermatozoen war keine Immunreaktion im Bereich des Spermatozokopfes festzustellen. Das als Negativkontrolle eingesetzte Präimmunserum P31 wies keine spezifischen Reaktionen auf (Abbildung 15B, D, F und H).



**Abbildung 15:** Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC3 Protein in bovinen Spermatozoen aus Caput epididymidis (**A, B**), Corpus epididymidis (**C, D**), Cauda epididymidis (**E, F**) und frischem Ejakulat (**G, H**). Die Spermatozoen wurden mit Methacarn fixiert, anschließend mit dem Antiserum P31 (**A, C, E, G**) bzw. mit dem Präimmunserum P31 (**B, D, F, H**) inkubiert. Das Antiserum und das Präimmunserum wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit FITC markiertem anti-Kaninchen IgG (1:200) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

Mit Methacarn fixierte epididymale Spermatozoen aus Caput epididymidis (Abbildung 16A), Corpus epididymidis (Abbildung 16C) und Cauda epididymidis (Abbildung 16E) sowie ejakulierte Spermatozoen (Abbildung 16G) wurden mit dem anti-VDAC2 AS P45 inkubiert. Es konnte in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen eine sehr deutliche Fluoreszenz im Mittelstück des Spermatozoenschwanzes beobachtet werden (Abbildung 16A, C, E und G). Bei Spermatozoen aus dem Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) und dem Ejakulat trat die Markierung im gesamten Flagellum mit Betonung des Mittelstücks auf (Abbildung 16E und G). In den ejakulierten Spermatozoen zeigte sich dabei eine etwas geringere Fluoreszenz als bei den aus dem Nebenhodenschwanz isolierten Spermatozoen. Auffällig bei den ejakulierten Spermatozoen war die deutliche Fluoreszenz im Bereich des Äquatorialsegmentes der Köpfe (Abbildung 16G). In den epididymalen Spermatozoen trat diese Reaktion nicht auf (Abbildung 16A, C, E). Als Negativkontrolle diente das Präimmunserum P45. Hier konnte keine spezifische Färbung festgestellt werden (Abbildung 16B, D, F und H).



**Abbildung 16:** Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC2 Protein in bovinen Spermatozoen aus Caput epididymidis (**A, B**), Corpus epididymidis (**C, D**), Cauda epididymidis (**E, F**) und frischem Ejakulat (**G, H**). Die Spermatozoen wurden mit Methacarn fixiert, anschließend mit dem Antiserum P45 (**A, C, E, G**) und mit dem Präimmunserum P45 (**B, D, F, H**) inkubiert. Das Antiserum und das Präimmunserum wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit FITC markiertem anti-Kaninchen IgG (1:200) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).



Durch die immunzytochemischen Untersuchungen konnten die VDAC Subtypen 2 und 3 in unterschiedlichen Spermatozoenkompartimenten nachgewiesen werden. Während VDAC3 Protein vor allem im Bereich des Hauptstücks lokalisiert werden konnte, war VDAC2 hauptsächlich im Mittelstück zu finden. Außerdem wurde eine Zunahme der Immunreaktion beider anti-VDAC Antiseren im Verlauf der Nebenhodenpassage beobachtet.

## **4.2 Proteinphosphorylierung in bovinen Spermatozoen während der Nebenhodenpassage und in ejakulierten Spermatozoen**

Zur Überprüfung des Phosphorylierungszustandes boviner Spermatozoenproteine während der Nebenhodenpassage wurden Tyrosin- und Threoninphosphorylierungsmuster von epididymalen und ejakulierten Spermatozoen untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Nachweismethoden angewandt. Zunächst wurden 2% TX-100 Proteinextrakte von je  $25 \times 10^6$  Spermatozoen aus den drei Nebenhodenabschnitten bzw. aus ejakulierten Spermatozoen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und einem Immunoblot mit verschiedenen anti-Phospho-spezifischen Antikörpern unterzogen (n=3). Um erste Hinweise zur Phosphorylierung von VDAC Proteinen zu erhalten, wurden parallel dazu Immunoblots (n=3) mit dem AS P31 und dem AS P45 durchgeführt und die detektierten Bandenmuster verglichen.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden immunzytologische Untersuchungen mit anti-Phospho-spezifischen Antikörpern auf Zellausstrichen boviner epididymalen und ejakulierter Spermatozoen durchgeführt. Mit diesen Experimenten sollten die immunbiochemischen Ergebnisse verifiziert und vorhandene Phosphorylierungen näher lokalisiert werden.

### **4.2.1 Immunbiochemischer Nachweis phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoen**

#### Tyrosinphosphorylierung boviner Spermatozoenproteine

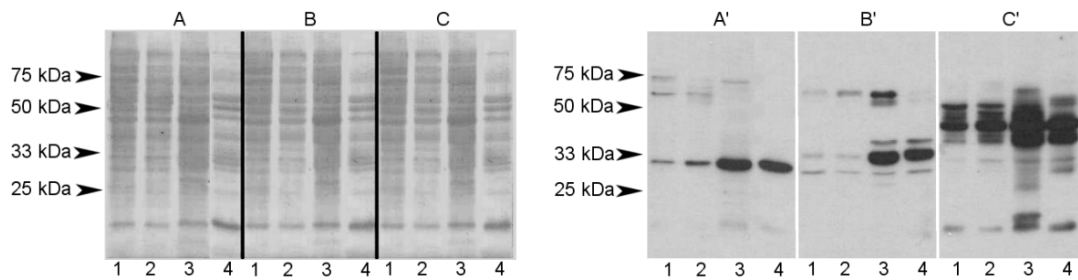
Abbildung 17C' zeigt exemplarisch die Ergebnisse des Immunoblots nach Einsatz des anti-Phosphotyrosin Antikörpers Klon 4G10. Der Antikörper detektierte mehrere Proteinbanden im Molekularmassenbereich zwischen 50 und 37 kDa, zwei Banden im Bereich von 37 und 36 kDa sowie eine Bande bei etwa 20 kDa in allen Spermatozoenextrakten. Zwei weitere immunreaktive Banden traten zwischen 33 und 30 kDa auf, wobei die 30 kDa Bande nur im Cauda- und Ejakulatextrakt festzustellen war (Abbildung 17C', Spuren 3 und 4). Während

der Nebenhodenpassage (Caput-, Corpus- Caudaextrakt) bis hin zum Ejakulatextrakt konnte eine stärkere Immunreaktivität einiger Banden beobachtet werden. Besonders auffällig war diese Zunahme im Molekularmassenbereich von 36 bis 50 kDa. Die Banden wurden vom Caput- zum Ejakulatextrakt hin immer breiter und weniger fokussiert. Die erhöhte Immunreaktivität war nicht auf eine größere Menge von extrahiertem Protein zurückzuführen, was durch die Ponceaufärbung der Membran in Abbildung 17, links dargestellt, verdeutlicht wird. Obwohl im Caputextrakt (jeweils Spur 1) im Vergleich zum Ejakulatextrakt (jeweils Spur 4) deutlich mehr Protein trotz gleicher Zellzahl extrahiert wurde, zeigten sich im Immunoblot, wie bereits beschrieben, die Banden deutlich schwächer ausgeprägt als im Ejakulatextrakt. Im Caudaextrakt traten neben den bereits beschriebenen Immunreaktionen weitere immunreaktive Banden zwischen 20 und 30 kDa auf, die in den übrigen Extrakten fehlten.

Vergleichend wurden dieselben Zellextrakte mit den Antiseren P31 (Verdünnung 1:100) und P45 (Verdünnung 1:500) im Immunoblot untersucht. Das für VDAC3 spezifische Antiserum P31 erkannte eine deutlich markierte, gut fokussierte Bande bei etwa 32 kDa in allen Extrakten (Abbildung 17A', Spuren 1-4). Weitere, im Vergleich zur 32 kDa Bande wesentlich schwächer markierte Banden traten zwischen 50 und 75 kDa auf.

Eine andere Membran wurde mit dem für VDAC2 spezifischem Antiserum P45 inkubiert (Abbildung 17B'). Es konnte in allen Extrakten eine immunreaktive Bande bei etwa 33 kDa nachgewiesen werden, die im Cauda- und Ejakulatextrakt sehr stark markiert war (Abbildung 17B', Spuren 3 und 4). Zusätzlich war im Cauda- und Ejakulatextrakt eine positive Immunreaktion bei 36 kDa zu beobachten (Abbildung 17B', Spuren 3 und 4). Weitere, unterschiedlich stark reagierende Banden traten zwischen 50 und 60 kDa sowie bei 30 kDa auf.

Beim Vergleich der detektierten Proteinbanden des anti-Phosphotyrosin Antikörpers und der anti-VDAC Antiseren konnte festgestellt werden, dass Proteinbanden im Bereich zwischen 30 und 37 kDa zum einen phosphorylierte Tyrosinreste aufwiesen (Abbildung 17C') und zum anderen innerhalb dieses Molekularmassenbereiches eine Immunreaktion mit den anti-VDAC3 Antikörpern (Abbildung 17A') und den anti-VDAC2 Antikörpern (Abbildung 17B') stattfand.



**Abbildung 17:** Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen und Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in Extrakten aus epididymalen (**1**: Caput epididymidis, **2**: Corpus epididymidis, **3**: Cauda epididymidis) und ejakulierten (**4**) bovinen Spermatozoen. 2% TX-100 Extrakte ( $25 \times 10^6$  Zellen/Spur) wurden in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. **Links:** Darstellung der aufgetrennten Proteinbanden durch eine Ponceau S Färbung (**A**, **B**, **C**). **Rechts:** Darstellung der Immunreaktion mit anti-VDAC3 Antiserum P31 (**A'**, 1:100 verdünnt), anti-VDAC2 Antiserum P45 (**B'**, 1:500 verdünnt) und anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 (**C'**, 1:1000 verdünnt). Als „Zweitantikörper“ dienten Peroxidase gekoppeltes Protein A (**A'**, **B'**, 1:3000 verdünnt) sowie anti-Maus IgG (**C'**, 1:3000 verdünnt).

Neben den 2% TX-100 Extrakten wurden auch die 2% LDAO Extrakte boviner Spermatozoen aus den Nebenhodenabschnitten und aus ejakulierten Spermatozoen einem Immunoblot mit anti-Phosphotyrosin Antikörpern unterzogen (nicht gezeigt). Dabei zeigten sich mehrere immunreaktive Banden im Bereich von 36, 40 und 50 kDa, deren Intensität deutlich während der Nebenhodenpassage zunahm. Zusätzlich traten im Ejakulatextrakt mehrere Banden zwischen 20 und 30 kDa auf, die in den Nebenhodenextrakten fehlten.

Zusammenfassend konnte unter Verwendung des anti-Phosphotyrosin Antikörpers Klon 4G10 in mehreren Experimenten ( $n=3$ ) unter gleichen Untersuchungsbedingungen eine deutliche Zunahme der Proteinphosphorylierung diverser Proteinbanden an der Aminosäure Tyrosin während der Nebenhodenpassage bis zu den ejakulierten Spermatozoen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen lieferten auch erste Hinweise darauf, dass die in den Spermatozoenextrakten nachgewiesenen VDAC Proteine tyrosinphosphoryliert sein könnten.

### Threoninphosphorylierung boviner Spermatozoenproteine

Parallel zu den Experimenten zur Tyrosinphosphorylierung wurde auch untersucht, ob eine Phosphorylierung an Threoninresten vorlag. Im Immunoblot wurde zum Nachweis einer Threoninphosphorylierung ein monoklonaler anti-Phosphothreonin Antikörper (Verdünnung 1:500, Zymed) eingesetzt (Abbildung 18C', Spuren 1-4). Der Antikörper detektierte nur schwach diverse Proteinbanden im Molekularmassenbereich zwischen 50 und 75 kDa. Wogegen sich mehrere stärker markierte Proteine im Bereich zwischen 25 und 48 kDa darstellten. Besonders deutlich traten immunreaktive Banden mit apparenten Molekularmassen von etwa 48, 42, 36, 33, 32 und 25 kDa hervor. Dabei nahm die Immunreaktivität der 42 und der 32 kDa Proteine während der Nebenhodenpassage und im Ejakulatextrakt leicht zu, was sich nicht auf eine unterschiedliche Proteinmenge zurückführen ließ, denn die Ponceaufärbung zeigte, dass die extrahierte Proteinmenge trotz gleicher Zellzahl im Ejakulatextrakt (Abbildung 18C, Spur 4) im Vergleich zum Caputextrakt (Abbildung 18C, Spur 1) deutlich geringer war. Dennoch stellten sich die beiden Banden im Molekularmassenbereich von 42 und 32 kDa im Ejakulatextrakt stärker markiert dar als im Caputextrakt (Vergleich Abbildung 18C und Abbildung 18C').

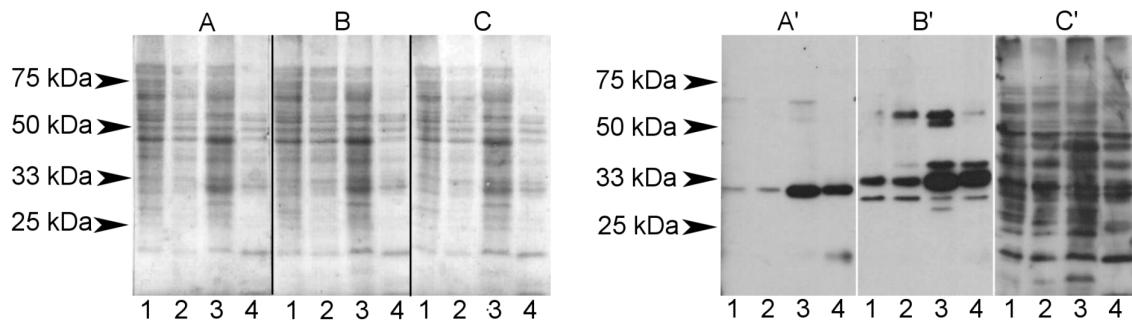
Auch in diesem Experiment wurden dieselben Zellextrakte im Immunoblot mit den Antiseren P31 (1:100) und P45 (1:500) untersucht.

AS P31 (anti-VDAC3) erkannte in den Extrakten aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis sowie aus ejakulierten Spermatozoen eine klar fokussierte Bande bei etwa 32 kDa (Abbildung 18A'). Diese war im Caput- und Corpusextrakt (Spuren 1 und 2) relativ schmal, stellte sich aber im Cauda- und Ejakulatextrakt (Spuren 3 und 4) breiter und intensiver dar. Zwei zusätzliche schmale, deutlich schwächer markierte Banden traten in allen Extrakten zwischen 50 und 75 kDa auf. Im Ejakulatextrakt wurde eine schwache Bande bei etwa 15 kDa sichtbar (Abbildung 18A', Spur 4).

Das Antiserum P45 (anti-VDAC2) reagierte stark mit einer Proteinbande im 33 kDa Bereich in allen Extrakten (Abbildung 18B', Spuren 1-4). Die Immunreaktion wurde im Verlauf der Nebenhodenpassage immer intensiver und die markierte Proteinbande breiter. Eine weitere Reaktion konnte im Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt bei etwa 36 kDa beobachtet werden (Abbildung 18B', Spuren 2-4). Die Intensität der Markierung dieser Bande nahm während der Nebenhodenpassage zu. Im Bereich von 30 kDa trat eine, im Vergleich zu den bereits beschriebenen Banden, schwach reagierende Proteinbande in allen Extrakten auf. Weitere, unterschiedlich stark ausgeprägte Immunreaktionen stellten sich im Molekularmassenbereich zwischen 50 und 60 kDa dar.

Bei vergleichender Betrachtung der Immunreaktionen des anti-Phosphothreonin Antikörpers (Abbildung 18C'), des anti-VDAC3 Antiserums P31 (A') und des anti-VDAC2 Antiserums P45

(B') konnte festgestellt werden, dass es innerhalb des Molekularmassenbereiches von 32 bis 36 kDa sowohl zu einer deutlichen Immunreaktion mit anti-VDAC Antikörpern, als auch mit anti-Phosphothreonin Antikörpern kam. Dies lässt eine Threoninphosphorylierung der VDAC Proteine vermuten.



**Abbildung 18:** Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen und Threonin-phosphorylierten Proteinen in epididymalen (1: Caput epididymidis, 2: Corpus epididymidis, 3: Cauda epididymidis) und ejakulierten (4) bovinen Spermatozoenextrakten. 2% TX-100 Extrakte ( $25 \times 10^6$  Zellen/Spur) wurden in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. **Links:** Darstellung der aufgetrennten Proteinbanden durch eine Ponceau S Färbung (A, B, C). **Rechts:** Darstellung der Immunreaktion mit anti-VDAC3 Antiserum P31 (A', 1:100 verdünnt), anti-VDAC2 Antiserum P45 (B', 1:500 verdünnt) und anti-Phosphothreonin Antikörper (C', 1:500 verdünnt). Als „Zweitantikörper“ dienten Peroxidase gekoppeltes Protein A (A', B', 1:3000 verdünnt) sowie anti-Maus IgG (C', 1:3000 verdünnt).

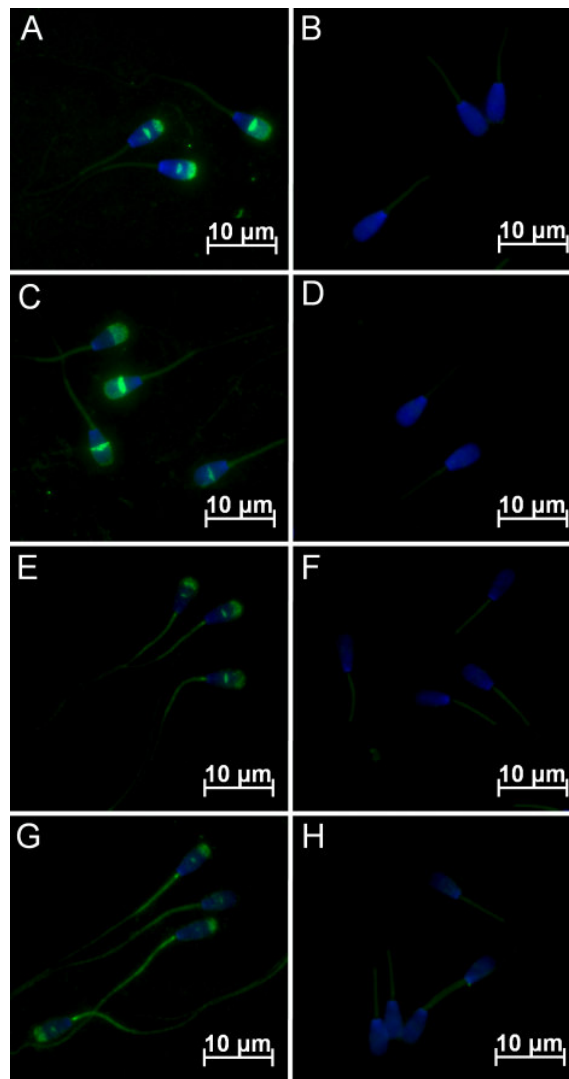
## 4.2.2 Immunzytochemischer Nachweis phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoen

Um festzustellen, in welchen Spermatozoenkompartimenten die Phosphorylierung lokalisiert ist, wurden immunzytologische Untersuchungen mit anti-Phospho-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Verwendet wurden Ausstriche von epididymalen (Caput, Corpus, Cauda epididymidis) und ejakulierten Spermatozoen, die in 1% Paraformaldehydlösung fixiert wurden. Die Anzahl der durchgeführten Experimente lag jeweils bei drei.

### Tyrosinphosphorylierung

Abbildung 19 zeigt beispielhaft den immunfluoreszenzoptischen Nachweis Tyrosinphosphorylierter Spermatozoenproteine. Dargestellt sind Spermatozoen aus Caput (A), Corpus, (C) und Cauda epididymidis (E) sowie ejakulierte Spermatozoen (G) nach Einsatz des anti-Phosphotyrosin Antikörpers Klon 4G10 (Verdünnung 1:25). Die jeweiligen Negativkontrollen mit nicht relevantem Maus IgG (Verdünnung 1:25) sind in Abbildung 19B, D, F und H abgebildet. Der anti-Phosphotyrosin Antikörper detektierte eindeutig phosphorylierte Proteine im Bereich des Akrosoms und des äquatorialen Segmentes. Allerdings stellte sich das Fluoreszenzmuster in den verschiedenen Abschnitten unterschiedlich dar. Während bei Spermatozoen des Caput epididymidis und des Corpus epididymidis die Fluoreszenz überwiegend im gesamten akrosomalen Bereich beobachtet werden konnte (Abbildung 19A und C), war die Antigen-Antikörperreaktion in Spermatozoen aus Cauda epididymidis und bei den ejakulierten Spermatozoen hauptsächlich auf den apikalen Bereich des Akrosoms beschränkt (Abbildung 19E und G). Im Bereich des äquatorialen Segmentes zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede im Fluoreszenzmuster. In Spermatozoen des Caput epididymidis stellte sich eine positive Immunreaktion im Zentrum des äquatorialen Segmentes als halbmondförmige Struktur dar. In Spermatozoen des Corpus epididymidis wurde das Signal etwas stärker und nahm die gesamte Breite des äquatorialen Segmentes ein. Bei Spermatozoen aus der Cauda epididymidis war das Äquatoralsegment nur noch als schmaler, zentral gelegener Strich und in ejakulierten Spermatozoen in Form eines kleinen Punktes als Zeichen der Immunreaktion sichtbar (Abbildung 19E).

Neben der positiven Antigen-Antikörperreaktion im Kopfbereich konnte in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen eine Fluoreszenz im Mittelstück des Flagellums beobachtet werden. Diese war bei Spermatozoen des Caput epididymidis relativ schwach, nahm aber im Verlauf der Nebenhodenpassage zu und war bei ejakulierten Spermatozoen am deutlichsten ausgeprägt. Die als Negativkontrolle mit nicht relevantem Maus IgG behandelten Spermatozoenausstriche wiesen im Bereich der Spermatozoenköpfe keine Fluoreszenzmarkierung auf. Es trat eine schwache unspezifische Markierung des Schwanzmittelstückes auf.



**Abbildung 19:** Immunfluoreszenzoptischer Nachweis Tyrosin-phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoen aus Caput epididymidis (**A, B**), Corpus epididymidis (**C, D**), Cauda epididymidis (**E, F**) und frischem Ejakulat (**G, H**). Die Spermatozoen wurden mit 1% Paraformaldehyd fixiert, anschließend mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 (**A, C, E, G**) und Maus IgG (**B, D, F, H**) inkubiert. Beide Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit FITC markiertem anti-Maus IgG (1:32) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

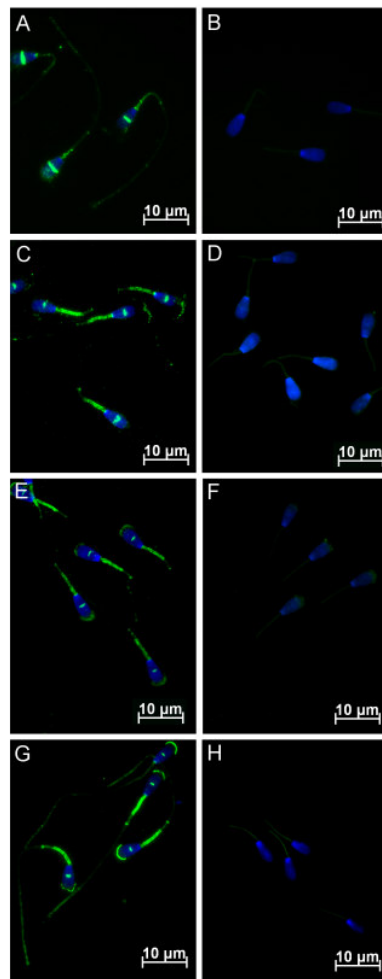
### Threoninphosphorylierung

Parallel zur Untersuchung phosphorylierter Tyrosinreste wurden immunzytologische Untersuchungen mit einem monoklonalen anti-Phosphothreonin Antikörper (10µg/ml, Zymed) durchgeführt. Als Kontrolle diente die Behandlung der Ausstriche mit nicht relevantem Maus IgG (10µg/ml, Sigma). Die mit dem anti-Phosphothreonin Antikörper behandelten Spermatozoenausstriche aus dem Caput epididymidis, dem Corpus epididymidis und der Cauda epididymidis sowie aus Ejakulat sind in Abbildung 20A, C, E, G und die dazugehörigen Kontrollen in Abbildung 20B, D, F, H dargestellt. Nach Inkubation der Spermatozoen mit dem anti-Phosphothreonin Antikörper konnte eine deutliche Immunfluoreszenzmarkierung im äquatorialen Segment nachgewiesen werden, die sich innerhalb der verschiedenen Nebenhodenabschnitte veränderte. Spermatozoen des Caput epididymidis (A) wiesen überwiegend eine intensiv fluoreszierende Markierung auf, die sich als breiter Streifen über die gesamte Fläche des äquatorialen Segmentes darstellte. Bei Spermatozoen des Corpus epididymidis (C) war die Markierung im Zentrum des äquatorialen Segmentes zu finden und stellte sich als sichelförmige Struktur dar. Bei Spermatozoen aus der Cauda epididymidis (E) und bei ejakulierten Spermatozoen (F) war ebenfalls das Zentrum des äquatorialen Segmentes markiert, allerdings war die Immunfluoreszenz nur noch auf einen dünnen Streifen beschränkt. Zusätzlich wiesen die Spermatozoen aus Cauda epididymidis und Ejakulat eine positive Antigen-Antikörperreaktion im Akrosom auf, wobei sich die Markierung auf einen dünnen fluoreszierenden Streifen am apikalen Rand des Akrosoms beschränkte. Die Farbinintensität war dabei in ejakulierten Spermatozoen deutlich stärker als in Spermatozoen aus der Cauda epididymidis.

Bei allen Spermatozoen trat neben den beschriebenen Reaktionen im Kopfbereich eine deutliche Fluoreszenzmarkierung im Bereich des Schwanzmittelstückes als Zeichen einer positiven Immunreaktion auf. Diese war bei Spermatozoen des Caput epididymidis sehr schwach ausgeprägt, nahm an Intensität bei Spermatozoen aus Corpus und Cauda epididymidis deutlich zu und wies die stärkste Fluoreszenz bei ejakulierten Spermatozoen auf. Weiterhin fiel bei ejakulierten Spermatozoen eine schwache positive Reaktion im Hauptstück auf.

Die als Negativkontrollen mit nicht relevantem Maus IgG behandelten Spermatozoenausstriche zeigten weder im Kopf- noch im Schwanzbereich der Spermatozoen eine Fluoreszenzmarkierung.





**Abbildung 20:** Immunfluoreszenzoptischer Nachweis Threonin-phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoen aus Caput epididymidis (**A, B**), Corpus epididymidis (**C, D**), Cauda epididymidis (**E, F**) und frischem Ejakulat (**G, H**). Die Spermatozoen wurden mit 1% Paraformaldehyd fixiert, anschließend mit dem anti-Phosphothreonin Antikörper (**A, C, E, G**) und Maus IgG (**B, D, F, H**) inkubiert. Beide Antikörper wurden in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit FITC markiertem anti-Maus IgG (1:32) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

Durch die immunzytochemischen Experimente (n=3) konnten im Bereich des Akrosoms, des äquatorialen Segmentes und im Mittelstück des Flagellums Spermatozoenproteine nachgewiesen werden, die sowohl phosphorylierte Tyrosin- als auch Threoninreste aufwiesen. Im Verlauf der Nebenhodenpassage bis zu ejakulierten Spermatozoen wurden unterschiedlich starke Antigen-Antikörperreaktionen nach Einsatz der anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin Antikörper beobachtet. In Spermatozoen des Caput und Corpus

epididymidis waren Tyrosin- und Threonin-phosphorylierte Proteine hauptsächlich im Spermatozoonkopf nachweisbar und weniger im Flagellum. Bei Spermatozoen des Cauda epididymidis und bei ejakulierten Spermatozoen verhielt es sich umgekehrt. Hier waren Tyrosin- und Threonin-phosphorylierte Proteine vor allem im Flagellum und weniger im Kopfbereich lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die Tyrosin- als auch die Threoninphosphorylierung boviner Spermatozoonproteine während der Spermatozoenreifung verändert.

#### **4.2.3 Affinitätschromatografische Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Spermatozoonproteine**

Nachdem mit immunbiochemischen und immunzytochemischen Untersuchungsmethoden erste Hinweise zur Phosphorylierung von VDAC Proteinen gefunden wurden, sollten Spermatozoonproteine, die phosphorylierte Tyrosin- und/oder Threoninreste aufwiesen, aus den Gesamtproteinextrakten mit Hilfe des PhosphoProtein Purification Kits der Firma Qiagen affinitätschromatografisch getrennt werden. Da das Kit laut Herstellerangaben für TX-100 Extrakte ungeeignet ist, wurde mit 2% LDAO Gesamtzellextrakten gearbeitet. Nach der affinitätschromatografischen Trennung wurden die Spermatozoonproteine des 2% LDAO Extrakts (400µl/Spur), die nicht phosphorylierten Proteine der „Flow-through“ Fraktion (400µl/Spur) und die Phosphoproteine der Eluate (400µl/Spur) in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

Um festzustellen, ob VDAC Proteine unter den phosphorylierten Proteinen waren, wurden die Membranen aufgrund des geringen Probenmaterials mit dem Antiserum  $P_{\text{common}}$  inkubiert, das sowohl VDAC2 als auch VDAC3 Proteine detektierte (Abbildung 21).

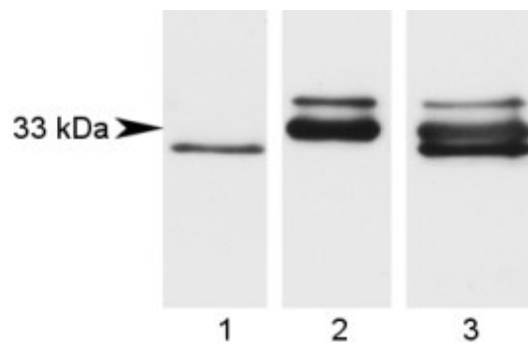
##### **4.2.3.1 Charakterisierung des anti-VDAC Antiserums $P_{\text{common}}$**

Bevor das Antiserum  $P_{\text{common}}$  für die Versuche eingesetzt wurde, wurden zu dessen Charakterisierung Immunoblots mit H/C gereinigten VDAC Proteinen aus ejakulierten Spermatozoen ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur) durchgeführt (n=3). Dabei wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten und auf Nitrozellulosemembranen transferierten Proteine jeweils mit den Antiseren P31, P45 und  $P_{\text{common}}$  inkubiert und die detektierten Bandenmuster verglichen (Abbildung 21).

Das für VDAC3 spezifische Antiserum P31 erkannte eine schmale, intensiv markierte Bande von etwa 32 kDa in Spur 1. Hierbei handelt es sich nach bisherigen Erkenntnissen um VDAC3 Protein.

Die zweite Spur zeigt die Immunreaktion des VDAC2 spezifischen Antiserums P45. Es konnten eine breite, gut fokussierte Bande bei ca. 33 kDa und eine etwas schmalere, ebenfalls gut fokussierte Bande bei 36 kDa nachgewiesen werden. Die 32 kDa Bande wurde nicht erkannt. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse handelt es sich bei den detektierten Proteinbanden höchst wahrscheinlich um VDAC2 Protein.

Nach Einsatz des Antiserums P<sub>common</sub> (Spur 3) traten immunreaktive Banden bei 32, 33 und 36 kDa auf. Alle drei Banden waren gut fokussiert und deutlich markiert, wobei die 36 kDa Bande im Vergleich zu den beiden anderen Banden relativ schmal war. Das Antiserum P<sub>common</sub> erkannte somit sowohl VDAC2 als auch VDAC3 Proteine.



**Abbildung 21:** Charakterisierung des Antiserums P<sub>common</sub> im Immunoblot mit H/C gereinigten Proteinen aus ejakulierten Spermatozoen. Die gereinigten H/C Extrakte ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur) wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Diese wurden einem Immunoblot mit **1:** AS P31 (1:100 verdünnt), **2:** AS P45 (1:500 verdünnt) und **3:** AS P<sub>common</sub> (1:500 verdünnt) inkubiert. Als „Zweitantikörper“ diente Peroxidase gekoppeltes Protein A (1:3000 verdünnt). Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen.

#### 4.2.3.2 Nachweis von phosphorylierten VDAC Proteinen nach affinitätschromatografischer Auftrennung

Der Nachweis von Phosphoproteinen erfolgte im Immunoblot (n=3) mit anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin Antikörpern. Um zu klären ob den phosphorylierten Proteinen auch VDAC zuzuordnen ist, wurden die identischen Proben (geteilte Nitrozellulosemembran mit identischer Probe) parallel mit dem AS P<sub>common</sub> inkubiert.

Die Untersuchungen mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 lieferte keinen Hinweis auf eine Phosphorylierung von VDAC Proteinen an der Aminosäure Tyrosin (nicht gezeigt). Daher wird im Folgenden nur auf die Threoninphosphorylierung eingegangen.

Das Ergebnis der chromatografischen Trennung in phosphorylierte und nicht phosphorylierte Proteine aus 2% LDAO Proteinextraktionen boviner Spermatozoen des Caput epididymidis, des Corpus epididymidis und der Cauda epididymidis sowie ejakulierter Spermatozoen demonstriert Abbildung 22 I - IV. Dargestellt sind jeweils als Ausgangsprobe die 2% LDAO Extrakte (A), die „Flow-through“ Fraktionen mit den nicht phosphorylierten Proteinen (B) und, exemplarisch für die Eluate 1-5, das dritte Eluat (C) mit phosphorylierten Proteinen. In den Spuren 1 sind die Ergebnisse nach Inkubation der Membranen mit dem anti-VDAC Antiserum P<sub>common</sub> dargestellt. Die Spuren Nr. 2 zeigen die Immunreaktion des anti-Phosphothreonin Antikörpers.

Die Immunreaktion des anti-Phosphothreonin Antikörpers fiel bei Caput- und Corpus-extrakten insgesamt schwächer aus als bei Spermatozoenextrakten des Cauda epididymidis und Extrakten ejakulierter Spermatozoen. Die durchschnittliche Expositionszeit zur Darstellung der Antikörperbindung an Phosphoproteine aus Caput- und Corpusextrakten lag bei 10min (Abbildung 22 I und II). Die Immunreaktion bei Cauda- und Ejakulatextrakten, vor allem nach Einsatz des anti-Phosphothreonin Antikörpers, war so stark, dass nach 10min die einzelnen Banden nur schwer voneinander abzugrenzen waren. Zur besseren Darstellung der Ergebnisse in Cauda- und Ejakulatextrakten wurden abweichende Expositionszeiten, für Caudaextrakt 5min und Ejakulatextrakt 1min, gewählt (Abbildung 22 III und IV). Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse näher beschrieben.

##### Caputextrakt

Das anti-VDAC Antiserum P<sub>common</sub> detektierte im 2% LDAO Caputextrakt (Ausgangsprobe) eine breite, sehr deutlich markierte Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse von ca. 32 kDa (Abbildung 22I, A1). Eine weitere, im Vergleich zum 32 kDa Protein, etwas schwächer ausgeprägte Bande, konnte bei etwa 33 kDa visualisiert werden. Des Weiteren wurden drei schmale Proteinbanden bei ca. 36, 40 und 45 kDa sichtbar, die aber wesentlich

schwächer markiert waren als die Proteine im 32 und 33 kDa Bereich. Bei den immunreaktiven, 32, 33 und 36 kDa großen Polypeptiden handelt es sich aufgrund der bisherigen Ergebnisse sehr wahrscheinlich um VDAC3 (32 kDa) bzw. um VDAC2 Proteine (33 und 36 kDa). In der „Flow-through“ Fraktion traten neben den bereits beschriebenen Proteinbanden weitere schwache Reaktionen zwischen 50 und 75 kDa auf (Abbildung 22I, B1). Die Intensität der Markierung aller Banden nahm gegenüber der Ausgangsprobe zu. Besonders deutlich zeichneten sich die Proteine im Bereich von 32 bis 36 kDa ab, die sich als breite, stark markierte Banden darstellten, wobei die Signale der 32 und 33 kDa Proteine miteinander verschmolzen.

Im Eluat (phosphorylierte Proteine) reagierte das AS P<sub>common</sub> ebenfalls deutlich mit Proteinen im Bereich von 32 und 33 kDa (Abbildung 22I, C1). Hier waren zwei breite Proteinbanden sichtbar, die fast ineinander übergingen. Die 36 kDa Bande des VDAC2 Proteins wurde als kaum sichtbare, schmale Proteinbande dargestellt. Weitere, schwach markierte Proteine traten im Molekularmassenbereich von 40 bis 75 kDa auf. Die Immunreaktivität im Eluat war gegenüber der „Flow-through“ Fraktion (I, B1) schwächer. Verglichen mit der Ausgangsprobe (I, A1) nahm die Intensität der Markierung der 32 und 33 kDa Bande etwas zu, in den relativen Molekularmassen 36, 40 und 45 kDa dagegen eher ab.

Nach Einsatz des anti-Phosphothreonin Antikörpers waren im 2% LDAO Caputextrakt zwei gut fokussierte, deutlich markierte Banden im Bereich von etwa 50 und 75 kDa festzustellen (Abbildung 22I, A2). Im Molekularmassenbereich zwischen 32 und 36 kDa, der den VDAC Proteinen entspricht, fand keine Immunreaktion statt.

In der „Flow-through“ Fraktion nahm die Intensität der Markierung der 50 und 75 kDa Banden gegenüber der Ausgangsprobe zu. Weitere Banden, die nur schwach markiert und schlecht fokussiert erschienen, waren im Bereich von 75 bis 100 kDa sichtbar. Auch im mittleren Molekularmassenbereich von 30 bis 45 kDa zeichneten sich diverse, schwach markierte, schmale Proteinbanden ab. Im unteren Molekularmassenbereich von 15 bis 30 kDa waren drei schwache, gut fokussierte Banden sichtbar.

Im Eluat war die Immunreaktion im Bereich von ca. 50 und 75 kDa gegenüber der Ausgangsprobe und der „Flow-through“ Fraktion wesentlich stärker, die Banden erschienen aber weniger fokussiert. Mehrere gut abgegrenzte Proteinbanden mit unterschiedlicher Intensität waren im Bereich von 40 bis 25 kDa sichtbar. Einige schwach markierte, schmale Banden waren zwischen 25 und 10 kDa festzustellen.

### Corpusextrakt

Das anti-VDAC Antiserum P<sub>common</sub> erkannte im 2% LDAO Corpusextrakt zwei immunreaktive Banden im Bereich von 32 und 33 kDa (Abbildung 22II A). Die Intensität der Reaktion war so stark, dass die Banden nicht mehr voneinander getrennt darstellbar waren. Zwei weitere, schmale, schwach markierte Banden waren bei ca. 36 und 45 kDa festzustellen. Im oberen Molekularmassenbereich zeigte sich eine gut fokussierte, deutlich positive Bande bei etwa 75 kDa (Abbildung 22II, A1).

Sowohl das 32 kDa als auch das 33 kDa Protein waren auch in der „Flow-through“ Fraktion nachweisbar (Abbildung 22II, B1). Im Bereich von 32 kDa handelte es sich um eine breite deutlich markierte Bande, dagegen war eine schwach markierte, schmale Bande bei etwa 33 kDa erkennbar. Die Immunreaktivität beider Banden war im Gegensatz zur Ausgangsprobe deutlich schwächer ausgeprägt.

Auch im Eluat wurden die 32 und 33 kDa Proteine erkannt (Abbildung 22II, C1). Das Bandenmuster war vergleichbar mit dem der „Flow-through“ Fraktion, allerdings war die Intensität der Immunreaktion etwas stärker.

Nach Einsatz des anti-Phosphothreonin Antikörpers zeigten sich im 2% LDAO Extrakt fünf stark markierte, schlecht fokussierte, breite Banden im Bereich von 25, 30, 32, 33 und 45 kDa (Abbildung 22II, A2). Weitere, scharf fokussierte und deutlich markierte Proteinbanden waren bei etwa 34, 37, 40, 48, 60 und 62 kDa zu erkennen. Im Molekularmassenbereich von 75 kDa traten zwei schlecht abgegrenzte Banden, bei ca. 100 kDa zwei schmale Banden auf.

In der „Flow-through“ Fraktion waren Proteinbanden bei 25, 30, 32 und 45 kDa sichtbar (Abbildung 22II, B2). Im Gegensatz zum 2% LDAO Corpusextrakt (Ausgangsprobe) nahm die Intensität der Markierung ab, wodurch die Banden besser fokussiert erschienen. Eine weitere, schmale und sehr schwach markierte Bande trat bei etwa 40 kDa auf. Alle übrigen Proteinbanden, die in der Ausgangsprobe durch den anti-Phosphothreonin Antikörper detektiert wurden, waren in der „Flow-through“ Fraktion nicht nachweisbar.

Im Eluat erkannte der Antikörper zwei scharf fokussierte, schwach markierte Banden bei ca. 45 und 60 kDa (Abbildung 22II, C2). Zwei weitere, in der Abbildung kaum sichtbare schmale Banden zeigten sich bei etwa 32 kDa. Verglichen mit der Ausgangsprobe und der „Flow-through“ Fraktion, fiel die Immunreaktion bei dieser Probe am geringsten aus. Erst nach einer Expositionszeit von 30min (nicht gezeigt) stellte sich bei 45 und 60 kDa eine scharf begrenzte, deutlich markierte Bande dar. Auch die beiden Proteinbanden im 32 kDa Bereich waren gut fokussiert und gut sichtbar. Nach 30 minütiger Expositionszeit traten diverse, schmale, schwach markierte Banden im Molekularmassenbereich von 48, 75 und 100 kDa auf.

### Caudaextrakt

Nach Einsatz des anti-VDAC Antiserums P<sub>common</sub> traten im 2% LDAO Spermatozoenextrakt aus der Cauda epididymidis zwei breite, deutlich markierte Proteinbanden bei etwa 32 und 33 kDa auf, wobei die Immunreaktion des Antikörpers mit dem 32 kDa Protein etwas stärker erschien als mit dem 33 kDa Protein (Abbildung 22III, A1). Eine wesentlich schwächere Reaktion war im Bereich von 36 bis 45 kDa zu beobachten. Hier traten diverse, schmale, schwach markierte Banden auf.

In der „Flow-through“ Fraktion zeigten sich immunreaktive Banden erneut bei ca. 32 und 33 kDa. Beide Banden waren gut fokussiert und deutlich markiert (Abbildung 22III, B1). Die Proteinbande bei 33 kDa war auch hier schwächer markiert als die 32 kDa Bande. Verglichen mit der Ausgangsprobe, war die Intensität der Markierung der Proteine geringer. Eine weitere, schmale, schwach markierte Bande zeichnete sich bei ca. 45 kDa ab.

Im Eluat wurden durch das AS P<sub>common</sub> ebenfalls zwei breite, deutlich markierte Proteinbanden im Molekularmassenbereich von etwa 32 und 33 kDa detektiert (Abbildung 22III, C1). Auch hier war die Intensität des Signals bei der 32 kDa stärker als bei der 33 kDa. Weitere Proteinbanden, die in der Ausgangsprobe und in der „Flow-through“ Fraktion auftraten (siehe oben), waren nicht festzustellen.

Im 2% LDAO Extrakt wurden durch anti-Phosphothreonin Antikörper zwei stark markierte, scharf begrenzte Banden bei etwa 10 und 25 kDa sichtbar (Abbildung 22III, A2). Eine sehr gut fokussierte und stark markierte Bande war zwischen 32 und 33 kDa festzustellen. Weitere schmale, gut fokussierte aber nur schwach markierte Banden zeigten sich bei etwa 20, 32, 37, 40, 45 und 46 kDa sowie im Bereich von 50 bis 75 kDa.

In der „Flow-through“ Fraktion war keine Immunreaktion des Antikörpers mit phosphorylierten Proteinen festzustellen (Abbildung 22III, B2).

Im Eluat zeichneten sich zwei breite, stark markierte Banden zwischen 32 und 33 kDa ab (Abbildung 22III, C2). Weitere, intensiv markierte Banden waren bei 10 und 50 kDa erkennbar. Etwas schwächer markierte, schmale Proteinbanden konnten im mittleren Molekularmassenbereich von 33 bis 50 kDa und im oberen Molekularmassenbereich von 50 bis 100 kDa visualisiert werden. Im Vergleich zum Bandenmuster des Ausgangsmaterials, dem 2% LDAO Caudaextrakt (Abbildung 22III, A2), waren die Banden im Eluat deutlich intensiver markiert.

### Ejakulatextrakt

Das anti-VDAC Antiserum detektierte im 2% LDAO Ejakulatextrakt deutlich zwei breite, immunreaktive Banden bei 32 und 33 kDa. Zwei weitere, schmale Banden, die relativ schwach ausgeprägt waren, zeichneten sich bei etwa 36 und 45 kDa ab (Abbildung 22IV, A1).

Auch in der „Flow-through“ Fraktion waren die 32 und die 33 kDa Banden sichtbar (Abbildung 22IV, B1), allerdings war die Markierung hier deutlich schwächer als in der Ausgangsprobe.

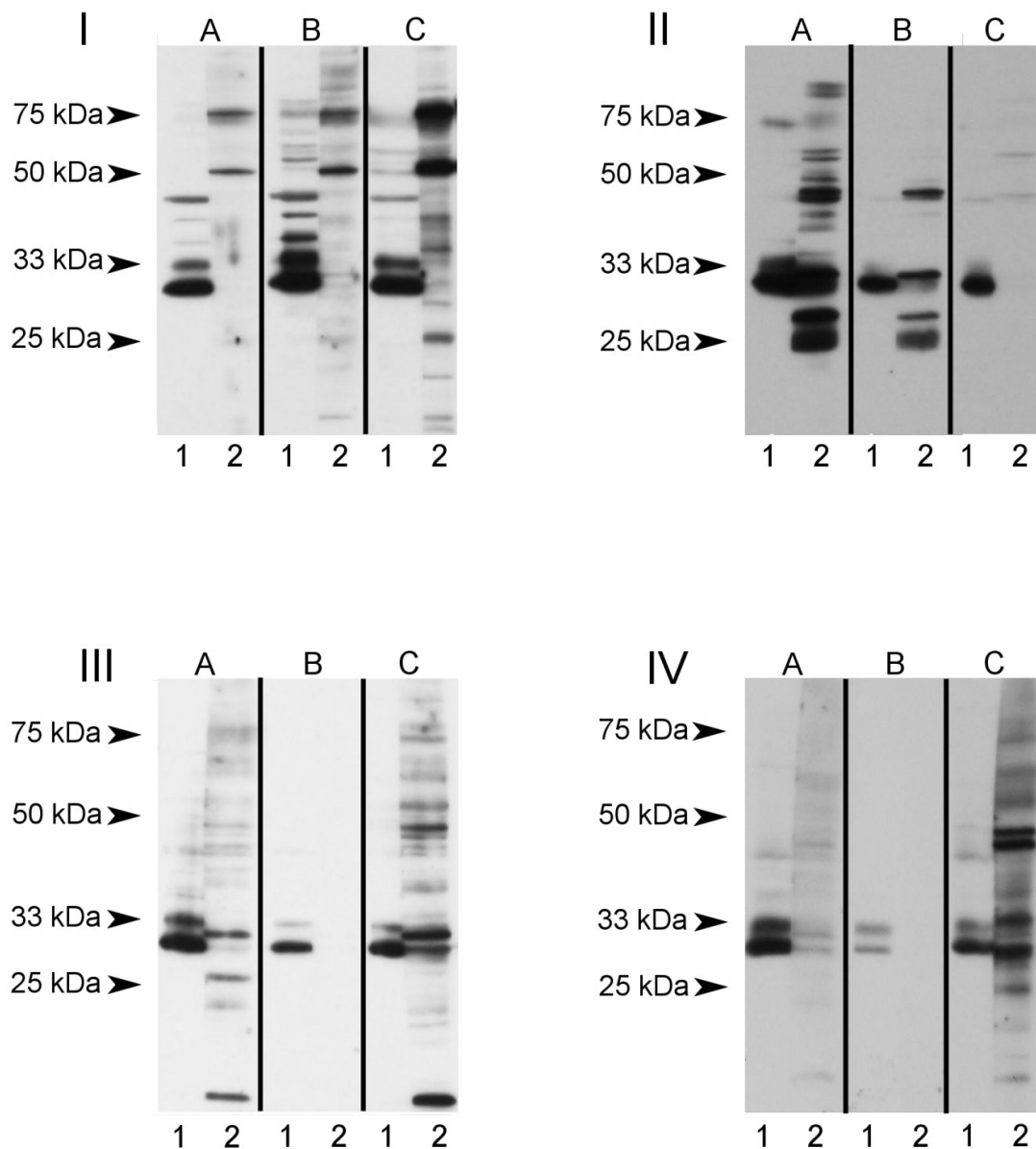
Im Eluat traten erneut deutlich die 32 und 33 kDa Banden auf (Abbildung 22IV, C1). Dabei nahm die Intensität der Markierung der 32 und 33 kDa Proteine gegenüber der „Flow-through“ Fraktion deutlich zu, gegenüber der Ausgangsprobe aber leicht ab. Bei etwa 45 und 50 kDa wurden zwei schmale, schwach markierte Banden sichtbar.

Nach Einsatz des anti-Phosphothreonin Antikörpers waren im 2% LDAO Extrakt diverse phosphorylierte Proteine im Bereich zwischen 32 und 60 kDa zu erkennen (Abbildung 22IV, A2). Besonders deutlich traten zwei Proteinbanden zwischen 32 und 33 kDa und eine weitere Bande bei 48 kDa hervor. Sie waren in diesem Bereich gut fokussiert und etwas stärker markiert als die übrigen Banden, die schwer abzugrenzen waren und nur sehr schwach dargestellt wurden. Zwei weitere, schmale, ebenfalls sehr schwach markierte Proteinbanden waren im unteren Molekularmassenbereich zwischen 15 und 25 kDa zu erkennen.

In der „Flow-through“ Fraktion konnten keine Threonin-phosphorylierten Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 22IV, B2).

Im Eluat wurden mit dem anti-Phosphothreonin Antikörper zwei breite, gut fokussierte und stark markierte Banden zwischen 32 und 34 kDa und zwei weitere bei 48 und 49 kDa detektiert (Abbildung 22IV, C2). Im unteren Molekularmassenbereich von 15 bis 25 kDa zeichneten sich weitere, schwach markierte, schmale Proteinbanden ab. Auch im mittleren Molekularmassenbereich waren diverse, schmale, schwach markierte Banden zwischen 32 und 33 kDa und von 37 bis 45 kDa nachzuweisen. Drei nicht sehr scharf fokussierte, schmale Banden traten zwischen 50 und 75 kDa auf. Insgesamt waren alle Banden, die der anti-Phosphothreonin Antikörper im Eluat (Abbildung 22IV, C2) detektierte, deutlich intensiver markiert als die des 2% LDAO Extrakts (Abbildung 22IV, A2).





**Abbildung 22:** Immunoblot mit angereicherten Phosphoproteinen boviner Spermatozoen aus Caput epididymidis (I) Corpus epididymidis (II), Cauda epididymidis (III) und Ejakulat (IV). Die 2% LDAO Extrakte wurden affinitätschromatografisch in phosphorylierte und unphosphorylierte Proteine getrennt, anschließend in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden einem Immunoblot mit dem anti-VDAC Antiserum  $P_{\text{common}}$  (Spur 1, 1:500) und einem monoklonalen anti-Phosphothreonin Antikörper (Spur 2, 1:500) unterzogen. Als „Zweitantikörper“ dienten Peroxidase gekoppeltes Protein A (1:3000, Spur 1) sowie Anti-Maus IgG (1:3000, Spur 2). **A:** 2% LDAO Extrakt (Ausgangsmaterial), **B:** „Flow-through“-Fraktion (unphosphorylierte Proteine), **C:** Eluat (phosphorylierte Proteine). Die Expositionszeiten lagen für Caput und Corpus bei 15min, für Cauda bei 5min und für Ejakulat bei 1min.

Eine vollständige affinitätschromatografische Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Spermatozoenproteine mit dem „PhosphoProtein Purification Kit“ gelang nur für die Spermatozoenextrakte aus Cauda epididymidis und frischem Ejakulat. Mithilfe des anti-Phosphothreonin Antikörpers konnten diverse phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden. Besonders deutlich war die Immunreaktion sowohl im Cauda- als auch im Ejakulat-extrakt im Bereich von 32 bis 36 kDa sowie im Bereich von 48 bis 50 kDa. Nach Einsatz des anti-VDAC Antiserums P<sub>common</sub> zeigten sich zwei stark immunreaktive Banden, ebenfalls im Molekularmassenbereich von etwa 32 und 33 kDa. Aufgrund der Spezifität des Antikörpers und bisheriger Ergebnisse könnte es sich hierbei um VDAC Proteine handeln.

### **4.3 Nachweis von phosphorylierten VDAC Proteinen in H/C gereinigten bovinen Spermatozoenextrakten**

#### **4.3.1 Phosphoproteinspezifische Färbung der H/C gereinigten VDAC Proteine**

Nachdem die immunbiochemischen Untersuchungen der Gesamtproteinextrakte darauf hindeuteten, dass VDAC Proteine zumindest teilweise phosphoryliert sein könnten, wurden weitergehende Untersuchungen (n=3) mit H/C gereinigten 2% TX-100 Extrakten von Spermatozoen aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis sowie ejakulierten Spermatozoen durchgeführt.

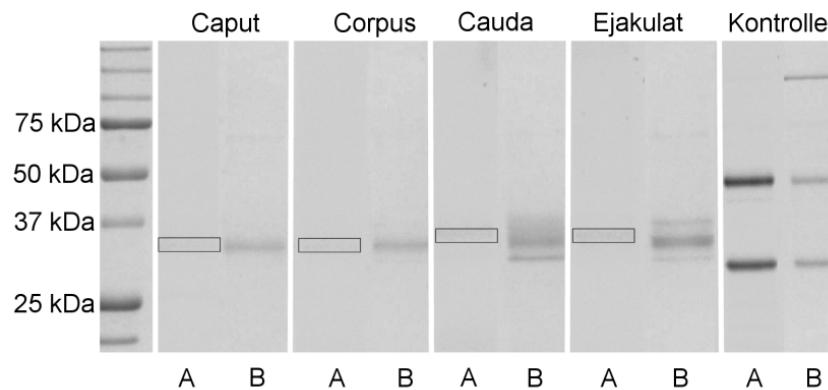
Mit jeweils 1ml der H/C gereinigten Extrakte ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur) erfolgte eine SDS-PAGE. Zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Darstellung phosphorylierter Proteine wurde ein „Peppermint Standard“ der Firma Molecular Probes in der SDS-PAGE mitgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel mit Pro-Q® Diamond (Molecular Probes), einem fluoreszierenden Farbstoff zur Detektion von Phosphothreonin-, -tyrosin- und -serinresten, gefärbt. Mit demselben Polyacrylamidgel wurde zur Anfärbung des Totalproteins anschließend eine Coomassie-Blau Färbung durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 23 exemplarisch dargestellt. Die phosphorylierten Proteinbanden der H/C gereinigten 2% TX-100 Proteinextrakte aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis sowie frischem Ejakulat nach Pro-Q® Diamond Färbung sind jeweils in Abbildung 23 Spur A dargestellt. Die mit Coomassie-Blau gefärbten identischen Proben demonstrieren Abbildung 23 jeweils Spur B.

Der Farbstoff Pro-Q® Diamond detektierte in allen vier Proben sehr schwach ein phosphoryliertes Protein mit einer apparenten Molekularmasse von etwa 33 kDa (Abbildung 23 Spur A, durch Kästchen markiert). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um zumindest teilweise phosphoryliertes VDAC2 Protein. Dabei schien die Menge an phosphoryliertem

Protein im Caudaextrakt und Ejakulateextrakt etwas höher zu sein als im Caput- und Corpusextrakt.

Nach der Coomassie-Blau Färbung konnte in allen Extrakten eine deutliche Proteinbande bei etwa 33 kDa dargestellt werden, bei der es sich aufgrund der bisherigen Erkenntnisse sehr wahrscheinlich um VDAC2 Protein handelt. Zusätzlich traten im Cauda- und Ejakulateextrakt zwei weitere Proteinbanden im Bereich von 36 und 32 kDa auf, bei denen es sich vermutlich um eine weitere VDAC2 Isoform (36 kDa) bzw. um VDAC3 (32 kDa) handelt.

Insgesamt variierte die extrahierte Proteinmenge aus den Spermatozoen der einzelnen Nebenhodenabschnitten und von ejakulierten Spermatozoen trotz gleicher Ausgangsmenge ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur). Aus den Proteinextrakten der Spermatozoen aus Cauda epididymidis und frischem Ejakulat wurde insgesamt mehr Protein gereinigt als aus Spermatozoenextrakten des Caput und Corpus epididymidis. Eine Aussage über die Art der Phosphorylierung (Threonin-, Tyrosin- oder Serinphosphorylierung) kann an dieser Stelle nicht erfolgen. Im Vergleich zu den Untersuchungsproben waren die Phosphoproteine des Kontrollstandards deutlich angefärbt, sodass von einer optimalen Funktion des Nachweissystems ausgegangen werden konnte.



**Abbildung 23:** Gelelektrophoretische Darstellung phosphorylierter Proteine H/C gereinigter 2% TX-100 Proteinextrakte boviner Spermatozoen aus dem Nebenhoden (Caput, Corpus, Cauda epididymidis) und ejakulierten Spermatozoen (Ejakulat). Das Gel wurde zur Detektion phosphorylierter Proteine zunächst mit Pro-Q® Diamond gefärbt (**A**). Zur Darstellung des Gesamtproteins wurde das gleiche Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt (**B**). Zur Kontrolle wurde ein „Peppermint Standard“ mitgeführt. Links dargestellt: Molekularmassen des mitgeführten Standards. Pro Spur wurde der gereinigte Extrakt von  $165 \times 10^6$  Spermatozoen aufgetragen.

### 4.3.2 Immunbiochemischer Nachweis von phosphorylierten VDAC Proteinen

Neben der zuvor beschriebenen Nachweismethode zur Detektion phosphorylierter VDAC Subtypen wurden die gereinigten H/C Extrakte aus  $165 \times 10^6$  Spermatozoen elektrophoretisch aufgetrennt ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/Spur), auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit anti-Phospho spezifischen Antikörpern inkubiert ( $n=3$ ). Die Membran wurde zunächst mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 inkubiert und die Immunreaktion mittels ECL nachgewiesen. Anschließend wurden gebundene Antikörper durch die „Stripping“ Methode, wie unter 3.2.7 beschrieben, entfernt und die Membran mit dem anti-Phosphothreonin Antikörper ein weiteres Mal inkubiert. Parallel dazu wurde zum Nachweis der VDAC Subtypen ein Immunoblot mit dem anti-VDAC Antiserum  $P_{\text{common}}$  durchgeführt.

Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Immunreaktion der eingesetzten Antikörper mit H/C gereinigten 2% TX-100 Extrakten von Spermatozoen aus Caput (1), Corpus (2), Cauda epididymidis (3) und ejakulierten Spermatozoen (4).

Das anti-VDAC Antiserum  $P_{\text{common}}$  erkannte in allen Extrakten eine gut fokussierte, deutlich markierte Bande bei etwa 33 kDa (Abbildung 24A). Eine weitere Proteinbande stellte sich im Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt bei ca. 32 kDa dar (Abbildung 24A, Spuren 2-4). Sie war im Corpus- und Ejakulatextrakt schmal und scharf fokussiert, im Caudaextrakt dagegen so breit dargestellt und stark markiert, dass sie von der über ihr liegenden 33 kDa Bande nicht mehr eindeutig zu trennen war. Eine weitere Immunreaktion durch das AS  $P_{\text{common}}$  konnte im Cauda- und im Ejakulatextrakt bei etwa 36 kDa nachgewiesen werden. Die Immunreaktivität zeigte sich dabei im Caudaextrakt in Form einer breiten, gut markierten Bande (Abbildung 24A, Spur 3). Im Ejakulatextrakt hingegen war die Immunreaktion in Form einer relativ schwach ausgeprägten, schmalen Bande erkennbar (Abbildung 24A, Spur 4).

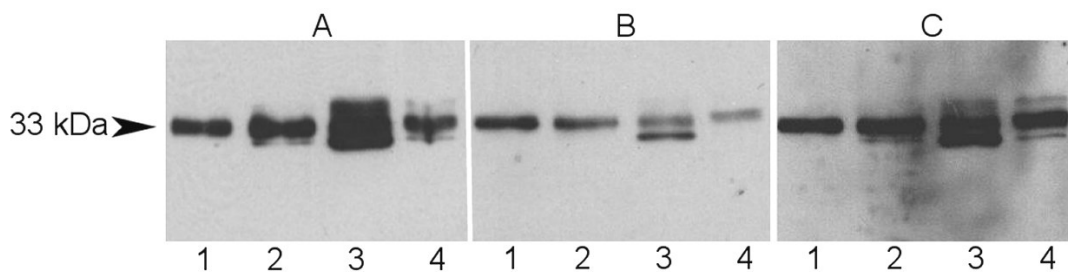
Der anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 detektierte in allen Extrakten eine scharf begrenzte immunreaktive Bande bei 33 kDa (Abbildung 24B, Spuren 1-4). Dabei nahm die Intensität der Immunreaktion während der Nebenhodenpassage bis zum Ejakulat hin leicht ab. Im Caudaextrakt trat eine weitere, gut fokussierte und deutlich markierte Bande bei 32 kDa auf.

Nach Einsatz des anti-Phosphothreonin Antikörpers war eine breite, stark markierte Bande bei 33 kDa in allen Extraktionen sichtbar (Abbildung 24C, Spuren 1-4). Weiterhin zeigte sich eine gut fokussierte Bande mit einer apparenten Molekularmasse von etwa 32 kDa im Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt. Die Intensität der Immunreaktion des Antikörpers mit dem Protein variierte in den einzelnen Abschnitten. Während die Proteinbande im Caudaextrakt sehr breit und deutlich markiert war, war sie im Corpus- und Ejakulatextrakt nur schmal und relativ schwach markiert.

Eine weitere schmale, schwach ausgeprägte Proteinbande wurde durch den anti-Phosphothreonin Antikörper im Cauda- und Ejakulatextrakt bei 36 kDa erkannt. Sie ließ sich

---

im Caudaextrakt nur schwer von den anderen Banden abgrenzen (Abbildung 24C, Spur 3). Im Gegensatz dazu war sie im Ejakulatextrakt scharf begrenzt (Abbildung 24C, Spur 4). Die Ponceaufärbung der Membranen (nicht gezeigt) wies darauf hin, dass sich, obwohl alle Extrakte aus gleichen Mengen Ausgangsmaterial ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen) gewonnen wurden, unterschiedliche Proteinmengen reinigen ließen. Während im Caput- und Corpusextrakt nur eine Bande bei 33 kDa auftrat, war neben der 33 kDa Proteinbande im Cauda- und Ejakulatextrakt auch eine Bande im 36 kDa Bereich sichtbar. Desweiteren stellte sich im Cauda- und Ejakulatextrakt eine Bande bei etwa 32 kDa dar, die im Caudaextrakt deutlich zu erkennen war, im Ejakulatextrakt hingegen nur sehr schwach darstellbar war.



**Abbildung 24:** Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen sowie phosphorylierten Tyrosin- und Threoninresten in H/C gereinigten 2% TX-100 Proteinextrakten boviner Spermatozoen aus **1:** Caput epididymidis, **2:** Corpus epididymidis, **3:** Cauda epididymidis und **4:** frischem Ejakulat. Die H/C gereinigten Proteinextrakte von jeweils  $165 \times 10^6$  Spermatozoen pro Spur wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Diese wurden mit dem anti-VDAC Antiserum  $P_{\text{common}}$  (**A**, 1.500 verdünnt), dem anti-Phosphotyrosin Antikörper Klon 4G10 (**B**, 1:1000 verdünnt) und dem anti-Phosphothreonin Antikörper (**C**, 1:500 verdünnt) inkubiert. Als „Zweitantikörper“ dienten Peroxidase gekoppeltes Protein A (**A**, 1:3000 verdünnt) sowie Anti-Maus IgG (**B und C**, 1:3000 verdünnt). Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch das Chemilumineszenzverfahren.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Untersuchung gereinigter VDAC Proteine auf eine Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyrosin und Threonin hin. Für VDAC2 konnte eine positive Immunreaktion mit monoklonalen anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin Antikörpern in Spermatozoenextrakten aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis sowie Ejakulat im Molekularmassenbereich von 33 kDa nachgewiesen werden. Eine weitere VDAC2 Isoform im Bereich von 36 kDa war an der Aminosäure Threonin im Cauda- und Ejakulatextrakt phosphoryliert. Für VDAC3 konnte eine Tyrosinphosphorylierung nur im

Caudaextrakt festgestellt werden. Dagegen war eine Threoninphosphorylierung von VDAC3 Protein in Spermatozoenextrakten aus Corpus epididymidis, Cauda epididymidis und Ejakulat nachweisbar. Zur Übersicht sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen nochmals in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3:** Immunbiochemischer Nachweis phosphorylierter VDAC Proteine in bovinen epididymalen und ejakulierten Spermatozoen

<b>H/C gereinigter 2%TX-100 Extrakt boviner Spermatozoen</b>	<b>Nachgewiesene VDAC Proteine</b>	<b>Tyrosin- phosphorylierung</b>	<b>Threonin- phosphorylierung</b>
Caput epididymidis	VDAC2 (33 kDa)	+	+
Corpus epididymidis	VDAC2 (33 kDa)	+	+
	VDAC3 (32 kDa)	-	+
Cauda epididymidis	VDAC2 (36 kDa)	-	+
	VDAC2 (33 kDa)	+	+
	VDAC3 (32 kDa)	-	+
Ejakulierte Spermatozoen	VDAC2 (36 kDa)	-	+
	VDAC2 (33 kDa)	+	+
	VDAC3 (32 kDa)	-	+

+ : nachgewiesene Phosphorylierung; - : keine Phosphorylierung nachgewiesen

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation und die Regulation der VDAC Proteinsubtypen in bovinen Spermatozoen im Verlauf der Nebenhodenpassage bis hin zu ejakulierten Spermatozoen näher zu untersuchen. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Untersuchung einer möglichen posttranslationalen Modifikation in Form einer Tyrosin- und/oder Threoninphosphorylierung der VDAC Isoformen.

### 5.1 Nachweis und Lokalisation der VDAC Subtypen in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen

Zunächst wurde eine Proteinextraktion der epididymalen und ejakulierten Spermatozoen mit den Detergenzien Triton X-100 (2%) und LDAO (2%) durchgeführt und die Gesamtzellextrakte über Hydroxyapatit/Celite (H/C) Säulen gereinigt. Eine Proteinbestimmung konnte nur für den LDAO Extrakt erfolgreich durchgeführt werden. Obwohl das gewählte Protokoll laut Hersteller (Calbiochem) für Triton Konzentrationen bis 3% geeignet sein sollte, gelang eine verwertbare Proteinbestimmung der 2% TX-100 Extrakte nicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Konzentration von 2% Triton zu hoch für eine exakte Proteinbestimmung war. Die gemessene Proteinkonzentration in den Proteinextrakten lag stets unter der der Kontrollprobe (reiner Extraktionspuffer). Auch andere Methoden zur Proteinbestimmung blieben erfolglos, sodass als Vergleichsmass in diesem Fall die Spermatozoenzahl heran gezogen wurde.

Die Proteinextrakte (gleiche Proteinmenge für 2% LDAO Extrakte bzw. Spermatozoenzahl für 2% Triton X-100 Extrakte) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit dem Farbstoff Coomassie-Blau gefärbt oder auf Nitrozellulosemembranen transferiert und diese im Immunoblot eingesetzt.

Nach Coomassie-Blau Färbung zeigte sich sowohl bei den 2% TX-100 als auch bei den 2% LDAO Gesamtproteinextrakten ein Proteinbandenmuster, welches sich im Verlauf der Nebenhodenpassage bis hin zu ejakulierten Spermatozoen veränderte. Besonders auffällig waren die Veränderungen in den 2% TX-100 Extrakten. Während bei den Gesamtextrakten der Spermatozoen aus Caput und Corpus epididymidis (Caputextrakt, Corpusextrakt) sehr viele, intensiv gefärbte Banden im Molekularmassenbereich von 40 und 120 kDa auftraten, waren in den Gesamtextrakten der Spermatozoen aus Cauda epididymidis und Ejakulat (Caudaextrakt, Ejakulatextrakt) einige prominente Proteinbanden vor allem im Bereich von 25 bis 37 kDa nachweisbar, die in den Caput- und Corpusextrakten fehlten. Sehr wahrscheinlich sind diese Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der Spermato-

zoen auf die Spermatozoenreifung zurückzuführen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, verändert sich während der Reifung im Nebenhoden die Zusammensetzung der Plasmamembran, indem neue Oberflächenantigene hinzukommen und andere, bereits bestehende Proteine modifiziert werden (Eddy und O'Brien, 1994). Durch proteolytische Spaltung von Proteinen im Verlauf der Nebenhodenpassage kommt es ebenfalls zu Veränderungen im Proteinmuster. Rutllant und Meyers (2001) untersuchten das Protein PH-20 im Verlauf der Nebenhodenreifung beim Hengst. Sie konnten im Western Blot ebenfalls Unterschiede im Bandenmuster zwischen Spermatozoenextrakten aus Caput und Cauda epididymidis feststellen. Bei dem Protein PH20 beobachteten sie eine Reduzierung der Molekularmasse im Verlauf der Nebenhodenpassage, welche sie durch proteolytische Spaltung während der Reifung im Nebenhoden erklärten (Rutllant und Meyers, 2001). Diese Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass eine proteolytische Spaltung der Proteine während der Spermatozoenreifung dafür verantwortlich sein kann, dass in den Caput- und Corpus-extrakten die Proteinbandenzahl im oberen Molekularmassenbereich und im Cauda- und Ejakulatextrakt hingegen im unteren Molekularmassenbereich überwog.

Eine weitere Ursache für die Veränderung im Proteinmuster könnte die Ausbildung von Disulfidbrücken sein. Während der Spermatozoenreifung werden Mantelfaserproteine und Proteine der fibrösen Hülle durch Disulfidbrücken stabilisiert (Eddy und O'Brien, 1994; Henkel *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2005). Dies führt dazu, dass die Proteine gegenüber Ultraschallbehandlungen, Detergenzien und Trypsin resistenter sind und sich schlechter oder nicht lösen lassen (Shabanowitz und Killian, 1987). Es wäre denkbar, dass durch die Ausbildung der Disulfidbrücken, einige Proteine widerstandsfähiger gegenüber TX-100 und LDAO wurden und die verwendete DTT Konzentration bei der Proteinextraktion nicht ausreichend war, um alle Disulfidbrücken zu spalten.

Die auf Nitrozellulosemembranen transferierten 2% TX-100 und 2% LDAO Extrakte wurden im Immunoblot mit anti-VDAC3 und anti-VDAC2 Antiseren inkubiert, um die VDAC Isoformen während der Spermatozoenreifung immunbiochemisch zu identifizieren. In vorangegangenen Studien wurde die Spezifität der verwendeten anti-VDAC Antiseren überprüft, wobei das Antiserum (AS) P45 nur mit rekombinantem VDAC2 bei einer apparenten Molekularmasse von etwa 33 kDa reagierte. Das AS P31 detektierte ausschließlich die VDAC3 Isoform mit einer apparenten Molekularmasse von ca. 32 kDa (Hinsch *et al.*, 2004). In den hier durchgeführten Experimenten erkannte das AS P31 (spezifisch für VDAC3) sowohl im 2% TX-100 als auch in 2% LDAO Caput-, Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakten deutlich eine Bande in Höhe von etwa 32 kDa. Das AS P45 (spezifisch für VDAC2) detektierte Proteinbanden bei ca. 33 und 36 kDa. Aufgrund der Molekularmassen könnte es sich dabei um VDAC3 und VDAC2 Proteine handeln. Zusätzlich konnte nach Einsatz von AS P45 in 2% TX-100



Extrakten des Nebenhodens und 2% LDAO Extrakten eine spezifische Immunreaktion im Bereich von ca. 60 kDa beobachtet werden. Hierbei könnte es sich um ein VDAC2 Dimer handeln. Kürzlich publizierte Untersuchungen berichten über die Existenz von VDAC als Dimer, Trimer oder Tetramer und unterstützen so diese Vermutung (Zalk *et al.*, 2005).

In den eigenen Experimenten stellte sich heraus, dass in den 2% TX-100 Extrakten die Intensität der Immunreaktion während der Nebenhodenpassage für VDAC3 und VDAC2 Proteine deutlich zunahm. In den 2% LDAO Extrakten hingegen war die Reaktion der Antiseren mit VDAC3 und der unteren VDAC2 Proteinbande im Bereich von 33 kDa nahezu gleich stark. Lediglich bei der oberen VDAC2 Bande (36 kDa) war, wie bei den TX-100 Extrakten, auch in den LDAO Extrakten eine deutliche Zunahme der Immunreaktion im Verlauf der Spermatozoenreifung zu beobachten. Eine Zunahme der Immunreaktion bei den TX-100 Extrakten im Verlaufe der Spermatozoenreifung aufgrund unterschiedlicher pro Spur aufgetragener Proteinmengen, kann ausgeschlossen werden. Die Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembranen nach Elektrotransfer zeigte, dass die extrahierte Proteinmenge trotz gleicher Zellzahlen im Ausgangsmaterial, im Ejakulatextrakt geringer als in Spermatozoenextrakten der Nebenhodenabschnitte war. Dennoch war die Immunreaktion der anti-VDAC2 und anti-VDAC3 Antiseren im Ejakulatextrakt deutlich stärker als in den Caput- und Corpusextrakten. Dies deutet darauf hin, dass sich aus Spermatozoen des Caput und Corpus epididymidis scheinbar weniger VDAC3 und VDAC2 Proteine extrahieren ließen als aus Spermatozoen der Cauda epididymidis und frisch ejakulierten Spermatozoen. Wahrscheinlich ist eine unterschiedliche Löslichkeit der VDAC Proteine in 2% TX-100 bzw. 2% LDAO Ursache dafür, dass die Immunreaktion der VDAC3 und VDAC2 Proteinbanden der TX-100 Extrakte von denen der LDAO Extrakte differierte. De Pinto *et al.* (1989) untersuchten die Löslichkeit von VDAC in verschiedenen Detergenzien. Dazu wurden Mitochondrienmembranen aus Rinderherzen isoliert und diese in verschiedenen Detergenzien, unter anderem auch in LDAO und TX-100 inkubiert. Gelöstes und nicht gelöstes Material wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit TX-100 bis zu 65% VDAC Protein gelöst werden konnte und in LDAO VDAC Protein komplett gelöst war (De Pinto *et al.*, 1989). Die Löslichkeit von VDAC in Triton X-100 scheint während der Nebenhodenpassage zuzunehmen, denn mit zunehmender Reife der Spermatozoen wurde mehr VDAC3 und VDAC2 Protein aus den Spermatozoen extrahiert. Im Falle der 36 kDa Bande (VDAC2), bei der die Immunreaktion mit dem AS P45 während der Spermatozoenreifung sowohl in den TX-100 als auch in den LDAO Extrakten deutlich zunahm, ist anzunehmen, dass das Protein im Verlauf der Nebenhodenpassage modifiziert wird. Die Ergebnisse des Immunoblots der 2% LDAO Extrakte zeigten deutlich, dass sich die 36 kDa Bande des VDAC2 Proteins im Verlauf der Nebenhodenpassage verändert. Im Gegensatz dazu blieb die Immunreaktion des AS P45 im Bereich von 33 kDa und des AS P31 im Bereich von 32 kDa nahezu unverändert.

Um die in den Gesamtspermatozoenextrakten enthaltenen VDAC Subtypen näher zu charakterisieren, erfolgte eine Aufreinigung der VDAC Proteine aus 2% TX-100 und 2% LDAO Gesamtzellextrakten über H/C Säulen. Die gereinigten Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Nach der Färbung waren in den 2% TX-100 Extrakten drei Banden im Bereich zwischen 32 und 36 kDa sichtbar, bei denen es sich wahrscheinlich um VDAC Proteine handelte. Das Coomassie-Blau gefärbte Gel der gereinigten LDAO Extrakte wies neben den vermuteten VDAC Proteinen zwischen 32 und 36 kDa fünf weitere Proteine im Molekularmassenbereich von etwa 20, 40, 60, 70 und 100 kDa auf, deren Identität ungeklärt blieb. Zur Identifizierung der Proteine zwischen 32 und 36 kDa wurden als weiterführende Untersuchungen Immunoblots mit anti-VDAC Antisera und massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Da die gereinigten 2% LDAO Proteinextrakte einen deutlich höheren Anteil an isolierten unspezifischen Proteinen aufwiesen, wurden für die weiterführenden Untersuchungen die H/C gereinigten 2% TX-100 Extrakte ausgewählt.

Der immunbiochemische Nachweis von VDAC2 erfolgte durch das AS P45 und von VDAC3 durch das AS P31. Das AS P31 detektierte in den 2% TX-100 Extrakten aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis (Caput-, Corpus-, Caudaextrakt) sowie Ejakulat eine Proteinbande bei etwa 32 kDa. Das AS P45 reagierte in allen Extrakten mit zwei Proteinen im Bereich von 33 und 36 kDa.

Zur Verifizierung der immunbiochemischen Ergebnisse wurden die gereinigten H/C Extrakte mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Dabei wurde die 36 kDa Bande in Caput-, Corpus und Caudaextrakt als VDAC2 Protein, die 33 kDa Bande in allen Extrakten ebenfalls als VDAC2 Protein und die 32 kDa Bande in Caput- und Caudaextrakten als VDAC3 Protein identifiziert. Aufgrund einer zu geringen Proteinmenge war bei der 32 kDa Bande des Corpusextrakts und bei den 36 und 32 kDa Banden des Ejakulatextrakts eine Identifizierung nicht möglich. Durch die MALDI-TOF-MS konnten die Ergebnisse der immunbiochemischen Experimente weitgehend bestätigt werden.

Aufgrund der bisherigen Resultate ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den gereinigten Proteinen um VDAC3 bzw. VDAC2 handelt. Bisher konnte VDAC aus mitochondrialen Membranen verschiedener Organe wie Leber, Herz, Niere, Gehirn (De Pinto *et al.*, 1987; Gincel *et al.*, 2001), Skelettmuskel (Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996) und Retina (Gincel *et al.*, 2002) sowie aus Schaf- und Rattenhirn isolierten Synaptosomen (Gincel *et al.*, 2000) gereinigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, war in den genannten Studien immer nur eine Bande bei etwa 35 kDa nach der H/C Reinigung in Coomassie-Blau gefärbten Gelen sichtbar. Eine Charakterisierung dieser Bande hinsichtlich des VDAC Subtyps fand in einigen dieser Studien durch immunbiochemische Untersuchungen (Immunoblot) statt. Verwendet wurde hierfür ein monoklonaler anti-VDAC1

Antikörper (31HL, Firma Calbiochem), der gegen den N-Terminus des humanen Porin 31HL gerichtet ist (Gincel *et al.*, 2000; Gincel *et al.*, 2001). Aufgrund der positiven Immunreaktion des Antikörpers gehen die Autoren davon aus, dass es sich bei dem gereinigten Protein um VDAC1 handelt. Die VDAC2 und VDAC3 Isoformen konnten bisher nicht aus Geweben isoliert werden (De Pinto und Messina, 2004). Somit ist es mit dieser Arbeit erstmals gelungen, VDAC2 und VDAC3 aus Zellen bzw. Gewebe, im Speziellen aus bovinen Spermatozoen zu isolieren.

Erste Experimente zum Vorhandensein der Isoform VDAC1 in bovinen Spermatozoen wurden durchgeführt. Zurzeit liegen aber noch keine endgültigen Resultate vor, sodass diese Untersuchungen nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

Als weitere Methode zum Nachweis und zur Lokalisation der VDAC Proteine kam die indirekte Immunfluoreszenz (Immunzytochemie) zum Einsatz. Mit dieser Methode konnten die VDAC Subtypen 2 und 3 in unterschiedlichen Spermatozonenkompartimenten nachgewiesen werden: Durch das anti-VDAC3 Antiserum kam es in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen zu einer spezifischen Markierung des gesamten Flagellums mit deutlicher Betonung des Hauptstücks. Eine positive Immunreaktion im akrosomalen Bereich des Kopfes trat bei Spermatozoen des Caput epididymidis auf, konnte jedoch bei Spermatozoen der übrigen Nebenhodenabschnitte und ejakulierten Spermatozoen nicht festgestellt werden. Nach Inkubation der Spermatozoen mit dem anti-VDAC2 Antiserum P45 war eine deutliche Fluoreszenz im Bereich des Mittelstückes sichtbar, in dem sich die Mitochondrien befinden. Außerdem wurde bei Spermatozoen der Cauda epididymidis und bei ejakulierten Spermatozoen durch das AS P45 das Hauptstück und zusätzlich bei ejakulierten Spermatozoen der Bereich des äquatorialen Segments markiert. Eine mögliche Erklärung für die zusätzlich auftretende Immunreaktion im Bereich des Hauptstücks und des Kopfes wäre eine Permeabilitätserhöhung der Plasmamembran im Zuge der Spermatozonenreifung. Dadurch könnte das Antigen für den entsprechenden Antikörper in reifen Spermatozoen (Cauda epididymidis und Ejakulat) besser zugänglich sein als in unreifen Spermatozoen (Caput und Corpus epididymidis). Es wäre aber auch denkbar, dass es im Verlauf der Nebenhodenpassage zu einer Demaskierung der VDAC Epitope kommt, so dass die Antikörper mit zunehmender Spermatozonenreifung besser an ihr Antigen binden können und die Immunreaktion entsprechend stärker ausfällt. Welche subzellulären Strukturen des Kopfes und des Flagellums genau markiert wurden, war lichtmikroskopisch nicht zu klären. VDAC2 und VDAC3 wurden bereits in den Mantelfasern (outer dense fibers, ODF) boviner Spermatozoen nachgewiesen (Hinsch *et al.*, 2004). Da die ODF sowohl im Mittelstück als auch im Hauptstück lokalisiert sind, liegt die Vermutung nahe, dass durch die Antikörper VDAC in den ODF dargestellt wurde. Aufgrund der intensiven Markierung des Mittelstücks,

vor allem nach Einsatz des anti-VDAC2 Antiserums, ist das Vorkommen von VDAC2 in den Mitochondrien nicht auszuschließen. Die deutliche Reaktion des anti-VDAC3 Antiserums im Hauptstück der Spermatozoen könnte auch als Hinweis auf eine Lokalisation von VDAC3 im Bereich der fibrösen Hülle, die die Mikrotubuli und die ODF im Bereich des Hauptstücks umgibt, gedeutet werden.

Über die Funktion von VDAC2 und VDAC3 in Spermatozoen kann bisher nur spekuliert werden. ODF sind subzelluläre Strukturen in Säugetierspermatozoen, die Keratine enthalten und hauptsächlich aus zytoskelettären Proteinen bestehen (Hinsch *et al.*, 2003). Aus der Literatur ist bekannt, dass VDAC mit zytoskelettären Proteinen interagiert. In der Studie von Schwarzer *et al.* (2002), konnte eine Wechselwirkung von VDAC mit der leichten Dynein-Kette Tctex-1 gezeigt werden. Als Bestandteil des Dynein Motorkomplexes ist Tctex-1 am Transport von membranösen Zellorganellen und Proteinkomplexen entlang der Mikrotubuli beteiligt (Lane und Allan, 1998). Tctex-1 Proteine konnten auch im Axonem von Mauspermatozoen nachgewiesen werden (Harrison *et al.*, 1998). Da die ODF in direktem Kontakt zum Axonem stehen, in dem die Dynein-Leichtkette der Mikrotubuli lokalisiert ist, könnte VDAC an der Aufrechterhaltung der Strukturintegrität des Flagellums durch Assoziation mit Tctex Proteinen beteiligt sein. Eine weitere Assoziation von VDAC mit zytoskelettären Proteinen zeigten die Untersuchungen von Linden und Karlson (1996). In früheren Untersuchungen wies die Arbeitsgruppe in isolierten Mitochondrien aus Gehirnzellen der Ratte nach, dass MAPs (microtubule associated protein) *in vitro* an zwei spezifische Stellen der äußeren mitochondrialen Membran binden (Linden *et al.*, 1989). Später konnten sie zeigen, dass MAP2 und VDAC aus der äußeren mitochondrialen Membran co-extrahiert werden, weshalb sie vermuteten, dass eine der Bindungsstellen für MAP2 VDAC ist. Dies würde bedeuten, dass die Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli durch Bindung der MAPs an VDAC Domänen der äußeren mitochondrialen Membran vermittelt wird (Leterrier *et al.*, 1994; Linden und Karlsson, 1996).

Weitere Experimente, die zu der Hypothese führten, dass VDAC für die Erhaltung der Flagellenstruktur von Bedeutung ist, wurden von Sampson *et al.* (2001) durchgeführt. Männliche VDAC3 knock-out Mäuse hatten eine physiologische Spermienkonzentration, waren aber aufgrund einer herabgesetzten Motilität infertil. Die eingeschränkte Motilität wurde auf Strukturschäden im Bereich des Flagellums, meist in Form von fehlenden Mikrotubuli, zurückgeführt. Im Gegensatz zu den unfruchtbaren männlichen knock-out Mäusen waren die weiblichen knock-out Mäuse fertil. Sie bekamen nach Paarung mit männlichen Wildtyp-Mäusen gesunde Nachkommen.

Die Bereitstellung von ATP für die Mikrotubuli des Axonems könnte eine weitere Funktion von VDAC in Spermatozoen sein (Hinsch *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass VDAC eine ATP-Bindungsstelle besitzt und zum ATP-Transport befähigt ist (Rostovtseva und Colombini,

1996; Rostovtseva und Colombini, 1997; Rostovtseva *et al.*, 2002). Rostovtseva und Colombini (1996, 1997) untersuchten mit dem Luciferin/Luciferase System den ATP-Durchfluss und berichteten, dass VDAC Proteine nicht nur den ATP Ausstrom aus den Mitochondrien vermitteln, sondern den ATP-Fluss auch kontrollieren können. Es wäre daher möglich, dass VDAC Proteine als Bestandteil der ODF am ATP-Transport von den Mitochondrien des Mittelstücks bis zu den Dynein ATPasen des Hauptstücks beteiligt sind (Hinsch *et al.*, 2004). Es wurde zwar eine anaerobe ATP-Produktion im Flagellum boviner Spermatozoen beschrieben, aber bei porzinen Spermatozoen führten anaerobe Bedingungen zu einem Verlust der progressiven Motilität (Mann und Lutwak-Mann, 1982). Eine permanente Bereitstellung von ATP durch die Mitochondrien für die Dynein ATPasen scheint daher für die Spermatozoenmotilität essentiell zu sein. Aufgrund ihrer nahen Lokalisation zum Axonem vermuten Hinsch *et al.* (2004), dass die ODF als eine Art „Batterie“ funktionieren, die für die konstante Versorgung des Axonems mit ATP verantwortlich ist und bei Bedarf sofort höhere ATP-Level freisetzt. VDAC kommt in bedeutenden Mengen in den ODF vor und besitzt die Fähigkeit ATP zu binden und zu transportieren, deshalb könnten VDAC2 und 3 an der ATP Versorgung des Axonems beteiligt sein und somit eine Rolle bei der Regulation der Spermienmotilität spielen (Hinsch *et al.*, 2004).

Neben der Permeabilität für ATP ist aus der Literatur bekannt, dass VDAC auch durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$  ist und wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase der Zelle spielt, indem es sowohl den Calciumefflux als auch den -influx an der äußeren mitochondrialen Membran kontrolliert (Gincel *et al.*, 2001). Es wäre daher möglich, dass VDAC an der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration in Spermatozoen beteiligt ist. Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration haben einen wesentlichen Einfluss auf die Motilität, die akrosomale Reaktion und die Kapazitation der Spermatozoen (Felix, 2005; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006). Wie im Detail die intrazelluläre Calciumkonzentration in Spermatozoen geregelt wird, ist noch nicht bekannt. Derzeit wird angenommen, dass der Calciumeinstrom in Spermatozoen einerseits durch plasmamembranständige, spannungsabhängige Calciumkanäle (VOOCs) des T-Typs (Catterall *et al.*, 2003) und andererseits durch intrazelluläre Calciumspeicher reguliert wird (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006). Der Calciumefflux aus intrazellulären Speichern bewirkt, so die Hypothese, die Aktivierung weiterer  $\text{Ca}^{2+}$  permeabler Kanäle (store operated channels, SOCs). Als Kandidaten für die SOCs kommen Kanäle der TRPC (transient receptor potential channels) Familie in Betracht. Es wurden noch zahlreiche weitere Kanäle, die für die  $\text{Ca}^{2+}$  Permeabilität in Spermatozoen eine Rolle spielen, in den letzten Jahren beschrieben (Felix, 2005; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006). Neben Calciumkanälen sind auch die Mitochondrien an der Calciumhomöostase beteiligt, wenngleich ihre Rolle dabei limitiert ist (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006). Als

möglicher Kandidat, der den Calciumaustausch entlang der mitochondrialen Membran vermittelt und somit auch an der Calciumhomöostase des Spermatozoons beteiligt wäre, könnte VDAC in Betracht gezogen werden.

## **5.2 Phosphorylierung boviner Spermatozoenproteine während der Nebenhodenpassage**

### Tyrosinphosphorylierung

Aufbauend auf die Ergebnisse zum Nachweis der VDAC Subtypen in bovinen Spermatozoen, wurden Untersuchungen zur Phosphorylierung von Spermatozoenproteinen durchgeführt. Um erste Hinweise auf eine Phosphorylierung der VDAC Proteine zu erhalten, wurden zunächst Proteinextrakte epididymaler (Caput-, Corpus- und Caudaextrakt) und ejakulierter Spermatozoen (Ejakulatextrakt) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden anschließend mit anti-Phospho-Antikörpern (anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin) inkubiert. Der anti-Phosphotyrosin Antikörper detektierte diverse Proteinbanden bei ca. 20 kDa sowie zwischen 30 und 50 kDa in allen Spermatozoenextrakten. Während der Nebenhodenpassage war eine deutliche Intensitätssteigerung der Immunreaktion zu verzeichnen, was als Zunahme Tyrosin-phosphorylierter Proteine interpretiert werden könnte. Im Ejakulatextrakt war die Immunreaktion des Antikörpers deutlich stärker als im Caput- und Corpusextrakt und etwas schwächer als im Caudaextrakt. Da aus ejakulierten Spermatozoen deutlich weniger Protein aus der gleichen Zellzahl extrahiert wurde als aus epididymalen Spermatozoen, ist die leicht abgeschwächte Immunreaktion im Vergleich von Cauda- zum Ejakulatextrakt vermutlich auf eine geringere Proteinmenge zurückzuführen und nicht Resultat einer Abnahme der Tyrosinphosphorylierung. Seligman *et al.* (2004) untersuchten in ihrer Studie die Tyrosinphosphorylierung während der Spermatozoenreifung im Nebenhoden der Ratte. Sie konnten zeigen, dass mehrere Spermatozoenproteine des Flagellums, die aus Spermatozoen der Cauda epididymidis extrahiert wurden, eine höhere Phosphorylierung an Tyrosinresten aufwiesen als Proteine, die aus Spermatozoen des Caput epididymidis stammten (Seligman *et al.*, 2004). Die hier für Rinderspermatozoen vorgestellten Ergebnisse werden durch diese Studie bestätigt.

Zur Verifizierung der immunbiochemischen Ergebnisse und um festzustellen, in welchen Spermatozoenkompartimenten die Phosphorylierung lokalisiert ist, wurde als weitere Methode zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen die indirekte Immunfluoreszenz (Immunzytochemie) eingesetzt. Die Analyse der immunzytochemischen Ergebnisse ergab unterschiedliche Lokalisationen der Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten. Während bei

---

Spermatozoen des Caput und Corpus epididymidis nach Einsatz des anti-Phosphotyrosin Antikörpers phosphorylierte Tyrosinreste im gesamten akrosomalen Bereich festzustellen waren, beschränkte sich die Lokalisation Tyrosin-phosphorylierter Proteine in Spermatozoen aus Cauda epididymidis und Ejakulat auf den apikalen Bereich des Akrosoms. Dies lässt vermuten, dass die Tyrosinphosphorylierung akrosomaler Proteine im Verlauf der Spermatozoenreifung abnimmt. Die Abnahme Tyrosin-phosphorylierter Proteine des Akrosoms im Verlauf der Nebenhodenpassage beobachteten auch Lewis und Aitken (2001) in ihrer Studie an epididymalen Spermatozoen der Ratte. Sie vertraten die Hypothese, dass die Veränderungen der Tyrosinphosphorylierung im Zusammenhang stehen könnten mit der Regulation der Akrosomreaktion, indem die phosphorylierten Proteine durch Hemmung der Membranfusion die akrosomale Exozytose verhindern (Lewis und Aitken, 2001). Kürzlich publizierte Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung im akrosomalen Bereich während der epididymalen Reifung von Mauspermatozoen, die weder cAMP noch  $Ca^{2+}$  abhängig zu sein scheint (Lin *et al.*, 2006). Obwohl in dieser Studie die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung im Spermatozoenkopf ebenfalls mit der Fähigkeit zur Akrosomreaktion korrelierte, sehen die Autoren keinen direkten Zusammenhang zwischen diesen beiden Ereignissen, sondern betrachten sie lediglich als zwei verschiedene Kriterien der Spermatozoenreifung.

Neben Tyrosin-phosphorylierten Proteinen im akrosomalen Bereich konnten weitere im äquatorialen Segment lokalisiert werden. Ähnlich wie im akrosomalen Bereich nahm die Phosphorylierung während der Nebenhodenpassage tendenziell ab.

Tyrosin-phosphorylierte Proteine konnten auch im Mittelstück des Flagellums detektiert werden. Die Immunreaktion des anti-Phosphotyrosin Antikörpers nahm im Mittelstück des Flagellums von Spermatozoen des Caput epididymidis bis zu ejakulierten Spermatozoen hin kontinuierlich zu. Dies spricht für eine Zunahme Tyrosin-phosphorylierter Proteine in diesem Bereich. Welche subzellulären Strukturen des Mittelstücks genau markiert wurden, war mit dieser Methode nicht festzustellen. Da im Bereich des Mittelstücks die Mitochondrien lokalisiert sind, wäre es möglich, dass es sich um mitochondriale Proteine handelt, die im Verlauf der Nebenhodenpassage phosphoryliert werden. In den letzten Jahren konnten verschiedene Proteinkinasen und Phosphatasen in Mitochondrien identifiziert werden, weshalb die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation mitochondrialer Prozesse wie z.B. der ATP Synthese durch oxidative Phosphorylierung spielt (Salvi *et al.*, 2005). Die Flagellenbewegung ist das Resultat der Dynein ATPase Aktivität, die abhängig ist von der Versorgung mit ATP (Mukai und Okuno, 2004). Es wäre möglich, dass durch die Zunahme der Phosphorylierung mitochondrialer Proteine während der Nebenhodenpassage der ATP Gehalt in Spermatozoen und somit die Dynein ATPase Aktivität steigt und dadurch die Ausbildung der progressiven Motilität im

Zuge der Nebenhodenreifung positiv beeinflusst wird. Da in neueren Studien anhand von Mauspermatozoen gezeigt werden konnte, dass die Spermatozoenmotilität vor allem von der Glycolyse und nicht von der oxidativen Phosphorylierung abhängig zu sein scheint (Miki *et al.*, 2004; Mukai und Okuno, 2004), ist davon auszugehen, dass die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine in Spermatozoen wahrscheinlich andere Funktionen als die Energiebereitstellung hat. Lin *et al.* (2006) vermuten, dass die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine für die Regulation der zytoplasmatischen Calciumkonzentration oder für die Aufrechterhaltung der Stabilität des Axonems wichtig sein könnte.

### Threoninphosphorylierung

Nach Einsatz des anti-Phosphothreonin Antikörpers stellten sich diverse Proteinbanden im Molekularbereich zwischen 50 und 75 kDa sowie zwischen 25 und 48 kDa in allen Extrakten dar. Dabei nahm die Immunreaktivität zweier Proteinbanden von etwa 32 und 42 kDa während der Nebenhodenpassage und im Ejakulatextrakt leicht zu. Ansonsten waren keine Veränderungen im Phosphorylierungsmuster während der Spermatozoenreifung festzustellen. Bisher ist sehr wenig über eine Threoninphosphorylierung während der Spermatozoenreifung im Nebenhoden bekannt. Nath und Majumder (1999) berichten über eine Modifikation des Threoninphosphorylierungsmusters während der Spermatozoenreifung bei Proteinen, die aus der Plasmamembran epididymaler Spermatozoen der Ziege isoliert wurden. Sie beobachteten im Verlauf der Nebenhodenpassage die deutliche Dephosphorylierung eines 74 kDa Proteins und eine zunehmende Phosphorylierung zweier Proteine im Bereich von 18 und 21 kDa. Die Autoren vermuteten, dass die Veränderungen der Proteinphosphorylierung im Zusammenhang mit der Ausbildung der Fähigkeit zur Vorwärtsbewegung stehen könnten (Nath und Majumder, 1999). Die deutlichen Unterschiede im Phosphorylierungsmuster, die Nath und Majumder in ihrer Studie beschrieben, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse scheint sich im bovinen System die Threoninphosphorylierung im Laufe der Nebenhodenpassage nicht so markant zu verändern wie von Nath und Majumder (1999) bei der Ziege dargestellt.

Mittels anti-Phosphothreonin Antikörper in der Immunzytochemie konnten Threoninphosphorylierte Spermatozoenproteine während der Nebenhodenpassage im Bereich des äquatorialen Segmentes und im Mittelstück des Flagellums lokalisiert werden. Dabei nahm während der Spermatozoenreifung der Anteil phosphorylierter Proteine im äquatorialen Segment ab, im Flagellum hingegen zu. Mit zunehmender Reifung traten weitere Threoninphosphorylierte Proteine am apikalen Rand des Akrosoms (Spermatozoen der Cauda epididymidis und ejakulierte Spermatozoen) und im Hauptstück des Flagellums (ejakulierte



Spermatozoen) auf. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten, dass neben der Tyrosinphosphorylierung auch die Threoninphosphorylierung für die Spermatozoenreifung relevant zu sein scheint.

Insgesamt konnten durch die immunzytochemischen Untersuchungen die Resultate der immunbiochemischen Experimente bestätigt werden, und es gelang der Nachweis phosphorylierter Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten des bovinen Spermatozoons.

Parallel zu den immunbiochemischen Untersuchungen mit anti-Phosphotyrosin bzw. anti-Phosphothreonin Antikörpern wurden die auf Nitrozellulosemembranen transferierten Proteine aus den Zellextrakten auch mit den Antisera P31 (spezifisch für VDAC3) und P45 (spezifisch für VDAC2) inkubiert. Die detektierten Bandenmuster wurden mit der Immunreaktion des anti-Phosphotyrosin und des anti-Phosphothreonin Antikörpers verglichen. Dabei zeigte sich, dass Proteinbanden im Bereich zwischen 30 und 37 kDa einerseits phosphorylierte Tyrosin- bzw. Threoninreste aufwiesen und andererseits innerhalb dieses Molekularmassenbereichs VDAC3 und VDAC2 Protein nachweisbar waren. In den immunzytochemischen Experimenten konnten phosphorylierte Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten des Spermatozoons, unter anderem im Mittelstück des Flagellums, in dem auch VDAC2 Protein detektiert wurde, nachgewiesen werden (siehe oben). Somit lieferten die Ergebnisse der immunbiochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen erste Hinweise auf eine mögliche Tyrosin- und Threoninphosphorylierung der VDAC Proteine.

### 5.3 Phosphorylierung der VDAC Proteine

Auf den Ergebnissen der Phosphorylierung boviner Spermatozoenproteine aufbauend, wurden die Gesamtproteinextrakte affinitätschromatografisch in phosphorylierte und nicht phosphorylierte Proteine getrennt. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Um festzustellen, ob sich unter den phosphorylierten Proteinen VDAC befand, wurden parallel laufende Immunoblots (identische Probe auf der Nitrozellulosemembran geteilt in 2 Spuren) mit dem anti-VDAC Antiserum P<sub>common</sub> und anti-Phosphotyrosin bzw. anti-Phosphothreonin Antikörpern durchgeführt. Die Affinitätschromatografie zur Trennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Proteine war nur bedingt erfolgreich. Eine vollständige Trennung gelang nur für die Spermatozoenextrakte aus Cauda epididymidis und frischem Ejakulat. In den Spermatozoenextrakten des Caput epididymidis war auch in der Fraktion, die theoretisch nur aus unphosphorylierten Proteinen bestehen sollte, Phosphoproteine nachweisbar. Obwohl die vom Hersteller angegebene maximale Proteinbindungskapazität in den Experimenten theoretisch nicht überschritten wurde, könnte es sein, dass die Säule bei den Caputextrakten übersättigt war und dies die Ursache für das Vorhandensein der Phosphoproteine in der unphosphorylierten Proteinfraction ist.

Aus dem Corpusextrakt konnten keine phosphorylierten Proteine angereichert werden. Hier fand sich bereits in der „Flow through Fraktion“, die die unphosphorylierten Proteine enthalten sollte, ein großer Anteil phosphorylierter Proteine. Im Eluat hingegen waren kaum noch phosphorylierte Proteine nachweisbar. Eine genaue Ursache hierfür konnte noch nicht gefunden werden. Ein zu schneller Probenlauf durch die Säule, der eine komplette Bindung phosphorylierter Proteine verhindern könnte, kann ausgeschlossen werden. Es wäre aber möglich, dass durch Proteinkomplexbindungen die Phosphatgruppen im Corpusextrakt nicht freilagen und somit nicht an die Säulenmatrix binden konnten. Weitere Untersuchungen wären erforderlich, um diese Vermutung zu bestätigen.

Der Einsatz des anti-Phosphotyrosin Antikörpers lieferte keinen Hinweis auf eine Phosphorylierung von VDAC Proteinen an der Aminosäure Tyrosin. Mithilfe des anti-Phosphothreonin Antikörpers konnten diverse Proteinbanden im oberen, mittleren und unterem Molekularbereich in allen Extrakten nachgewiesen werden. Dabei war im Cauda- und Ejakulatextrakt die Immunreaktion im Bereich von 32 bis 36 kDa besonders stark ausgeprägt, in dem auch VDAC mithilfe des AS P<sub>common</sub> detektiert wurde. Diese Resultate verstärken die bisherigen Erkenntnisse der immunbiochemischen und immunzytochemischen Experimente und weisen auf eine mögliche Threoninphosphorylierung von VDAC in bovinen Spermatozoen hin.

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden weitere Untersuchungen mit H/C gereinigten Extrakten durchgeführt.

---

Die phosphoproteinspezifische Färbung mit dem Farbstoff Pro-Q® Diamond war nur bedingt erfolgreich, da die Farbreaktion bei den Untersuchungsproben insgesamt sehr schwach ausfiel. Dies könnte auf einen sehr geringen Anteil an phosphorylierten Aminosäureresten der Proteine zurückzuführen sein. Ein Fehler im Nachweissystem als Ursache für die schwache Reaktion konnte ausgeschlossen werden, da die Phosphoproteine des Kontrollstandards deutlich gefärbt waren. Mit Hilfe des Farbstoffs Pro-Q® Diamond wurde, zwar nur gering ausgeprägt, in allen Extrakten (Caput-, Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt) ein phosphoryliertes Protein mit einer Molekularmasse von ca. 33 kDa detektiert. Die Farbreaktion im Caput- und Corpusextrakt fiel dabei deutlich geringer aus als im Cauda- und Ejakulatextrakt. Aufgrund der vorangegangenen Analysen der H/C Extrakte (siehe 5.1) handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um phosphoryliertes VDAC2 Protein. Eine Aussage über die Art der Phosphorylierung (Tyrosin-, Threonin- oder Serinphosphorylierung) konnte nicht erfolgen, da der Farbstoff nicht zwischen den verschiedenen Phosphorylierungsarten differenziert.

Durch die sich an die Pro-Q® Diamond Färbung anschließende Coomassie-Blau Färbung konnten neben der 33 kDa Bande des VDAC2 Proteins weitere Banden im Cauda- und Ejakulatextrakt bei 36 kDa und bei 32 kDa nachgewiesen werden, die zuvor durch ProQ-Diamond nicht detektiert wurden. Da es noch ungeklärt ist, ob die Sensitivität des Nachweissystems ausreichte, um auch geringe Phosphorylierungen nachzuweisen, konnte zu diesem Zeitpunkt über den Phosphorylierungszustand der 36 und 32 kDa Proteine keine endgültige Aussage getroffen werden. Aufgrund der MALDI-TOF-MS Analyse handelt es sich hierbei vermutlich um eine weitere VDAC2 Isoform (36 kDa) sowie um VDAC3 (32 kDa). Da bereits schon bei den Gesamtzellextrakten die Extraktion der VDAC Proteine aus Spermatozoen der einzelnen Nebenhodenabschnitte und Ejakulat trotz gleicher Ausgangsmenge ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen/ Spur) variierte (siehe 5.1), wurde aus den Cauda- und Ejakulatgesamtproteinextrakten insgesamt mehr Protein gereinigt als aus den Caput- und Corpusextrakten. Aus diesem Grund war es nicht möglich, eine definitive Aussage darüber zu treffen, ob die Phosphorylierung von VDAC2 (33 kDa) während der Nebenhodenpassage zunimmt.

Da die phosphoproteinspezifische Färbung nicht so erfolgreich war wie erhofft, wurden die gereinigten H/C Extrakte aus Caput, Corpus und Cauda epididymidis sowie Ejakulat einem Immunoblot mit anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin Antikörpern unterzogen. Es sollte einerseits festgestellt werden, ob neben der 33 kDa Bande des VDAC2 Proteins weitere VDAC Subtypen phosphoryliert sein könnten und andererseits sollte evaluiert werden, ob eine Phosphorylierung an Tyrosin- und/oder Threoninresten vorliegt. Parallel zu diesen Experimenten wurde zum Nachweis der VDAC Subtypen das AS P<sub>common</sub> eingesetzt, welches sowohl VDAC2 als auch VDAC3 Proteine erkennt (siehe 4.2.3.1). Mit dem AS P<sub>common</sub> wurde in allen Extrakten eine Bande bei 33 kDa erkannt. Zusätzlich wurden im

Corpus-, Cauda- und Ejakulatextrakt eine Proteinbande bei 32 kDa und im Cauda- und Ejakulatextrakt eine Bande bei 36 kDa detektiert. Die Immunreaktion des AS P<sub>common</sub> war im Caudaextrakt am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Ejakulat- und Corpusextrakt. Im Caputextrakt war die Immunreaktion am schwächsten.

Aufgrund der Molekularmassen, der Ergebnisse der MALDI-TOF-MS und der Spezifität des Antiserums P<sub>common</sub> handelt es sich bei der 32 kDa Bande sehr wahrscheinlich um VDAC3 Protein und bei den Proteinen mit der Molekularmasse von 33 und 36 kDa um VDAC2.

Durch den Einsatz des anti-Phosphotyrosin Antikörpers konnte die Phosphorylierung der 33 kDa Bande des VDAC2 Proteins in allen Extrakten nachgewiesen werden. Tendenziell nahm die Immunreaktion des Antikörpers während der Nebenhodenpassage bis hin zum Ejakulat leicht ab. Des Weiteren konnte der Nachweis einer Tyrosinphosphorylierung des VDAC3 Proteins im Caudaextrakt erbracht werden.

Mittels anti-Phosphothreonin Antikörper konnte die Threoninphosphorylierung der 33 kDa Bande des VDAC2 Proteins in allen Extrakten, der 36 kDa Bande des VDAC2 Proteins in Cauda- und Ejakulatextrakt sowie die Threoninphosphorylierung des VDAC3 Protein in Corpus- Cauda- und Ejakulatextrakt nachgewiesen werden. Die Immunreaktion des Antikörpers war im Caudaextrakt am stärksten ausgeprägt.

Obwohl die Ergebnisse auf eine Veränderung der Phosphorylierung während der Nebenhodenpassage hindeuten, sind die Intensitätsunterschiede der Immunreaktionen der anti-Phosphothreonin und -tyrosin Antikörper nicht unbedingt auf eine Zu- oder Abnahme der Phosphorylierung der VDAC Proteine an Tyrosin- oder Threoninresten zurückzuführen. Bei der Beurteilung sind die unterschiedlichen Proteinmengen zu berücksichtigen, denn auch hier bestand das Problem, dass sich, obwohl alle Gesamtzellproteinextrakte aus gleichen Mengen Ausgangsmaterial ( $165 \times 10^6$  Spermatozoen) gewonnen wurden, unterschiedliche Proteinmengen reinigen ließen. Dennoch zeigten die Ergebnisse, dass sowohl VDAC2, als auch VDAC3 Proteine, die aus epididymalen und ejakulierten Spermatozoen gereinigt wurden, teilweise Tyrosin- und alle Threonin-phosphoryliert sind. Eine funktionelle Beeinflussung der VDAC Isoformen in Spermatozoen wäre durch die Phosphorylierung von Tyrosin- und Threoninresten möglich. Eine Regulation von VDAC durch Phosphorylierung vermuteten auch Liberatori *et al.* (2004). Sie fanden Tyrosin-phosphoryliertes VDAC1 und VDAC2 in Synaptosomen von Meerschweinchen. Ihre Untersuchungen von hypoxischen und normoxischen Synaptosomen ergaben, dass nur im hypoxischen Zustand eine Tyrosinphosphorylierung der VDAC Subtypen stattfand (Liberatori *et al.*, 2004). Da die Phosphorylierung eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion in der Zelle spielt, vermuteten die Autoren, dass die Tyrosinphosphorylierung von VDAC1 und VDAC2 wichtig ist bei der Modulation von Protein-Protein Interaktionen, die zur Aktivierung/Inaktivierung zellulärer Prozesse, wie Apoptose, Zelldegeneration oder Überleben der Zelle, führen.

---

Threonin-phosphoryliertes VDAC wurde bereits von Pastorino *et al.* (2005) beschrieben. Sie zeigten in ihrer Studie an HeLa Zellen, dass die Threoninphosphorylierung von VDAC1 in Zellen, in denen die Aktivität des anti-apoptotischen Proteins Akt durch Wortmannin oder andere Inhibitoren gehemmt wurde, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen deutlich anstieg. Die Hemmung von Akt war verbunden mit einer Aktivierung der GSK3 $\beta$  (Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ), die einen Anstieg der Threoninphosphorylierung von VDAC1 bewirkte. In somatischen Zellen wird die Bindung von Hexokinase I und II (HXK I und II) an die äußere mitochondriale Membran durch VDAC vermittelt, indem die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne (Porin-Bindungsstelle, PBD) der HXK I und II mit VDAC interagiert (Wilson, 2003). Die Ergebnisse von Pastorino *et al.* (2005) zeigten, dass die Threoninphosphorylierung des VDAC1 Proteins zur Spaltung des HXK II/VDAC Komplexes führt. Die Hexokinase ist das erste essentielle Enzym der Glycolyse somatischer Zellen, indem es unter Verwendung von ATP die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat katalysiert (Wilson, 2003). Auch in Spermatozoen wurde eine Hexokinase beschrieben, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften allerdings wesentlich von der somatischen Form unterscheidet, denn sie enthält nicht die klassische NH<sub>2</sub>-terminale PBD (Mori *et al.*, 1993; Visconti *et al.*, 1996). In einer Studie von Travis *et al.* (1998) konnte gezeigt werden, dass diese PBD der somatischen Hexokinase für die in Spermatozoen vorhandene Hexokinase nicht notwendig ist, um an die Mitochondrien in Spermien zu binden (Travis *et al.*, 1998). Als mögliche Erklärung vermuten die Autoren, dass die spezifische Sequenz der Spermatozoen-Hexokinase als eine alternative PBD dienen könnte, die mit anderen VDAC Isoformen interagiert als in somatischen Zellen (Travis *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Assoziation der Hexokinase mit der fibrösen Hülle postuliert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Hexokinase in Spermatozoen der extra-mitochondrialen Energiegewinnung dient um die ATP Versorgung der Dynein-ATPasen zu gewährleisten. Weiterhin vermuten Travis *et al.* (1998), dass diese Lokalisation der Hexokinase in der fibrösen Hülle auch aufgrund einer Interaktion der Hexokinase mit VDAC zustande kommen könnte, was bedeutet, dass VDAC dann ebenfalls in dieser Region lokalisiert sein müsste. Aufgrund dieser Zusammenhänge wäre es denkbar, dass in Spermatozoen die Interaktion zwischen VDAC Isoformen und der Spermatozoen-Hexokinase durch Threoninphosphorylierung der VDAC Proteine reguliert ist und einen Einfluss auf die Energieproduktion in Form von ATP haben könnte.

In Untersuchungen von Bera *et al.* (1995) wurde erstmals darüber berichtet, dass gereinigtes VDAC, das aus Leberzellmitochondrien der Ratte stammte, *in vitro* durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden kann. Eine Aussage darüber, um welche Art der Phosphorylierung es sich handelte, wurde nicht gemacht. Neueste Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass in künstlichen Lipid-

doppelmembranen die Leitfähigkeit von gereinigtem, mitochondrialem VDAC, das aus Gehirnzellen der Ratte isoliert wurde, in Anwesenheit von ATP und der katalytischen Untereinheit der PKA abnimmt (Banerjee und Ghosh, 2006). Sie vermuten daher, dass die Phosphorylierung von VDAC zur Schließung des Kanals führt. Die mögliche Beteiligung von VDAC bei der Bereitstellung von ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  in Spermatozoen wurde bereits diskutiert. In Anbetracht der Ergebnisse von Banerjee und Ghosh (2006) wäre eine weitere Hypothese, dass in Spermatozoen durch die Phosphorylierung der VDAC Proteine der ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  Flux reguliert sein könnte, wobei die einzelnen VDAC Isoformen von unterschiedlicher funktioneller Bedeutung sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wären Experimente mit den H/C gereinigten VDAC Subtypen in künstlichen Lipiddoppelmembranen hilfreich. Zum einen könnte durch diese Experimente überprüft werden, ob und falls ja, welcher VDAC Subtyp in Spermatozoen tatsächlich für ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel ist, und zum anderen könnte man durch Zugabe von alkalischer Phosphatase, die zur Dephosphorylierung von VDAC führt (Banerjee und Ghosh, 2006), untersuchen, inwiefern sich die Leitfähigkeit der VDAC Isoformen in Spermatozoen bei einer Dephosphorylierung verändert.

#### 5.4 Abschließende Betrachtung

Mittels subtyp-spezifischer anti-VDAC Antikörper gelang es mit dieser Arbeit erstmals, VDAC2 und VDAC3 Proteine in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die VDAC Subtypen in unterschiedlichen Spermatozoen-kompartimenten lokalisiert sind. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die ODF und/ oder die fibröse Hülle. Um genauere Informationen zur subzellulären Lokalisation der VDAC Subtypen während der Spermatozoenreifung zu erhalten, sind weiterführende Untersuchungen, wie z. B. immunelektronenmikroskopische Experimente, notwendig.

Weiterhin ist es mit dieser Arbeit erstmals gelungen, VDAC2 und VDAC3 aus Zellen bzw. Gewebe, im Speziellen aus bovinen epididymalen und ejakulierten Spermatozoen zu extrahieren und anzureichern. Dies bildet die Grundlage für zukünftige Untersuchungen, in künstlichen Lipiddoppelmembranen die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser beiden Isoformen näher zu charakterisieren.

Durch den Einsatz von anti-Phosphotyrosin und anti-Phosphothreonin Antikörpern konnte gezeigt werden, dass neben der Tyrosinphosphorylierung auch die Threoninphosphorylierung für die Spermatozoenreifung relevant zu sein scheint. Es fanden sich erste Hinweise auf eine Phosphorylierung der VDAC2 und VDAC3 Proteine an Tyrosin- und Threoninresten. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass VDACs in Spermatozoen durch Phosphorylierung reguliert sein könnten und somit möglicherweise Einfluss auf spezielle Spermatozoenfunktionen, wie zum Beispiel die Motilität oder die Akrosomreaktion nehmen.

Um einen definitiven Zusammenhang von Phosphorylierung und spezifischen Eigenschaften der einzelnen VDAC Isoformen herstellen zu können, sind allerdings weitere zukünftige Untersuchungen notwendig.

## 6 Zusammenfassung

Voltage-deependent anion channels (VDACs) sind 30-36 kDa große, porenformende Proteine, die in der äußeren mitochondrialen Membran und in der Plasmamembran von Eukaryoten vorkommen. In vorangegangenen Studien konnten VDAC2 und VDAC3 Proteine in den outer dense fibers, (ODF, Mantelfasern) boviner, ejakulierter Spermatozoen lokalisiert werden. Im bovinen Hoden wurde VDAC1 in Sertolizellen und VDAC2 in Spermatozyten, Spermatischen und Spermatozoen nachgewiesen. Über das Vorkommen von VDAC3 in bovinen Hoden ist bisher nichts bekannt. Aus der Literatur kann aufgrund von Analogien zu somatischen Zellen die Hypothese aufgestellt werden, dass VDACs in Spermatozoen durch Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten posttranslational modifiziert werden.

Ziel der Dissertationsarbeit war es, erstmals Informationen über die Lokalisation und posttranslationalen Modifikation von VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen zu erhalten; mögliche Veränderungen einer Tyrosin- und/oder Threoninphosphorylierung der VDAC Subtypen während der Spermatozoenreifung sollten untersucht werden.

Dazu wurden VDAC Proteine aus bovinen Spermatozoen der verschiedenen Nebenhodenabschnitte und aus Ejakulaten extrahiert und mit biochemischen und immunbiochemischen Methoden identifiziert. Durch den Einsatz von Subtyp-spezifischen anti-VDAC Antikörpern konnten VDAC2 und VDAC3 in Gesamtproteinextrakten aus Caput epididymidis, Corpus epididymidis, Cauda epididymidis sowie aus Ejakulaten nachgewiesen werden. Aus den Gesamtproteinextrakten erfolgte eine Proteinreinigung mittels Säulenchromatografie. Immunoblots mit anti-VDAC Antikörpern und MALDI-TOF-MS Analysen bestätigten, dass es sich bei den gereinigten Proteinen um VDAC2 und VDAC3 handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass VDAC2 und VDAC3 Proteine aus bovinen Spermatozoen mit biochemischen Methoden isoliert werden können. Mit Hilfe der Immunzytochemie gelang es, in epididymalen und ejakulierten Spermatozoen VDAC2 hauptsächlich im Mittelstück und VDAC3 vor allem im Hauptstück des Flagellums zu lokalisieren. Somit wurden die VDAC Subtypen 2 und 3 in unterschiedlichen Kompartimenten der bovinen Samenzelle nachgewiesen. Immunoblots mit anti-Phosphotyrosin und anti- Phosphothreonin Antikörpern ergaben, dass VDAC2 und VDAC3 Proteine, die aus epididymalen und ejakulierten Spermatozoen angereichert wurden, an Tyrosin- und an Threoninresten phosphoryliert sind.

Aus den Untersuchungen ergeben sich erste Hinweise darauf, dass VDAC Funktionen in Spermatozoen durch Phosphorylierung reguliert werden könnten. Da VDACs permeabel für ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  sind, wäre es denkbar, dass in Spermatozoen VDAC Isoformen an der Speicherung und Bereitstellung von ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt sind. Die Freisetzung dieser Moleküle könnte durch die Phosphorylierung von VDAC reguliert werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Überprüfung der Frage, ob VDAC Proteine und deren Phosphorylierungsstatus an der Regulation der Spermatozoenmotilität beteiligt sind.



## 7 Summary

Voltage-deependent anion channels (VDACs) are small pore-forming proteins identified in outer mitochondrial membranes and in the plasma membrane of eukaryotes. In previous studies, VDAC2 and VDAC3 proteins could be identified in the outer dense fibers (ODF) of ejaculated bovine sperm. VDAC1 was found in Sertoli cells and VDAC2 was present in spermatocytes, spermatids and spermatozoa of the bovine testis. Data published in literature led to the hypothesis that, in analogy to somatic cells, posttranslational modification of VDACs (e.g. phosphorylation of tyrosine- or threonine residues) in spermatozoa could possibly be involved in the regulation of sperm function. The aim of this study was to gain more information about the localisation and regulation of VDACs in bovine spermatozoa, particularly to analyse tyrosine and threonine phosphorylation of VDAC proteins during sperm cell maturation.

Using subtype-specific anti-VDAC antibodies, VDAC2 and VDAC3 could be detected in protein extracts of spermatozoa isolated from caput epididymidis, corpus epididymidis, cauda epididymidis as well as in ejaculated sperm cells. From the total protein extract, proteins were purified using biochemical methods. Immunoblot analysis and MALDI-TOF-MS revealed that the purified proteins were VDAC2 and VDAC3. To our knowledge, this is the first report on the purification of VDAC2 and 3 from bovine spermatozoa. Immunocytochemistry with epididymal and ejaculated sperm revealed that VDAC3 is abundant in the principal piece while VDAC2 was found mainly in the midpiece of the flagellum. Thus VDAC2 and 3 subtypes are located in different sperm compartments; this finding and data from literature suggest that bovine VDAC are located in ODF and/or the fibrous sheath.

Using anti-phosphotyrosine and anti-phosphothreonine specific antibodies, western blot analysis showed that purified VDAC2 and 3 proteins from epididymal and ejaculated spermatozoa were phosphorylated at threonine residues and at tyrosine residues. Thus, the hypothesis is strengthened that VDAC function in spermatozoa is regulated by tyrosine and threonine phosphorylation. Because VDACs are permeable for ATP and  $\text{Ca}^{2+}$ , VDAC proteins could play also a role for storage and supply of ATP and  $\text{Ca}^{2+}$  in the sperm flagellum; the release of ATP and  $\text{Ca}^{2+}$  could be regulated by VDAC phosphorylation. Therefore, the results presented in this thesis could be the basis for further investigations to answer the question whether sperm motility is affected by VDAC proteins and their status of phosphorylation.

## 8 Literatur

Abou-Haila A, Tulsiani D R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 2000; (379): 173-182.

Adams V, Griffin L, Towbin J, Gelb B, Worley K, McCabe E R. Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane. *Biochem Med Metab Biol* 1991; (45): 271-291.

Anflous K, Armstrong D D, Craigen W J. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem* 2001; (276): 1954-1960.

Anflous K, Craigen W J. Mitochondrial porins in mammals: insights into functional roles from mutant mice and cells. In: *Bacterial and eukaryotic porins*. (Ed. Benz R). Weinheim: WILEY-VCH, 2004; 285-307.

Asmarinah. Lokalisation und Relevanz von Porin Subtypen im bovinen Hoden. 1-103. 2002. Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Austin CR. Capacitation of spermatozoa. *Int J Fertil* 1967; (12): 25-31.

Baker M A, Lewis B, Hetherington L, Aitken R J. Development of the signalling pathways associated with sperm capacitation during epididymal maturation. *Mol Reprod Dev* 2003; (64): 446-457.

Baker M A, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken R J. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2005; (5): 1003-1012.

Baltz J M, Williams P O, Cone R A. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod* 1990; (43): 485-491.

Banerjee J, Ghosh S. Interaction of mitochondrial voltage-dependent anion channel from rat brain with plasminogen protein leads to partial closure of the channel. *Biochim Biophys Acta* 2004; (1663): 6-8.

Banerjee J, Ghosh S. Phosphorylation of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion as a potential tool to control leakage of cytochrome c. *J Neurochem* 2006; (98): 670-676.

Barros C, Yanagimachi R. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 1971; (233), 268-269.

Bathori G, Parolini I, Szabo I, Tombola F, Messina A, Oliva M, Sargiacomo M, De Pinto V, Zoratti M. Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr* 2000; (32): 79-89.

Bathori G, Parolini I, Tombola F, Szabo I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M. Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* 1999; (274): 29607-29612.

Bedford J M, Calvin H I. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 1974; (188): 137-155.

Benz R, Brdiczka D. The cation-selective substate of the mitochondrial outer membrane pore: single-channel conductance and influence on intermembrane and peripheral kinases. *J Bioenerg Biomembr* 1992; (24): 33-39.

Bera AK, Ghosh S, Das S. Mitochondrial VDAC can be phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; (209): 213-217.

Berndston W E, Desjardins C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 1974; (140): 167-179.

Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; (1368): 7-18.

Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC channels. *IUBMB Life* 2001; (52): 113-118.

Blachly-Dyson E, Zambronicz E B, Yu W H, Adams V, McCabe E R, Adelman J, Colombini M, Forte M. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 1993; (268): 1835-1841.

Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; (72): 248-254.

Bureau M H, Khrestchatisky M, Heeren M A, Zambrowicz E B, Kim H, Grisar T M, Colombini M, Tobin A J, Olsen R W. Isolation and cloning of a voltage-dependent anion channel-like Mr 36,000 polypeptide from mammalian brain. *J Biol Chem* 1992; (267): 8679-8684.

Calogero A E, Burrello N, Ferrara E, Hall J, Fishel S, D'Agata R. Gamma-aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil Steril* 1999; (71): 930-936.

Calvin H I, Hwang F H, Wohlrab H. Localization of zinc in a dense fiber-connecting piece fraction of rat sperm tails analogous chemically to hair keratin. *Biol Reprod* 1975; (13): 228-239.

Carrera A, Gerton G L, Moss S B. The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Dev Biol* 1994; (165): 272-284.

Carrera A, Moos J, Ning X P, Gerton G L, Tesarik J, Kopf G S, Moss S B. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 1996; (180): 284-296.

Casadio R, Jacoboni I, Messina A, De Pinto V. A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett* 2002; (520): 1-7.

Catterall W.A., Streissnig J., Snutch T., Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Pharmacol Rev* 2003; (55): 579-581.

Chang M C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; (168): 697-698.

Chang M C. Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature* 1955; (175): 1036-1037.

Cheng E H, Sheiko T V, Fisher J K, Craigen W J, Korsmeyer S J. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003; (301): 513-517.

Cho C, Bunch D O, Faure J E, Goulding E H, Eddy E M, Primakoff P, Myles D G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998; (281): 1857-1859.

Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 2004; (256-257): 107-115.

---

Dacheux J L, Castella S, Gatti J L, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 2005; (63): 319-341.

Dacheux J L, Gatti J L, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 2003; (61): 7-17.

Darszon A, Acevedo J J, Galindo B E, Hernandez-Gonzalez E O, Nishigaki T, Trevino C L, Wood C, Beltran C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006; (131): 977-988.

Darszon A, Beltran C, Felix R, Nishigaki T, Trevino C L. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 2001; (240): 1-14.

De Blas G, Michaut M, Trevino C L, Tomes C N, Yunes R, Darszon A, Mayorga L S. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2002; (277): 49326-49331.

De Kretser D M, Kerr J B. The Cytology of the Testis. In: *The Physiology of Reproduction*. (Eds.Knobil E, Neill JD). New York: Raven Press, 1994; second ed. : 1177-1290.

De Pinto V, Benz R, Palmieri F. Interaction of non-classical detergents with the mitochondrial porin. A new purification procedure and characterization of the pore-forming unit. *Eur J Biochem* 1989; (183): 179-187.

De Pinto V, Messina A. Gene family expression and multitopological localization of eukaryotic porin/voltage dependent anion-selective channel (VDAC: intracellular trafficking and alternative splicing. In: *Bacterial and eukaryotic porins*. (Ed.Benz R). Weinheim: 2004; 309-337.

De Pinto V, Prezioso G, Palmieri F. A simple and rapid method for the purification of the mitochondrial porin from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1987; (905): 499-502.

Eddy E M. Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; (9): 451-457.

Eddy E M. The Spermatozoon. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (Ed.Neill JD). Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2006; third ed. : 3-54.

Eddy E M, O'Brien D. The Spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction*. (Eds.Knobil E, Neill JD). New York: Raven Press, 1994; second ed. : 29-77.

Eddy E M, Toshimori K, O'Brien D A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2003; (61): 103-115.

Evans J P, Florman H M. The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol* 2002; (4 Suppl): 57-63.

Fawcett D W. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975; (44): 394-436.

Felix R. Molecular physiology and pathology of Ca<sup>2+</sup>-conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reproduction* 2005; (129): 251-262.

Ficarro S, Chertihin O, Westbrook V A, White F, Jayes F, Kalab P, Marto J A, Shabanowitz J, Herr J C, Hunt D F, Visconti P E. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem* 2003; (278): 11579-11589.

Flesch F M, Brouwers J F, Nievelstein P F, Verkleij A J, van Golde L M, Colenbrander B, Gadella B M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 2001; (114): 3543-3555.

Florman H M, Ducibella T. Fertilization in Mammals. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. (Ed. Neill JD). Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2006; third ed. : 55-112.

Foster J A. *J Biol Chem* 1997; (272): 12714.

Gadella B M, Harrison R A. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002; (67): 340-350.

Geraci E, Giudice G. Sperm activation and sperm-egg interaction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2006; (38): 11-20.

Gincel D, Silberberg S D, Shoshan-Barmatz V. Modulation of the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) by Glutamate<sup>1</sup>. *J Bioenerg Biomembr* 2000; (32): 571-583.

Gincel D, Vardi N, Shoshan-Barmatz V. Retinal voltage-dependent anion channel: characterization and cellular localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; (43): 2097-2104.

Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 2001; (358): 147-155.

Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson C E, Gawdi G, Pizzo S V. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; (278): 27312-27318.

Guarino F, Specchia V, Zapparoli G, Messina A, Aiello R, Pia B M, De Pinto V. Expression and localization in spermatozoa of the mitochondrial porin isoform 2 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006.

Harrison A, Olds-Clarke P, King S M. Identification of the t complex-encoded cytoplasmic dynein light chain tctex1 in inner arm I1 supports the involvement of flagellar dyneins in meiotic drive. *J Cell Biol* 1998; (140): 1137-1147.

Harrison R A, Miller N G. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2000; (55): 220-228.

Henkel R, Baldauf C, Schill W B. Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. *Reprod Domest Anim* 2003; (38): 97-101.

Henkel R, Bittner J, Weber R, Huther F, Miska W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril* 1999; (71): 1138-1143.

Henkel R, Stalf T, Miska W. Isolation and partial characterization of the outer dense fiber proteins from human spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; (373): 685-689.

Herrick S B, Schweissinger D L, Kim S W, Bayan K R, Mann S, Cardullo R A. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 2005; (202): 663-671.

Hinsch E, Boehm J G, Groeger S, Mueller-Schloesser F, Hinsch K D. Identification of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibre fractions. *Reprod Domest Anim* 2003; (38): 155-160.

Hinsch K D, Asmarinah, Hinsch E, Konrad L. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta* 2001; (1518): 329-333.

Hinsch K D, De Pinto V, Aires V A, Schneider X, Messina A, Hinsch E. Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J Biol Chem* 2004; (279): 15281-15288.

Horvath PM, Kellom T, Caulfield J, Boldt J. Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 1993, (34): 65-72.

Hoskins D D, Hall M L, Munsterman D. Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol Reprod* 1975; (13): 168-176.

Hoskins D D, Stephens D T, Hall M L. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1974; (37): 131-133.

Huang Z, Vijayaraghavan S. Increased phosphorylation of a distinct subcellular pool of protein phosphatase, PP1gamma2, during epididymal sperm maturation. *Biol Reprod* 2004; (70): 439-447.

Inaba K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci* 2003; (20): 1043-1056.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; (434): 234-238.

Jassim A, Gillott D J, al Zuhdi Y. Human sperm tail fibrous sheath undergoes phosphorylation during its development. *Hum Reprod* 1991; (6): 1135-1142.

Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper C V, Barratt C L, Publicover S J. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006; (12): 253-267.

Kaji K, Kudo A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 2004; (127): 423-429.

Kirchhoff C, Ivell R. Molekulare Aspekte der Spermienreifung im Nebenhoden. *Fertilität* 1995; (11): 167-174.

Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; (227): 680-685.

Lane J, Allan V. Microtubule-based membrane movement. *Biochim Biophys Acta* 1998; (1376): 27-55.

Letierrier JF, Rusakov DA, Nelson BD, Linden M. Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. *Microsc Res Tech* 1994; (27): 233-261.



Lewis B, Aitken R J. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod* 2001; (64): 1545-1556.

Liberatori S, Canas B, Tani C, Bini L, Buonocore G, Godovac-Zimmermann J, Mishra O P, Delivoria-Papadopoulos M, Bracci R, Pallini V. Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. *Proteomics* 2004; (4): 1335-1340.

Liebig H G. Funktionelle Histologie. 1993. Schattauer, Stuttgart.

Lin M, Lee Y H, Xu W, Baker M A, Aitken R J. Ontogeny of tyrosine phosphorylation-signaling pathways during spermatogenesis and epididymal maturation in the mouse. *Biol Reprod* 2006; (75): 588-597.

Lindemann C B. Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996; (34): 258-270.

Linden M, Karlsson G. Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; (218): 833-836.

Linden M, Nelson B D, Leterrier J F. The specific binding of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) to the outer membrane of rat brain mitochondria. *Biochem J* 1989; (261): 167-173.

Mann T, Lutwak-Mann C. Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. *Crit Rev Toxicol* 1982; (11): 1-14.

Miki K, Qu W, Goulding E H, Willis W D, Bunch D O, Strader L F, Perreault S D, Eddy E M, O'Brien D A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; (101): 16501-16506.

Mori C, Welch J E, Fulcher K D, O'Brien D A, Eddy E M. Unique hexokinase messenger ribonucleic acids lacking the porin-binding domain are developmentally expressed in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 1993; (49): 191-203.

Morisawa M. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoolog Sci* 1994; (11): 647-662.

Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 2004; (71): 540-547.

Mwethera P G, Makokha A, Chai D. Fertilin beta peptides inhibit sperm binding to zona-free eggs in a homologous baboon in vitro fertilization system. *Contraception* 1999; (59): 131-135.

Nagdas S K, Skudlarek M D, Orgebin-Crist M C, Tulsiani D R. Biochemical alterations in the proacrosin-acrosin system during epididymal maturation of the rat spermatozoa. *J Androl* 1992; (13): 36-43.

Nagdas S K, Winfrey V P, Olson G E. Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation. *Biol Reprod* 2005; (72): 164-171.

Nath D, Majumder G C. Maturation-dependent modification of the protein phosphorylation profile of isolated goat sperm plasma membrane. *J Reprod Fertil* 1999; (115): 29-37.

Nishimura H, Cho C, Branciforte D R, Myles D G, Primakoff P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 2001; (233): 204-213.

Oko R. Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1988; (39): 169-182.

Olson G E, Lifshics M R, Winfrey V P, Rifkin J M. Modification of the rat sperm flagellar plasma membrane during maturation in the epididymis. *J Androl* 1987; (8): 129-147.

Ostlund A K, Gohring U, Krause J, Brdiczka D. The binding of glycerol kinase to the outer membrane of rat liver mitochondria: its importance in metabolic regulation. *Biochem Med* 1983; (30): 231-245.

Pastorino J G, Hoek J B, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 2005; (65): 10545-10554.

Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 2000; (92): 255-266.

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* 1987; (104): 141-149.

Primakoff P, Myles D G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 2002; (296): 2183-2185.

Rawe V Y, Galaverna G D, Acosta A A, Olmedo S B, Chemes H E. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; (16): 879-886.

Roman I, Figys J, Steurs G, Zizi M. Direct measurement of VDAC-actin interaction by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 2006; (1758): 479-486.

Rostovtseva T, Colombini M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1996; (271): 28006-28008.

Rostovtseva T, Colombini M. VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J* 1997; (72): 1954-1962.

Rostovtseva T K, Komarov A, Bezrukov S M, Colombini M. VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J Membr Biol* 2002; (187): 147-156.

Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 1991. Parey, Berlin/Hamburg.

Rutllant J, Meyers S A. Posttranslational processing of PH-20 during epididymal sperm maturation in the horse. *Biol Reprod* 2001; (65): 1324-1331.

Saling PM, Sowinski J, Storey BT. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool* 1979, (209): 229-238.

Salvi M, Brunati A M, Toninello A. Tyrosine phosphorylation in mitochondria: a new frontier in mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; (38): 1267-1277.

Sampson M J, Decker W K, Beaudet A L, Ruitenbeek W, Armstrong D, Hicks M J, Craigen W J. Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem* 2001; (276): 39206-39212.

Sampson M J, Lovell R S, Craigen W J. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J Biol Chem* 1997; (272): 18966-18973.

Schein S J, Colombini M, Finkelstein A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 1976; (30): 99-120.

Schultz R, Williams C. Developmental biology: sperm-egg fusion unscrambled. *Nature* 2005; (434): 152-153.

Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinner F P, Hilschmann N. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; (34): 1059-1070.

Seligman J, Zipser Y, Kosower N S. Tyrosine phosphorylation, thiol status, and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; (71): 1009-1015.

Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Takaoka Y, Ishikawa M, Dukelow WR. Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1995; (105): 85-90.

Shabanowitz R B, Killian G J. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. *Biol Reprod* 1987; (36): 753-768.

Shoshan-Barmatz V, Hadad N, Feng W, Shafir I, Orr I, Varsanyi M, Heilmeyer L M. VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett* 1996; (386): 205-210.

Shoshan-Barmatz V, Israelson A. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol* 2005; (204): 57-66.

Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu S S. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 2006; (12): 2249-2270.

Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 1999; (61): 240-246.

Sinowatz F, Plendl J, Kolle S. Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat (Basel)* 1998; (161): 196-205.

Snell W J, White J M. The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 1996; (85): 629-637.

Somanath P R, Jack S L, Vijayaraghavan S. Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation. *J Androl* 2004; (25): 605-617.

Steger K. Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reproduktionsmedizin* 2001; (17): 137-148.

Su D, Novoselov S V, Sun Q A, Moustafa M E, Zhou Y, Oko R, Hatfield D L, Gladyshev V N. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem* 2005; (280): 26491-26498.

Thinnes F P, Gotz H, Kayser H, Benz R, Schmidt W E, Kratzin H D, Hilschmann N. Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (Porin 31HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the progenitor cell. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1989; (370): 1253-1264.

Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 2003; (61): 1-6.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; (76): 4350-4354.

Travis A J, Foster J A, Rosenbaum N A, Visconti P E, Gerton G L, Kopf G S, Moss S B. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Biol Cell* 1998; (9): 263-276.

Triphan X, Menzel V, Petrunkina A, Cassara C, Wemheuer W, Hinsch KD, Hinsch E. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Europ J Phys* 2007, accepted.

Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N, Shalgi R. When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol* 2006; (252): 107-114.

Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003; (125): 17-26.

van Gestel R A, Brewis I A, Ashton P R, Helms J B, Brouwers J F, Gadella B M. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod* 2005; (11): 583-590.

Vander Heiden M G, Li X X, Gottlieb E, Hill R B, Thompson C B, Colombini M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2001; (276): 19414-19419.

Vijayaraghavan S, Liberty G A, Mohan J, Winfrey V P, Olson G E, Carr D W. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Mol Endocrinol* 1999; (13): 705-717.

Visconti P E, Bailey J L, Moore G D, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf G S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995a; (121): 1129-1137.

Visconti P E, Moore G D, Bailey J L, Leclerc P, Connors S A, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf G S. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995b; (121): 1139-1150.

Visconti P E, Olds-Clarke P, Moss S B, Kalab P, Travis A J, de las H M, Kopf G S. Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1996; (43): 82-93.

Visconti P E, Westbrook V A, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman A B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; (53): 133-150.

Warner F D, Mitchell D R. Dynein: the mechanochemical coupling adenosine triphosphatase of microtubule-based sliding filament mechanisms. *Int Rev Cytol* 1980; (66): 1-43.

Weeber E J, Levy M, Sampson M J, Anflous K, Armstrong D L, Brown S E, Sweatt J D, Craigen W J. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *J Biol Chem* 2002; (277): 18891-18897.

Westermann P, Wittmann-Liebold B. Enzym- und Proteinanalytik. In: *Grundlagen der Molekularen Medizin*. (Eds. Ganten D, Ruckpaul K). Berlin: Springer-Verlag, 2003; zweite Auflage: 441-493.

Wilson J E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 2003; (206): 2049-2057.

Wu S, Sampson M J, Decker W K, Craigen W J. Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration. *Biochim Biophys Acta* 1999; (1452): 68-78.

Xu X, Decker W, Sampson M J, Craigen W J, Colombini M. Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol* 1999; (170): 89-102.

Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: The Physiology of Reproduction. (Eds. Knobil E, Neill JD). New York: Raven Press, Ltd., 1994; second ed. : 189-317.

Zalk R, Israelson A, Garty E S, Azoulay-Zohar H, Shoshan-Barmatz V. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2005; (386): 73-83.

Zizi M, Forte M, Blachly-Dyson E, Colombini M. NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem* 1994; (269): 1614-1616.

## 9 Anhang

### 9.1 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. E. Hinsch und Herrn Prof. Dr. K. D. Hinsch für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende Betreuung der vorliegenden Arbeit und den vielen fruchtbaren Diskussionen. Weiterhin sei ihnen für die motivierenden Ratschläge während immer wiederkehrenden „Durststrecken“ und ihr persönliches Interesse gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. V. Menzel für die fachliche Betreuung und ihr immerwährendes Engagement. Sie wies mich in das methodisch-wissenschaftliche Arbeiten ein, war immer für Fragen offen und stand mir im Laboralltag mit innovativen Vorschlägen zur Seite.

Herrn apl. Prof. Dr. Schuler danke ich für die Betreuung und Vertretung meiner Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse. Ebenso möchte ich mich bei ihm an dieser Stelle herzlich dafür bedanken, dass er mir die bovinen Ejakulate zur Verfügung stellte.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Laborteams, Carolina, Doro, und Simone, für die gute Zusammenarbeit im Laboralltag und die vielen motivierenden, unterstützenden und persönlichen Gespräche.

Nicht zuletzt bin ich auch meiner Familie dankbar: Meinen Eltern Christel und Herbert Wagner dafür, dass sie mich immer in der Durchführung meiner beruflichen Wünsche bestärkt haben und ohne deren finanzielle und moralische Unterstützung ich meine beruflichen Ziele nicht hätte realisieren können. Ebenso vielen Dank an meinen Mann Gerhard, der mich stets liebevoll unterstützte, motivierte und mich durch die Höhen und Tiefen des Doktorandenlebens geduldig begleitet hat. Meinen allerliebsten Dank an Euch alle.

Die Arbeit entstand mit freundlicher Unterstützung eines Doktorandenstipendiums im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ (GK 533).



## **9.2 Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit**

### **Posterbeiträge**

Wagner Y, Hinsch KD, Hinsch E, Aires VA (2005) Post-translational modifications of voltage-dependent-anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 2(147): 82.

Menzel VA, Wagner Y, Hinsch KD, Hinsch E (2005) Untersuchungen zur Identifizierung post-translational modifizierter VDAC-Isoformen in bovinen Spermatozoen. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2(5): 302-303.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



**ISBN 978-3-939902-60-7**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
e-mail: [Geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>**