

UNTERSUCHUNG ZUR FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG VON VDAC IN WEIBLICHEN GAMETEN DES RINDES UND DES MARMOSSET-AFFEN

DOROTHEE UHL



INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

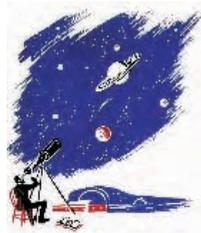
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem „Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen“
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser

und

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

Untersuchung
zur funktionellen Bedeutung von VDAC in weiblichen
Gameten des Rindes und des Marmoset-Affen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dorothee Uhl

Tierärztin aus Stuttgart

Gießen 2008

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

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Hinsch

Tag der Disputation: 24.04.2008

meinen Eltern

Sieh eine Welt in einem Körnchen Sand,
und einen Himmel in der wilden Blume,
greif das Unendliche mit deiner Hand
und fühle Ewigkeit in einer Stunde.

William Blake

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AEC | 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol |
| AK | Antikörper |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| AS | Antiserum |
| AT | Annealingtemperatur |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calziumionen |
| Cl ⁻ | Chloridionen |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DNA | desoxyribonucleotide acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| cDNA | copy DNA |
| gDNA | genomic DNA |
| EM | Elektronenmikroskop |
| EZ | Eizelle / Oozyte |
| <i>et al.</i> | et alii (und andere) |
| etc. | et cetera (und so weiter) |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| h | Stunde |
| g | Gramm |
| HEPES | N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N´-2-ethan |
| hGAPDH | Humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| IVF | <i>in-vitro</i> -Fertilisation |
| IVM | <i>in-vitro</i> -Maturation |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| KOK | Kumulus-Oozyten-Komplex |
| LM | Lichtmikroskop |
| M | Molar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| mm | Millimeter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PBS | Phosphat-Buffered-Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| pH | pondus Hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration) |
| PI | Präimmunserum |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RNA | ribonucleotide acid (Ribonukleinsäure) |
| mRNA | messenger RNA |
| RT-Reaktion | Reverse Transkriptase-Reaktion (Reverse Transkription) |
| s | Sekunde |
| SEM | Standard error of mean (mittlere Standardabweichung) |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| V | Volt |
| vs | versus |
| v/v | volume per volume (Volumen/Volumen) |
| w/v | weight per volume (Gewicht/Volumen) |
| WW | Wechselwirkung |
| z.B. | zum Beispiel |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 | VDAC (Voltage-dependent anion channel) | 9 |
| 1.1.1 | Vorkommen von VDAC in Eukaryonten | 9 |
| 1.1.2 | VDAC in Oozyten | 12 |
| 1.1.3 | Funktionelle Bedeutung von VDAC | 13 |
| 1.1.3.1 | Transport von Ionen und Metaboliten | 13 |
| 1.1.3.2 | Apoptose | 13 |
| 1.1.3.3 | Interaktion von VDAC mit Proteinkomplexen | 14 |
| 1.1.3.4 | Interaktion von VDAC mit dem Zytoskelett | 14 |
| 1.1.3.5 | Die Bedeutung von VDAC bei der Volumenregulation | 14 |
| 1.2 | Die Oozyte | 16 |
| 1.2.1 | Morphologie der Oozyten | 16 |
| 1.2.2 | Oogenese und Follikulogenese | 17 |
| 1.2.3 | Volumenregulation weiblicher Gameten | 19 |
| 1.3 | Das Tiermodell | 20 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| | | |
| 2 | MATERIALIEN UND METHODEN | 22 |
| | | |
| 2.1 | Materialien | 22 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 22 |
| 2.1.2 | Medien und Pufferlösungen | 26 |
| 2.1.3 | Verwendete Kits | 28 |
| 2.1.4 | Geräte | 29 |
| 2.1.5 | Untersuchungsmaterial | 31 |
| 2.2 | Methoden | 32 |
| 2.2.1 | Gewinnung von Rinder-Oozyten | 32 |
| 2.2.2 | Gewinnung von Marmoset-Oozyten | 33 |
| 2.2.3 | Nachweis der VDAC-Genexpression in bovinen und Marmoset-Oozyten | 33 |
| 2.2.3.1 | Isolierung von gesamt-RNA aus bovinen und Marmoset-Oozyten | 33 |
| 2.2.3.2 | DNA-Isolierung aus bovinem und Marmoset-Ovargewebe | 34 |
| 2.2.3.3 | Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) | 34 |
| 2.2.3.4 | Oligonukleotid-Primer | 34 |
| 2.2.3.5 | Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2.3.6 | Gelelektrophorese der PCR-Produkte | 35 |
| 2.2.3.7 | Sequenzierung der PCR-Produkte | 36 |
| 2.2.4 | Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen im bovinen und Marmoset-Ovar | 38 |
| 2.2.4.1 | Verwendete anti-VDAC-Antikörper | 38 |
| 2.2.4.2 | Herstellung von Paraffinschnitten aus Rinder- und Marmoset-Ovarien | 38 |
| 2.2.4.3 | Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen in Ovarschnitten | 39 |
| 2.2.5 | Immunzytochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten | 40 |
| 2.2.5.1 | Indirekte Immunfluoreszenz mit lichtmikroskopischer Auswertung | 40 |
| 2.2.5.2 | Indirekte Immunfluoreszenz mit konfokalmikroskopischer Auswertung | 41 |
| 2.2.6 | Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen | 42 |
| 2.2.6.1 | Herstellung der Schnittpräparate für die Immunelektronenmikroskopie | 43 |
| 2.2.6.2 | Immunogoldreaktion auf Ultradünnschnitten | 44 |
| 2.2.7 | Funktionelle Untersuchungen zum Regulatory Volume Decrease boviner Oozyten | 45 |
| 2.2.7.1 | Inaktivierung des Komplementsystems in anti-VDAC-Antisera und Präimmunsere | 46 |
| 2.2.7.2 | Inkubation der Oozyten mit anti-VDAC-Antikörpern | 46 |
| 2.2.7.3 | Injektion der anti-VDAC-Antikörper in die Oozyten | 46 |
| 2.2.7.4 | Hypotone Stimulation der Oozyten | 47 |
| 2.2.7.5 | Fotografische Dokumentation der Größenveränderung der Oozyten | 47 |
| 2.2.7.6 | Statistische Auswertung der Ergebnisse zum RVD | 47 |
| 3 | ERGEBNISSE | 48 |
| 3.1 | Nachweis der Expression VDAC-kodierender Gene | 48 |
| 3.1.1 | VDAC-RNA-Expression in bovinen Oozyten | 48 |
| 3.1.2 | VDAC-RNA-Expression in Marmoset-Oozyten | 49 |
| 3.1.3 | Sequenzierung der PCR-Fragmente | 50 |
| 3.2 | Immunhistochemische Identifizierung der VDAC-Proteine im Ovar | 51 |
| 3.2.1 | Nachweis von VDAC-Protein im bovinen Ovar | 52 |
| 3.2.2 | Nachweis von VDAC-Protein im Marmoset-Ovar | 54 |
| 3.3 | Subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten | 58 |
| 3.3.1 | Immunzytochemische Identifizierung von VDAC-Proteinen in bovinen Oozyten | 58 |
| 3.3.1.1 | Lichtmikroskopischer Nachweis von VDAC mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz | 58 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.3.1.2 | Nachweis von VDAC mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie | 60 |
| 3.3.2 | Immunelektronenmikroskopische Identifizierung der VDAC1- und VDAC3-Proteine in bovinen Kumulus-Oozyten-Komplexen | 63 |
| 3.4 | Untersuchungen zur funktionelle Bedeutung von VDAC bei der Volumenregulation boviner Oozyten | 63 |
| 3.4.1 | Einfluss von anti-VDAC1-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten | 65 |
| 3.4.1.1 | Einfluss nach Antikörperinkubation | 65 |
| 3.4.1.2 | Einfluss nach Antikörperinjektion | 66 |
| 3.4.2 | Einfluss von anti-VDAC2-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten | 68 |
| 3.4.2.1 | Einfluss nach Antikörperinkubation | 68 |
| 3.4.2.2 | Einfluss nach Antikörperinjektion | 69 |
| 3.4.3 | Einfluss von anti-VDAC3-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten | 71 |
| 3.4.3.1 | Einfluss nach Antikörperinkubation | 71 |
| 3.4.3.2 | Einfluss nach Antikörperinjektion | 72 |
| 4 | DISKUSSION | 75 |
| 4.1 | Nachweis der Expression VDAC-kodierender Gene | 75 |
| 4.2 | Anti-VDAC-Antikörper | 76 |
| 4.3 | Immunhistochemische Identifizierung der VDAC-Proteine im Ovar | 77 |
| 4.4 | Subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten | 81 |
| 4.5 | Funktionelle Relevanz von VDAC-Antikörpern bezüglich des Regulatory Volume Decrease boviner Oozyten | 86 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 92 |
| 6 | SUMMARY | 94 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 96 |
| 8 | ANHANG | 107 |
| 8.1 | Danksagung | 107 |

1 Einleitung

1.1 VDAC (Voltage-dependent anion channel)

Als VDAC (Voltage-dependent anion channel) wird eine Gruppe von Membranproteinen mit einer Molekularmasse von 30 und 36 kDa bezeichnet. Sie bestehen aus ca. 285 Aminosäuren und liegen in einer klassischen β -Faltblattstruktur vor. Zunächst wurde VDAC in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien (Benz, 1988; Nakae, 1976) und in der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen (Schein *et al.*, 1976). Synonym zu der Bezeichnung VDAC wurde auch der Begriff Porin verwendet. Er beschreibt die Fähigkeit des Proteins, Poren zu bilden. Der Durchmesser des VDAC-Kanals beträgt im geöffneten Zustand etwa 3 nm, im geschlossenen Zustand 1,9 nm (Blachly-Dyson und Forte, 2001). Bisher sind drei Isoformen (VDAC1, VDAC2, und VDAC3) bekannt (Sampson *et al.*, 1996b; Sampson *et al.*, 1996a). Erkenntnisse über die porenbildenden Eigenschaften der VDAC-Isoformen beruhen auf Studien mit rekombinanten Proteinen (Xu *et al.*, 1999). Während VDAC1 und VDAC2 Poren in künstlichen Bilipidmembranen bilden, ist VDAC3 nicht zur Porenbildung befähigt (Aiello *et al.*, 2004)

1.1.1 Vorkommen von VDAC in Eukaryonten

In eukaryontischen Zellen wurde VDAC erstmals von Schein *et al.* (1976) beschrieben. Das aus Mitochondrienextrakten von *Paramecium aurelia* isolierte VDAC wurde in künstliche Lipiddoppelmembranen eingesetzt und seine Leitfähigkeit in Abhängigkeit zum Membranpotential gemessen. Es zeigte sich eine hohe Einzelkanalleitfähigkeit und eine deutliche Spannungsabhängigkeit, die einen Wechsel der Ionenselektivität von Anionen zu Kationen beinhaltet. Die größte Leitfähigkeit besteht bei Spannungen um 0 mV. In diesem Zustand ist der Kanal selektiv für Anionen. Die Leitfähigkeit sinkt auf ein Minimum bei Spannungen von 40 mV, sowohl positiv als auch negativ. Bei Spannungen größer als 20 mV zeigt sich eine veränderte Permeabilität und es kommt zu einer Selektivität für Kationen. Der Kanal ist etwa siebenmal durchlässiger für Cl⁻- als für K⁺- und Na⁺- Ionen sowie impermeabel für Ca²⁺- Ionen.

Dieselbe Arbeitsgruppe stellte auch Unterschiede in der quantitativen Verteilung der Kanäle fest und vermutet, dass VDAC nicht gleichmäßig verteilt, sondern punktuell gehäuft in der Membran verankert ist (Schein *et al.*, 1976). Obwohl die Eigenschaften des VDAC-Kanals bezüglich der Selektivität und der Spannungsabhängigkeit zwischen verschiedenen Spezies in hohem Maße konserviert sind, zeigt sich eine bemerkenswert geringe Ähnlichkeit bezüglich der Aminosäuresequenz. Werden alle bekannten Aminosäuresequenzen

verglichen, so stimmen lediglich an zehn Positionen die Aminosäuren überein. Die Sekundärstruktur dagegen erscheint in hohem Maße konserviert. Die Pore setzt sich aus β -Faltblättern zusammen, deren hydrophobe Aminosäuren der Membran angelagert sind und deren hydrophile Aminosäuren den Ionenkanal bilden (Blachly-Dyson und Forte, 2001).

Untersuchungen zur Tertiärstruktur des Mitochondrien-VDAC von *Neurospora crassa* (Guo und Mannella, 1993; Mannella, 1990; Mannella *et al.*, 1992), *S. cerevisiae* (Peng *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993) und aus humanem Gewebe (De Pinto *et al.*, 1991) lieferten erste Daten zur Berechnung eines Kanalmodells.

Die Forschergruppe um Casadio näherte sich in ihrer Arbeit einer genaueren Vorstellung des VDAC-Kanals mittels einer neuen computergesteuerten Berechnungsmethode. Grundlage dieser Berechnungsmethode ist die Ausrichtung der Sekundärstruktur des Proteins (Casadio *et al.*, 2002). Aus diesen Untersuchungen geht das heute gültige 3D-Modell für eukaryontisches VDAC hervor. Man geht davon aus, dass bei allen drei VDAC-Subtypen der N-Terminus des Proteins in Form einer α -Helix außerhalb der Membran liegt. Der Großteil der folgenden Sequenz durchspannt bei allen drei VDAC-Subtypen in Form von 16 β -Faltblättern die Membran. Extramembranär befinden sich kleinere Loops, innerhalb der Membran liegen zwei größere Loops (Abbildung 1).

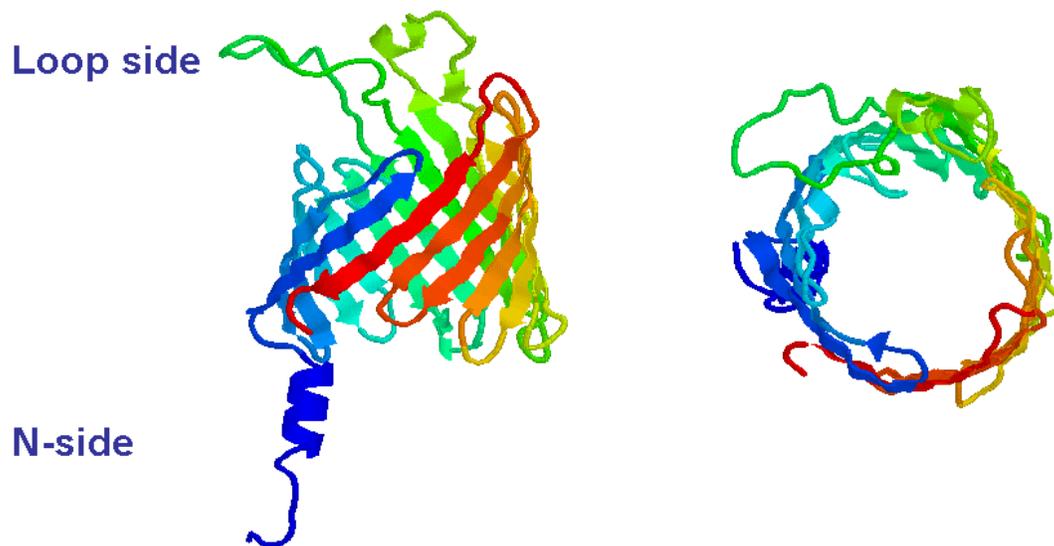


Abbildung 1: Schematische Darstellung der 3D-Struktur von VDAC in *Neurospora crassa* (Casadio *et al.*, 2002)

Das extramitochondriale Vorkommen von VDAC wurde erstmals mit Hilfe chromatographischer Verfahren sowie immunfluoreszenztechnisch in der Plasmamembran von humanen B-Lymphozyten nachgewiesen. Das Protein mit einer Molekularmasse von 31 kDa wurde zusammen mit Transplantationsantigenen aus der Plasmamembran humaner B-Lymphozyten isoliert, nach Edman sequenziert und aufgrund seiner hohen Homologie zu bekannten Sequenzen den VDAC-Proteinen zugeordnet (Thinnes *et al.*, 1989).

Dieselbe Arbeitsgruppe entwickelte monoklonale Antikörper gegen das extrazellulär liegende α -Helikale N-terminale Ende des humanen VDAC1-Proteins (Abbildung 2). Mit deren Hilfe konnte in immunhistologischen Untersuchungen VDAC in verschiedenen Geweben und Zellen nachgewiesen werden (Thinnes, 1992). Unter Verwendung der bereits beschriebenen Antikörper wurde VDAC in humanen Epithelzellen nachgewiesen (Babel *et al.*, 1991). Neben dem Vorkommen von VDAC in der äußeren mitochondrialen Membran und in der Plasmamembran wurden VDAC-Subtypen auch im Sarkoplasmatischen Retikulum humaner und Kaninchen-Skelettmuskulatur (Jurgens *et al.*, 1995), in präsynaptischen Vesikeln im Cortex von Rattengehirn und in Astrozyten (Guibert *et al.*, 1998), sowie in Endosomen (Reymann *et al.*, 1998), im Golgiapparat und dem Endoplasmatischen Retikulum (Okada *et al.*, 2004) gefunden. Letzte Zweifel über das extramitochondriale Vorkommen von VDAC wurden durch die Nutzung einer speziellen membranimpermeablen Markierung mit Biotin-Streptavidin zur Kennzeichnung von membranständigem VDAC in hämatopoetischen Zellen beseitigt (Bathori *et al.*, 2000). Sie konnten auch die Lokalisation von VDAC in Caveolae zeigen (Bathori *et al.*, 1999). Caveolae sind spezielle cholesterol- und sphingolipidreiche, sich einstülpende Bezirke der Plasmamembran, die in die Signaltransduktion eingebunden sind (Anderson, 1993). Neben dem Vorkommen von VDAC in biologischen Membranen wurde in der Literatur auch das extramembranäre Vorkommen von VDAC beschrieben. Die Arbeitsgruppe Hinsch wies in ihren Arbeiten VDAC2 im bovinen Hoden und VDAC2 und 3 in den Outer-Dense-Fibers des bovinen Spermien-Flagellums nach (Aires *et al.*, 2003b; Hinsch *et al.*, 2001; Hinsch *et al.*, 2004). Es liegt die Vermutung nahe, dass VDAC einen Einfluss auf die Spermienmotilität haben könnte. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass männliche VDAC3-Knock-out-Mäuse aufgrund eines Strukturdefektes des Spermium-Flagellums eine reduzierte Spermienmotilität aufwiesen. Der Strukturdefekt zeigte sich in Form des Verlustes eines der neun Mikrotubulidupletts und trat bei zwei Dritteln der epididymalen Spermien der VDAC3-Knock-out-Mäuse auf. Aufgrund dieses Defektes waren die männlichen Versuchstiere infertil. Die weiblichen Tiere dieser Versuche wiesen eine ungestörte Fertilität auf (Sampson *et al.*, 2001).

Nach erfolgreichem Klonen von humanem VDAC1 und VDAC2 (HVDAC1 und HVDAC2) in Hefezellen gelang die Identifikation und Charakterisierung der für HVDAC1 und HVDAC2 codierenden cDNA (Blachly-Dyson *et al.*, 1990; Blachly-Dyson *et al.*, 1993). Die Isolierung

der cDNA von HVDAC3 wurde von (Rahmani *et al.*, 1998) beschrieben. Auf genetischer Ebene zeigte sich, dass verschiedene Gene für VDAC codieren. Die drei Isoformen, die in Eukaryonten exprimiert werden, sind vermutlich ein Ergebnis alternativen Splicings (Aiello *et al.*, 2004).

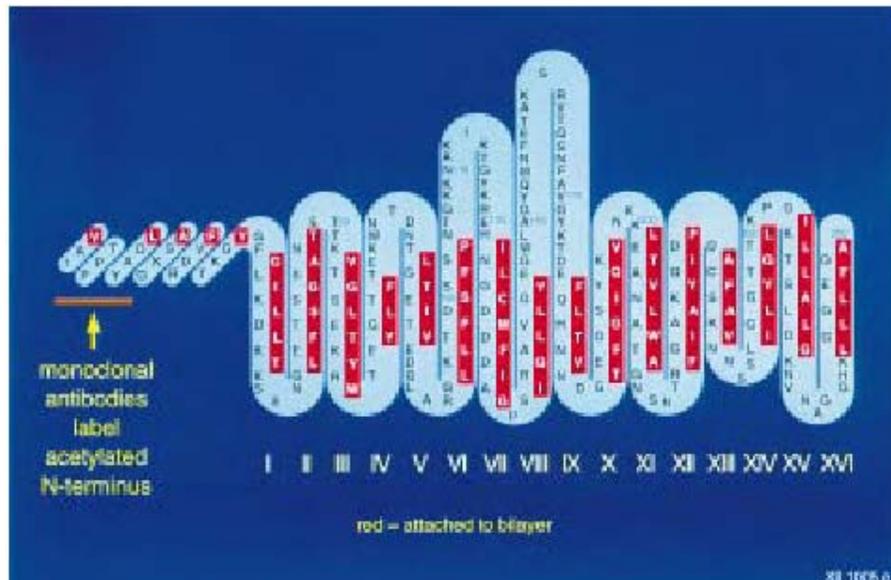


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sequenz und der mutmaßlichen transmembranären Anordnung von humanem VDAC1 in der Plasmamembran (Thinnes und Reymann, 1997)

1.1.2 VDAC in Oozyten

Über das Vorkommen von VDAC in Oozyten sind bislang nur wenige Untersuchungen bekannt. Die publizierten Ergebnisse beziehen sich alle auf *Xenopus laevis*-Oozyten. Steinacker *et al.* (2000) wiesen erstmalig VDAC in der Zytoplasmamembran von *Xenopus laevis*-Oozyten nach. In der konfokalen Lasermikroskopie der mit monoklonalen Antikörpern gegen VDAC1 inkubierten Oozyten zeigte sich eine punktweise, über die gesamte Zelloberfläche gleichmäßig im Abstand von ca. 10 µm verteilte Markierung. Im Zellinneren war keine Fluoreszenz festzustellen. Auch elektronenmikroskopische und immunbiochemische Untersuchungen bestätigten dieses Ergebnis. Derselben Arbeitsgruppe gelang es, mit molekularbiologischen Methoden die heterologe Expression von humanem VDAC1 in der Plasmamembran von *Xenopus laevis*-Oozyten zu induzieren. *Xenopus laevis*-Oozyten werden häufig für Studien basaler Zellfunktionen genutzt. So könnte die Möglichkeit der heterologen Expression des VDAC1-Kanals für zukünftige Studien der

elektrophysiologischen Eigenschaften von VDAC von großer Bedeutung sein (Schwarzer *et al.*, 2000).

Über das Vorkommen und die mögliche funktionelle Bedeutung von VDAC in Säugetier-Oozyten liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine publizierten Daten vor.

1.1.3 Funktionelle Bedeutung von VDAC

Der Nachweis in verschiedenen Zellkompartimenten und die ubiquitäre Expression von VDAC in unterschiedlichen Zelltypen legen eine multifunktionelle Bedeutung des VDAC-Proteins nahe.

1.1.3.1 Transport von Ionen und Metaboliten

In der äußeren Mitochondrienmembran wird VDAC für den Großteil des Stoffaustausches verantwortlich gemacht und ist damit maßgeblich am aeroben Stoffwechsel beteiligt. Im geöffneten Zustand ist VDAC permeabel für Cl⁻, ATP, ADP, NADH und NADPH (Rostovtseva und Colombini, 1996; Rostovtseva *et al.*, 2002). Experimentell ist VDAC sogar für ungeladene Moleküle mit einem Molekulargewicht bis 5000 Da wie z.B. Inulin, Dextran oder Polyethylenglycol permeabel (Colombini, 1980).

1.1.3.2 Apoptose

Außerdem spielt VDAC1 bei der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in der frühen Phase der Apoptose eine wichtige Rolle (Shimizu *et al.*, 1999). Cytochrom *c* leitet wiederum die Aktivierung der Caspase-Kaskade ein, deren proteolytische Spaltung zum programmierten Zelltod führt. Der Durchmesser der VDAC-Pore von ca. 3 nm im geöffnetem Zustand ist im Grunde zu gering für die Passage eines gefalteten Proteins wie Cytochrom *c*. Neuere Untersuchungen wiesen auf eine Di-, Tri- oder Tetramerbildung von VDAC hin, was die Vergrößerung der Pore und damit die Passage von Cytochrom *c* erklären könnte (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2006). Auch der Einfluss unterschiedlicher Apoptose-regulierender Faktoren auf VDAC war Gegenstand der Forschung. Das Ergebnis zeigte, dass die Proteine der Bcl2-Familie, wie Bax und Bak bei der Freisetzung von Cytochrom *c* direkt mit VDAC interagieren, während die BH3-Apoptoseregulatoren keinen Einfluss auf den VDAC gesteuerten Cytochrom *c*-Release nehmen. Des Weiteren bildet VDAC gemeinsam mit der Adenine-Nucleotide-Translocase (ANT) und Cyclophilin D (CyP D) die Mitochondrial Permeability-Transition-Pore (PTP), die verantwortlich ist für die Calcium-Homöostase an der inneren Mitochondrienmembran. Diese spielt ebenfalls eine Rolle im Apoptosegeschehen (Crompton, 1999). Ist das Ca²⁺-Gleichgewicht an der inneren Mitochondrienmembran

gestört, kommt es zur Schwellung der Matrix und zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, was wiederum zu Cytochrom c-Freisetzung und Apoptose führt (Colombini, 2004; Tsujimoto und Shimizu, 2000). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass der VDAC-Kanal der Plasmamembran ebenfalls am Apoptosegeschehen beteiligt ist. Apoptose-induzierte Zellen einer Hippocampus-Zelllinie (HT22) zeigten eine erhöhte Anzahl an VDAC-Kanälen in der Plasmamembran sowie eine stärkere Aktivität dieser Kanäle gegenüber Kontrollzellen. Die Blockade des VDAC-Kanals mittels VDAC-spezifischen Antikörpern verhinderte in diesen Studien die Apoptose (Akanda und Elinder, 2006; Elinder *et al.*, 2005).

1.1.3.3 Interaktion von VDAC mit Proteinkomplexen

VDAC dient auch als Verankerungsprotein und als Koordinator von großen Proteinkomplexen. So wurde zum Beispiel bei verschiedenen Enzymen wie Hexokinase, Glucokinase, Glycerol-Kinase und der mitochondrialen Kinase eine Assoziation zum VDAC-Protein gefunden (Brdiczka, 1994). Andere Forschungen zeigen VDAC als eine Komponente des peripheren Benzodiazepinrezeptors (Bureau *et al.*, 1992; McEnery *et al.*, 1992). Ein funktioneller Zusammenhang scheint auch zwischen VDAC und dem ORDIC (outwardly rectifying depolarisation induced chloride channel) zu bestehen, dessen Funktion bei der Zystischen Fibrose gestört ist (Reymann *et al.*, 1995).

1.1.3.4 Interaktion von VDAC mit dem Zytoskelett

Ein weiteres Charakteristikum der VDAC-Proteine ist die Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts wie MAP2, Gelsolin und G-Aktin (Kusano *et al.*, 2000; Linden und Karlsson, 1996; Xu *et al.*, 2001). Damit ist VDAC vermutlich auch an der mitochondrialen Beweglichkeit sowie an der Zellmotilität beteiligt (Roman *et al.*, 2005).

1.1.3.5 Die Bedeutung von VDAC bei der Volumenregulation

Die Funktion von VDAC als Chloridkanal legt die Hypothese nahe, dass das Kanalprotein eine wichtige Rolle bei der Volumenregulation verschiedener Zellen spielen könnte. Chloridkanäle sind generell vor allem beim Mechanismus des Regulatory Volume Decrease (RVD) von Bedeutung. Zellen, die einem hypotonen Milieu ausgesetzt sind, reagieren zunächst mit einer Volumenzunahme. Die meisten Vertebratenzellen besitzen die Fähigkeit, sich aktiv durch Volumenreduktion an ein hypotones Milieu anzupassen. Der Vorgang wird als Regulatory Volume Decrease (RVD) bezeichnet. Nachdem Zellen in einer hypotonen Umgebung zunächst anschwellen, kommt es zu einem Ausstrom von Cl⁻ und K⁺- Ionen aus

der Zelle, der - osmotisch bedingt - von einem Wasserausstrom begleitet wird. Als hauptverantwortlich für den Cl⁻- und K⁺-Ausstrom gelten VSOACs (Volume-sensitive osmolyte and anion channels) (Hermoso *et al.*, 2002). Es sind jedoch noch weitere Chloridkanäle beschrieben: der GABA- und der Glycinrezeptor (Betz, 1992; Smith und Olsen, 1995), der CFTR-Kanal (Riordan, 1993), der Ca²⁺-aktivierte Chloridkanal (Gruber *et al.*, 1998), die CLC Chloridkanal-Familie (Jentsch *et al.*, 1999) und die VDAC-Kanalproteine. Neben den VSOACs werden die Kanäle der CLC- Familie sowie die VDAC-Kanalproteine im Zusammenhang mit der Volumenregulation von Zellen diskutiert.

Dermietzel *et al.* (1994) untersuchten mittels Patch clamp-Experimenten die Rolle von VDAC1 bei der Volumenregulation von Astrozyten. Mit einem gegen das N-terminale Ende von VDAC1 gerichteten Antikörper gelang es den Kanal zu blockieren. Dies deutet darauf hin, dass das N-terminale Ende essentiell für den Öffnungsmechanismus des VDAC1-Kanals ist. Es wird vermutet, dass die Präsenz von VDAC in Astrozyten von entscheidender Bedeutung für die intrakranielle Volumenregulation und damit für den Pathomechanismus des Hirnödems ist (Dermietzel *et al.*, 1994). Eine direkte Beteiligung von VDAC1 an der Volumenregulation von Zellen konnte auch bei B-Lymphozyten und HeLa-Zellen gezeigt werden. In isotoner Ringer-Lösung induziert Gadolinium das Anschwellen von B-Lymphozyten und HeLa-Zellen. Diese Volumenzunahme lässt sich durch die Präinkubation der Zellen mit anti-VDAC1-Antikörpern spezifisch inhibieren (Thinnes *et al.*, 2000b).

Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von VDAC1 am RVD von HeLa-Zellen gezeigt werden. Nach hypotoner Stimulation wurde das RVD in HeLa-Zellen durch die Präinkubation der Zellen mit dem monoklonalen anti-human Type-1-VDAC-Antikörper verhindert. Innerhalb einer Minute nach hypotoner Stimulation mit ca. 200 mM Ringer-Lösung nahmen die Zellen ca. 8% an Volumen zu. Zellen, die nicht mit anti-VDAC-Antikörpern vorbehandelt waren, reduzierten in den folgenden 15 min ihr Volumen wieder bis zu ihrem Ausgangswert (RVD). Dagegen blieben die mit VDAC-Antikörpern präinkubierten HeLa-Zellen unverändert groß (Thinnes *et al.*, 2000a).

Es existieren auch Hinweise auf einen anderen als den bisher beschriebenen Bezug von VDAC1 zum Mechanismus des RVD. Sie basieren auf der Tatsache, dass extrazelluläres ATP über die Aktivierung eines P2Y₂ Rezeptor-vermittelten Cl⁻- und K⁺-Kanals das RVD nach hypoton bedingtem Anschwellen unterstützt, sowie auf der Funktion von VDAC1 als ATP-Kanal. Es konnte gezeigt werden, dass Atemweg-Epithelzellen von VDAC1 Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Mäusen 50% weniger ATP ausschleusen. Dadurch läuft in Epithelien von VDAC1 Knock-out-Mäusen das durch Hypotonizität hervorgerufene RVD im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen langsamer ab (Okada *et al.*, 2004).

Ein Zusammenhang zwischen VDAC und der Volumenregulation von Oozyten ist bislang in der Literatur nicht beschrieben.

1.2 Die Oozyte

1.2.1 Morphologie der Oozyten

In reifem Zustand sind Oozyten die größten Zellen des Organismus. Sie stellen sich als zytoplasmareiche, sphärische Zellen dar, die von der Zona Pellucida und von Follikelzellen umgeben sind (Abbildung 3). Der Durchmesser der Oozyten zum Zeitpunkt der Ovulation ist unter anderem abhängig vom Dottergehalt und variiert bei verschiedenen Säugetierarten. Bovine und canine Oozyten haben einen Durchmesser von etwa 150 μm , humane und porcine Oozyten sind 100-120 μm groß (Junqueira und Carneiro, 1996), *Callithrix jacchus*-Oozyten weisen einen Durchmesser von 90-100 μm (Gilchrist *et al.*, 1995) und Maus-Oozyten einen Durchmesser von ca. 80 μm auf. Im Zytoplasma sind neben dem Zellkern, der den Syntheseort der Ribosomen sowie vieler Proteine darstellt (Fair *et al.*, 2001), die Zellorganellen lokalisiert. Die Mitochondrien unterscheiden sich je nach Entwicklungsstadium der Oozyten in Form, Anzahl und Verteilungsmuster (Tarazona *et al.*, 2006). In den frühen Entwicklungsstufen sind die Mitochondrien von geringer Anzahl, längsoval geformt, enthalten in den meisten Fällen nur einen Vesikel und quer angeordnete Cristae. Mit weiterem Oozytenwachstum nehmen die Mitochondrien an Anzahl zu. Ihre Form wird abgerundet, sie enthalten mehrere Vakuolen und die Cristae sind in Stapeln angeordnet (Yanagimachi, 1994). Der Golgiapparat, zuständig für den intrazellulären Proteintransport, ist hauptsächlich in immaturren Oozyten zu finden. Während der Maturation der Oozyten bewegt sich der Golgiapparat zum animalen Pol hin und ist in maturaen Oozyten nicht mehr vorhanden (Colman *et al.*, 1985). Der Golgiapparat, die Ribosomen und das Endoplasmatische Retikulum sind unter anderem an der Synthese der Corticalen Granula beteiligt, die im Zuge des folliculären Wachstums entstehen und in Metaphase II-arretierten Oozyten unter der Plasmamembran liegen. Sie haben eine Größe von 0,2-0,6 μm . Unter anderem enthalten sie Glycosidasen und Proteinasen, deren Freisetzung in den perivitellinen Spalt das „Hardening“ der Zona Pellucida und den Polyspermieblock nach vollzogener Befruchtung bewirken (Hoodbhoy und Talbot, 1994; Sathananthan *et al.*, 2006). Die Anzahl der Lysosomen in gereiften Oozyten ist gering, nimmt aber mit zunehmendem Alter der Oozyten zu. Sie gelten als Zeichen der Atresie.

Die Plasmamembran von Oozyten besitzt beim Säugetier Mikrovilli, die mit der Zellmembran der Follikelzellen in Verbindung stehen. Auch die Kumuluszellen bilden Ausläufer, die durch die Zona Pellucida hindurch weit in das Zytoplasma der Oozyte reichen. Die Ausläufer der Follikelzellen stehen über Desmosomen und gap junctions mit der Oozyte in Verbindung (Sathananthan *et al.*, 2006).

Umgeben ist die Oozyte von der Zona Pellucida, einer extrazellulären Matrix. Sie besitzt neben einer mechanischen Schutzfunktion wesentliche Bedeutung bei der

speziesspezifischen Spermatozoenbindung, der Induktion der akrosomalen Reaktion und der Verhinderung einer Mehrfachbindung (Yanagimachi, 1994). Die Bestandteile der Zona Pellucida sind Proteoglycane und Glycoproteine, deren Aufbau und Dicke speziesspezifische Unterschiede aufweist. Ihre Dicke beträgt beim Rind beispielsweise 27 μm (Sinowitz *et al.*, 2001) und beim Weißbüschelaffen 16 μm (Gilchrist *et al.*, 1995). Die Synthese der Zona Pellucida beginnt in primären Follikeln. Sie läuft speziesspezifisch entweder ausschließlich in den Oozyten oder auch in den anliegenden Granulosazellen ab. Beim Marmoset-Affen werden die ZP-Glycoproteine sowohl in den Oozyten als auch in den Follikelzellen transkribiert und translatiert (Bogner *et al.*, 2004). Zwischen der Zytoplasmamembran der Oozyte und der Zona Pellucida befindet sich der perivitelline Spalt.

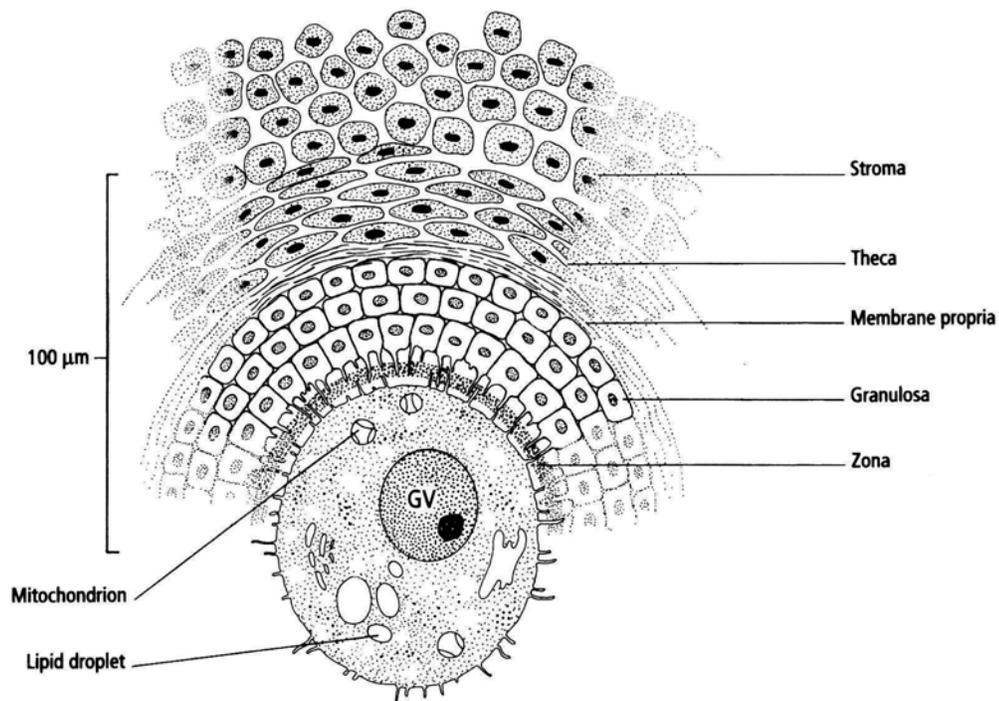


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Oozyte mit angrenzenden Follikelstrukturen (Sekundärfollikel). Aus Johnson: „Essential Reproduction“ (Johnson und Everitt, 1995)

1.2.2 Oogenese und Follikulogenese

Die Oogenese beginnt in der frühen Fetalperiode mit der Einwanderung von Primordialkeimzellen in die Gonadenanlagen. Diese Zellmigration wird von diversen molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen Keimzellen und somatischen Zellen reguliert. Die Oogonien vermehren sich durch zahlreiche mitotische Teilungen und bleiben untereinander über Zytoplasmabrücken verbunden. Die Differenzierung von Oogonien zu

primären Oozyten ist durch den Eintritt in die Meiose und damit durch einen Verlust der Teilungsfähigkeit gekennzeichnet (Voronina und Wessel, 2003). Im Ovar wird der Übergang von Mitose zu Meiose durch Signale somatischer Zellen verursacht (Nakatsuji und Chuma, 2001). In der Prophase der ersten Reifeteilung unterbrechen die primären Oozyten nach vollzogenem „crossing over“ der Chromosomen ihre Weiterentwicklung. Dies geschieht speziesspezifisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bei den meisten Tierarten aber noch pränatal (Schnorr, 1996). In dieser meiotischen Pause, die bis zum Eintritt der Geschlechtsreife anhält, finden hohe Syntheseleistungen statt, aus denen eine Volumenzunahme der Oozyte um das 200-fache resultiert (Moor *et al.*, 1990). Die Oozyte ist durch einen prominenten Nucleus, den sogenannten „Germinal Vesicle“ gekennzeichnet, der Zeichen ihrer transkriptionellen Aktivität ist. Durch die Zunahme der total-RNA um ca. 300% bereitet die primäre Oozyte die Grundlage für ihre weitere Entwicklung und für die frühe Embryonalentwicklung (Sternlicht und Schultz, 1981). Alle Oozyten werden von einem einschichtigen Plattenepithel eingeschlossen und bilden mit diesem den Primordialfollikel. Die Bildung eines Follikels ist essentiell für das Oozytenwachstum und die Bildung reifer Oozyten. Zell-Zell-Interaktionen zwischen Oozyten und Follikelzellen finden in beide Richtungen statt und steuern sowohl das Oozyten- als auch das Follikelwachstum (Voronina und Wessel, 2003).

Mit Einsetzen der Pubertät und Aufnahme der zyklischen Ovarfunktion wird in den dominanten Follikeln, unter anderem bedingt durch die Freisetzung der beiden Hypophysenhormone FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) bei Herbeiführung der Ovulation, die Meiose fortgesetzt. Aber auch weitere Substanzen, wie der M-Phase-Promoting Faktor (MPF) und Calciumionen sind essentiell für die Wiederaufnahme der Meiose und den Germinal Vesicle Breakdown (GVBD). Der Zeitraum vom GVBD bis zur Beendigung der ersten Reifeteilung wird als Maturation bezeichnet. Er schließt aufeinander abgestimmte Veränderungen des Nucleus sowie des Zytoplasmas ein (Tosti, 2006). Nachdem während der ersten Reifeteilung die homologen Chromosomen getrennt wurden, folgt die Abschnürung des ersten Polkörpers von der sekundären Oozyte in den perivitellinen Raum. Direkt im Anschluss daran und zeitgleich mit der Ovulation tritt die sekundäre Oozyte in die zweite Reifeteilung. Allerdings verharrt die Meiose in der Metaphase erneut und wird erst nach Fusionierung von Spermatozoon und Oozyte beendet. Nach der zweiten Reifeteilung sind die haploide Oozyte und drei Polkörper entstanden.

Die Follikulogenese ist das Resultat einer komplexen Balance zwischen Proliferation, Differenzierung und Zelltod beider Bereiche des Follikels: den Keimzellen und den somatischen Zellen (Hussein *et al.*, 2005). So entwickelt sich zeitgleich mit der Oogenese der Primordialfollikel durch Zunahme der Anzahl und Differenzierung der Follikelzellschichten

über den primären, sekundären und tertiären Follikel zum Graaf'schen Follikel, der unter LH- und FSH-Wirkung oder bei Kaninchen und Katze durch mechanische Simulation zur Ovulation führt (Schnorr, 1996).

1.2.3 Volumenregulation weiblicher Gameten

Bisherige Untersuchungen zur Volumenregulation weiblicher Gameten beziehen sich hauptsächlich auf befruchtete Oozyten und präimplantierte Embryonen. Nicht nur somatische Zellen, auch Oozyten und Embryonen haben die Fähigkeit, ihre Größe genau zu regulieren. Oozyten wachsen bis zu einem bestimmten Durchmesser, der für jede Spezies charakteristisch ist. Die reifen Oozyten halten diesen Durchmesser über einen längeren Zeitraum aufrecht. Dies zeigt, dass Oozyten über einen Mechanismus verfügen müssen, mit dessen Hilfe sie ihre Größe steuern können (Baltz, 2001). In besonderer Weise sind Amphibien von der Fähigkeit zur Volumenregulation ihrer Gameten abhängig. *Xenopus laevis*-Oozyten werden in Teichen abgelegt, in welchen das Wasser mit ca. 200 mOsmol deutlich hypoton ist. Die Fähigkeit zum Regulatory Volume Decrease ist jedoch erst maturierten *Xenopus laevis*-Oozyten möglich. Unreife Frosch-Oozyten reagieren auf Hypotonizität mit stetiger Volumenzunahme, die in den meisten Fällen zum Bersten der Oozyten führt. Es werden mehrere Faktoren diskutiert, die zum Überleben weiblicher Gameten in Lösungen mit geringerer Osmolarität beitragen: 1. der Ausstrom von Osmolyten, 2. die Erhöhung des intrazellulären Druckes, 3. die Undurchlässigkeit der Plasmamembran für Wasser und 4. die Veränderung des Aggregatzustandes des Zytoplasmas (z.B. Gel vs. Sol) (Kelly *et al.*, 1995).

Untersuchungen von Seguin und Baltz (1997) zeigten, dass Maus-Zygoten in der Lage sind, ihr Volumen nach hypoton bedingtem Anschwellen zu regulieren (Regulatory Volume Decrease). Das RVD konnte sowohl durch K⁺- als auch durch Cl⁻- Kanalblocker verhindert werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von K⁺- und Cl⁻- Kanälen an diesem Mechanismus hin (Seguin und Baltz, 1997). Eine andere Studie zeigte, dass auch die Aminosäure Taurin als Osmolyt in Maus-Oozyten und -Zygoten wirksam ist, um osmotisch bedingte Imbalancen auszugleichen (Dumoulin *et al.*, 1992).

Es erwies sich, dass Embryonen sehr sensitiv bezüglich der Osmolarität der Kulturmedien sind. Diese Sensitivität ist besonders im Zygotenstadium ausgeprägt. Erstaunlich ist die Feststellung, dass präimplantierte Embryonen sich *in vitro* besser entwickeln, wenn die Osmolarität des Kulturmediums geringer als die *in vivo* vorherrschende Osmolarität gewählt wird (Baltz, 2001).

1.3 Das Tiermodell



Abbildung 4: *Callithrix jacchus*, Marmoset oder Weißbüschelaffe

Für den Großteil der Versuche wurden als Untersuchungsmaterial Rinderovarien verwendet. Aufgrund der guten Verfügbarkeit von Rinderovarien wurden diese zur Etablierung aller Versuche sowie für Versuche, zu deren Durchführung frisches Untersuchungsmaterial notwendig war, eingesetzt.

Um einen Hinweis auf humane Bedingungen zu erhalten, aber limitiert durch die stark eingeschränkte Verfügbarkeit an Untersuchungsmaterial, wurden wenige Untersuchungen mit Gewebe von Primaten durchgeführt. Als Modell diente dabei der Marmoset-Affe, *Callithrix jacchus*. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit zum Menschen und ihrer hohen Fortpflanzungsrate wird der Marmoset-Affe in der biomedizinischen Forschung gerne als Modell für den Menschen herangezogen. Als Vertreter der Neuwelt-Primaten gehört der Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus* / Marmoset-Affe (NCBI-Taxonomy ID: 9483) zur Familie der Callitrichiden (Krallenaffen), einer Unterordnung der Neuwelt- oder Breitnasenaffen (*Platyrrhini*). Der Marmoset-Affe wiegt etwa 300-360 g bei einer Körpergröße von etwa 12-15 cm. Damit gehört er zu den kleineren Vertretern der Krallenaffen. Seine Lebenserwartung in Gefangenschaft beträgt etwa 16 Jahre. Charakteristisch sind seine abstehenden weißen Ohrbüschel, von denen sich die deutsche Bezeichnung ableitet. Des Weiteren zeichnet er sich durch einen weißen Stirnfleck aus. Das Fell ist graubraun mit heller Querbänderung, die besonders stark am Schwanz ausgeprägt ist.

Der natürliche Lebensraum der Weißbüschelaffen beschränkt sich auf die Regenwälder an der Nordostküste Brasiliens. Sie leben in Gruppen von zwei bis zwölf Mitgliedern in maximal fünf Hektar umfassenden Revieren. Sie sind tagaktiv und ernähren sich in erster Linie von Baumsäften, Früchten, Blüten, Insekten und kleinen Wirbeltieren (Wolters und Immelmann, 1988). Die Geschlechtsreife erlangen die Tiere in einem Alter von 18-20 Monaten (Abbott und Hearn, 1978). Der ovarielle Zyklus der Weibchen von 28 Tagen entspricht in etwa dem der Frau. Nach einer Tragezeit von ungefähr 148 Tagen gebären die Weibchen in der Regel Zwillinge.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten die VDAC-Subtypen 1, 2 und 3 im bovinen Hoden und die VDAC-Subtypen 2 und 3 in Spermatozoen, hier besonders in den outer dense fibers (ODF) nachgewiesen werden (Aires *et al.*, 2003a; Hinsch *et al.*, 2004). In diesen Experimenten scheinen die VDAC-Proteine, wie auch die Untersuchungen von Sampson 2001 mit VDAC3 Knock-out-Mäusen zeigten, von Bedeutung für die Spermatozoenmotilität und damit für die Fertilität zu sein (Sampson *et al.*, 2001). Über das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung von VDAC-Subtypen in den weiblichen Gameten der Säugetiere ist bisher nichts bekannt. Erste Hinweise zum Vorkommen von VDAC1 in *Xenopus laevis*-Oozyten bildeten den Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen in Säugetieroozyten. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von anti-VDAC-Antikörpern die Präsenz der unterschiedlichen VDAC-Subtypen im Ovar und deren Lokalisation in Zellen des Säugerovars am Beispiel vom Rind und *Callithrix jacchus* zu untersuchen. Weiterhin sollten unter Verwendung der anti-VDAC-Antikörper die funktionelle Relevanz der VDAC-Subtypen bezüglich der Volumenregulation in bovinen Oozyten überprüft werden.

Es wurden folgende Arbeitsziele definiert:

1. Nachweis der Expression der VDAC1, 2 und 3 kodierenden Gene in bovinen und Marmoset-Oozyten mittels RT-PCR.
2. Immunhistochemischer Nachweis von VDAC1, 2 und 3 Protein im bovinen und Marmoset-Ovar unter Berücksichtigung möglicher speziesspezifischer Unterschiede.
3. Die Durchführung immunzytochemischer und immunelektronenmikroskopischer Experimente zur Darstellung der subzellulären Lokalisation von VDAC1, 2, und 3 in bovinen Oozyten.
4. Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der VDAC-Subtypen bezüglich des Regulatory Volume Decrease in bovinen Oozyten mit Hilfe spezifischer anti-VDAC-Antikörper.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

AMS GmbH, Wiesbaden, Deutschland:

Ambion® RNA later
Ambion® DEPC-Treated water

Baxter, Belgien:

Isotone Kochsalzlösung

Becton Dickinson Labware, USA:

Beaver® Micro-Blade, angled 45°
Falcon® org. Kulturgewebsschalen mit Zentrumsvertiefung, 60x15 mm
Falcon® Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml
Mikrolance™ 3, 20G Kanülen 0,9x40 mm
Petrischalen 60x15 mm, 100x20 mm

Bio Rad, München, Deutschland:

100 bp-Marker, Molecular Ruler

Biomeda Corp., USA:

Crystal Mount

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland:

PCR Softtubes 0,5 ml

Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland:

Blaubrand® Einmal-Mikropipetten mit Ringmarke 200 µl

Braun, Melsungen, Deutschland:

Einmalspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml

British Bio Cell international, England:

Streptavidin: Immunogold EM, 20 nm

Ziegen anti-Kaninchen IgG: Immunogold EM, 10 nm

Calbiochem, Schwalbach, Taunus, Deutschland:

Anti-Porin 31 HL (Ab-1) Maus mAb

Maus IgG_{2a}

DAKO Cytomation, Denmark:

Chem Mate™ Hematoxylin

Eppendorf, Hamburg, Deutschland:

dNTP Mix 100 mM

Femtotip 2

Mikroloader

PCR-Tubes 0,2 ml, 0,5 ml

Sterile VacuTips

Euroclone, Italien:

Fettfreies Milchpulver

Fresenius, Bad Homburg, Deutschland:

Ampuwa (H₂O)

GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland:

L-15 Leibovitz-Medium

Glaswerk Wertheim, Wertheim, Deutschland:

Küvetten

Invitrogen, England:

Agarose

RNase Inhibitor

Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenrot, Deutschland:

Pasteurpipetten aus Plastik, 3 ml

Labvision Corporation, USA:

Large Volume Streptavidin: Peroxidase (ready to use)

Leica Mikrosysteme GmbH, Österreich:

Ultrastain1 und Ultrastain2

London Resin Company Ltd, England:

LR-White Hard Grade Acrylic Resin

Hexagon Dünnsteg-Netzchen 100 mesh Nickel, Kupfer

Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland:

Deckgläser

Objekträger

Merck, Darmstadt, Deutschland:

Agar

Calciumchlorid

Chrom(3)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat

di-Natriumhydrogenphosphat

Essigsäure

EDTA (Titriplex III)

Formaldehydlösung 37%

Isopropanol

Kaisers Glyceringelatine

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Magnesiumchlorid-Hexahydrat

Natriumacetat

Natriumphosphat-Dihydrat

Wasserstoff-Peroxid

Xylol

PFM Produkte für Medizin AG, Köln, Deutschland:

Feather® Einmalskalpell

Pierce, USA:

Zeba™ Desalt spin columns

Plano, Wetzlar, Deutschland:

Citifluor
Gelatinekapseln

Promega, Mannheim, Deutschland:

Random Hexamer Primer

Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland:

Aza-2
Ethanol
Ethidiumbromid
Methanol
Methylenblau
Natriumbicarbonat
Paraformaldehyd
Trichlormethan
Trypanblau

Roth, Karlsruhe, Deutschland:

Diagnostika Objektträger mit 8 Kammern (Spotslides)
Glycin
Natriumchlorid
Tris-Base

Santa Cruz Biotechnology, USA:

Ziegen Polyklonale IgG anti-Human VDAC2 (C17)
Esel anti-Ziegen IgG:FITC
Normales Ziegen IgG

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland:

Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml

Serva, Heidelberg, Deutschland:

Triton X-100

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland:

Anti-Maus IgG: Biotin

Anti-Maus IgG: FITC
Anti-Kaninchen IgG: Biotin
Anti-Kaninchen IgG: FITC
BSA
Borsäure
Bromphenolblau
FBS (Fetales Kälberserum)
Gentamycin-Sulfat
Glutaraldehyd 25%
HEPES
Mineralöl
Monoklonales anti-Kaninchen IgG: Biotin
Natrium-Pyruvat
Polyvinylpyrrolidon
Sucrose
TCM 199
Ziegenserum

Terumo, Leuven, Belgien:

Einmalkanülen, Nr. 17, 0,55x25

Vogel, Gießen, Deutschland:

Paraffin

Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster, Deutschland:

Borax

2.1.2 Medien und Pufferlösungen

Chromalaun-Gelatine:

1 g Gelatine
0,1 g Chrom(3)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat
260 ml Aqua dest.

Fixierungs- und Permeabilisierungslösung (Qi *et al.*, 2002):

100 ml PBS (pH 7,2)
400 mg Polyvinylpyrrolidon
3,7% Formaldehydlösung
0,1% Triton X-100

Folikeldissektionsmedium:

Leibovitz L-15 Medium
5% (v/v) FBS
0,5 mM Natrium-Pyruvat
5% (v/v) Gentamycin-Sulfat
pH 7,4

Folikelpunktionsmedium:

Leibovitz L-15 Medium
10% (v/v) FBS
0,5 mM Natrium-Pyruvat
5% (v/v) Gentamycin-Sulfat
pH 7,4

Methacarn-Lösung:

60% (v/v) Methanol
30% (v/v) Trichlormethan
10% (v/v) Essigsäure

PBS (Phosphate- Buffered- Saline):

120 mM Natriumchlorid
4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
10 mM di-Natriumhydrogenphosphat
pH 7,4

Probenaufnahmepuffer (6x):

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylenen cyanol FF
40% (w/v) Sucrose in Aqua dest.

Richardson- Blau:

A: 1% (w/v) Aza-2 in Aqua bidest.

B: 1% (w/v) Metylenblau in Aqua bidest. in 1% (w/v) Borax in Aqua bidest.
gelöst

A und **B** im Verhältnis 1:1 mischen

Ringer Lösung:

145 mM Natriumchlorid

5 mM Kaliumchlorid

2 mM Calciumchlorid

1 mM Magnesiumchlorid

10 mM Glucose

10 mM HEPES

5xTBE (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer):

54 g Tris Base

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5 M EDTA

pH 8,0

TBS (Tris-Buffered-Saline):

150 mM Natriumchlorid

25 mM Tris Base

pH 7,4

TCM air (Tissue Culture Medium):

1,51 g TCM 199 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES

0,0022 g Na-Pyruvat

0,035 g Natriumbicarbonat

0,005 g Gentamycin-Sulfat

0,1 g BSA (FAF)

ad 100 ml H₂O (Ampuwa)

2.1.3 Verwendete Kits

Biologo, Kronshagen, Deutschland:

AEC Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland:

DNeasy Tissue Kit
Omniscript RT-Kit
RNase-free DNase Set
RNeasy Mini Kit
QIAquick PCR Purification Kit

2.1.4 Geräte

Bender & Hobein AG, Schweiz:

Vortex Genie 2 TM

Bio Rad, München, Deutschland:

Power Pac 200

Biozym Diagnostika GmbH, Hameln, Deutschland:

PTC-200 Peltier Thermal Cycler

Canon, Krefeld, Deutschland:

Digitalkamera Power Shot G3

Eppendorff, Hamburg, Deutschland:

Cell Tram Air
Femto jet
Transfer Man NK2

Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland:

Accumet® Research AR 20 pH Meter

Heraeus, Hanau, Deutschland:

Begasungsbrutschrank
Biofuge fresco

Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland:

Hettich Universal 30F, Zentrifuge

Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen, Deutschland:

IKA-Combimag RCT

IKA-Schüttler MTS 4

Joun GmbH, Unterhaching, Deutschland:

Trockenschrank

Leica AG, Solms, Deutschland:

Leica WILD M8

Leitz, Bensheim, Deutschland:

Mikrotom 212 nach Minot

Leybold-Heraeus, Hürth, Deutschland:

Lyovac GT2

Millipore , Eschborn, Deutschland:

Wasseraufbereiter

PeqLab, Erlangen, Deutschland:

Easy Cast Minigelsystem Modell B2

Reichert-Jung, Österreich:

Ultracut Ultramikrotome S/FC

Ultrastainer LKB 2168

Zeiss, Frankfurt, Deutschland:

Axioskop 2 mot plus mit Fotoeinheit AxioCam MRc und Programmpaket

AxioVision 4.4 SP2

Konfokales Mikroskop LSM 510 Axioplan 2 Imaging

Inverses Mikroskop Axiovert 100 mit elektr. Mikromanipulationseinheit

Inverses Mikroskop Axiovert 405M mit Photoeinheit

Stereomikroskop Stemi SV 11

Stereomikroskop Stemi SV 6

Transmissionselektronenmikroskop EM 109

Zweckform, Oberlaindern/Valley, Deutschland:

Verstärkungsringe

2.1.5 Untersuchungsmaterial

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Gewebe und Zellen aus Ovarien weiblicher Rinder sowie des Marmoset-Affen, *Callithrix jacchus*, durchgeführt. Die Rinderovarien stammten von Schlachttieren der Schlachthöfe Marburg, Gießen und Minden/Lübbecke. Die Marmoset-Affen gehörten zur Versuchstier-Kolonie der Abteilung Reproduktionsbiologie des Deutschen Primatenzentrum GmbH, Göttingen. Dieses Untersuchungsmaterial wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. P. Nayudu zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Rinder-Oozyten

Die Ovarien gesunder weiblicher Rinder verschiedenster Rassen, unterschiedlichen Alters und Zyklusstadiums wurden in den Schlachthöfen Gießen und Marburg direkt nach Öffnung der Bauchhöhle entnommen. Für die funktionellen, die immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die in Gießen durchgeführt wurden, wurden die Ovarien in einem mit ca. 20°C warmer physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Thermogefäß bis zur Ankunft im Labor gelagert. Das Material für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde in physiologischer Kochsalzlösung auf Eis umgehend zum Labor transportiert.

Nach Punktion von 4-7 mm großen Ovarfollikeln und gründlichem Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde der Follikelinhalt unter einem Stereomikroskop (Stemi SV11, Zeiss) bei Raumtemperatur untersucht. Die gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOKs) wurden für die weitere Verwendung in eine jeweilig geeignete Lösung umgesetzt. Mit einer ausgezogenen Mikropipette wurden die Oozyten bei Bedarf durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen mechanisch von den umgebenden Kumuluszellen befreit. Der Durchmesser der Mikropipette entsprach dem einer Oozyte. Die immunfluoreszenz- und die elektronenmikroskopischen Versuche sowie die funktionellen Untersuchungen schlossen sich unmittelbar an.

Die Oozyten für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden bis zur weiteren Verwendung in RNA later bei -20°C gelagert. Die elektronmikroskopischen und volumenregulatorischen Untersuchungen wurden unmittelbar nach Isolierung der Oozyten durchgeführt.

Die bovinen Ovarien für die immunzytochemischen Untersuchungen, die am Institut für Tierzucht, Abteilung Biotechnologie, der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (Mariensee) durchgeführt wurden, wurden im Schlachthof Minden/Lübbecke den dort geschlachteten weiblichen Tieren entnommen und bis zur Ankunft im Labor in Thermobehältern gelagert. Vor der Gewinnung der Oozyten wurden die Ovarien dreimal in 30°C warmer 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden mit der „Slicing-Methode“ mit Hilfe eines Vielklingenmessers isoliert und in TCM air Medium gesammelt (Eckert und Niemann, 1996). Mit Hilfe von ausgezogenen Glaskapillaren, deren Durchmesser dem der Oozyten entsprach, wurden die Oozyten mechanisch vom Kumulus befreit. Im Anschluss daran erfolgte eine Fixierung der denudierten Oozyten für mindestens eine Stunde in 3,7% Paraformaldehydlösung. Die fixierten Zellen wurden entweder unmittelbar dem Versuch zugeführt oder in der Paraformaldehydlösung bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.2 Gewinnung von Marmoset-Oozyten

Ovarien geschlechtsreifer Marmoset-Weibchen wurden im Deutschen Primatenzentrum Göttingen durch die dort tätigen Tierärzte im Zuge einer Kastration entnommen.

Nach Entnahme der Ovarien wurden diese direkt in 37°C warmes Dissektionsmedium überführt. Zur Gewinnung der Oozyten wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Stemi SV6, Zeiss) zunächst die Follikel bei einer 25-fachen Vergrößerung aus der ovariellen Matrix isoliert. Nach Überführung der Follikel in das Punktionsmedium wurden die Oozyten aus den Follikeln isoliert, indem diese mit Einmalkanülen (Nr. 17) eröffnet wurden. Alle Oozyten, die bis dahin noch von Kumuluszellen umgeben waren, wurden anschließend durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen durch eine ausgezogene Glaskapillare von diesen befreit.

Sowohl Oozyten als auch Follikelzellen aus den Marmoset-Follikeln wurden getrennt gesammelt. Bei den Follikelzellen handelte es sich um ein Gemisch aus Kumulus- und Granulosazellen. Oozyten und Follikelzellen, die später für die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet werden sollten, wurden in RNA later bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3 Nachweis der VDAC-Genexpression in bovinen und Marmoset-Oozyten

Zur Untersuchung der VDAC Genexpression wurde aus bovinen und Marmoset-Oozyten die RNA isoliert, eine Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt und die amplifizierten cDNA-Fragmente (copy DNA) näher charakterisiert.

2.2.3.1 Isolierung von gesamt-RNA aus bovinen und Marmoset-Oozyten

Mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) wurde gesamt-RNA aus einer Gruppe von 10 Rinder- bzw. Marmoset-Oozyten isoliert. Die bei -20°C in RNA later gelagerten Oozyten wurden 5 min bei 750 x g zentrifugiert. Um einen Verlust von Oozyten zu vermeiden, wurde der Überstand optisch unter einem Stereomikroskop (Stemi SV11, Zeiss) kontrolliert und anschließend verworfen. Die Isolation der gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde die gesamt-RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser und unmittelbar der RT-Reaktion zugeführt. Zusätzlich wurde zur Isolierung der RNA aus Marmoset-Oozyten das RNase-free DNase Set (Qiagen) gemäß der Gebrauchsanleitung angewendet um eine Verunreinigung mit genomischer DNA zu verhindern.

2.2.3.2 DNA-Isolierung aus bovinem und Marmoset-Ovargewebe

Zur Optimierung der Primer und für Kontrolleexperimente wurde genomische DNA (gDNA) benötigt, die aus bovinem und Marmoset-Ovargewebe isoliert wurde. Das bei -20°C in physiologischer Kochsalzlösung gelagerte Ovarzellengemisch (Follikelzellen und Blutzellen) wurde zunächst 5 min bei 750 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur DNA-Isolation wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen), wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben, verwendet. Eluiert wurde die DNA mit 2 x 100 µl DEPC-treated water und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.3 Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion)

Ziel der Reversen Transkriptase-Reaktion war die Herstellung einer cDNA ausgehend von der isolierten gesamt-RNA. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz für 60 min bei 37°C im PCR-Cycler (PTC 200 Peltier Cycler, MJ Research) inkubiert: 12 µl gesamt-RNA, 2 µl RT-Puffer, 2 µl 5 mM dNTP (Eppendorf), 2 µl Random Hexamer Primers (Promega), 1 µl RNase out (Invitrogen), 1 µl Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen). Daran schloss sich eine Denaturierung bei 95°C für 5 min an. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.4 Oligonukleotid-Primer

Mit Hilfe öffentlich zugänglicher online-Software (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3www.cgi>) und in der PubMed Datenbank veröffentlichten Sequenzen wurden spezifische Primer für die bovinen Sequenzen von VDAC1, VDAC2 und VDAC3 entworfen.

Da die VDAC-Sequenzen des Marmoset-Affen bisher nicht bekannt sind, wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen an Marmoset-Oozyten Primerpaare verwendet, die in der Lage sind, spezifisch cDNA von humanem VDAC1 und VDAC3 und porcinem VDAC2 zu erkennen. Die Primer wurden von Dr. Carolina Cassara und PD Dr. Lutz Konrad konzipiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Ihre Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.3.5 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der cDNA erfolgte in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) in einem Thermocycler (PTC 200 Peltier thermal cycler, MJ Research). Die PCR wurde optimiert und

die Annealingtemperatur ermittelt, bei der nur eine Bande mit deutlicher Intensität im Agarosegel sichtbar war.

Die Proben beinhalteten 2 µl Template, 5 µl 1x NH₄-Puffer mit MgCl₂, 1 µl dNTPs (0,2 mM jedes dNTP, Eppendorf), je 2 pmol der Primer eines Primerpaares und 2,5 IU der Taq DNA-Polymerase (Eppendorf). Das fehlende Volumen zum Endvolumen von 50 µl wurde mit DEPC water (Ambion) ausgeglichen.

Als Kontrolle wurde für jede Primerkombination eine Blindprobe angesetzt, die statt cDNA das gleiche Volumen DEPC water enthält. Zudem wurde zur Überprüfung möglicher gDNA-Kontaminationen auch gesamt-RNA anstelle von cDNA in einer PCR eingesetzt. Zur Identifikation falsch positiver Ergebnisse diente in einem weiteren Versuchsansatz gDNA als Template.

Jede PCR begann mit der Denaturierung des Templates bei 94°C für 4 min. Danach schlossen sich für jede PCR 35 Zyklen an. Ein PCR-Zyklus lief wie folgt ab:

1. Denaturierung bei 94°C für 45 s
2. Primerannealing bei der jeweiligen Annealingtemperatur für 45 s
3. Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase bei 72°C für 90 s

Beim letzten Zyklus erfolgte der Schritt der Kettenverlängerung bei 72°C für 5 min.

Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarose-Gelsystem getrennt, identifiziert und danach bei -20°C eingefroren.

2.2.3.6 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Darstellung der amplifizierten PCR-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte im Agarosegel. Dazu wurde 1,5% (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Nach Polymerisation des Gels folgte die Elektrophorese. Es wurden 10 µl Probe, zusammengesetzt aus 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Probenaufnahmepuffer (6x konzentriert), aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Ein 100 bp-Marker wurde als Größenmarker aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V für 90 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel einem UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm ausgesetzt und das Bandenmuster mit der Biometra Computersoftware und der Canon Megashot G3 Kamera digitalphotographisch festgehalten. Die Größe vorhandener PCR-Fragmente wurde durch den Vergleich mit dem 100 bp-Marker annähernd bestimmt.

2.2.3.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) wurden die cDNA Fragmente aus dem PCR-Produkt aufgereinigt.

Tabelle 1: Aufstellung der zur Ermittlung der VDAC Expression in Oozyten verwendeten Primer.

| Spezies / Gen | Primer | Primersequenz | AT (°C) | Fragmentgröße (bp) |
|---------------|-------------|-----------------------------|---------|--------------------|
| Bovin VDAC1 | bVDAC-1 F | 5'-TGGTGCTGGGTTATGAAGGT-3' | 55 °C | 220 bp |
| | bVDAC-1 R | 5'-CGAAGCGAGTGTGCTGTT-3' | | |
| Bovin VDAC2 | bVDAC-2 F | 5'-TTCGGGTGTCTTCGGTTATG-3 | 62,4 °C | 234 bp |
| | bVDAC-2 R | 5'-TCCTGATGTCCAAGCAAGGT-3' | | |
| Bovin VDAC3 | bVDAC-3 F | 5'-GCAGTAACAACACCCGCTTC-3 | 59,3 °C | 201 bp |
| | bVDAC-3 R | 5'-CAAATCCCAGACCGACCTT-3' | | |
| Human VDAC1 | h5-VDAC1 | 5'-AGTGACCCAGAGCAACTTTGC-3' | 58 °C | 329 bp |
| | h3-VDAC1 | 5'-GGCCACCAGCATTGACGTTTC-3 | | |
| Porcin VDAC2 | VDAC2-por-F | 5'-AAATCAAAGCTGACAAGGAA-3 | 56,7 °C | 231 bp |
| | VDAC2-por-R | 5'-ATTTGGTCTCCAAGGTCCC-3 | | |
| Human VDAC3 | h5-VDAC3 | 5'-ACGATGGCACTGAATTTGGAG-3' | 58 °C | 284 bp |
| | h3-VDAC3 | 5'-AAATCCCAGCCCAACCTTGTG-3' | | |

Angegeben sind die Sequenz, die Position, die Annealingtemperatur (AT), sowie die Fragmentgrößen des zu erwartenden PCR-Produkts in Basenpaaren (bp) für cDNA-Templates.

2.2.4 Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen im bovinen und Marmoset-Ovar

Um die Lokalisation der drei VDAC-Proteine VDAC1, VDAC2 und VDAC3 in den Ovarien des Rindes und des Marmoset-Affen zu ermitteln, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf einer Visualisierung der Bindung spezifischer Antikörper an das gesuchte Protein in fixiertem Gewebe.

2.2.4.1 Verwendete anti-VDAC-Antikörper

Die gegen die synthetischen VDAC- Peptide 1b, H1 und H4 gewonnenen Antiseren (Tabelle 2) standen für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung (Hinsch *et al.*, 2004).

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten anti-VDAC-Antiseren.

| VDAC Subtyp | Peptidsequenz (Antigen) | Bezeichnung des Peptides | Antiserum |
|-------------|-------------------------|--------------------------|-----------|
| VDAC1 | G-H-K-L-G-L-G-L-E-F-Q-A | 1b | AS P6 |
| VDAC2 | Y-Q-L-D-P-T-A-S-I-S-A-K | H1 | AS P45 |
| VDAC3 | S-V-F-A-K-G-Y-G-F-M | H4 | AS P31 |

2.2.4.2 Herstellung von Paraffinschnitten aus Rinder- und Marmoset-Ovarien

Etwa 5 mm³ große Stücke der Rinder- und Marmoset-Ovarien wurden für 20 h in Methacarn-Lösung fixiert. Nach Entfernung des Fixiermediums und anschließender Entwässerung mit 96% Ethanol sowie Isopropanol für je 3-4 h wurde das Ovargewebe für 12 h zur Entfettung in Xylol gelegt.

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Durchdringung des Gewebes wurde das fixierte Gewebestück für 8-10 h in flüssigem Paraffin bei 60°C belassen. Nach Einbettung der Gewebeprobe in Paraffinblöcke und deren Aushärtung wurden die Blöckchen bei Raumtemperatur gelagert.

Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 4-6 µm wurden mit einem Mikrotom (Minot) hergestellt, auf mit Chromalaun beschichtet Objektträger transferiert und getrocknet.

2.2.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen in Ovarschnitten

Die Ovarschnitte wurden zunächst 2 x 3 min in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe gewässert. Nach 5 min Waschen in Aqua dest. und einem weiteren 5 minütigen Waschschrift in PBS, pH 7,4 erfolgte die Inkubation der Schnitte in 3% (v/v) Wasserstoffperoxid- Lösung für 15 min bei Raumtemperatur in einer dunklen Küvette. Dies diente dazu, endogene Peroxidasen im Ovargewebe zu inaktivieren. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen im Gewebe wurden die Ovarschnitte nach einem Waschschrift von 5 min in PBS für 1 h bei Raumtemperatur mit einer 1% (w/v) Milchpulver (MP)/PBS-Lösung präinkubiert. Daran schloss sich die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1 h bei Raumtemperatur an. Die Antikörper wurden in der in Tabelle 3 aufgeführten Konzentration in 1% (w/v) MP/PBS verdünnt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch 4 x 4 min Waschen der Schnitte in PBS entfernt. Danach wurde der Zweitantikörper für 30 min in einer 1% (w/v) MP/PBS Lösung zugegeben (Tabelle 3). Nach der Antikörperinkubation wurden die Schnitte, wie bereits beschrieben, gewaschen. Im Anschluss daran wurde Streptavidin-Peroxidase (Labvision Corporation) als gebrauchsfertige Lösung zugegeben und die Schnitte für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte für 4 x 4 min in PBS wurde das AEC Peroxidase Substrat Kit (Biologo) entsprechend der Gebrauchsanweisung eingesetzt. Der Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion führte zur Entwicklung eines roten Farbproduktes. Die Farbreaktion wurde durch Eintauchen der Objektträger in Aqua dest. abgestoppt. Die Entfernung überschüssigen Substrats erfolgte durch erneutes dreimaliges Waschen der Schnitte in Aqua dest. für je 5 min.

Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte dann mit Hematoxylin für 10 s gegengefärbt. Die Blaufärbung der Zellkerne stellte sich durch intensives, 10-minütiges Spülen der Objektträger mit Leitungswasser ein. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Crystal mount eingedeckt und unter einem Lichtmikroskop (Axioskop2 mot plus, Zeiss) ausgewertet und dokumentiert.

Tabelle 3: Verdünnungen der verwendeten Erst- und Zweitantikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen auf Paraffinschnitten.

| VDAC Subtyp | Erstantikörper | Verdünnung* | Zweitantikörper | Verdünnung* |
|-------------|--|-------------|--------------------------------------|-------------|
| anti-VDAC1 | AS P6 / PI P6 | 1:60 | Anti-Kaninchen IgG:Biotin (Sigma) | 1:500 |
| anti-VDAC1 | Anti-Porin 31 HL (Calbiochem) Maus IgG _{2a} | 1:100 | Anti-Maus IgG:Biotin (Sigma) | 1:200 |
| anti-VDAC2 | AS P45 / PI P45 | 1:40 | Anti-Kaninchen IgG:Biotin (Sigma) | 1:500 |
| anti-VDAC3 | AS P31 / PI P31 | 1:40 | Anti-Kaninchen IgG:Biotin (Sigma) | 1:500 |

*Alle Antikörper wurden in 1% (w/v) MP/PBS verdünnt.

2.2.5 Immunzytochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten

Um weitere Erkenntnisse über die Lokalisation der verschiedenen VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten zu gewinnen, wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Zum Nachweis möglicher Antikörperbindungen an das Oolemm wurden die Oozyten nicht permeabilisiert. Intrazytoplasmatische Antikörperbindungsstellen sollten anhand permeabilisierter Oozyten dargestellt werden.

2.2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit lichtmikroskopischer Auswertung

Zur Etablierung der Methode wurden in unserem Labor Vorversuche durchgeführt. Dazu wurden an den Schlachthöfen Gießen und Marburg den Schlachtkörpern Ovarien entnommen. Die Oozyten wurden, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, gewonnen, in einem Inkubationsschritt (15 min) unter Anwendung der Lösung nach Qi *et al.* (2002) fixiert und permeabilisiert. Für die Vorversuche wurden alle Oozyten permeabilisiert. Zur Etablierung der Methode wurde als Erstantikörper lediglich das anti-VDAC1 Antiserum AS P6 und als Negativkontrolle das Präimmunserum PI P6 eingesetzt (Verdünnung:1:100). Später wurde jeweils ein Experiment mit dem anti-VDAC2- (AS P45) und mit dem anti-VDAC3- (AS P31) Antikörper 1:50 verdünnt durchgeführt. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten in Tropfen der entsprechenden Lösungen (30 µl für die Inkubation, 100 µl für die

Waschschritte). Die Oozyten wurden mit Hilfe von ausgezogenen Glaskapillaren von Tropfen zu Tropfen transferiert.

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Oozyten in PBS mit 1% (w/v) MP für 1 h präinkubiert. Im Anschluss daran wurden die Oozyten 1 h lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur in Erstantikörperlösung, verdünnt in 0,1% (w/v) MP/PBS, inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 4). Als Negativkontrolle dienten die entsprechenden Präimmunsereen. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Oozyten anschließend mit einer Mikropipette in drei Tropfen 0,1% (w/v) MP/PBS gewaschen. Die Zweitantikörper wurden 1:40 verdünnt in 0,1% (w/v) MP/PBS eingesetzt (Tabelle 4). Die Inkubationszeit betrug 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer bei Raumtemperatur. In einem erneuten Waschvorgang wurden die Oozyten dann mit einer Mikropipette nacheinander in fünf Tropfen 0,1% (w/v) MP/PBS gewaschen und auf einen Objektträger transferiert. Auf die unbeschichteten Objektträger waren zuvor Lochrandverstärkungsringe aufgeklebt und die Vertiefung mit 10 µl Eindeckmedium (Citifluor) aufgefüllt worden. Pro Vertiefung wurden fünf Oozyten in das Medium eingebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die lichtmikroskopische Auswertung der Ergebnisse erfolgte bei einer Wellenlänge von 495 nm am Axioskop2 mot plus (Zeiss).

2.2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit konfokalmikroskopischer Auswertung

Weiterführende immunzytochemischen Untersuchungen wurden am Institut für Tierzucht, Abteilung Biotechnologie, der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (Mariensee) durchgeführt.

Die bovinen Ovarien wurden im Schlachthof Minden/Lübbecke den dort geschlachteten weiblichen Tieren entnommen und die Oozyten, wie bereits unter Punkt 2.2.1 beschrieben, gewonnen. Für einen Teil des Versuches sollten die Antikörper in das Zellinnere diffundieren. Dazu wurden die denudierten und fixierten Oozyten mit 1% Triton X-100 in PBS mit 0,1% (w/v) MP über 5 min permeabilisiert. In einem zweiten Versuchsansatz sollte die Antikörperbindung an die Plasmamembran untersucht werden. Diese Oozyten wurden nach der Fixierung nicht permeabilisiert.

Der Versuch wurde wie bereits unter Punkt 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die jeweilig verwendete Antikörperkonzentration ist in Tabelle 4 aufgeführt. Es wurden die gleichen Materialien wie für die lichtmikroskopischen Versuche eingesetzt. Zur Auswertung der Versuchsergebnisse wurde ein konfokales Lasermikroskop (LSM 510 Zeiss Axioplan 2 Imaging) mit Argonlaser (Wellenlänge 488 nm) herangezogen.

Tabelle 4: Verdünnungen der verwendeten Erst- und Zweitantikörper für die immunozytochemischen Untersuchungen

| Bovine Oozyten | Erstantikörper | Verdünnung* | Zweitantikörper | Verdünnung* |
|------------------------------|--|--------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Permeabilisiert | AS P6 / PI P6 | 1:200 | Anti-Kaninchen IgG:FITC (Sigma) | 1:60 |
| | Anti-Porin 31 HL (Calbiochem) / Maus IgG _{2a} | 1:30 | Anti-Maus IgG:FITC (Sigma) | 1:100 |
| | AS P45 / PI P45 | 1:80 | Anti-Kaninchen IgG:FITC (Sigma) | 1:60 |
| | Anti-VDAC2 (Santa Cruz) / Ziegen IgG | 1:50 | Anti-Ziegen IgG:FITC (Santa Cruz) | 1:100 |
| | AS P31 / PI P31 | 1:80 | Anti-Kaninchen IgG:FITC (Sigma) | 1:60 |
| Nicht permeabilisiert | AS P6 / PI P6 | 1:60 | Anti-Kaninchen IgG: FITC (Sigma) | 1:40 |
| | Anti-Porin 31 HL (Calbiochem) / Maus IgG _{2a} | 1:10 | Anti-Maus IgG:FITC (Sigma) | 1:100 |
| | AS P45 / PI P45 | 1:30 | Anti-Kaninchen IgG:FITC (Sigma) | 1:40 |
| | Anti-VDAC2 (Santa Cruz) / Ziegen IgG | 1:10 | Anti-Ziegen IgG:FITC (Santa Cruz) | 1:100 |
| | AS P31 / PI P31 | 1:30 | Anti-Kaninchen IgG:FITC (Sigma) | 1:40 |

*Alle Antikörper wurden in 1% (w/v) MP/PBS verdünnt.

2.2.6 Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen

Vorrangiges Ziel der immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen war, Informationen über die subzelluläre Lokalisation von VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten zu gewinnen. Es wurden zwei Verfahren der Immunelektronenmikroskopie angewandt: die Postembedding- und die Preembedding-Methode. Während beim Postembedding die Antikörperinkubation

erst am fertig vorliegenden Ultradünnschnitt vorgenommen wurde, erfolgte sie beim Preembedding vor der Fixierung der Zellen, woran sich dann die Einbettung anschloss.

2.2.6.1 Herstellung der Schnittpräparate für die Immunelektronenmikroskopie

Postembedding

Bovine KOKs (Kumulus-Oozyten-Komplexe) wurden, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, gewonnen und in 0,1% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,2) 24 h fixiert. Anschließend wurden die KOKs zum Entfernen der Fixierlösung 3 x 5 min in PBS gewaschen.

Während dessen wurde eine 2%-ige Agarlösung mit Aqua dest. hergestellt und diese in der Mikrowelle erhitzt, bis sie eine gelartige Konsistenz aufwies. Die KOKs wurden daraufhin in den etwas abgekühlten Agar verbracht. Nachdem der Agar bei 4°C fest geworden war, wurde ein Blöckchen, das die KOKs enthielt, mit einer Kantenlänge von ca. 4 mm ausgeschnitten.

Es folgten Entwässerungsschritte in einer aufsteigenden Ethanolreihe beginnend in 50% Ethanol in Aqua dest. für 10 min, dann jeweils 10 min in 70%, 96% Ethanol und zweimal 10 min in 100% Ethanol.

Die Agarblöckchen wurden mit dem Einbettmedium LR White (London Resin Company) in aufsteigender Konzentration erst 1/3 LR-White 2/3 Ethanol 100%, dann LR White Ethanol 1:1 jeweils für 20 min infiltriert. Die Infiltration mit 100% LR White erfolgte über drei Zeiträume: 60 min, über Nacht und 2 h.

Eingebettet wurden die Agarblöckchen mit den KOKs in Gelatine kapseln, die mit LR-White aufgefüllt und über 24 h bei 60°C ausgehärtet wurden.

Um eine geeignete Schnittebene im Präparat zu finden, wurden zunächst 1 µm dicke Semidünnschnitte mit Hilfe von Glasmessern am Reichert Ultracut S/FC (Leica) angefertigt, auf unbeschichteten Glasobjektträgern bei 60°C getrocknet und mit Richardson-Blau angefärbt. Unter einem Zeiss Lichtmikroskop wurden die Schnitte beurteilt. Enthielt die Schnittebene die KOKs, wurde das Blöckchen mittels eines Pyramitoms auf die gewünschte Ultradünnschnittfläche getrimmt. Anschließend wurden mit Hilfe eines Diamantmessers ebenfalls am Reichert Ultracut S/FC (Leica) Ultradünnschnitte (70 nm) angefertigt. Diese wurden auf 100 mesh Hexagon Dünnsteg-Netzchen aus Nickel und Kupfer aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die gewonnenen Ultradünnschnitte wurden für die Immunogoldreaktion weiter verwendet.

Preembedding

Die KOKs wurden vor der Fixierung und Einbettung mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Im Einzelnen wurde der Versuch wie folgt durchgeführt:

Die Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben gewonnen. An ein einmaliges Waschen der KOKs in 0,1% (w/v) MP/PBS (pH 7,2) schloss sich zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen eine 1 h Präinkubation in 1% (w/v) MP/PBS an. Danach wurden die KOKs in der Antikörperlösung bzw. die Negativkontrolle (Präimmunserum) in 0,1% (w/v) MP/PBS für 60 min inkubiert (Tabelle 5). Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die KOKs dreimal in 0,1% (w/v) MP/PBS gewaschen. Die Inkubation der KOKs im Zweitantikörper (Tabelle 5) wurde über einen Zeitraum von 45 min durchgeführt. Die Proben wurden weitere fünfmal gewaschen, dann wie unter Punkt 2.2.6.1, „*Postembedding*“ beschrieben fixiert, in Agar eingebracht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden sie wie bereits beschrieben in Gelatinekapseln eingebettet, geschnitten und auf Netzchen aufgezogen (siehe *Postembedding*). Die Schnitte wurden im Ultrastainer LKB 2168 (Reichert) mit den Gebrauchslösungen Ultrastain1 und -2 (Leica) mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Am Elektronenmikroskop EM 109 (Zeiss) erfolgte die Auswertung der Schnittpräparate.

2.2.6.2 Immunogoldreaktion auf Ultradünnschnitten

Postembedding

Als Untersuchungsmaterial dienten die gewonnenen Ultradünnschnitte boviner KOKs (Abschnitt 2.2.6.1).

Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in 50 µl großen Tropfen der entsprechenden Lösung durchgeführt, auf die die Netzchen mit den Schnitten nach unten gelegt wurden.

Zur Hydrierung der Schnitte wurden diese zunächst 5 min in TBS pH 7,4 gelegt und dann 20 min in 0,1% Glycin in TBS zur Abdeckung freier Aldehydgruppen inkubiert. Anschließend folgte eine Präinkubation über 45 min in 3% (w/v) MP/TBS zur Blockierung möglicher unspezifischer Antikörperbindungsstellen. Danach wurden die Schnitte in der Antikörperlösung bzw. die Negativkontrolle in Präimmunserum in 10% Ziegen Serum in TBS für 75 min (Tabelle 5) inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern wurden die Netzchen 5 x 3 min in TBS gewaschen. Als Zweitantikörper wurde biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:600 in 10% Ziegen Serum/TBS eingesetzt und die Netzchen 45 min darin belassen. Danach wurden sie ebenfalls 45 min in TBS gewaschen. Der Nachweis einer Antigen-Antikörperreaktion erfolgte über 45 min mit Streptavidin-Gold-Konjugat (20 nm Partikelgröße), das 1:40 verdünnt eingesetzt wurde. Nach weiteren fünf 3-minütigen Waschschritten wurde zur Stabilisierung der Antikörperbindung eine Fixierung in 1% Glutaraldehyd in TBS für 5 min durchgeführt. Danach wurden die Schnitte dreimal 3 min in Aqua dest. gewaschen und auf Filterpapier getrocknet.

Die Kontrastierung erfolgte wie bereits unter dem Punkt „*Preembedding*“ beschrieben mit Uranyl- und Bleiacetat.

Die mikroskopische Auswertung wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskopes EM 109 (Zeiss) durchgeführt.

Tabelle 5: Verdünnungen der verwendeten Erst- und Zweitantikörper für die immun-elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ultradünnschnitten.

| Methode | Erstantikörper | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|----------------|-----------------------|-------------------|--|-------------------|
| Post-embedding | AS P6 / PI P6 | 1:60* | Anti-Kaninchen IgG:Biotin (Sigma) | 1:600* |
| | AS P31 / PI P31 | 1:40* | Anti-Kaninchen IgG:Biotin (Sigma) | 1:600* |
| Pre-embedding | AS P6 / PI P6 | 1:100** | Kaninchen- Goldpartikel- Konjugat (10 nm, Bio Cell) | 1:40** |
| | AS P31 / PI P31 | 1:50** | Kaninchen- Goldpartikel- Konjugat (10 nm, Bio Cell) | 1:40** |

* Die Antikörper wurden in 10% Ziegenserum in TBS verdünnt.

** Die Antikörper wurden in 1% (w/v) MP/PBS verdünnt.

2.2.7 Funktionelle Untersuchungen zum Regulatory Volume Decrease boviner Oozyten

Im funktionellen Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die anti-VDAC-Antikörper einen Einfluss auf das Regulatory Volume Decrease (RVD) boviner Oozyten besitzen. Es wurde mit zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen gearbeitet. Zum einen wurden die KOKs in der Antikörperlösung inkubiert, zum anderen wurden die Antikörper in die Oozyten injiziert.

2.2.7.1 Inaktivierung des Komplementsystems in anti-VDAC-Antiseren und Präimmunseren

Für die funktionellen Untersuchungen an Oozyten wurden anti-VDAC-Antiseren (siehe Punkt 2.2.4.1) verwendet, in denen zuvor das Komplementsystem inaktiviert worden war. Dazu wurden jeweils 50 µl des Anti- bzw. Präimmunserums für 60 min im Thermo-Cycler (PTC 200 Peltier Cycler, MJ Research) auf 56°C erhitzt und anschließend die Antikörpersuspension 3 min bei 13.800 x g zentrifugiert. Der die Antikörper enthaltende Überstand (45 µl) wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet. Mittels eines ELISAs wurde die Bindungsfähigkeit der Komplement-inaktivierten Antikörper an ihr Antigen (Peptid) überprüft.

2.2.7.2 Inkubation der Oozyten mit anti-VDAC-Antikörpern

Die Inkubation der Oozyten mit den subtypspezifischen anti-VDAC-Antikörpern sollte Hinweise darüber geben, ob mögliche extrazelluläre Antigen-Bindungsstellen von funktioneller Bedeutung für das RVD sind.

Die KOKs wurden wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben gewonnen und bis zur weiteren Verwendung in zuvor 1 h equilibriertem und mit Mineralöl überdecktem Medium 199 (Sigma, ca. 300 mOsmol/kg, pH 7,2) im Wärmeschrank bei 38,5°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Die zu untersuchenden Gruppen von ca. 10 KOK wurden nacheinander bis zur hypotonen Stimulation für 25 min in einer Antikörperverdünnung im Wärmeschrank inkubiert. Es wurden die gegen die drei VDAC-Subtypen gerichteten Antikörper (AS P6, AS P45, AS P31) 1:20 in Medium 199 verdünnt verwendet. Als Negativkontrollen kamen die korrespondierenden Präimmunseren in entsprechender Verdünnung zum Einsatz. Vor der hypotonen Stimulation (Abschnitt 2.2.7.4) wurden die Oozyten mechanisch von den Kumuluszellen befreit.

2.2.7.3 Injektion der anti-VDAC-Antikörper in die Oozyten

Um zu untersuchen, ob intrazelluläre antigene Determinanten von funktioneller Bedeutung sind, wurden die Antikörper in einem zweiten Versuchsaufbau in die denudierten Oozyten injiziert. Verwendet wurden die drei VDAC-Subtyp-spezifischen-Antiseren (AS P6, AS P45, AS P31) und die korrespondierenden Präimmunseren als Negativkontrollen. Dazu wurden die denudierten Oozyten in einen neuen, ca. 100 µl großen, mit Mineralöl überschichteten Medium 199-Tropfen transferiert. Die Antiseren wurden unverdünnt mit einem Druck von 190 Pa über 8 s injiziert (Arbeitseinheit aus Axiovert 100 (Zeiss) mit Mikromanipulator TransferMan® NK2, CellTram® air und FemtoJet® (Eppendorf)). Der notwendige Druck und die Injektionszeit wurden in Vorversuchen ermittelt. Bis zur hypotonen Stimulation wurden die Oozyten für 15 min im Wärmeschrank bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.7.4 Hypotone Stimulation der Oozyten

Die hypotone Stimulation der Oozyten wurde für die beiden Versuchsansätze (Antikörper-Inkubation und -Injektion) auf die gleiche Weise durchgeführt. Die zu testenden Oozytengruppen wurden in einen 10 µl großen Tropfen Ringer-Lösung (ca. 300 mM, pH 7,2) auf mit Teflon beschichteten Objektträgern mit Vertiefungen (Spotslides) transferiert. Der Tropfen wurde mit einem feinen Streifen Vaseline umrandet. Nachdem die Oozyten unter dem Axioskop 2 (Zeiss) bei Durchlicht grob fokussiert worden waren, wurden zur hypotonen Stimulation 10 µl NaCl freie Ringer-Lösung (ca. 90 mM) dem Tropfen zugefügt, so dass das die Oozyten umgebende Milieu ca. 190 mM betrug. Zur besseren Fokussierung und zum Schutz vor Verdunstung wurde ein Deckgläschen auf den Vaselining gelegt und vorsichtig angedrückt.

2.2.7.5 Fotografische Dokumentation der Größenveränderung der Oozyten

In den folgenden 31 min nach der hypotonen Stimulation wurde die Größenveränderung der Oozyten im Abstand von 60 s unter Verwendung des Programmpaketes AxioVision 4.4 SP2 (Zeiss) digitalphotographisch festgehalten.

2.2.7.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse zum RVD

Zur Feststellung eventueller Größenveränderungen wurden die Oozyten vermessen. Die Versuchsgruppen, die mit dem anti-VDAC1-Antikörper AS P6 und dem entsprechenden PI P6 behandelt wurden, umfassten jeweils 20 Oozyten. Für die mit anti-VDAC2 und anti-VDAC3-Antikörpern (AS P45 und AS P31) und den entsprechenden Negativkontrollen (PI P45 und PI P31) behandelten Oozyten wurden jeweils zehn Zellen pro Gruppe ausgewertet. Der Oozytendurchmesser wurde zu jedem Messzeitpunkt mit Hilfe der Computer-Software AxioVision 4.4 SP2 (Zeiss) an drei Stellen ermittelt und der jeweilige Mittelwert der drei Messungen errechnet.

Für die Angaben in Prozent wurden die Ursprungsdaten mit Hilfe der Formel: $D(\%) = (D_1 - D_0) : D_0 \times 100$ transformiert. Der Mittelwert der 20 bzw. zehn Oozyten pro Gruppe sowie der SEM (Standard error of mean) wurden mit dem Programm InStat™ von Graph Pad® errechnet. Zur Statistischen Prüfung des Behandlungs- (AS vs. PI) und Zeiteinflusses sowie der Wechselwirkung zwischen Behandlung und Zeit wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Zeit durchgeführt. Dazu wurde das Statistik Programmpaket BMDP/Dynamik, Release 7.0 (DIXON, 1993) verwendet. Die Statistik wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Failing (AG Biomathematik und Datenverarbeitung, Institut für Veterinärphysiologie, Gießen) angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression VDAC-kodierender Gene

Nach Isolierung der gesamt-RNA aus jeweils zehn bovinen und zehn Marmoset-Oozyten wurde die Reverse Transkriptase-Reaktion zur Herstellung der komplementären cDNA durchgeführt. Die gewonnene cDNA diente als Template der folgenden PCR. Durch Einsatz spezifischer VDAC-Primer konnten definierte cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Zur Überprüfung der Testmethode diente als Positivkontrolle die Amplifizierung eines cDNA-Fragments des „house-keeping-gens“ GAPDH. Um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen wurde eine PCR durchgeführt, bei der Wasser und RNA anstelle von cDNA als Template eingesetzt wurden. Eine weitere PCR mit gDNA als Template wurde für jedes Primerpaar durchgeführt um zu überprüfen, ob die Primer sich über Introns erstrecken und damit falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

3.1.1 VDAC-RNA-Expression in bovinen Oozyten

Die PCR-Produkte stellten sich im Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel unter UV-Licht als sichtbare Bande dar. Zur ersten Abschätzung, ob es sich um die gesuchten cDNA-Teilstücke von bovinem VDAC handelte, diente die Bestimmung der Fragmentgröße mit Hilfe eines 100 bp-Markers, der ebenfalls im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt war.

Im Agarosegel zeigte sich, dass ausgehend von der cDNA aus bovinen Oozyten alle erhaltenen Amplifikationsprodukte im annähernd errechneten Größenbereich lagen (Abbildung 5, Spuren 1-3). Das VDAC1-Fragment war ca. 220 bp groß (Abbildung 5, Spur 1), das VDAC2-Produkt hatte eine Größe von ca. 234 bp (Abbildung 5, Spur 2) und das VDAC3-Amplifikat stellte sich mit einer Größe von ca. 201 bp dar (Abbildung 5, Spur 3). Die als Positivkontrolle vervielfältigte GAPDH-Sequenz hatte ca. 300 bp (nicht gezeigt). Ausgehend von der gDNA boviner Ovar-Zellen (Abbildung 5, Spuren 4-6) zeigte sich, dass die Amplifikationsprodukte mit Ausnahme eines gDNA VDAC2-Fragmentes von ca. 200 bp deutlich größer waren. In Abbildung 5, Spur 4 dargestellt ist das VDAC1-Amplifikat mit ca. 600 bp. Das gDNA VDAC2-Fragment stellte sich mit drei Banden dar: eine Bande auf der für die cDNA von VDAC2 erwarteten Höhe von ca. 200 bp, eine Bande bei ca. 900 bp und eine Bande mit >1000 bp (Abbildung 5, Spur 5). In Abbildung 5, Spur 6 ist das VDAC3-Produkt mit >1000 bp gezeigt. Als Negativkontrolle wurde eine PCR durchgeführt, bei deren Versuchsansatz das Template (cDNA) durch Wasser bzw. durch RNA ersetzt wurde. Die übrigen Versuchsbedingungen blieben identisch. Bei diesen Proben wurden keine Sequenzbereiche amplifiziert (nicht gezeigt).

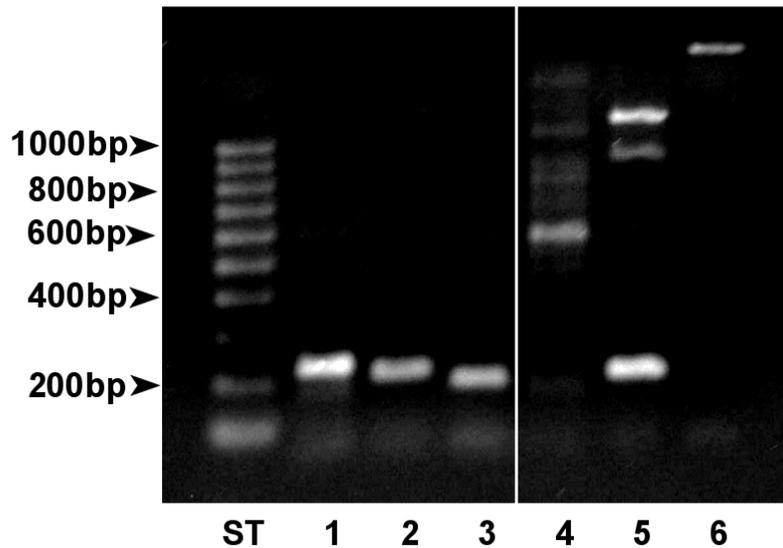


Abbildung 5: Genexpression von VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten

In einem 1,5%igen Agarosegel sind die PCR Fragmente (Amplikons) nach Einsatz der aus zehn bovinen Oozyten gewonnenen cDNA (**Spuren 1-3**) und aus bovinen Ovarzellen gewonnener gDNA (**Spuren 4-6**) dargestellt. In **Spur 1** gezeigt ist das VDAC1-Amplikon mit 220 bp und in **Spur 4** mit ca. 600 bp (bVDAC1-Primerpaar). **Spuren 2** und **5** demonstrieren die VDAC2-Amplifikate mit 220 bp bzw. ca. 220 bp, ca. 900 bp und >1000 bp (bVDAC2-Primerpaar). Die VDAC3-Amplifikate befinden sich in **Spuren 3** und **6** mit ca. 200 bp bzw. >1000 bp (bVDAC3-Primerpaar). **ST**= Standard: Basenpaarmarkierung von 100 bp.

3.1.2 VDAC-RNA-Expression in Marmoset-Oozyten

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR mit Marmoset-Oozyten. Für VDAC1 wurde ein Fragment mit einer Größe von 329 bp, für VDAC2 ein 231 bp großes Amplifikat und für VDAC3 eine vervielfältigte cDNA-Sequenz von 284 bp errechnet.

Mit Hilfe der eingesetzten Primer konnte bei den Marmoset-Oozyten für alle drei VDAC-Gene ein cDNA-Fragment in der jeweils berechneten Größe amplifiziert werden (Abbildung 6, Spuren 1-3).

Um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen, wurde eine PCR ausgehend von aus Marmoset-Ovarzellen isolierter gDNA durchgeführt. Für VDAC1 ergab sich eine Bande im Agarosegel, die mit ca. 300 bp auf derselben Höhe lag wie das cDNA Produkt (Abbildung 6 Spur 4). Auch die VDAC2-Amplifikate bei Einsatz von gDNA als Template lagen mit einer Größe von ca. 200 bp auf gleicher Ebene mit dem VDAC2 cDNA-Produkt (Abbildung 6, Spur

5). Nach Einsatz der VDAC3-Primer zeigte sich eine Bande bei >1000 bp (Abbildung 6 Spur 6).

Zur Kontrolle, ob die für VDAC1, 2 und 3 erhaltenen Banden auf eine Kontamination der cDNA mit gDNA zurückzuführen waren, wurde eine PCR durchgeführt, bei deren Versuchsansatz das Template (cDNA) durch Wasser bzw. RNA ersetzt wurde. Die übrigen Versuchsbedingungen blieben identisch. Bei diesen Proben wurden keine Sequenzbereiche amplifiziert (nicht gezeigt).

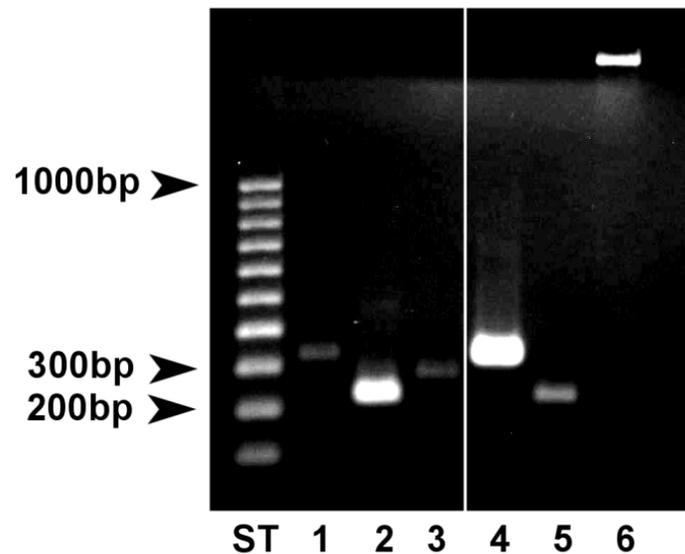


Abbildung 6: Genexpression von VDAC Subtypen in Marmoset-Oozyten

In einem 1,5%igen Agarosegel sind die PCR-Fragmente (Amplikons) nach Einsatz der aus zehn Marmoset-Oozyten gewonnenen cDNA (**Spuren 1-3**) und aus Marmoset-Ovarzellen gewonnener gDNA (**Spuren 4-6**) dargestellt. **Spur 1** und **Spur 4** demonstrieren das VDAC1-Amplikon mit 329 bp (hVDAC1-Primerpaar). **Spuren 2** und **5** zeigen Amplifikate mit einer Größe von ca. 231 bp nach Einsatz des VDAC2-Primerpaares VDAC2-por. Die VDAC3-Amplifikate befinden sich in **Spur 3** und **Spur 6** mit ca. 284 bp bzw. >1000 bp (bVDAC3-Primerpaar). **ST**= Standard: Basenpaarmarkierung von 100 bp

3.1.3 Sequenzierung der PCR-Fragmente

Um zu überprüfen, ob es sich bei den dargestellten PCR-Fragmenten tatsächlich um Teilbereiche der Nukleotidsequenz VDAC-Proteine kodierender Gene handelte, wurden die PCR-Produkte aus bovinen und Marmoset-Oozyten nach ihrer Aufbereitung der Firma MWG Biotech zur Sequenzierung zugesandt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden über

das Internetportal NCBI-BLAST mit der jeweiligen Sequenz der Datenbank verglichen. Der Vergleich ergab für die bovinen VDAC1- und VDAC2-Amplifikate eine Übereinstimmung von 100% mit der Sequenz der Datenbank. Die Übereinstimmung der Nukleotidabfolge für bovinen VDAC3 verglichen mit der Datenbank betrug 98%.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der amplifizierten PCR-Fragmente von VDAC1 und VDAC3 aus Marmoset-Oozyten wurden ebenfalls unter Verwendung des Internetportals NCBI-BLAST mit bekannten VDAC-Sequenzen der Datenbank verglichen. Die Übereinstimmung der Nukleotidabfolge für VDAC1 von Marmoset verglichen mit der aus der Datenbank bekannten Sequenz von humanem VDAC1 betrug 98% und für VDAC3-Sequenzierungsprodukt, verglichen mit humanem VDAC3 der Datenbank 96%. Aufgrund der stark eingeschränkten Verfügbarkeit an Ausgangsmaterial (Marmoset-Oozyten) stand nach den Amplifikationsversuchen nicht mehr genügend VDAC2-cDNA für eine Sequenzierung zur Verfügung.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass die Expression der VDAC-kodierenden Gene in bovinen Oozyten mit Hilfe der RT-PCR für die drei VDAC-Subtypen dargestellt werden konnte und die Ergebnisse durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt wurden. In Marmoset-Oozyten konnte erfolgreich der Nachweis einer Genexpression von VDAC1 und VDAC3 geführt werden. Hier lag eine sehr hohe Übereinstimmung der Nukleotidabfolge der PCR-Produkte mit humanem VDAC1 und VDAC3 vor. Die Expression des VDAC2-kodierenden Gens konnte in Form eines positiven Nachweises der Amplifikate im Agarosegel gebracht werden. Die endgültige Bestätigung des Ergebnisses durch die Sequenzierung des PCR-Produktes war jedoch nicht möglich, da nach den Amplifikationsversuchen nicht mehr ausreichend Material zur Sequenzierung zur Verfügung stand.

3.2 Immunhistochemische Identifizierung der VDAC-Proteine im Ovar

Zum Nachweis von VDAC1, -2, und -3-Protein im bovinen und im Marmoset-Ovar wurden die Antiseren AS P6 (anti-VDAC1), P45 (anti-VDAC2) und P31 (anti-VDAC3) sowie der monoklonale anti-VDAC1-Antikörper Anti-Porin 31 HL (Calbiochem) auf Paraffinschnitten eingesetzt. Als Kontrolle diente die Behandlung der Gewebeschnitte mit den entsprechenden Präimmunseren bzw. Maus IgG_{2a}. Nach Zugabe von biotinylierten Zweitantikörpern, gefolgt von Streptavidin-Peroxidase und AEC als Substrat, konnte die Immunreaktion visualisiert werden.

3.2.1 Nachweis von VDAC-Protein im bovinen Ovar

Nach Einsatz von AS P6 und AS P31 konnten eine eindeutige Immunreaktion in Zellen des bovinen Ovars dargestellt werden (Abbildung 8 A-C und G-I). Abhängig vom Follikulogenesestadium und verwendeten Antikörper war allerdings ein Unterschied bezüglich der Lokalisation der VDAC-Subtypen und der Intensität der Immunreaktion zu verzeichnen.

In den Primärfollikeln konnte mit dem AS P6 im Zytoplasma der Oozyten eine deutliche, in Follikelzellen eine schwächer ausgeprägte Antigen-Antikörperreaktion (Rotfärbung) detektiert werden (Abbildung 8 A). In jedem Fall war das Zytoplasma gleichmäßig rot gefärbt. In den Sekundärfollikeln färbte sich das Ooplasma ungleichmäßig strukturiert, aber deutlich rot an (Abbildung 7 B). Die Farbintensität entsprach der in den primären Oozyten. Das Zytoplasma der Follikelzellen in Sekundärfollikeln nahm im Vergleich zu den Follikelzellen der Primärfollikel an Farbkraft zu. Vor allem der an die Basalmembran angrenzende Pol der peripheren Follikelzellen wies eine sehr deutliche Rotfärbung auf (Abbildung 8 B). Eine schwach positive, punktuell stärker ausgeprägte Immunreaktion innerhalb der Oozyten zeigte sich bei tertiären Follikeln (Abbildung 8 C, Abbildung 9). Das Zytoplasma der umliegenden Follikelzellen war bei einigen Zellen sehr stark, bei anderen kaum gefärbt (Abbildung 9). Vor allem die der Basalmembran angelagerten Follikelzellen waren an ihrem peripher gelegenen Pol stark angefärbt. In den mit AS P6 inkubierten Schnitten zeigte sich neben der Markierung der Oozyten und Follikelzellen in allen Schnitten auch eine deutliche Markierung des Endothels von Blutgefäßen und der Blutzellen (nicht gezeigt). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden identische Versuche mit dem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper (Anti-Porin 31 HL; Calbiochem) durchgeführt. Sowohl das anti-VDAC1-Antiserum AS P6 als auch der Anti-Porin 31 HL (nicht dargestellt) wiesen eine identische Immunreaktion im bovinen Ovargewebe auf.

Abbildung 8 G-I demonstriert die Ergebnisse der Immunhistochemie nach Einsatz des AS P31. Im Vergleich zum Färbemuster des anti-VDAC1-Antikörpers konnte unter Verwendung von AS P31 in den Primärfollikeln sowohl im Zytoplasma der Oozyten als auch im Zytoplasma der Follikelzellen eine sehr intensive homogene Immunreaktion beobachtet werden (Abbildung 8 G). Die Sekundärfollikel zeigten eine im Verhältnis zu den Primärfollikeln deutlich schwächere Antigen-Antikörperreaktion im Ooplasma und im Zytoplasma der umgebenden Follikelzellen (Abbildung 8 H). Die Anfärbung des Ooplasmas wies eine gleichmäßig verteilte, körnige Struktur auf. Dagegen waren die Follikelzellen homogen angefärbt. In den tertiären Follikeln konnte das VDAC3-Protein in den Oozyten in Form einer gleichmäßig im Zytoplasma der Oozyte verteilten, feinkörnig strukturierten Markierung sehr deutlich dargestellt werden. In den Follikelzellen dieses

Entwicklungsstadiums konnte dagegen keine Immunreaktion beobachtet werden (Abbildung 8 I).

In keinem der drei Follikelstadien konnte mit dem AS 45 VDAC2-Protein eindeutig detektiert werden (Abbildung 8 D-F). Lediglich in den Follikelzellen der Sekundärfollikel zeigte sich eine leichte Rosafärbung an der Basis der peripheren Follikelzellen (Abbildung 8 E).

Eine Aussage über das Vorkommen von VDAC-Subtypen in Primordialfollikeln konnte nicht getroffen werden, da in den Schnitten keine Primordialfollikel vorhanden waren.

Die Kontrollschnitte, die mit Präimmunserum behandelt wurden, zeigten weder in der Oozyte noch in den Follikelzellen eine spezifische Färbung. Stellvertretend für alle drei Negativkontrollen ist hier das Präimmunserum zum VDAC1-Antiserum abgebildet (Abbildung 8 J-L).

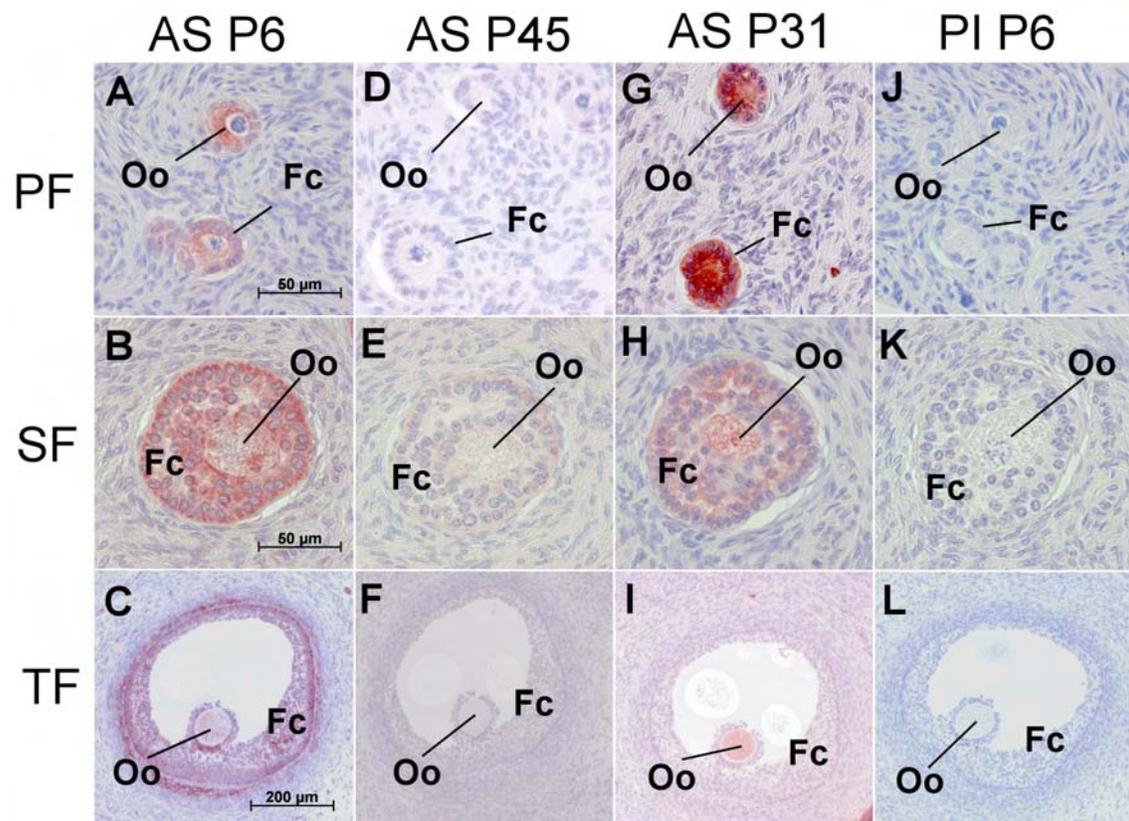


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Proteinen im bovinen Ovar
Eingesetzt wurden die Antiseren AS P6 in einer Verdünnung von 1:60 (A-C), AS P45 in einer Verdünnung von 1:40 (D-F); AS P31 in einer Verdünnung von 1:40 (G-I) und das Präimmunserum PI P6 stellvertretend für alle verwendeten Präimmunseren in einer Verdünnung von 1:60 (J-L). Als Nachweissystem für die Antikörperbindung dienen das Biotin-Streptavidin-Peroxidase-System und AEC als Substrat. PF= Primärfollikel, SF= Sekundärfollikel, TF= Tertiärfollikel, Oo = Oozyte, Fc= Follikelzellen. Maßstab: Primär- und Sekundärfollikel: 50 µm, Tertiärfollikel: 200 µm.

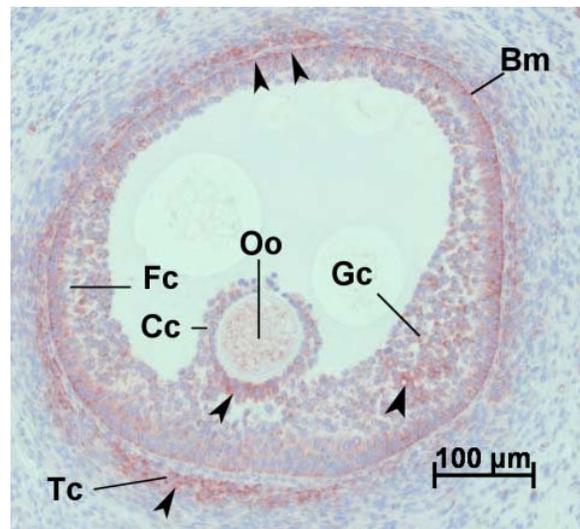


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von VDAC1-Proteinen im bovinen Tertiärfollikel (2,75x vergrößerte Darstellung der Abbildung 7C)

Eingesetzt wurden das Antiserum AS P6 in einer Verdünnung von 1:60. Als Nachweissystem für die Antikörperbindung dienten das Biotin-Streptavidin-Peroxidase-System und AEC als Substrat. Bm= Basalmembran, Oo= Oozyte, Cc= Kumuluszellen, Gc= Granulosazellen, Fc= Follikelzellen, Tc= Theka externa Zellen, Pfeile zeigen auf die deutlich markierten Follikelzellen

3.2.2 Nachweis von VDAC-Protein im Marmoset-Ovar

Die Ergebnisse der Immunhistochemie mit Marmoset-Ovarschnitten unterschieden sich deutlich von denen im bovinen Ovar. Hier führten AS P6 und AS P45 zu einer positiven Immunreaktion (Abbildung 10 A-C und D-F).

Das VDAC1-Protein konnte in den Primordial- und Primärfollikeln in den Oozyten in Form einer fein granulierten deutlichen Rotfärbung im gesamten Ooplasma detektiert werden (Abbildung 10 A). Im Zytoplasma der Follikelzellen von Primordialfollikeln war keine Antigen-Antikörperreaktion zu erkennen (Abbildung 10 A). Bei Primärfollikeln konnte eine dezente Rosafärbung im Zytoplasma der Follikelzellen festgestellt werden (nicht dargestellt). In den Sekundärfollikeln war das Ooplasma deutlich, jedoch etwas schwächer als in den Primären Oozyten angefärbt. Die Markierung war ebenfalls fein granuliert und gleichmäßig verteilt (Abbildung 10 B). Auch im Zytoplasma der Follikelzellen sekundärer Follikel fand eine deutliche Immunreaktion statt. Die feinkörnig strukturierte Färbung erstreckte sich über alle Follikelzellen gleichmäßig (Abbildung 10 B). Die Oozyten der tertiären Follikel waren nicht angefärbt. Es zeigte sich aber eine starke Färbung der Theka externa-Zellen mit dem anti-VDAC1-Antikörper. Die Theka interna-Zellen sowie die Zellen des Kumulus Oophorus

tertiärer Follikel blieben ohne spezifische Markierung, lediglich in den basal gelegenen Granulosazellen war eine leichte Rosafärbung im Zytoplasma erkennbar (Abbildung 10 C). Neben den Oozyten und Follikelzellen wiesen die intravasalen Blutzellen im Marmoset-Ovar eine deutlich positive Immunreaktion mit dem anti-VDAC1-Antikörper auf (nicht gezeigt). Der monoklonale Antikörper Anti-Porin 31 HL wurde zur Verifizierung der Ergebnisse eingesetzt. Beide anti-VDAC1-Antikörper zeigten die gleiche Antigen-Antikörperreaktion im Marmoset-Ovargewebe (nicht dargestellt).

Nach Einsatz des anti-VDAC2-Antikörpers AS P45 zeigte sich eine sehr deutliche Antigen-Antikörperbindung im Ooplasma der primordialen und primären Oozyten. In den Follikelzellen der Primordialfollikel sowie der primären Follikel konnte keine positive Immunreaktion mit AS P45 erzielt werden (Abbildung 10 D). Auch die Oozyten der Sekundärfollikel waren sehr stark angefärbt. Die Follikelzellen der Sekundärfollikel hingegen waren nicht markiert (Abbildung 10 E). Eine sehr ausgeprägte Antigen-Antikörperreaktion zeigte sich auch im Ooplasma der tertiären Oozyten. Von den Follikelzellen hingegen wiesen lediglich vereinzelte Zellen der Theka externa eine dezente Rosafärbung auf. Die Theka interna sowie die Granulosazellen und die Follikelzellen des Kumulus Oophorus waren nicht markiert (Abbildung 10 F). Die Intensität der Immunreaktion in den Oozyten war in allen Entwicklungsstadien gleich stark ausgeprägt, gleichmäßig im Ooplasma verteilt und feinkörnig strukturiert (Abbildung 10 D-F).

Schnitte, die mit AS P31 (anti-VDAC3-Antikörper) behandelt waren, wiesen keine spezifische Markierung auf (Abbildung 10 G-I).

In den Kontrollschnitten, die mit den korrespondierenden Präimmunseren behandelt wurden, konnte keine spezifische Anfärbung beobachtet werden. Stellvertretend für alle Negativkontrollen ist hier das zum VDAC2-Antiserum gehörende Präimmunserum PI P45 dargestellt (Abbildung 10 J-L).

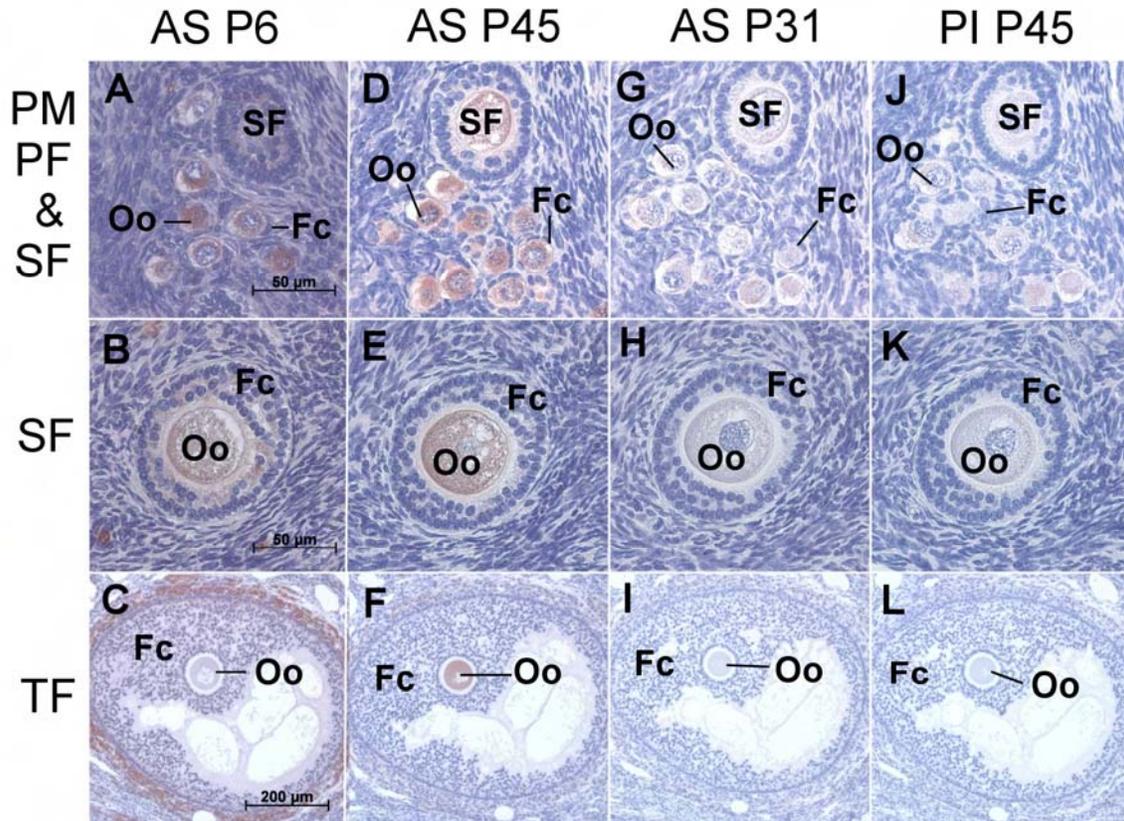


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Proteinen im Marmoset-Ovar

Eingesetzt wurden die Antiseren AS P6 in einer Verdünnung von 1:60 (A-C), AS P45 in einer Verdünnung von 1:40 (D-F); AS P31 in einer Verdünnung von 1:40 (G-I) und das Präimmunsereum PI 45 stellvertretend für alle verwendeten Präimmunsereen in einer Verdünnung von 1:60 (J-L). Als Nachweissystem für die Antikörperbindung dienten das Biotin-Streptavidin-Peroxidase-System und AEC als Substrat. PM = Primordialfollikel, PF= Primärfollikel, SF= Sekundärfollikel, TF= Tertiärfollikel, Oo = Oozyte, Fc= Follikelzellen. Maßstab: Primär- und Sekundärfollikel: 50 µm, Tertiärfollikel: 200 µm.

Im bovinen Ovar konnte in Oozyten und Follikelzellen ein positiver Nachweis für das VDAC1- und für das VDAC3-Protein erbracht werden. Im Marmoset-Ovar dagegen wurden VDAC1 und VDAC2 als Proteine nachgewiesen. Die tierartlichen Unterschiede im Färbemuster abhängig vom Follikelstadium sind in Tabelle 6 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 6: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit anti-VDAC-subtypspezifischen Antikörpern auf Paraffinschnitten von bovinem und Marmoset-Ovargewebe

| | | | AS P6 | AS P45 | AS P31 |
|----------------------|-------------------------|----------------|--------|--------|--------|
| Bovines Ovar | Primordial-follikel | Oozyten | ∅ | ∅ | ∅ |
| | | Follikelzellen | ∅ | ∅ | ∅ |
| | Primärfollikel | Oozyten | +++ | - | +++ |
| | | Follikelzellen | + | - | +++ |
| | Sekundärfollikel | Oozyten | ++ | - | ++ |
| | | Follikelzellen | +++ | (+) | ++ |
| | Tertiärfollikel | Oozyten | + | - | ++ |
| | | Follikelzellen | +++ * | - | - |
| | Endothel und Blutzellen | | +++ | - | - |
| Marmoset-Ovar | Primordial-follikel | Oozyten | +++ | +++ | - |
| | | Follikelzellen | - | - | - |
| | Primärfollikel | Oozyten | +++ | +++ | - |
| | | Follikelzellen | + | - | - |
| | Sekundärfollikel | Oozyten | ++ | +++ | - |
| | | Follikelzellen | ++ | - | - |
| | Tertiärfollikel | Oozyten | - | +++ | - |
| | | Follikelzellen | +++ ** | (+) ** | - |
| | Blutzellen | | +++ | - | - |

* einzelne Follikelzellen

** Theka externa

+++ : sehr deutliche Immunreaktion

++ : deutliche Immunreaktion

+ : schwache Immunreaktion

(+) : sehr schwache Immunreaktion

- : keine Immunreaktion

∅ : Beurteilung nicht möglich, da Follikelstadium nicht eindeutig im Schnitt zu identifizieren.

3.3 Subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten

Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten sollten immunzytochemische (indirekte Immunfluoreszenz) sowie immunelektronenmikroskopische Untersuchungen geben.

3.3.1 Immunzytochemische Identifizierung von VDAC-Proteinen in bovinen Oozyten

Mit Hilfe immunzytochemischer Untersuchungen sollte näher untersucht werden, ob die drei VDAC-Proteinsubtypen in der Plasmamembran und bzw. oder intrazytoplasmatisch lokalisiert sind.

3.3.1.1 Lichtmikroskopischer Nachweis von VDAC mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz

Die Etablierung der indirekten Immunfluoreszenz-Methode wurde in zahlreichen Experimenten unter Verwendung des anti-VDAC1-Antikörpers AS P6 durchgeführt. Um erste Hinweise bezüglich der VDAC-Subtypen 2 und 3 zu erhalten, wurde ein weiterer Versuch mit den Antiseren P45 (anti-VDAC2) und P31 (anti-VDAC3) als Erstantikörper durchgeführt. Ein FITC-markierter Sekundärantikörper diente zur Visualisierung der Immunreaktion. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte im Axioskop2 mot plus bei einer Wellenlänge von 495 nm (Abbildung 12). Aufgrund der Tatsache, dass die Oozyten lichtmikroskopisch nur als gesamte Zelle und nicht in einzelnen Ebenen betrachtet werden konnten, war eine definitive Aussage über die subzelluläre Lokalisation der untersuchten Proteine nicht möglich. Es konnten dennoch erste Hinweise gewonnen werden. Alle mit dem VDAC1-Antikörper behandelten Oozyten zeigten eine deutliche, über die gesamte Oozyte verteilte, körnig strukturierte Fluoreszenz mit besonderer Betonung einzelner Areale. Die Zona Pellucida war nicht markiert (Abbildung 12 A). Die mit dem Präimmunserum PI P6 behandelten Oozyten waren sehr schwach grün angefärbt (Abbildung 12 B).

Entgegen den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit konnte in isolierten Oozyten eine deutliche Immunreaktion mit dem anti-VDAC2-Antikörper AS P45 in Form einer flächigen, wenig strukturierten Grünfärbung beobachtet werden (Abbildung 12 C). Die mit PI P45 inkubierten Oozyten wiesen ebenfalls eine Fluoreszenz auf, die jedoch eindeutig schwächer als die durch das AS P45 hervorgerufene war (Abbildung 12 D). VDAC3 konnte mit dieser Methode nicht zweifelsfrei detektiert werden. Die Intensität der Reaktion war bei AS P31 und PI P31 nahezu identisch (Abbildung 12 E, F). An dieser Stelle

muss aber noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die lichtmikroskopisch ausgewerteten Ergebnisse der indirekten Immunzytochemie aufgrund des geringen Stichprobenumfangs als preliminär zu betrachten sind.

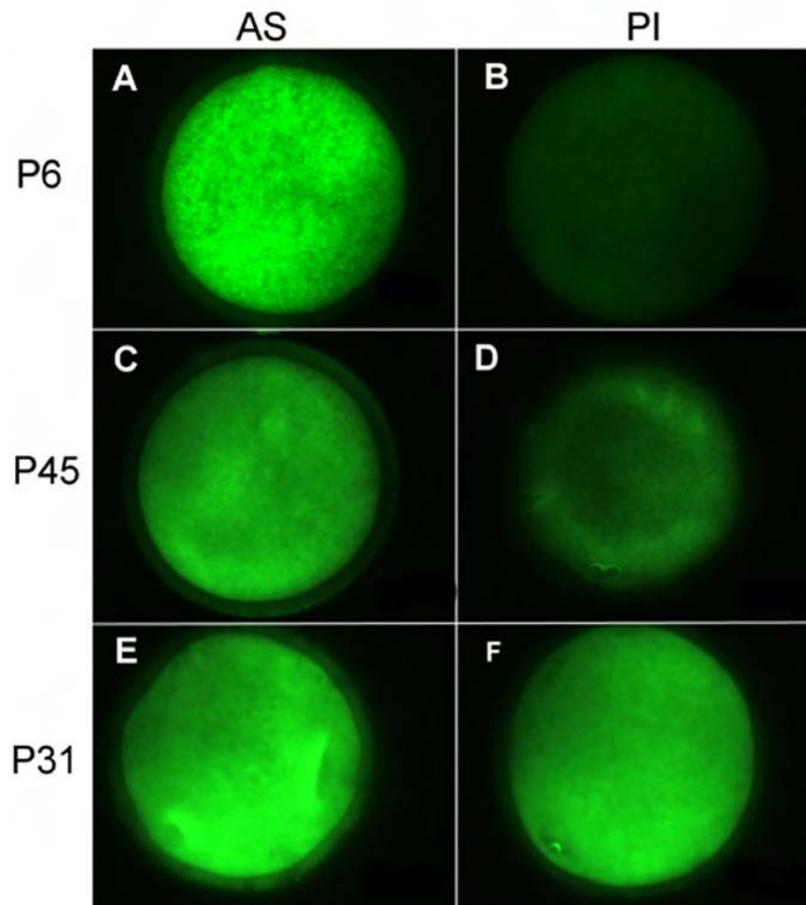


Abbildung 12: Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC1-, VDAC2- und VDAC3-Protein in permeabilisierten bovinen Oozyten. Die Oozyten wurden **A:** mit dem AS P6 (Verdünnung 1:100) **B:** mit der Negativkontrolle PI P6 (Verdünnung von 1:100), **C:** mit dem AS P45 (Verdünnung 1:40) bzw. **D:** mit dem PI P45 (Verdünnung 1:40), **E:** mit dem AS P31 (Verdünnung 1:40) und **F:** mit dem PI 31 (Verdünnung 1:40) inkubiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mit FITC konjugiertem Anti-Kaninchen IgG lichtmikroskopisch am Axioskop2 mot plus (Zeiss) bei einer Wellenlänge von 495 nm. Originalvergrößerung: x 400.

3.3.1.2 Nachweis von VDAC mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie

Nach Etablierung der indirekten Immunfluoreszenz-Methode wurden als Erstantikörper die Antiseren AS P6 (anti-VDAC1), P45 (anti-VDAC2) und P31 (anti-VDAC3) sowie Antikörper Anti-Porin 31 HL (gerichtet gegen VDAC1) und Human anti-VDAC2 (Santa Cruz) in der konfokalen Lasermikroskopie verwendet. Gebundene Antikörper wurden mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Antikörperbindung stellte sich unter dem konfokalen Lasermikroskop (LSM 510 Zeiss Axioplan 2 Imaging) mit dem Argonlaser bei 488 nm als grüne Fluoreszenz dar.

Bindung von anti-VDAC-Antikörpern an die Plasmamembran boviner Oozyten

Um zu untersuchen, ob die VDAC-Proteine in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurden die Oozyten nicht permeabilisiert. Die Oozyten die mit dem AS P6 inkubiert worden waren, zeigten eine deutliche, in feinen Punkten verteilte Markierung des Antigens im Bereich der Plasmamembran der Oozyten (Abbildung 13 A, B). Diese punktförmige Markierung stellte sich im äquatorialen Schnitt der Oozyte in Form eines feinen Ringes dar (Abbildung 13 A). In der Aufsicht auf die Zelloberfläche war die Antikörperbindung als flächige Markierung erkennbar (Abbildung 13 B). Die Zona Pellucida wies keine Färbung auf. Nach Einsatz des Präimmunserums (PI P6) in der Kontroll- Oozytengruppe war in keiner Betrachtungsebene eine Fluoreszenz nachweisbar (Abbildung 13 C). Bestätigt wurde das Ergebnis nach Einsatz des monoklonalen Antikörpers Anti-Porin 31HL (Calbiochem) und Maus IgG_{2a} als Negativkontrolle (nicht gezeigt).

Keine spezifische Antigen-Antikörperbindung konnte nach Verwendung des AS P45, des Human anti-VDAC2-Antikörpers (Santa Cruz) und des AS P31 mit dieser Methode nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

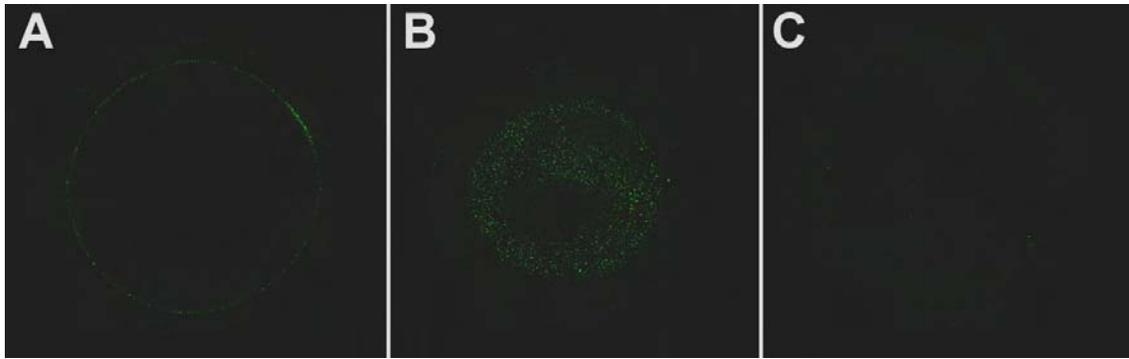


Abbildung 13: Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC1-Protein in nicht permeabilisierten bovinen Oozyten. Die Oozyten wurden **A+B**: mit dem AS P6 in einer Verdünnung von 1:60 und **C**: mit dem PI P6 als Negativkontrolle ebenfalls in einer Verdünnung von 1:60 inkubiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen IgG (Verdünnung: 1:40) unter dem konfokalen Lasermikroskop LSM 510 (Zeiss) bei einer Wellenlänge von 488 nm. **A** = Darstellung der äquatorialen Ebene der Oozyte, **B** = Darstellung der Zelloberfläche der Oozyte, **C** = äquatoriale Ebene der Negativkontrolle. Originalvergrößerung: x 600.

Intrazytoplasmatische Bindung von anti-VDAC-Antikörpern in bovinen Oozyten

Zur Darstellung einer möglichen intrazytoplasmatischen Antikörperbindung wurden die Oozyten mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Oozyten, die mit dem AS P6 behandelt worden waren, zeigten eine deutliche, körnig strukturierte Fluoreszenz im gesamten Ooplasma (Abbildung 14 A). In der horizontalen Schnittebene stellte sich die Peripherie der Oozyte als stärker fluoreszierender Bereich dar. Im Zentrum dagegen war die Antigen-Antikörperreaktion deutlich schwächer ausgeprägt. In der Zona Pellucida zeigte sich stellenweise eine dezente Markierung in Form von radiären Streifen. Nach Inkubation der Oozyten mit dem korrespondierenden Präimmunserum (PI P6) war eine schwache, punktförmige, homogen verteilte Fluoreszenz im gesamten Ooplasma sichtbar, die aufgrund ihrer geringen Ausprägung als unspezifische Reaktion bewertet wurde (Abbildung 14 B).

Bei bovinen Oozyten, die mit AS P31 behandelt wurden, stellte sich das gesamte Ooplasma stark fluoreszierend dar (Abbildung 14 C). Die Fluoreszenz war feinkörnig strukturiert und im Zentrum der Oozyten geringgradig schwächer ausgeprägt. Eine sehr viel schwächere, grobkörnig strukturierte und homogen verteilte Fluoreszenz trat bei der Negativkontrolle (PI P31) auf (Abbildung 14 D).

Wurden die Oozyten mit AS P45 oder dem kommerziellen Human anti-VDAC2-Antikörper (Santa Cruz) inkubiert, konnte keine spezifische Immunreaktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

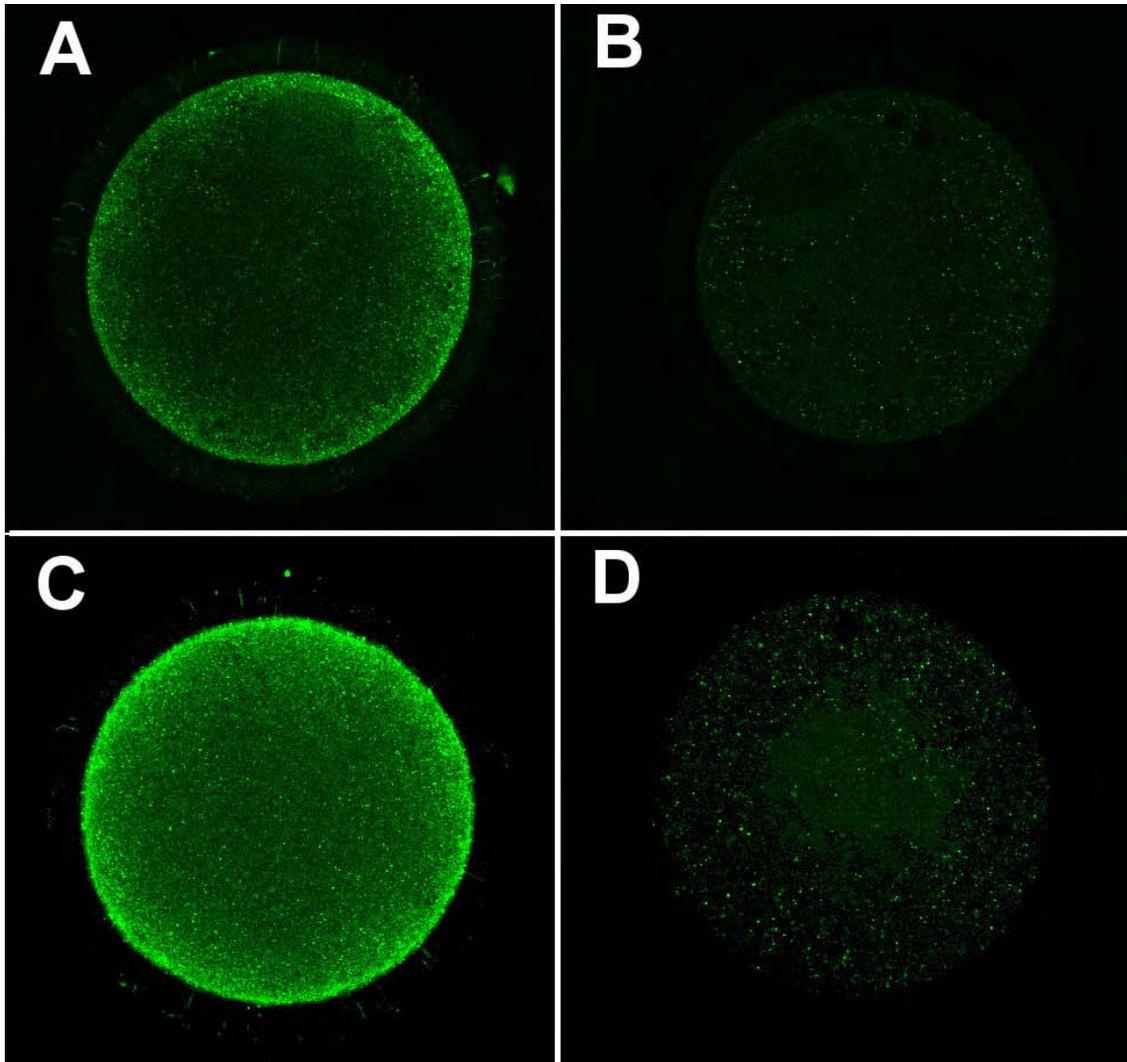


Abbildung 14: Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC1- und VDAC3- Protein in permeabilisierten bovinen Oozyten. Die Oozyten wurden mit AS P6 in einer Verdünnung von 1:200 (A), mit dem AS P31 in einer Verdünnung von 1:80 (C) und als Negativkontrollen mit dem PI P6 in einer Verdünnung von 1:200 (B) und mit dem PI P31 in einer Verdünnung von 1:80 (D) inkubiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen IgG (Verdünnung:1:60) unter dem konfokalen Lasermikroskop LSM 510 (Zeiss) bei einer Wellenlänge von 488 nm. Dargestellt sind jeweils die äquatorialen Ebenen der Oozyten. Originalvergrößerung: x 600.

Eindeutige Hinweise für einen positiven Nachweis des VDAC1-Proteins existieren sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytoplasma boviner Oozyten. Intrazytoplasmatisch konnte durch konfokalmikroskopische Untersuchungen auch mit dem anti-VDAC3-Antikörper eine spezifische positive Immunreaktion dargestellt werden. Über die genaue intrazytoplasmatische Lokalisation der VDAC1- und VDAC3-Proteine kann anhand der bisher vorliegenden immunzytochemischen Untersuchungen keine abschließende Aussage

getroffen werden. Das VDAC2 Protein konnte mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie übereinstimmend mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen weder in der Plasmamembran noch intrazytoplasmatisch in bovinen Oozyten nachgewiesen werden.

3.3.2 Immunelektronenmikroskopische Identifizierung der VDAC1- und VDAC3-Proteine in bovinen Kumulus-Oozyten-Komplexen

Mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie sollte eine genauere intrazytoplasmatische Lokalisation der VDAC1- und VDAC3-Proteine in bovinen Oozyten und Kumuluszellen erfolgen. Wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben wurden die Preembedding- und die Postembedding-Methode angewandt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte weder für VDAC1 noch für VDAC3 eine spezifische Immunreaktion nachgewiesen werden.

Auf Versuche mit dem anti-VDAC2 Antiserum, AS P45, wurde aufgrund der negativen Ergebnisse vorangegangener immunhistochemischer und immunzytochemischer Experimente verzichtet.

3.4 Untersuchungen zur funktionelle Bedeutung von VDAC bei der Volumenregulation boviner Oozyten

In Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von VDAC für die Volumenregulation boviner Oozyten sollte überprüft werden, ob anti-VDAC-Antikörper einen Einfluss auf das Regulatory Volume Decrease (RVD) im hypotonen Milieu haben. Dieser Effekt wurde sowohl nach der Präinkubation der Antikörper mit den Oozyten als auch nach Injektion dieser Antikörper in die Oozyten untersucht.

Dazu wurden die Versuchsbedingungen so optimiert, dass bovine Oozyten, die nicht unter Einfluss eines Antikörpers standen, ein ungestörtes RVD aufwiesen (Abbildung 15). Die Reaktion der Oozyten auf eine hypotone Stimulation verlief unter physiologischen Bedingungen biphasisch. In der ersten Phase nahmen die Oozyten an Volumen zu. Sie erreichten ihre maximale Größe nach ca. sechs Minuten, was eine Größenzunahme im Vergleich zum Ausgangswert von ca. 8% darstellte (Abbildung 15 B). Die zweite Phase, in der die Oozyten ihr Volumen wieder verringerten, begann nach ca. sieben Minuten. Nach ca. 31 Minuten hatten die Zellen nahezu ihre ursprüngliche Größe wieder erreicht (Abbildung 15 C).

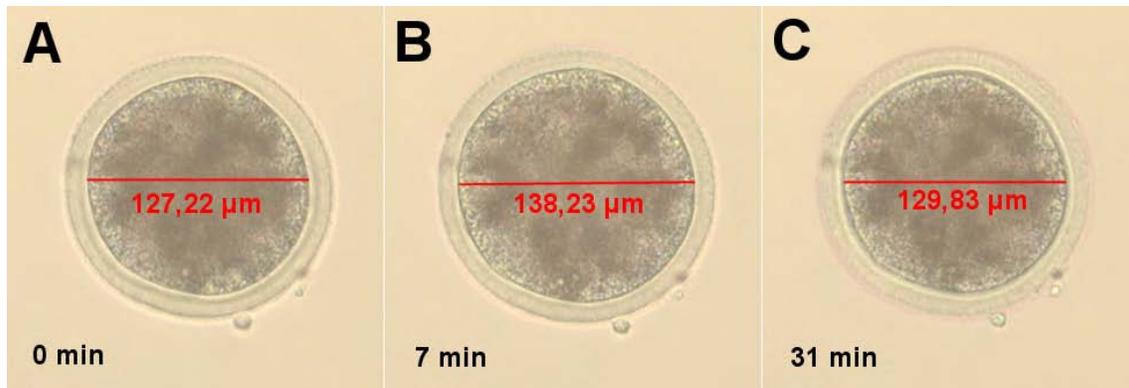


Abbildung 15: Verlauf des Regulatory Volume Decrease in bovinen Oozyten

Die Oozyten wurden mit 190 mmol/kg Ringer-Lösung hypoton stimuliert und der Zelldurchmesser ermittelt. **A:** Zeitpunkt: 0 min (unmittelbar nach Stimulation); **B:** 7 min nach Stimulation (maximaler Durchmesser); **C:** 31 min nach Stimulation.

Um auszuschließen, dass die Oozyten aufgrund einer gestörten Membranintegrität ihr Zellvolumen wieder verringerten, wurden sie am Ende des Versuchs mit Trypanblau angefärbt. Es wurden die Oozyten als intakt betrachtet und ausgewertet, bei denen sich lediglich die Zona Pellucida blau anfärbte, das Zytoplasma aber nahezu ungefärbt erschien (Abbildung 16 A). Die Oozyten, deren Zytoplasma eine starke Blaufärbung zeigten, wurden nicht in Auswertung einbezogen (Abbildung 16 B).

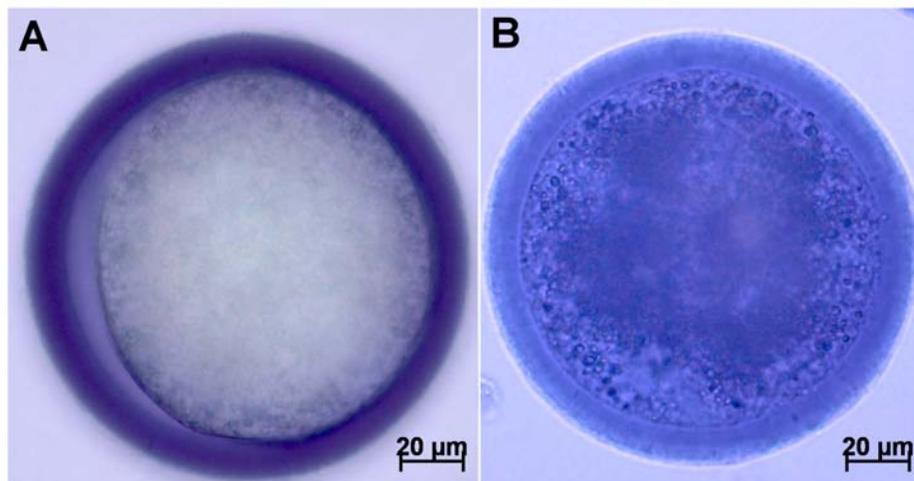


Abbildung 16: Zur Beurteilung der Membranintegrität mit Trypanblau angefärbte bovine Oozyten. **A:** intakte Oozyte, **B:** defekte Oozyte

Da die Oozyten zu Beginn der hypotonen Stimulation unterschiedlich groß waren, wurde der Ausgangsdurchmesser jeder Oozyte als 0% Durchmesser-Zunahme festgelegt. In den Ergebnissen wird die Zunahme des Durchmessers im Vergleich zu diesem Nullwert angegeben.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der Zeit durchgeführt. Bei dieser statistischen Methode wird überprüft, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem Verlauf beider Kurven vorliegen. Es wurde zunächst der gesamte Messzeitraum ausgewertet. Zur näheren Eingrenzung der statistisch signifikanten Unterschiede wurden außerdem die beiden Phasen (Zellschwellung (1-7 min) und RVD (8-31 min)) getrennt ausgewertet. Als statistisch signifikant galten Werte $p < 0,05$. Betrachtet wurde der Faktor „Behandlung“ (Inkubation bzw. Injektion der Oozyten mit Antiserum oder mit Präimmenserum), der anzeigt, ob ein genereller signifikanter Unterschied zwischen beiden Kurven vorliegt, sowie der Faktor „Zeit“, der anzeigt ob ein signifikanter Unterschied der Oozytengröße im gesamten Versuchszeitraum vorliegt. Würden die Oozyten nicht auf die hypotone Stimulation reagieren, dann wäre der Faktor Zeit nicht signifikant. Die „Wechselwirkung zwischen Behandlung und Zeit“ gibt an, ob die Kurven sich im Zeitverlauf unterscheiden, ob z.B. der Maximalwert der Kurve zu einem signifikant unterschiedlichen Zeitpunkt erreicht wird, ob die Kurven eine unterschiedliche Steigung haben oder sich schneiden.

3.4.1 Einfluss von anti-VDAC1-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten

3.4.1.1 Einfluss nach Antikörperinkubation

Abbildung 17 zeigt die mittlere Durchmesser-Veränderung von jeweils 20 bovinen Oozyten, die in anti-VDAC1-Antikörpern (AS P6) bzw. dem Präimmenserum (PI P6) inkubiert und danach mit 190 mM Ringer-Lösung hypoton stimuliert worden waren. Die Oozyten beider Gruppen zeigten im Mittel eine statistisch signifikante Größenveränderung im Zeitverlauf ($p < 0,0001$). Die mit AS P6 inkubierten Oozyten (Abbildung 17 ▲) erreichten ihren maximalen mittleren Durchmesser nach sieben Minuten (8,26% Durchmesser-Zunahme). Der Zelldurchmesser verringerte sich nahezu linear auf 4,15% des Ausgangswertes bis zum Endmesspunkt 31 Minuten nach Stimulation. Die Oozyten der Negativkontrolle (PI P6) zeigten eine ähnliche Größenentwicklung (Abbildung 17 ■). Ihre maximale Größe wurde sechs Minuten nach Stimulation (8,57% Durchmesser-Zunahme) erreicht. Am Versuchsende (31 min nach Stimulation) wiesen sie eine Größezunahme von 4,58% im Vergleich zum Ausgangswert auf. Während des gesamten Versuchsverlaufes war der Mittelwert der Durchmesser der mit PI P6 inkubierten Oozyten größer als der mit AS P6 inkubierten Zellen. Der Größenunterschied zwischen mit AS P6 und PI P6 behandelten Oozyten war statistisch

nicht signifikant ($p_{\text{ges}}=0,55$). Wurden die beiden Zeiträume, der Zeitraum der Zellschwellung (1-7 min) und der des RVD (8-31 min), getrennt ausgewertet, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen AS P6 und PI P6 ($p_{1-7}=0,44$; $p_{8-31}=0,58$). Die Wechselwirkung zwischen der Behandlung (AS P6 vs. PI P6) und der Zeit war statistisch nicht signifikant ($p_{\text{ges}}=1,0$; $p_{1-7}=0,29$; $p_{8-31}=0,999$).

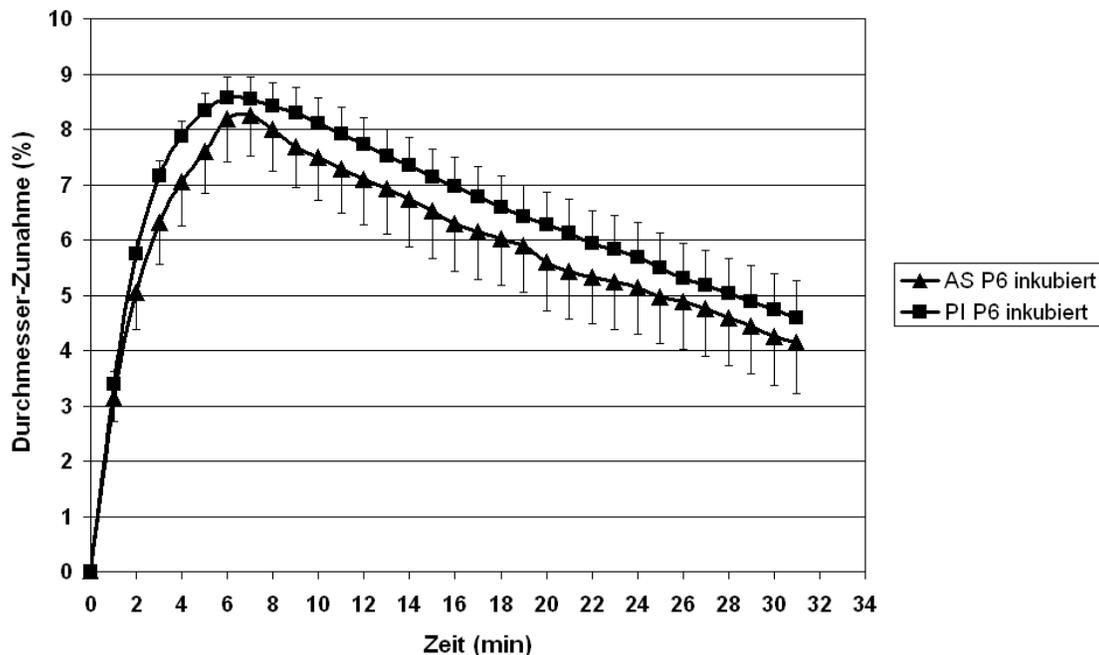


Abbildung 17: Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation mit 190 mM Ringer-Lösung. Die Oozyten wurden vor der hypotonen Stimulation 25 min bei 38,5°C und 5% CO₂ in AS P6 (1:20 in M199 verdünnt) bzw. in PI P6 (1:20 in M199 verdünnt) inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (%) dargestellt; n=20 Oozyten.

3.4.1.2 Einfluss nach Antikörperinjektion

Auch die mit dem AS P6 bzw. mit dem PI P6 injizierten Oozyten wiesen eine statistisch signifikante Größenveränderung ($p<0,0001$) im Verlauf der Zeit auf (Abbildung 18). Der mittlere Durchmesser der 20 bovinen Oozyten, denen AS P6 injiziert worden war, vergrößerte sich innerhalb der ersten sechs Minuten nach hypotoner Stimulation auf 8,17% des Ausgangswertes. Nach Erreichen dieses Maximalwertes verringerte sich der mittlere Oozytendurchmesser wieder nahezu linear auf 5,34% bis zum Versuchsende (Abbildung 18 ▲). Auch die Gruppe der Oozyten, in die das PI P6 injiziert wurde, erreichte im Mittel ihren größten Durchmesser nach sechs Minuten (7,38% Durchmesser-Zunahme). Am letzten

Messpunkt waren die Oozyten dieser Gruppe im Mittel noch 5,22% größer als zu Beginn der hypotonen Stimulation (Abbildung 18 ■).

In diesem Versuch hatte die Gruppe Oozyten, denen das AS P6 injiziert wurde, im Mittel über den gesamten Zeitraum einen größeren Durchmesser als die Gruppe Oozyten, welchen das PI P6 injiziert wurde. Der Unterschied bezüglich der Behandlung zwischen AS P6 und PI P6 war statistisch nicht signifikant ($p_{ges}=0,45$, $p_{1-7}=0,21$; $p_{8-31}=0,52$). Dagegen wies die Wechselwirkung zwischen Behandlung (AS P6 vs. PI P6) und Zeit über den gesamten Messzeitraum eine Signifikanz auf ($p_{ges}=0,0012$). Die weitere zeitliche Eingrenzung zeigte, dass während der Zellschwellung die Wechselwirkung nicht signifikant war ($p_{1-7}=0,18$). Dagegen verringerte sich während des RVD der Abstand beider Kurven statistisch signifikant ($p_{8-31}<0,0001$).

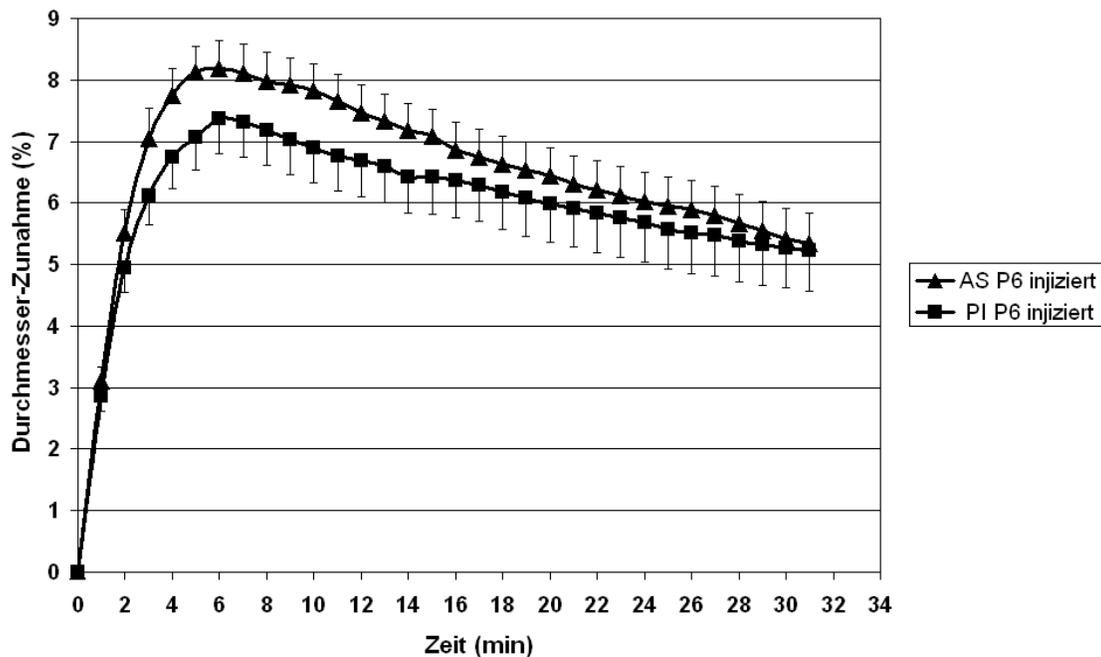


Abbildung 18: Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation mit 190 mM Ringer-Lösung. In die Oozyten wurde vor der hypotonen Stimulation AS P6 unverdünnt bzw. in die Oozyten der Negativkontrolle PI P6 unverdünnt injiziert (8 sec, 190Pa). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (%) dargestellt; n=20 Oozyten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass nach der Inkubation der Oozyten mit anti-VDAC1-Antikörpern kein statistisch signifikanter Unterschied der Größenveränderung zwischen den mit AS P6 und PI P6 inkubierten Oozyten vorlag. Nach Injektion des anti-VDAC1-Antiserums bzw. des korrespondierenden Präimmuserums verlief die mittlere Größenveränderung beider Oozytengruppen nach hypotoner Stimulation signifikant

unterschiedlich. Es war eine Wechselwirkung zwischen Behandlung (AS P6 vs PI P6) und Zeit vorhanden. Das bedeutet, dass das AS P6 im Zeitverlauf einen anderen Effekt auf die Größenentwicklung boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation hatte als das PI P6. Im vorliegenden Fall nahmen die Oozyten, in die das AS P6 injiziert wurde, während des RVD stärker an Volumen ab als die mit PI P6 injizierten Oozyten.

3.4.2 Einfluss von anti-VDAC2-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten

3.4.2.1 Einfluss nach Antikörperinkubation

Das Ergebnis der hypotonen Stimulation von Oozyten, die zuvor mit AS P45 bzw. PI P45 inkubiert worden waren, ist in Abbildung 19 dargestellt. In beiden Gruppen war eine statistisch signifikante Veränderung ($p < 0,0001$) des Oozytendurchmessers über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar. Die Kurve mit Dreiecken (\blacktriangle) repräsentiert die gemittelte Durchmesserentwicklung von zehn mit AS P45 vorbehandelten bovinen Oozyten. Den maximalen Durchmesser erreichte diese Gruppe sechs Minuten nach Beginn der hypotonen Stimulation (7,09% Durchmesser-Zunahme). Bis zum letzten Messzeitpunkt (31 min) hatte diese Gruppe ihren Durchmesser kontinuierlich auf 1,91% reduziert. Den größten mittleren Durchmesser erreichte die im PI P45 inkubierte Gruppe (Abbildung 19 \blacksquare) nach fünf Minuten (7,69% Durchmesser-Zunahme). Diese Oozyten hatten nach 31 Minuten mit 1,63% einen geringeren Durchmesser im Vergleich zu den mit AS P45 inkubierten. Über den gesamten Messzeitraum betrachtet unterschieden sich die beiden Behandlungen (AS P45 vs. PI P45) nicht signifikant ($p = 0,85$). Wurden die beiden Phasen (die der Zellschwellung (1-7 min) und die der Zellschrumpfung (8-31 min) allerdings getrennt betrachtet, so zeigte sich, dass die Vergrößerung der Oozyten zwischen AS P45 und PI P45 statistisch signifikant unterschiedlich verlief ($p = 0,0078$). Während des RVD (8-31 min) konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Behandlung festgestellt werden. Die Wechselwirkung zwischen Behandlung (AS P45/PI P45) und Zeit war über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Im Zeitraum 1-7 min war die Wechselwirkung statistisch signifikant ($p = 0,0003$). Während des RVD (8-31 min) lag allerdings keine Signifikanz vor ($p = 0,68$). Die statistische Wechselwirkung zeigt an, dass im frühen Zeitverlauf die Inkubation im PI P45 einen zunehmenden Effekt auf das Oozytenvolumen aufwies, der jedoch bis zur achten Minute wieder verschwand.

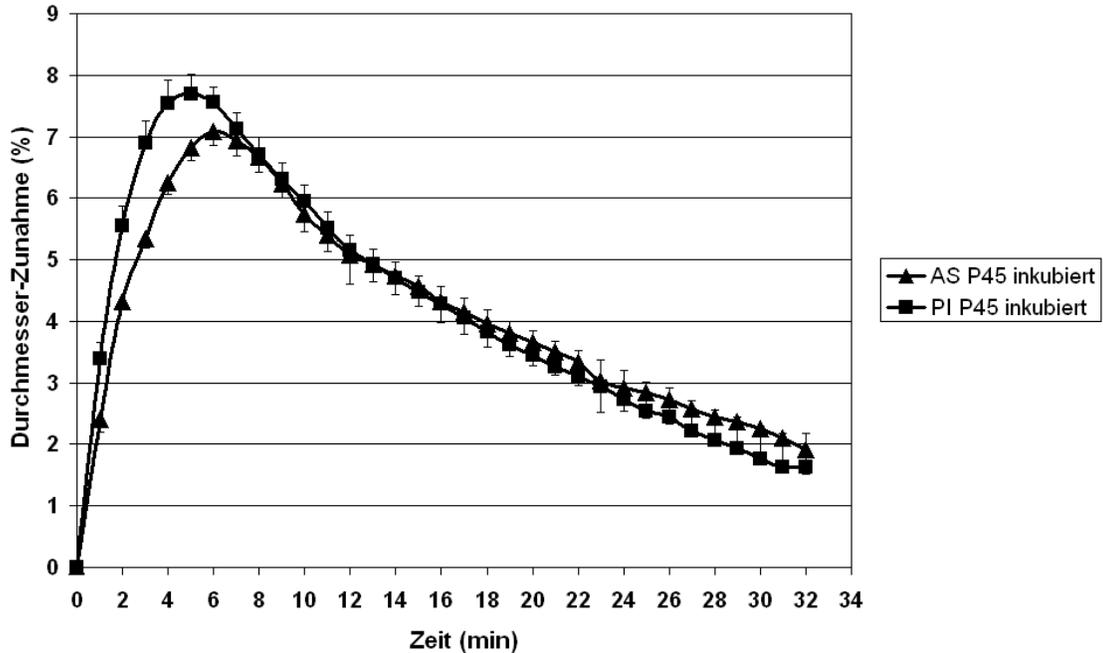


Abbildung 19: Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation mit 190 mM Ringer-Lösung. Die Oozyten wurden vor der hypotonen Stimulation 25 min bei 38,5°C und 5% CO₂ in AS P45 (1:20 in M199 verdünnt) bzw. in PI P45 (1:20 in M199 verdünnt) inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (%) dargestellt; n=10 Oozyten.

3.4.2.2 Einfluss nach Antikörperinjektion

In Abbildung 20 ist die Fähigkeit zum RVD von Oozyten, in die AS P45 bzw. PI P45 injiziert wurde, dargestellt. Beide Kurven, AS P45 (▲) und PI P45 (■), erreichten ihren größten Wert zum Zeitpunkt sechs Minuten (AS 7,52% und PI 7,27% Durchmesser-Zunahme). Am Ende des Versuches (31 min) waren die mit AS P45 injizierten Oozyten noch 2,74%, die mit PI P45 injizierten Oozyten noch 2,09% größer als zu Beginn der hypotonen Stimulation. Die mittlere Größenveränderung der Oozyten war über den gesamten Zeitraum statistisch signifikant ($p < 0,0001$), d.h. sie nahmen statistisch signifikant an Größe zu und wieder ab. Bezüglich der Wechselwirkung zwischen Behandlung (AS P45 vs PI P45) und Zeit lag ebenfalls eine statistische Signifikanz vor ($p_{\text{ges}} < 0,0001$, $p_{1-7} = 0,011$, $p_{8-31} = 0,0057$). Sowohl über die gesamte Zeit betrachtet als auch in der Phase der Zellschwellung und der des RVD getrennt betrachtet zeigte sich für die Behandlung keine statistische Signifikanz ($p_{\text{ges}} = 0,32$; $p_{1-7} = 0,63$; $p_{8-31} = 0,19$).

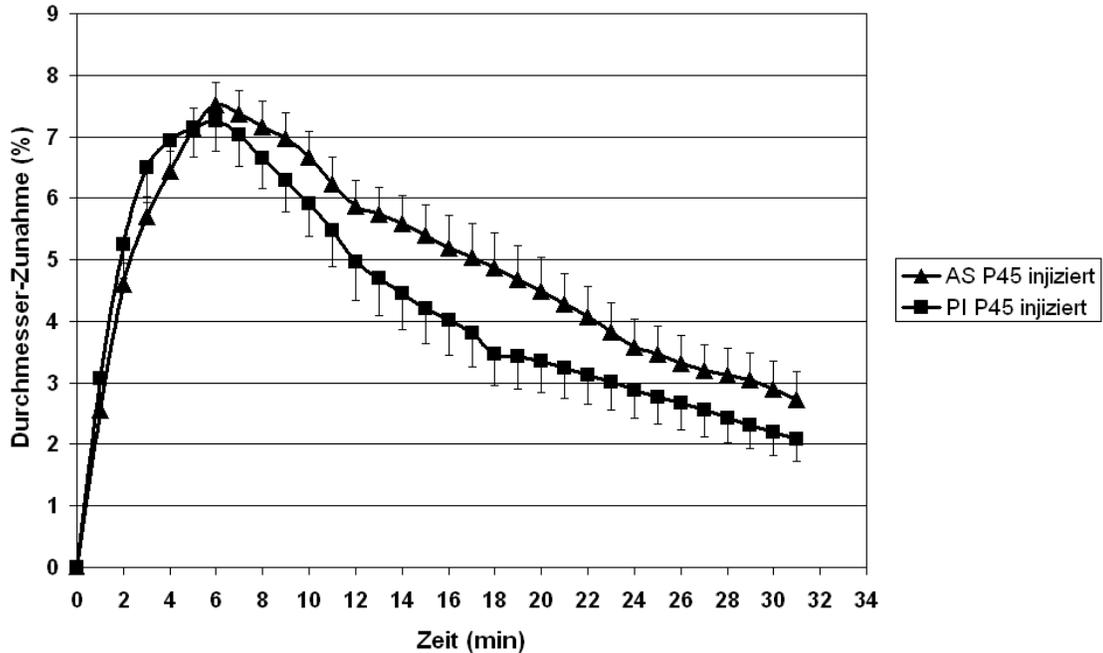


Abbildung 20: Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation mit 190 mM Ringer-Lösung. In die Oozyten wurde vor der hypotonen Stimulation AS P45 unverdünnt bzw. in die Oozyten der Negativkontrolle PI P45 unverdünnt injiziert (8 sec, 190Pa). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (%) dargestellt; n=10 Oozyten.

Für die Inkubation der Oozyten mit anti-VDAC2-Antikörper AS P45 bzw. PI P45 kann festgehalten werden, dass die Oozyten beider Gruppen auf statistisch signifikante Weise unterschiedlich ihr Volumen veränderten. Die als Negativkontrolle in PI P45 inkubierten Oozyten nahmen stärker an Volumen zu und erreichten ihren Maximalwert früher. Während des RVD lag kein signifikanter Unterschied vor. Das Ergebnis der mit AS P45 bzw. PI P45 injizierten Oozyten zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der Wechselwirkung, der sich über alle drei betrachteten Zeiträume erstreckte. Dies bedeutet, dass das injizierte AS P45 im Zeitverlauf einen anderen Effekt auf die Größenveränderung boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation hatte als das injizierte PI P45. Die mit AS injizierten Oozyten erreichten einen größeren Maximalwert als die mit PI injizierten Oozyten und hatten auch am Versuchsende im Mittel einen größeren Durchmesser als die Kontrollgruppe.

3.4.3 Einfluss von anti-VDAC3-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten

3.4.3.1 Einfluss nach Antikörperinkubation

Die Oozyten, die mit dem AS P31 (▲) und PI 31 (■) inkubiert worden waren, zeigten im Mittel eine statistisch signifikante Größenveränderung mit $p < 0,0001$ im Verlauf der Zeit (Abbildung 21). Die mit dem AS P31 inkubierten Oozyten erreichten den größten Durchmesser nach sechs Minuten (7,85% Durchmesser-Zunahme). Das Maximum des Durchmessers der Kontroll-Oozyten (PI P31) wurde fünf Minuten nach hypotoner Stimulation erreicht (7,25% Durchmesser-Zunahme). Im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser (Messpunkt 0) konnte bei den mit PI P31 behandelten Oozyten 31 Minuten nach hypotoner Stimulation ein um 2,23% vergrößerter Durchmesser beobachtet werden. Dagegen blieben die mit AS P31 inkubierten Oozyten am Endmesspunkt (31 min) um 3,61% größer. Die Wechselwirkung zwischen Behandlung (AS P31 vs. PI P31) und Zeit wies für den gesamten Messzeitraum einen signifikanten Unterschied zwischen AS P31 und PI P31 auf ($p < 0,0001$). Die nähere zeitliche Eingrenzung zeigte, dass sich der statistisch signifikante Unterschied ausschließlich auf den Abschnitt der Volumenreduktion bezog ($p_{1-7} = 0,49$; $p_{8-31} = 0,0081$). In der Phase des RVD (8-31 min) divergierten die beiden Kurven: während die Oozyten der Negativkontrolle im Mittel eine physiologische Volumenreduktion zeigten, blieben die Oozyten der Testgruppe größer. Über die gesamte Versuchszeit betrachtet lag kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Faktors „Behandlung“ zwischen AS P31 und PI P31 vor ($p_{\text{ges}} = 0,072$, $p_{1-7} = 0,48$, $p_{8-31} = 0,056$).

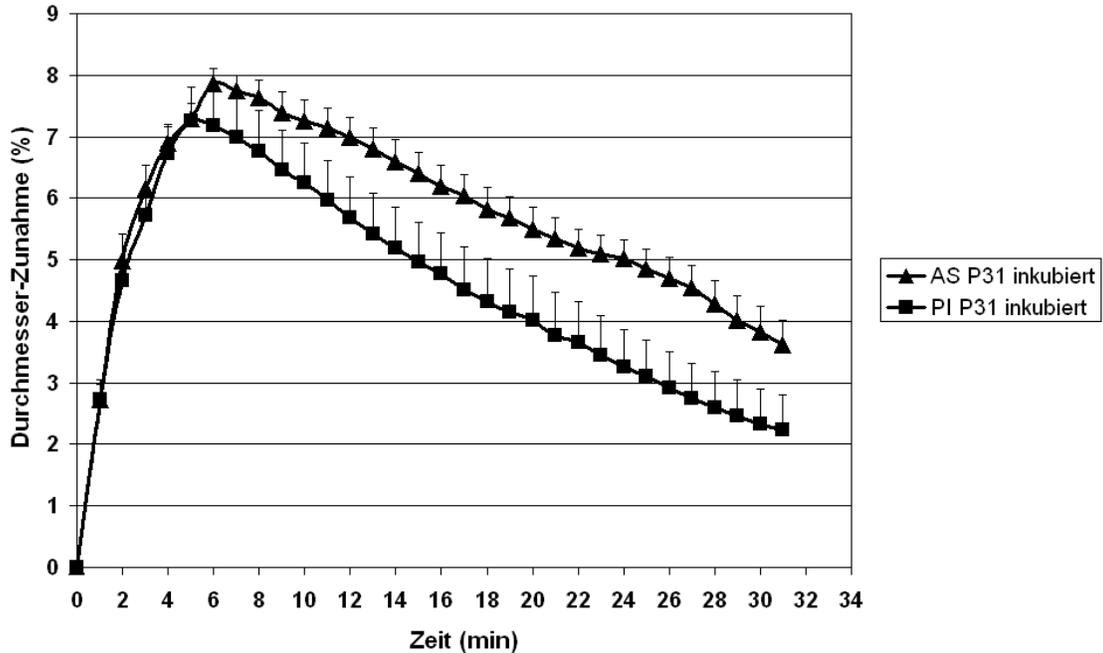


Abbildung 21: Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation mit 190 mM Ringer-Lösung über 32 min. Die Oozyten wurden vor der hypotonen Stimulation 25 min bei 38,5°C und 5% CO₂ in AS P31 (1:20 in M199 verdünnt) bzw. in PI P31 (1:20 in M199 verdünnt) inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (%) dargestellt; n=10 Oozyten.

3.4.3.2 Einfluss nach Antikörperinjektion

Interessante Ergebnisse erbrachte die hypotone Stimulation boviner Oozyten, in die zuvor das AS P31 (▲) bzw. das PI 31 (■) injiziert worden war (Abbildung 22). Der mittlere Größenverlauf der mit AS P31 injizierten Oozyten erreichte seinen Höhepunkt erst nach 9 Minuten (6,87% Durchmesser-Zunahme). Die Oozyten waren nach 31 Minuten mit 4,62% noch deutlich größer als zu Beginn der hypotonen Stimulation. Die mit PI P31 (Präimmunserum) injizierten Oozyten zeigten dagegen ein relativ physiologisches Verhalten. Sie erreichen ihren größten Durchmesser im Mittelwert nach fünf Minuten mit 7,24% Durchmesser-Zunahme und verringerten ihren Durchmesser in den folgenden 26 Minuten wieder auf 3,16% im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser. Die Oozyten beider Gruppen nahmen im Beobachtungszeitraum statistisch signifikant an Größe zu und wieder ab ($p < 0,0001$). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen nicht signifikanten Unterschied der Kurven bezüglich der Behandlung über den gesamten Zeitraum ($p_{ges} = 0,31$) und für die Zeit von 1-7 min ($p_{1-7} = 0,0666$). Ein signifikanter Unterschied der Behandlung (AS vs. PI) dagegen war im Zeitraum von 8-31 min ($p_{8-31} = 0,0062$) festzustellen. Bezüglich der Wechselwirkung zwischen Zeit und Behandlung zeigte sich eine statistische Signifikanz für

den gesamten Messzeitraum ($p_{\text{ges}} < 0,0001$). Nach getrennter Betrachtung der beiden Phasen (1-7 min (Zellschwellung) und 8-31 min (RVD)) war keine statistische Signifikanz ($p_{1-7} = 0,2290$; $p_{8-31} = 0,9992$) nachweisbar.

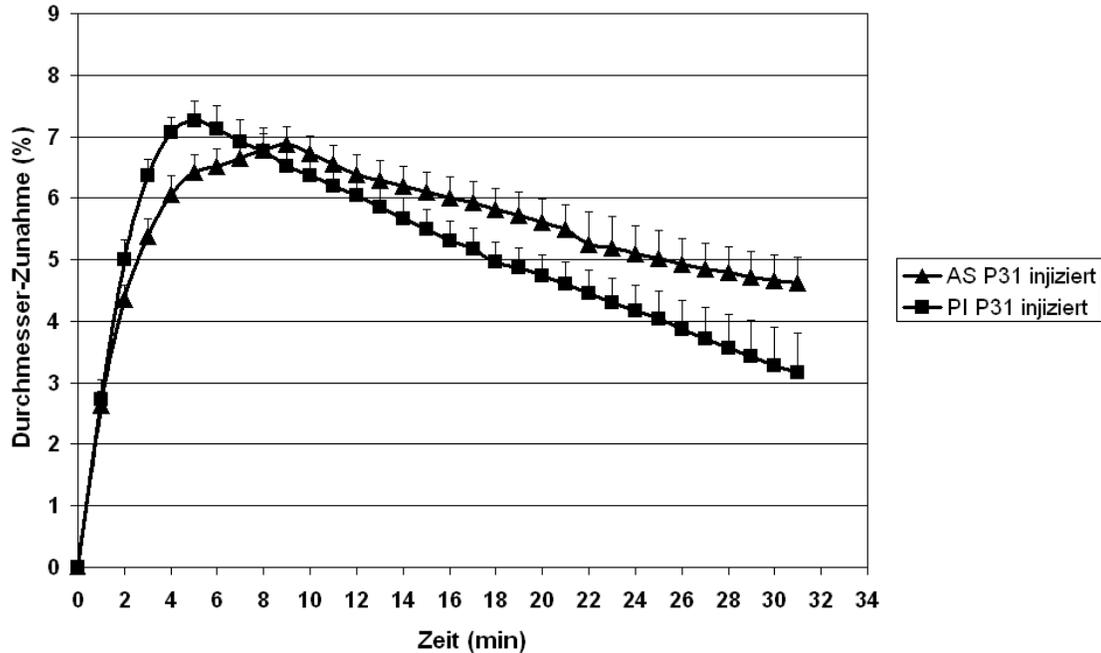


Abbildung 22: Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation mit 190 mM Ringer-Lösung. In die Oozyten wurde vor der hypotonen Stimulation AS P31 unverdünnt bzw. in die Oozyten der Negativkontrolle PI P31 unverdünnt injiziert (8 sec, 190Pa). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (%) dargestellt; n=10 Oozyten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nach der Inkubation boviner Oozyten mit AS P31 bzw. PI P31 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Oozytengruppen während des RVD vorlag. Die Oozyten der Testgruppe (AS P31) wurden größer, erreichten ihre maximale Größe später als die Kontrollgruppe (PI P31) und reduzierten ihr Volumen in geringerem Maße als die Kontrollgruppe.

Auch nach der Injektion der anti-VDAC3-Antikörper bzw. des korrespondierenden Präimmunsersums unterschieden sich die beiden Versuchsgruppen bzgl. der Größenabnahme während des RVD statistisch signifikant. Die mit AS P31 behandelten Oozyten erreichten ihre maximale Größe deutlich später (neun Minuten) und blieben größer als die Kontrollgruppe. Es scheint eine Tendenz zu bestehen, dass das RVD der mit AS P31 behandelten Oozyten im Vergleich zu den mit PI P31 behandelten Oozyten eingeschränkt ist. Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse sind in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Zeit“ für die relative Durchmesser-Zunahme boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation.

| | gesamter Zeitraum | Zeit 1-7 min | Zeit 8-31 min |
|------------------------------------|-------------------|--------------|---------------|
| <u>VDAC1 inkubiert</u> | | | |
| Behandlung | p=0,55 | p=0,44 | p=0,58 |
| Zeit | p<0,0001 | p<0,0001 | p<0,0001 |
| Wechselwirkung Behandlung/ Zeit | p=1,0 | p=0,29 | p=0,999 |
| <u>VDAC1 injiziert</u> | | | |
| Behandlung | p=0,45 | p=0,21 | p=0,52 |
| Zeit | p<0,0001 | p<0,0001 | p<0,0001 |
| Wechselwirkung Behandlung/ Zeit | p=0,0012 | p<0,18 | p<0,0001 |
| <u>VDAC2 inkubiert</u> | | | |
| Behandlung | p=0,85 | p=0,0078 | p=0,74 |
| Zeit | p<0,0001 | p<0,0001 | p<0,0001 |
| Wechselwirkung Behandlung/ Zeit | p<0,0001 | p=0,0003 | p=0,68 |
| <u>VDAC2 injiziert</u> | | | |
| Behandlung | p=0,32 | p=0,63 | p=0,19 |
| Zeit | p<0,0001 | p<0,0001 | p<0,0001 |
| Wechselwirkung Behandlung/ Zeit | p<0,0001 | p=0,011 | p=0,0057 |
| <u>VDAC3 inkubiert</u> | | | |
| Behandlung | p=0,072 | p=0,48 | p=0,057 |
| Zeit | p<0,0001 | p<0,0001 | p<0,0001 |
| Wechselwirkung Behandlung/ Zeit | p<0,0001 | p=0,49 | p=0,0081 |
| <u>VDAC3 injiziert</u> | | | |
| Behandlung | p=0,31 | p=0,067 | p=0,0062 |
| Zeit | p<0,0001 | p<0,0001 | p<0,0001 |
| Wechselwirkung Behandlung/ Zeit | p<0,0001 | p=0,23 | p=0,999 |

Als statistisch signifikant gelten p-Werte p<0,05.

4 Diskussion

Die dargestellten Untersuchungen dienten dazu, die Genexpression von VDAC in Oozyten des Rindes und des Marmoset-Affen nachzuweisen. VDAC-Protein sollte in Zellen des Ovars beider Spezies identifiziert werden, um im Anschluss daran die subzelluläre Lokalisation der VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten zu untersuchen. Des Weiteren sollte in funktionellen Studien die physiologische Relevanz der drei VDAC-Subtypen bezüglich der Volumenregulation boviner Oozyten evaluiert werden.

4.1 Nachweis der Expression VDAC-kodierender Gene

Um eine Genexpression genau zu untersuchen, sind höchst sensitive Methoden gefordert. Während der Northern Blot und die *in situ* Hybridisierung durch eine relativ geringe Sensitivität (Bustin, 2000) und einen hohen Bedarf an gesamt-RNA limitiert sind, ist im Vergleich dazu die RT-PCR die sensitivste Methode (Liu und Saint, 2002). Aus diesem Grund wurde zur Evaluierung der Expression der VDAC-kodierenden Gene die RT-PCR als Nachweismethode gewählt.

Ausgehend von der gesamt-RNA boviner Oozyten konnte mit Hilfe spezifischer Primerpaare die Expression der drei VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten dargestellt werden. Die Sequenzierung der PCR-Produkte und der Vergleich der Ergebnisse mit der NCBI-Datenbank bestätigte das Ergebnis. Eine Kontamination mit gDNA wurde aufgrund der deutlich größeren gDNA-Amplifikate ausgeschlossen.

Zum Zeitpunkt des Primerdesigns war die genomische Sequenz der VDAC-kodierenden Gene für den Marmoset-Affen nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung der Intron-Exon-Grenzen auf die bekannten genomischen VDAC-Sequenzen des Menschen zurückgegriffen. Trotz der hohen Homologie der Sequenzen von Mensch und Marmoset-Affe konnten Unterschiede zwischen den Intron-Exon-Grenzen und damit Fehler im Primerdesign nicht ausgeschlossen werden. Nach Verwendung des hVDAC1-Primerpaares wurden, obwohl beim Menschen Intron überspannend, zwei gleich große Amplifikate für die cDNA und gDNA beobachtet. Das gleiche Phänomen trat bei Einsatz des porcinen VDAC2-Primerpaares auf. Die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der Proben mit genomischer DNA konnte durch die Vorbehandlung der Proben mit DNase stark vermindert werden (Hurteau und Spivack, 2002). Ausserdem enthielt jede Probe lediglich die gDNA von zehn Oozyten, wodurch die Möglichkeit einer Kontamination sehr gering war. Das Ergebnis der Sequenzierung des cDNA-Amplifikates aus Marmoset-Oozyten unter Einsatz des hVDAC1-Primerpaares wies mit einer 98%igen Übereinstimmung mit der bekannten cDNA-Sequenz von humanem VDAC1 auf eine Expression der VDAC1-kodierenden Gene in Marmoset-

Oozyten hin. Für VDAC2 konnte im Agarosegel ein Amplifikat mit errechneter Größe dargestellt werden. Weitergehende Versuche wie die Sequenzierung des PCR-Produktes konnte aufgrund der Limitierung des Untersuchungsmaterials nicht durchgeführt werden, so dass eine abschließende Aussage in diesem Fall nicht erfolgen kann.

Die RT-PCR Ergebnisse mit hVDAC3 Primern zeigten, dass das verwendete Primerpaar auch beim Marmoset-Affen Intron überspannend war. Die cDNA- und gDNA-Amplifikate unterschieden sich eindeutig in ihrer Größe. Dieser erste Hinweis einer Expression des VDAC3-kodierenden Gens in Marmoset-Oozyten konnte anschließend durch die Sequenzierung des Amplifikates (96% Übereinstimmung mit der bekannten humanen VDAC3-Sequenz) bestätigt werden.

Mit den hier dargestellten molekularbiologischen Untersuchungen konnte die Expression der VDAC1-, 2- und 3-Isoformen in bovinen und erstmals auch in Marmoset-Oozyten nachgewiesen werden. Die Expression VDAC-kodierender Gene wurde bereits in anderen Geweben gezeigt (Blachly-Dyson *et al.*, 1993; De Pinto *et al.*, 1987). Steinacker *et al.* (2000) hatten VDAC1 in der Plasmamembran von *Xenopus laevis*-Oozyten nachgewiesen, jedoch ausschließlich auf Proteinebene. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte die Expression von VDAC1- und VDAC2-RNA und Protein in homogenisiertem Ovargewebe von *Drosophila melanogaster* (Guarino *et al.*, 2006).

Da die konventionelle RT-PCR keine Rückschlüsse auf die eingesetzte Transkriptmenge zulässt, konnte nur eine qualitative Aussage über die Expression der VDAC-Proteine getroffen werden.

4.2 Anti-VDAC-Antikörper

Der Nachweis von VDAC auf mRNA Ebene liefert keine Aussage darüber, ob die Translation von mRNA in ein Protein stattfindet.

Anti-VDAC-Antikörper wurden zum Nachweis einer Protein-Expression der VDAC-Isoformen in den untersuchten Gameten eingesetzt. Bei den verwendeten Antiseren handelte es sich um die hinsichtlich ihrer Isoformspezifität charakterisierten, in Kaninchen generierten, subtypspezifischen anti-VDAC Peptidantikörper AS P6 (anti-VDAC1), AS P45 (anti-VDAC2) und AS P31 (anti-VDAC3) (Hinsch *et al.*, 2004). Die als Antigen verwendeten Peptidsequenzen zur Generierung von AS P6 und AS P45 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. In der Literatur wurden zwar schon zuvor monoklonale und polyklonale anti-VDAC-Antikörper beschrieben (Babel *et al.*, 1991), doch ihre Spezifität konnte nicht

zufriedenstellend nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden sie für die hier durchgeführten Versuche nicht herangezogen.

Ergänzende Untersuchungen wurden mit dem monoklonalen Antikörper anti-Porin 31 HL (Calbiochem) durchgeführt. Dieser Antikörper ist gegen den N-Terminus von humanem VDAC1 (Porin 31HL) gerichtet, kreuzreagiert aber unter anderem in Frosch-Oozyten mit VDAC2 (Steinacker *et al.*, 2000). Die subzelluläre Lokalisation von VDAC2 wurde in konfokalmikroskopischen Studien zusätzlich mit Hilfe des anti-VDAC2-Antikörpers (C-17, Santa Cruz) untersucht. Hierbei handelt es sich um affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper, die gegen ein Peptid nahe dem C-Terminus humanem VDAC2 gerichtet sind (Chandra *et al.*, 2005).

4.3 Immunhistochemische Identifizierung der VDAC-Proteine im Ovar

In dieser Arbeit wurde VDAC- Protein mit Hilfe der Immunhistochemie in Säugetier-Oozyten und Follikelzellen am Beispiel von Rind und Marmoset nachgewiesen. Die Detektion der einzelnen VDAC-Protein Subtypen in den Oozyten und in den Follikelzellen war abhängig vom Entwicklungsstadium der Follikel und von der untersuchten Spezies.

Bovines Ovar

Davon ausgehend, dass die eingesetzten anti-VDAC-Antikörper subtypspezifisch sind, konnte VDAC1-Protein beim Rind in Oozyten, Follikelzellen, Gefäßendothelien und Erythrozyten detektiert werden. Dabei erbrachten beide verwendeten anti-VDAC1-Antikörper, anti-Porin 31 HL (Calbiochem) und AS P6 (Hinsch *et al.*, 2004) ein übereinstimmendes Ergebnis. In den Oozyten konnte eine Abnahme der Immunreaktion mit fortschreitender Follikelentwicklung festgestellt werden. Diese Reduktion der Farbdichte im Ooplasma von großen Oozyten könnte mit deren größerem Zellvolumen und dem damit höheren Verteilungseffekt in Zusammenhang stehen. Wenn die Größenzunahme von Oozyten und damit verbundene Verteilungseffekte die Ursache für eine Reduktion der Farbintensität sind, kann dies auch bedeuten, dass die Proteinsynthese mit zunehmender Follikelreife sistiert bzw. abnimmt. Oozyten verfügen über Regulationsmechanismen, welche die Stabilität der mRNA kontrollieren und die Translation während der Maturation und in frühen Embryogenesestadien unterdrücken. Dieser Mechanismus ist essentiell für eine normale frühembryonale Entwicklung (Bettegowda und Smith, 2007). Vertebraten Oozyten synthetisieren während der Oogenese mRNA, die über lange Zeit in polyadenylierter Form gespeichert und erst in der Embryonalentwicklung translatiert wird (Pique *et al.*, 2006). Bestätigt wird der Nachweis von VDAC1-Protein in den Oozyten durch ein entsprechendes

Resultat aus den RT-PCR-Experimenten mit isolierten Oozyten. Erste Hinweise für das Vorhandensein von VDAC1-Protein in *Xenopus laevis*-Oozyten publizierten Steinacker *et al.* (2000).

Der Nachweis des VDAC1-Proteins gelang in bovinen Follikelzellen aller untersuchten Stadien vom Primärfollikel bis hin zum Tertiärfollikel, wobei mit Heranreifen des Follikels eine moderate Intensitätssteigerung der Reaktion zu verzeichnen war. In den Tertiärfollikeln wurde VDAC1 in den Kumuluszellen, den Granulosazellen und den Thekazellen nachgewiesen. Auffällig dabei war, dass einzelne Follikelzellen eine prominente positive Immunreaktion aufwiesen. Dies könnte mit Apoptosevorgängen im Follikel in Zusammenhang stehen. Follikuläre Atresie ist nicht ein plötzlich auftretendes Geschehen, bei dem alle Zellen zugleich zu Grunde gehen, sondern ein Prozess, in welchem zunächst ein Teil der Granulosazellen abstirbt, während die übrigen Zellen lebensfähig bleiben. In späteren Stadien der Follikelatresie greift die Apoptose auch auf die Kumulus- und Thekazellen über, wobei als Charakteristikum bleibt, dass einzelne Zellen vom Zelluntergang betroffen sind (Zeuner *et al.*, 2003). Die Vermutung, dass der VDAC1-Antikörper eventuell apoptotische Zellen markieren könnte, wird unterstützt durch die Beobachtung, dass in frühen Entwicklungsstadien die Follikelatresie in der Oozyte, in höheren Stadien in den Follikelzellen beginnt (Vaskivuo *et al.*, 2001). Dies stimmt mit der in dieser Arbeit gefundenen Intensitätssteigerung der Immunreaktion in den Follikelzellen und der Abschwächung der Immunreaktion in den Oozyten überein.

Die Vermehrung der weiblichen Keimzellen ist bereits pränatal beendet. Ihre Anzahl nimmt im Laufe des Lebens ständig ab. Auch von den in jedem Zyklus neu heranreifenden Oozyten geht der überwiegende Teil zu Grunde, noch ehe sie die Ovulationsreife erreicht haben (Morita und Tilly, 1999). Wie bereits erwähnt, liegt der Follikelatresie der Mechanismus der Apoptose zu Grunde (Zeuner *et al.*, 2003). VDAC1 spielt bei der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in der frühen Phase der Apoptose eine wichtige Rolle (Shimizu *et al.*, 2001). Cytochrom *c* leitet die Aktivierung der Caspase-Kaskade ein, deren proteolytische Spaltung zum programmierten Zelltod führt. Apoptoseregulatoren der Bcl2- Familie wie Bax und Bak interagieren bei der Freisetzung von Cytochrom *c* direkt mit VDAC, während die BH3- Apoptoseregulatoren keinen Einfluss auf den VDAC-gesteuerten Cytochrom *c*-Release nehmen (Shimizu *et al.*, 2001). Zudem trägt VDAC als ein Teil der Mitochondrial Permeability Transition Pore (PTP) zur Calcium-Homöostase an der inneren Mitochondrienmembran bei. Diese spielt ebenfalls im Apoptosegeschehen eine Rolle (Crompton, 1999). Ist das Calcium-Gleichgewicht an der inneren Mitochondrienmembran gestört, kommt es zum Anschwellen der Matrix und zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, was wiederum zur Cytochrom *c*-Freisetzung und Apoptose führt (Colombini, 2004; Tsujimoto und Shimizu, 2002). Neben Oozyten und Follikelzellen konnte auch in Endothzellen von Blutgefäßen und

in Erythrozyten das VDAC1-Protein in bovinen Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Als Teil des peripheren Benzodiazepinrezeptors wurde bereits über das Vorkommen von VDAC im gesamten kardiovaskulären System, unter anderem auch im Endothel und in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen sowie in Erythrozyten und Leukozyten berichtet (Shimizu *et al.*, 2001; Thinnis *et al.*, 1989; Veenman und Gavish, 2006).

Wider Erwarten wurde kein VDAC2-Protein in bovinen Ovarschnitten unter Verwendung des AS P45 detektiert. Dem negativen Ergebnis in der Immunhistochemie steht der Nachweis der VDAC2-mRNA in bovinen Oozyten gegenüber. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass bei immunhistologischen Nachweismethoden die Fixierung des Gewebes eine erhebliche Rolle spielt (Lehmann *et al.*, 1995). Gründe für die Abwesenheit von VDAC2-Protein können zum einen in der Art der Gewebefixierung liegen, wodurch das antikörperbindende Epitop möglicherweise maskiert war. Oder die VDAC2-Proteinmenge lag unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode. Eine weitere Ursache könnte in der Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen begründet sein. Die Antikörper wurden gegen ein synthetisches Peptid der bovinen VDAC2-cDNA-Sequenz generiert. Demzufolge reagieren die Antikörper mit der linearen Form des Peptids und können möglicherweise ihr Antigen nicht in der dreidimensionalen Struktur des VDAC2-Proteins erkennen. Ursache könnte auch eine sterische Behinderung der Antikörperbindungsstellen in Form einer posttranslationalen Modifikation des Proteins, wie z.B. eine Phosphorylierung, sein. Das zur Herstellung des anti-VDAC2-Antiserums verwendete Peptid entspricht einer dem C-Terminus des Proteins nahegelegenen Aminosäuresequenz des VDAC2-Proteins, die an zwei Positionen die Aminosäure Serin und an jeweils einer Position die Aminosäuren Tyrosin und Threonin enthält (Tabelle 2). Proteinphosphorylierungen treten am häufigsten an der OH-Gruppe von Serin auf, Tyrosin- und Threoninphosphorylierungen sind seltener. Aufgrund einer Phosphorylierung der genannten Aminosäuren könnte das Antigen für die anti-VDAC2-Antikörper nicht zugänglich gewesen und deshalb der Nachweis von VDAC2-Protein in bovinen Oozyten fehlgeschlagen sein. Das Vorhandensein von mRNA bei fehlendem Proteinnachweis ist auch für Cyclin B1 beschrieben. Die Translation der Cyclin B1-mRNA ist relativ gering in Oozyten, steigt aber während der Maturation stark an (Barkoff *et al.*, 2000). Oozyten verfügen zudem über bemerkenswerte posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, die sowohl die Degradierung von mRNA bewirken, oder aber ihre Translation unterdrücken können (Bettegowda und Smith, 2007).

In den Follikelzellen der Primär- und der Tertiärfollikel war keine Antigenmarkierung nachzuweisen. Lediglich die peripheren Follikelzellen der Sekundärfollikel zeigten eine dezente Rosafärbung. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, ob es sich hierbei um eine spezifische Immunreaktion handelte.

Neben der Anfärbung der Oozyten in Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln kam es durch das AS P31 (anti-VDAC3-Antiserum) auch zur Detektion von antigenen Determinanten in den Follikelzellen primärer und sekundärer Follikel. In den Follikelzellen tertiärer Follikel konnte unter den gewählten Bedingungen kein Protein nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunreaktion war in den primären Follikeln sowohl in den Oozyten als auch in den Follikelzellen am stärksten, fiel in den Oozyten und in den Follikelzellen der Sekundärfollikeln deutlich schwächer aus und trat in den Tertiärfollikeln ausschließlich in den Oozyten (eher schwach ausgeprägt) auf. Übereinstimmend mit dem Nachweis von VDAC3 auf Proteinebene in bovinen Oozyten konnte auch mittels RT-PCR die Expression des VDAC3-kodierenden Gens in bovinen Oozyten gezeigt werden. Die Abnahme der Immunreaktion in den Oozyten könnte wiederum durch die Größenzunahme der Zellen oder durch eine „Down-Regulation“ der Proteinbiosynthese mit zunehmender Follikelentwicklung verursacht sein.

Marmoset-Ovar

Im Marmoset-Ovar waren im Vergleich zum Rind grundsätzliche Unterschiede bezüglich des Vorkommens und der Lokalisation der VDAC-Subtypen festzustellen. Es ist durchaus vorstellbar, dass bestimmte antigene Epitope der VDAC-Proteine je nach Spezies unterschiedlich stark exponiert werden. Somit könnte es zur Maskierung oder Demaskierung von Epitopen und damit zu voneinander abweichenden Anfärbemustern kommen.

VDAC1 war im Marmoset-Ovar von Primordialfollikeln bis hin zu Tertiärfollikeln nachweisbar. Prinzipiell wurde mit den beiden anti-VDAC1-Antikörpern (anti-Porin 31 HL und AS P6) ein identisches Resultat erzielt. Der Nachweis des VDAC1-Proteins im Zytoplasma der Oozyten ging konform mit dem RT-PCR-Ergebnis. Weiterhin fiel auf, dass die Intensität der Antigen-Antikörperreaktion vermutlich aufgrund der Volumenveränderung (Zunahme der Oozytengröße) geringer wurde. In Oozyten der Tertiärfollikel konnte keine Markierung mehr beobachtet werden. Dagegen nahm die Farbintensität der markierten Follikelzellen vom Primär- zum Sekundärfollikel zu. Im Tertiärfollikel war das Zytoplasma basal gelegener Follikelzellen gering angefärbt. Besonders auffällig hingegen war eine starke Immunreaktion in Zellen der Theka externa. Die unterschiedliche Verteilung eines Proteins im Follikel und die unterschiedliche Intensität der Immunreaktion abhängig vom Follikulogenesestadium ist auch von anderen Proteinen bekannt, wie die Arbeit von Bogner *et al.* (2004) am Beispiel der ZP Proteine zeigte. Sie könnte durch den unterschiedlichen Bedarf der Zellen in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien erklärt werden.

VDAC-Subtyp 2 konnte im Marmoset-Ovar nur in den Oozyten aller drei Follikelstadien eindeutig und in equivalenter Intensität dargestellt werden. Das oozytenspezifische Vorkommen von Proteinen ist aus der Literatur von anderen Proteinen bekannt. Zu ihnen gehört der growth differentiation factor (GDF9) und das bone morphogenetic protein 15

(BMP 15), eine Untergruppe der TGF β Familie, die als wichtige parakrine Wachstumsfaktoren für die Follikulogenese und Granulosazellproliferation z.B. in Maus Oozyten (Thomas und Vanderhyden, 2006), in bovinen Oozyten (Hussein *et al.*, 2005) und in porcinen Oozyten (Hickey *et al.*, 2005) beschrieben sind.

In Follikelzellen des Marmoset-Affen wurde mit AS P45 kein VDAC2-Protein detektiert. In weiterführenden Untersuchungen muss geklärt werden, ob die Expression der VDAC2-kodierenden Gene in Marmoset-Follikeln tatsächlich ausschließlich in den Oozyten stattfindet.

Eine immunhistochemische Detektion des VDAC3-Proteins war trotz eines zweifelsfreien Nachweises der Expression des VDAC3-kodierenden Gens weder in Oozyten noch in Follikelzellen der untersuchten Follikelstadien möglich.

Als Ursache dafür könnte auch hier zum einen die Art der Gewebefixierung in Betracht gezogen werden. Zum anderen könnte VDAC3-Protein in zu geringer Menge, unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methode, vorhanden sein. Es könnte auch auf eine gestörte Interaktion zwischen Antikörper und Tertiärstruktur des Proteins zurückzuführen sein. Die sterische Behinderung der Antikörperbindungsstelle in Form einer posttranslationalen Phosphorylierung des Proteins liefert eine weitere Erklärungsmöglichkeit. Das zur Antikörpergenerierung herangezogene VDAC3-Peptid (Peptid H4) mit zehn Aminosäuren beinhaltet sowohl die Aminosäure Serin als auch die Aminosäure Threonin, die beide *in vivo* phosphoryliert sein könnten. Ein weiterer Grund für den fehlenden Proteinnachweis bei nachweislich vorhandener RNA ist eine mögliche Unterdrückung der Translation, oder die Degradierung der RNA, wie sie bei Oozyten während der Oogenese beobachtet wird (Pique *et al.*, 2006).

Nach den ersten Hinweisen durch die molekularbiologischen Untersuchungen auf ein Vorhandensein der VDAC-Isoformen in bovinen und in Marmoset-Oozyten konnten die Ergebnisse größtenteils auf Proteinebene bestätigt werden. Lediglich das Vorhandensein von VDAC2 im bovinen Ovar und VDAC3 im Marmoset-Ovar konnte nicht abschließend geklärt werden.

4.4 Subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten

Zur näheren Bestimmung der subzellulären Lokalisation der VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten wurden immunzytologische Untersuchungen durchgeführt. Parallelversuche mit Marmoset-Oozyten konnten aufgrund der sehr stark eingeschränkten Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials nicht durchgeführt werden.

In Übereinstimmung mit den bereits dargelegten und diskutierten molekularbiologischen und immunhistochemischen Ergebnissen konnte auch mittels Immunzytochemie das VDAC1-Protein in bovinen Oozyten dargestellt werden. Nach der Inkubation permeabilisierter Oozyten mit AS P6 wurde eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenz im Zytoplasma der Oozyte beobachtet. Da bei der lichtmikroskopischen Auswertung eine Überlagerung aller Ebenen der Zelle stattfand, war eine nähere Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von VDAC1 nicht möglich.

Aus diesem Grund wurden nach Permeabilisation der Oozyten und unter Verwendung beider anti-VDAC1-Antikörper (anti-Porin 31 HL und AS P6) die Versuchsergebnisse zusätzlich konfokalmikroskopisch ausgewertet. Es konnte eine deutliche, körnig strukturierte Fluoreszenz im gesamten Ooplasma, mit stärkerer Ausprägung in der corticalen Region der Oozyten beobachtet werden. Eine Assoziation von VDAC1 mit verschiedenen Zellorganellen wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Neben dem Vorkommen von VDAC in Mitochondrien (Benz, 1994) wurde das Protein im Golgiapparat und dem Endoplasmatischen Retikulum (Okada *et al.*, 2004), im Sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskulatur (Jurgens *et al.*, 1991), in praesynaptischen Vesikeln im Cortex von Rattengehirn und in Astrozyten (Guibert *et al.*, 1998) sowie in Endosomen (Reymann *et al.*, 1998) gefunden. Mitochondrien in Oozyten weisen neben morphologischen Veränderungen eine spezielle, vom Entwicklungsstadium abhängige intrazelluläre Verteilung auf, die zudem deutlich speziesspezifisch ist (Torner *et al.*, 2004). Bei der Maus beispielsweise sind die Mitochondrien in nicht maturierten Oozyten konzentrisch um den Nukleus herum angeordnet (Nishi *et al.*, 2003; Stojkovic *et al.*, 2001). Stojkovic *et al.* (2001) untersuchten die Verteilung der Mitochondrien in bovinen Oozyten mittels konfokaler Lasermikroskopie und stellten eine Verteilung im gesamten Zytoplasma mit einer peripheren Häufung nahe der Plasmamembran fest. Die sehr ähnliche Lokalisation von Mitochondrien und VDAC1-Protein könnte ein Hinweis darauf sein, dass VDAC1 in Mitochondrienmembranen boviner Oozyten vorhanden ist. Auch die Corticalen Granula durchlaufen während des Oozytenwachstums bis zum Stadium des „germinal vesicle“ eine Migration in die suboolemale Region. In ausgewachsenen, nicht maturierten Maus-Oozyten präovulatorischer Follikel befinden sich die Corticalen Granula in einem 4 µm breiten, flächigen Bereich unterhalb der Zytoplasmamembran (Ducibella *et al.*, 1994). Unter Berücksichtigung dieser Kenntnisse scheint es möglich, dass das VDAC1-Protein in einer Assoziation mit Corticalen Granula in bovinen Oozyten vorliegt. Interessant wäre eine Untersuchung von maturierten Oozyten, da hier die perlschnurartige Verteilung der Corticalen Granula unter der Plasmamembran charakteristisch ist. Sun und Schatten (2006) berichten neben der Migration von Mitochondrien und Corticalen Granula auch über die Migration des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgiapparates in den subcorticalen Bereich von Säugetier-Oozyten

während der Oogenese. Eine abschließende Bewertung der intrazytoplasmatischen Lokalisation von VDAC1 in bovinen Oozyten konnte anhand des vorliegenden Ergebnisses noch nicht erfolgen, da die durchgeführten immunelektronenmikroskopischen Studien bisher erfolglos verliefen.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse unter Verwendung der anti-VDAC1-Antikörper (AS P6; anti-Porin 31 HL) mit nicht permeabilisierten Oozyten zeigte in der horizontalen Schnittebene eine in feinen Punkten verteilte ringförmige grüne Fluoreszenz. An der Zelloberfläche stellte sich die positive Immunreaktion ebenfalls in feinen Punkten, die flächig verteilt waren, dar. Dies deutet auf eine Bindung der anti-VDAC1-Antikörper an extrazelluläre Epitope des VDAC1-Proteins hin und lässt vermuten, dass VDAC1 auch in der Plasmamembran vorkommt. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass sich nach dem Modell von Thinner und Reymann (1997) sowie Casadio *et al.* (2002) das C-terminale Ende des Proteins innerhalb der Plasmamembran, direkt an den Extrazellulärraum angrenzend, befindet. Das AS P6 ist gegen ein Peptid nahe des C-Terminus gerichtet. Auch die antigene Determinante (N-terminal) des monoklonalen Antikörpers P31HL liegt im VDAC-Modell extrazellulär. Dies könnte die positive Immunreaktion der beiden anti-VDAC1-Antikörper mit nicht permeabilisierten Oozyten erklären. Der Nachweis von VDAC1 in der Plasmamembran von *Xenopus laevis*-Oozyten wurde bereits in der Literatur beschrieben. Steinacker *et al.* (2000) wiesen VDAC1 in *Xenopus laevis*-Oozyten mittels konfokaler Lasermikroskopie als punktförmige, über die gesamte Zelloberfläche gleichmäßig verteilte Fluoreszenzsignale nach. Intrazytoplasmatische Antikörperbindungsstellen wurden in dieser publizierten Arbeit nicht dokumentiert.

In der Zona Pellucida zeigte sich stellenweise eine dezente Markierung in Form von radiären Streifen. Möglicherweise handelt es sich hier um die Markierung der Kumuluszellausläufer, die durch die Zona Pellucida hindurch in das Ooplasma reichen (Sathananthan *et al.*, 2006). Die immunzytochemischen Ergebnisse nach Einsatz des anti-VDAC2-Antiserums AS P45 waren kontrovers. In den nach Qi *et al.* (2002) fixierten, permeabilisierten und lichtmikroskopisch ausgewerteten Oozyten war eine spezifische Antikörperbindung sichtbar, die aufgrund der begrenzten technischen Möglichkeiten lichtmikroskopisch nicht genauer eingegrenzt werden konnte. Zu beachten war dabei ebenfalls, dass es sich hierbei um einen einmaligen Versuch handelte und demzufolge die Aussagekraft als eingeschränkt betrachtet werden musste. Das lichtmikroskopische Ergebnis war jedoch mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie nicht reproduzierbar. Es konnte weder in permeabilisierten noch in nicht permeabilisierten Oozyten mit dem polyklonalen Antikörper anti-Human VDAC2 (Santa Cruz) oder mit AS P45 eine spezifische Immunreaktion dargestellt werden. Trotz des zweifelsfreien Nachweises der Expression der VDAC2-kodierenden Gene mittels RT-PCR konnte VDAC2 auf Proteinebene in bovinen Oozyten weder mittels Immunhistochemie noch mittels

Immunzytochemie eindeutig nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt die VDAC2-Proteinmenge in bovinen Oozyten unterhalb der Nachweisgrenze oder das Epitop ist entweder aufgrund der Fixierung oder aufgrund der Tertiärstruktur des Proteins für die Antikörper nicht erreichbar. Des Weiteren könnte VDAC2 in bovinen Oozyten, wie bereits näher ausgeführt, während der Oogenese zwar transkribiert, nicht aber translatiert werden (Bettegowda und Smith, 2007).

Unterschiedliche Ergebnisse erbrachten auch die immunzytochemischen Untersuchungen mit dem AS P31 (anti-VDAC3-Antiserum). In preliminären lichtmikroskopischen Experimenten mit permeabilisierten Oozyten trat eine starke unspezifische Fluoreszenz in den Kontrolloozyten auf. Die Ursache dafür konnte nicht identifiziert werden. Möglicherweise war die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen aus ungeklärten Gründen erfolglos. Dagegen zeigten die mit dem konfokalen Lasermikroskop ausgewerteten permeabilisierten Oozyten eine spezifische Antikörperbindung, deren Intensität in der Peripherie der Oozyten stärker ausgeprägt erschien. Bei den Kontrolloozyten trat keine Fluoreszenz auf. Die Übereinstimmung dieses Ergebnisses mit den molekularbiologischen und immunhistochemischen Ergebnissen für VDAC3 lässt den Schluss zu, dass VDAC-Protein Subtyp 3 in bovinen Oozyten vorhanden ist. Die intrazelluläre VDAC3-Antikörperbindung stellte sich im gesamten Ooplasma stark fluoreszierend dar. Die Fluoreszenz war feinkörnig strukturiert und im Zentrum der Oozyten geringgradig schwächer ausgeprägt. Da es bisher keine Hinweise auf porenbildende Eigenschaften von VDAC3 gibt (De Pinto *et al.*, 2003), hingegen aber über eine Verbindung von VDAC3 zum Zytoskelett in Spermatozoen diskutiert wird (Hinsch *et al.*, 2004), stellt sich die Frage, ob auch in bovinen Oozyten VDAC3 in Verbindung zum Zytoskelett steht. Hauptelemente des Zytoskelettes von vertebralen Zellen sind Mikrofilamente (Actinfilamente), Mikrotubuli (Tubulin) und Intermediärfilamente. In Oozyten im Germinal Vesicle Stadium befinden sich die Actinfilamente in einer relativ breiten gleichmäßigen Schicht im corticalen Bereich, aber auch in der Nähe des Germinal Vesicle. Eine VDAC-Actin-Interaktion wurde von Roman *et al.* (2006) beschrieben. Die Actinfilamente werden zur Verankerung der Spindel benötigt. Damit sind sie für die Zellteilung von grundlegender Bedeutung. Obwohl die Spindel, die die Chromosomen an den gegenüberliegenden Zellpol zieht, aus Mikrotubuli besteht, ist die Interaktion von Mikrofilamenten und Mikrotubuli für den Prozess der Chromosomentrennung essentiell. Auch die Translokationen der Mitochondrien in die Peripherie der Oozyten während der Oogenese geschieht mit Hilfe von Mikrotubuli (Sun und Schatten, 2006). In Nervengewebe konnte gezeigt werden, dass der Transport von Mitochondrien entlang der Axone ebenfalls entlang von Mikrotubuli geschieht. Die Mitochondrien sind über querbrückenbildende Proteine, sog. „Microtubule associated Proteins“ (MAP2), an die Mikrotubuli gebunden. Das Bindungsprotein auf mitochondrialer Seite ist VDAC (Linden und

Karlsson, 1996). Weitere Berichte über die Interaktion von VDAC mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie der Dynein- Untereinheit Tetex-1, G-actin oder dem Actin-assoziierte Protein Gelsolin unterstützen die Idee, dass VDAC an Transportvorgängen entlang des Zytoskelettes beteiligt sein könnte (Schwarzer *et al.*, 2002).

Unter Verwendung von nicht permeabilisierten Oozyten als Untersuchungsmaterial konnte immunzytochemisch keine spezifische VDAC3-Antikörperbindung gezeigt werden. Das in Kaninchen generierte AS P31 ist gegen eine Aminosäuresequenz des VDAC3-Proteins gerichtet, die im Abstand von ca. 35 Aminosäuren zum C-terminalen Ende des VDAC3-Proteins liegt. Da für die Tertiärstruktur von VDAC3 noch kein Modell verfügbar ist, kann die Position dieses ausgewählten Proteinabschnittes nicht eindeutig bestimmt werden. Möglicherweise liegt die ausgewählte VDAC3-Peptidsequenz in der Zytoplasmamembran oder in einem intrazellulären Loop, so dass eine Antikörperbindung in nicht permeabilisierten Oozyten nicht möglich war.

Eine weitere Aufklärung der subzellulären Lokalisation der VDAC-Subtypen sollten elektronenmikroskopischen Untersuchungen erbringen. Es wurde sowohl die Preembedding- als auch die Postembedding-Methode angewendet. Bisher konnte mit keiner der gewählten Methoden eine spezifische Antikörperbindung dargestellt werden. Bei der Preembedding-Methode wurden die Oozyten vor der Antikörperinkubation kurz fixiert, die stärker vernetzende Fixierung der Zellen mit Glutaraldehyd sowie weitere Waschschrte wurden danach durchgeführt. Möglicherweise hat sich während der 24-stündigen Fixierung der Oozyten und den darauf folgenden Waschschrten eine einmal bestehende Antikörperbindung wieder gelöst, so dass keine Antigen-Antikörperbindung mehr nachzuweisen war.

Die Postembedding-Methode beinhaltet die Immunogoldreaktion an bereits fixierten und ultradünn geschnittenen, auf Netzchen aufgezogenen KOKs (Kumulus-Oozyten-Komplex). Auch hier konnte keine positive Immunreaktion dargestellt werden. Möglicherweise ist auch die Fixierung der KOKs mit Glutaraldehyd, was stark vernetzend wirkt, Ursache dafür, dass vorhandene antikörperbindende Epitope verdeckt sind. Die Ergebnisse sind mit vorherigen, bereits publizierten Arbeiten der Arbeitsgruppe Hinsch an bovinen Spermatozoen vergleichbar (Hinsch *et al.*, 2004). Es wird berichtet, dass nur mit dem AS P20 (anti-VDAC2) ein spezifischer Nachweis von VDAC2 möglich war. Alle weiteren verwendeten subtypspezifischen anti-VDAC-Antikörper wiesen auch mit verschiedenen Fixierungsmethoden keine spezifische Bindungsfähigkeit auf. Das AS P20 stand für die hier vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung.

4.5 Funktionelle Relevanz von VDAC-Antikörpern bezüglich des Regulatory Volume Decrease boviner Oozyten

Auf der Grundlage des in dieser Arbeit gelungenen Nachweises der VDAC-Proteine in Säugetier-Oozyten wurde untersucht, ob durch Zugabe von anti-VDAC-Antikörper zu immaturren bovinen Oozyten das Regulatory Volume Decrease der Oozyten funktionell zu beeinflussen ist.

Generell besitzen alle Zellen die Fähigkeit, ihr Volumen zu regulieren, wenn sie anisootischen Bedingungen ausgesetzt sind (Hermoso *et al.*, 2002). Der für die Wiederherstellung des ursprünglichen Zellvolumens verantwortliche Vorgang nach osmotisch bedingtem Anschwellen wird als „Regulatory Volume Decrease“ (RVD) bezeichnet. Die Volumenregulation wird durch eine Veränderung der intrazellulären osmotisch aktiven Substanzen vermittelt. Diese bestehen sowohl aus anorganischen Ionen als auch aus kleinen organischen Molekülen. Sie werden als Osmolyte bezeichnet. Dem Prozess der Volumenregulation können verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen. Dazu gehören die dehnungsbedingte Aktivierung von Ionenkanälen, intrazelluläre Signaltransduktion und Regulationsmechanismen auf genomischer Ebene. Die Fülle der möglichen Ausgleichsmechanismen macht deutlich, dass nicht ein für alle Zelltypen gültiges Modell bestehen kann und dass physiologische Prozesse, die in einer Zelllinie identifiziert wurden, nicht ohne Einschränkungen auf andere Zelltypen übertragen werden können (Chamberlin und Strange, 1989). Ein Modell des RVD-Mechanismus geht davon aus, dass ein hypotoner Schock zur Volumenausdehnung von Zellen führt. Diese Volumenausdehnung induziert die Öffnung von Chloridkanälen. Dadurch werden die Zellen depolarisiert, bis das Chloridgleichgewichtspotential erreicht ist (-10 bis -35 mV). Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige Kaliumkanäle geöffnet. Der folgende Kaliumausstrom wird durch einen Wasserausstrom aus der Zelle begleitet, wodurch sich das Zellvolumen wieder verringert (Deutsch und Chen, 1993). Der genaue Signaltransduktionsweg ist bisher jedoch noch unklar. Es wird diskutiert, dass Rho-GTPasen, Phospholipasen, Lipidkinasen oder Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen dabei von Bedeutung sein könnten. Auch das Actin-Zytoskelett scheint neben anderen vielfältigen Funktionen in die zelluläre Volumenregulation eingebunden zu sein. Verschiedene volumenregulierte Transportproteine interagieren funktionell mit dem Zytoskelett. Allerdings variiert der Effekt des Zytoskelettes auf die Volumenregulation je nach Zelltyp erheblich (Pedersen *et al.*, 2001). In Chondrozyten beispielsweise ist die Integrität des Zytoskelettes für ein ungestörtes RVD von geringer Bedeutung (Kerrigan und Hall, 2005). Dagegen scheint in bovinen Spermatozoen eine intakte Morphologie Voraussetzung für volumenregulatorische Mechanismen zu sein (Triphan *et al.*, 2008). In den meisten untersuchten Zellen ist das Anschwellen nicht mit einer

erhöhten Membranspannung verbunden, sondern mit einem Verlust an Membraneinstülpungen, die vermutlich durch das F-Actin-Zytoskelett gebildet werden. Eine enge Verbindung besteht zwischen Ionenkanälen und dem corticalen Zytoskelett. Dabei kann das Zytoskelett als Verankerung der Kanalproteine dienen oder aber regulierend in den Ionentransport eingreifen, wie z.B. beim CFTR (Cystic fibrosis transmembrane regulator Cl⁻ channel) und anderen Cl⁻- und K⁺-Kanälen. Zudem kommt dem Zytoskelett, vor allem F-Aktin, eine entscheidende Bedeutung bei der Vesikelexozytose zu. Dies ist für die Volumenregulation in sofern von Belang, als dass einige Ionenkanäle nach Zellschwellung über Vesikel vermittelt in die Plasmamembran eingefügt werden. Auch dehnungsaktivierte Ionenkanäle spielen in einigen Zellen eine Rolle beim RVD. Sie werden entweder im Zusammenspiel mit der Plasmamembran oder dem Zytoskelett reguliert (Pedersen *et al.*, 2001). Als hauptverantwortlich für den Cl⁻- und K⁺-Ausstrom gelten VSOACs (Volume-sensitive osmolyte and anion channels) (Hermoso *et al.*, 2002). Es wurden in diesem Zusammenhang weitere Chloridkanäle beschrieben, wie z.B. der GABA- und der Glycinrezeptor (Betz, 1992; Smith und Olsen, 1995), der CFTR-Kanal (Riordan, 1993), der Ca²⁺-aktivierte Chloridkanal (Gruber *et al.*, 1998), die CLC-Chloridkanal-Familie (Jentsch *et al.*, 1999) und die VDAC-Kanalproteine (Thinnes *et al.*, 2000). Thinnes *et al.* (2000) konnte am Beispiel von HeLa-Zellen zeigen, dass nach Präinkubation der Zellen in anti-VDAC1-Antikörpern und anschließender hypotoner Stimulation ein normales Anschwellen der Zellen zu beobachten war. Das Zellvolumen konnte hingegen nicht wieder auf den Ausgangszustand reduziert werden, was auf ein gestörtes RVD schließen ließ. Die Dokumentation und Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte allerdings ausschließlich fotografisch. Die Größenveränderungen der HeLa-Zellen wurden weder messtechnisch erfasst, noch statistisch ausgewertet. Als Negativkontrolle dienten HeLa-Zellen in Ringer-Lösung ohne Zusatz nicht relevanter Antikörper (Thinnes *et al.*, 2000). Durch die Inkubation der HeLa Zellen nur mit Ringer-Lösung ist nicht auszuschließen, dass der hemmende Effekt auf das RVD der HeLa Zellen auf unspezifische Antikörperbindungen oder Zusätze der Antikörpersuspension, wie z.B. Natriumazid und dessen toxischen Effekt, zurückzuführen ist. Trotz intensiver Reinigungsversuche ist es in dieser Arbeit nicht gelungen das Natriumazid über spezielle Säulen (ZebaTM desalt columns) aus der Antikörpersuspension P31HL (Calbiochem) rückstandslos zu entfernen.

Um einen möglichen toxischen Effekt des Natriumazid auszuschließen, wurden die vorliegenden funktionellen Untersuchungen mit subtypspezifischen VDAC-Antisera AS P6, AS P45 und AS P31 durchgeführt. Sie enthielten kein Natriumazid. Zusätzlich wurde vor Versuchseinsatz das Komplementsystem inaktiviert.

Nach Inkubation bzw. Injektion boviner Oozyten mit anti-VDAC-Antikörper wurden die Oozyten hypoton stimuliert, die Größenveränderung der Oozyten digitalphotographisch festgehalten und vermessen (AxioVision 4.4 SP2, Zeiss).

In der statistischen Analyse wurde zunächst der gesamte Messzeitraum ausgewertet. Zur näheren Eingrenzung der statistisch signifikanten Unterschiede wurden außerdem die Phasen der Zellschwellung (1-7 min) und die des RVD (8-31 min) getrennt betrachtet.

Anti-VDAC1-Antikörper

Nach der Inkubation der bovinen Oozyten mit AS P6 (Testgruppe) und PI P6 (Kontrollgruppe) lag weder über den gesamten Messzeitraum betrachtet noch in der Phase der Zellschwellung oder der Phase des RVD ein statistisch signifikanter Unterschied der Größenveränderung zwischen den Gruppen vor. Möglicherweise konnten die Antikörper die antigenen Determinanten aufgrund der Kürze der Inkubationszeit nicht erreichen, oder die umgebenden Kumuluszellen stellten eine Barriere dar. Es ist aber auch möglich, dass VDAC1 in der Plasmamembran tatsächlich für das RVD boviner Oozyten nicht oder nicht allein von entscheidender Bedeutung ist. Vorstellbar ist auch, dass Oozyten über andere Chloridkanäle oder Kanalkomplexe verfügen, welche die Volumenregulation steuern. Betrachtet man die Osmolaritätsveränderung der die Oozyten umgebenden Flüssigkeiten beim Rind, so fällt auf, dass zum Zeitpunkt der Ovulation annähernd kein Unterschied zwischen der Osmolarität der Follikelflüssigkeit (292 mosmol/kg +/- 2,1) (Orsi *et al.*, 2005) und der Osmolarität des Oviduktes (295 mosmol/kg +/- 9) (Killian *et al.*, 1989) besteht. Es wäre also auch denkbar, dass Oozyten nicht zum RVD befähigt sind, da unter physiologischen Bedingungen dieser Regulationsmechanismus nicht benötigt wird. Diese Hypothese erscheint im Hinblick auf die fundamentale Bedeutung dieses Vorganges jedoch eher unwahrscheinlich.

Beim letzten Messpunkt der Untersuchungen zeigte sich, dass die Oozyten beider Versuchgruppen ihr Volumen nicht wieder bis zu ihrem Ausgangswert reduzieren konnten. Da dies aber sowohl in der Testgruppe wie auch in der Kontrollgruppe annähernd im gleichen Umfang der Fall war, ist von einem unspezifischen Effekt auszugehen und lässt nicht auf eine Interaktion zwischen den Antikörpern mit VDAC1-Protein schließen.

Um sicher zu stellen, dass die Antikörper in die Oozyte gelangen und eventuelle intrazytoplasmatische Antigen determinaten erkannt werden können, wurden die anti-VDAC-Antikörper in die Oozyten injiziert.

Nach Injektion von AS P6 bzw. des korrespondierenden Präimmuserums (PI P6) verlief die mittlere Größenveränderung beider Oozytengruppen nach hypotoner Stimulation signifikant unterschiedlich. Es war eine Wechselwirkung zwischen Behandlung (AS P6 vs PI P6) und Zeit vorhanden. Die Oozyten beider Gruppen vergrößerten ihr Volumen - bezogen auf die

Gesamtmesszeit - in gleicher Weise. Die Oozyten, in die das AS P6 (Testgruppe) injiziert wurde, nahmen während des RVD jedoch stärker an Volumen ab als die mit PI (Kontrollgruppe) injizierten Oozyten. Trotzdem galt für die Zellen beider Gruppen, dass sie am Versuchsende ein deutlich größeres Volumen aufwiesen als am Beginn, so dass auch hier nicht von einer spezifischen Reaktion des AS P6 ausgegangen werden kann. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu dem von Thinnes *et al.* (2000) demonstrierten Effekt. Hier war nach hypotoner Stimulation von zuvor mit anti-VDAC1-Antikörpern präinkubierten Zellen ein Anschwellen der HeLa-Zellen zu beobachten. Das RVD hingegen war gestört, so dass das Zellvolumen nicht wieder reduziert werden konnte. Auch in Astrozyten bewirkte die Präinkubation mit anti-VDAC1-Antikörpern eine gestörte Volumenregulation dieser Zellen. VDAC scheint beim Pathomechanismus des Hirnödems eine wichtige Rolle zu spielen (Dermietzel *et al.*, 1994). Aus welchem Grund in den hier dargestellten Versuchen die Oozyten der Kontrollgruppe, nicht aber die mit Antiserum injizierten Oozyten in ihrem RVD eingeschränkt waren, bleibt offen. Möglicherweise wurden die Oozyten durch die Manipulation während der Antikörperinjektion durch Mikroläsionen geschädigt.

Anti-VDAC2-Antikörper

Nach der Inkubation der Oozyten mit AS P45 (Testgruppe) bzw. PI P45 (Kontrollgruppe) zeigte sich, dass die Oozyten beider Gruppen auf statistisch signifikante Weise unterschiedlich ihr Volumen vergrößerten. Die als Negativkontrolle in PI P45 inkubierten Oozyten nahmen stärker an Volumen zu und erreichten ihren Maximalwert früher als die mit AS P45 inkubierten Oozyten. Die anti-VDAC2-Antikörper (AS P45) scheinen in der Phase der Zellschwellung einen hemmenden Effekt auf die Volumenvergrößerung boviner Oozyten zu haben. Die Ursache dafür ist bislang ungeklärt. Während des RVD lag kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor. Nach den negativen immunhistochemischen Ergebnissen war der Effekt während der Anschwellphase zunächst unerwartet. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die antigenen Determinanten in den funktionellen Versuchen erstmalig in nicht fixierter Form vorlagen. Aus diesem Grund wäre eine Bindung zwischen Antikörper und Antigen und somit ein funktionell sichtbarer Effekt dennoch denkbar. Nicht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Arbeiten war, dass sich der hemmende Effekt der VDAC2-Antikörper offenbar auf den Zeitraum der Volumenzunahme, hier mit einer Reduktion der Zellgröße, nicht aber auf den Zeitraum des RVD auswirkte. Ursächliche Zusammenhänge konnten dafür bislang nicht gefunden werden.

Das Ergebnis der mit AS P45 bzw. PI P45 injizierten Oozyten zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der Wechselwirkung, der sich über alle drei betrachteten Zeiträume erstreckte. Dies bedeutete, dass das injizierte AS P45 im Zeitverlauf einen anderen Effekt auf die Größenveränderung boviner Oozyten nach hypotoner Stimulation hatte als das

injizierte PI P45. Der Maximalwert der Größenzunahme der mit AS P45 injizierten Oozyten war höher und sie wiesen am Versuchsende einen größeren Durchmesser auf als die Kontrolloozyten. Volumenregulatorische Untersuchungen an Atemwegsepithelien von VDAC1-Knock-out-Mäusen erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Die Zellen waren in ihrer Fähigkeit, das Volumen nach hypotoner Stimulation wieder zu verringern, deutlich eingeschränkt (Okada *et al.*, 2004). Die Beobachtung, dass die Injektion des AS P45 einen signifikanten Effekt der Wechselwirkung nach sich zog und insbesondere einen hemmenden Effekt auf das RVD boviner Oozyten zu haben scheint, lässt darauf schließen, dass intrazellulär liegende Epitope des VDAC2-Proteins funktionell von Bedeutung sein könnten. Ob diese Epitope in intrazellulären Loops von plasmamembranständigem VDAC2 liegen oder intrazytoplasmatisch in Zellorganellen oder Elementen des Zytoskelettes lokalisiert sind, muss zunächst offen bleiben. Es liegt weder ein Modell des VDAC2-Proteins vor, noch brachten bisherige Untersuchungen mit fixierten bovinen Oozyten dahingehende Erkenntnisse.

Anti-VDAC3-Antikörper

Nach der Inkubation boviner Oozyten mit AS P31 (Testgruppe) bzw. PI P31 (Kontrollgruppe) lag ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Oozytengruppen während des RVD vor. Die Oozyten der Testgruppe wurden größer, erreichten ihre maximale Größe ca. eine min später als die Kontrollgruppe und reduzierten ihr Volumen in geringerem Maße als die mit PI P31 inkubierten Oozyten.

Auch nach der Injektion des AS P31 bzw. des korrespondierenden Präimmunserums unterschieden sich die beiden Versuchsgruppen bzgl. der Größenabnahme während des RVD statistisch signifikant. Die mit AS P31 behandelten Oozyten erreichten ihre maximale Größe später (9 min) und blieben deutlich größer als die Kontrollgruppe. Tendenziell scheint das Antiserum AS P31 sowohl nach Inkubation als auch nach Injektion einen inhibierenden Einfluss auf das RVD in bovinen Oozyten zu haben. Überraschend war der hemmende Effekt nach der Inkubation mit AS P31, da eine Antigen-Antikörperbindung mit Hilfe der Immunzytochemie im Bereich der Plasmamembran nicht gezeigt werden konnte. Möglich ist jedoch, dass die VDAC3-Proteinmenge in der Plasmamembran so gering ist, dass sie unter die Nachweisgrenze der immunzytochemischen Methode lag. Der funktionelle Effekt war dennoch deutlich sichtbar. Über welchen Mechanismus die Antigen-Antikörperbindung von VDAC3 zu einer Behinderung des RVD führt, ist bislang unklar. Möglicherweise binden die Antikörper an funktionelle Epitope eines plasmamembranständigen, zur Porenbildung befähigten VDAC3-Kanals. Gegen diese Hypothese spricht aber die Beobachtung, dass VDAC3 in künstlichen Bilipidmembranen keine Poren bildet (Xu *et al.*, 1999). Denkbar wäre auch, dass VDAC3, wie bereits vermutet, in Assoziation mit Komponenten des Zytoskelettes

vorliegt, dem eine entscheidende Bedeutung bei der Vesikelexozytose zukommt. Dies ist für die Volumenregulation in sofern von Belang, als dass einige Ionenkanäle nach Zellschwellung über Vesikel vermittelt in die Plasmamembran eingefügt werden (Pedersen *et al.*, 2001).

Das Ergebnis der funktionellen Untersuchungen mit injiziertem AS P31 entsprach den Erwartungen. Die vorhergehenden Experimente zur Lokalisation von VDAC3 in bovinen Oozyten zeigen eindeutige Fluoreszenzsignale in der Peripherie der Zelle, was eine Verbindung von VDAC3 zum Zytoskelett nahe legt. Möglicherweise ist VDAC3 mit einem oder mehreren zytoskelettären Proteinen assoziiert und nimmt so indirekt Einfluss auf die Volumenregulation boviner Oozyten. Die Bedeutung des Zytoskeletts für die Volumenregulation wurde bereits an anderer Stelle ausführlich diskutiert (Pedersen *et al.*, 2001). Über welchen intrazellulären Mechanismus diese Blockade des RVD tatsächlich zustande kommt, ist zurzeit aber ungeklärt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit der vorliegenden Arbeit gelang, subtypspezifische VDAC-RNA in bovinen und erstmals in Marmoset-Oozyten nachzuweisen. Die Expression der VDAC-Proteine Subtyp1, 2 und 3 konnte in Säuger-Oozyten und Follikelzellen, erstmals im Marmoset-Affen, dargestellt werden. Funktionelle Untersuchungen, in denen subtypspezifische anti-VDAC-Antikörper mit bovinen Oozyten inkubiert bzw. die Antikörper in die Oozyte injiziert wurden, erbrachten preliminäre Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von ein oder mehreren VDAC-Subtypen am „Regulatory Volume Decrease“ (RVD) boviner Oozyten. Das anti-VDAC3-Antiserum (AS P31) zeigte in diesen Versuchen den deutlichsten Effekt. Zur Verifizierung der Ergebnisse sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Zu berücksichtigen wäre dabei neben speziesspezifischen und zellspezifischen Unterschieden auch der Einfluss einer Kombination von anti-VDAC-Antikörpern gegen 2 oder alle 3 VDAC-Subtypen gleichzeitig auf das RVD.

Die mit dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungsergebnisse können Ausgangspunkt für weitere wissenschaftliche Fragestellungen sein. Das Verständnis der physiologischen Vorgänge in der Zelle, speziell in der Oozyte, ist auch von klinischer Bedeutung. So spielen bei der *in vitro*-Maturation, bei der *in vitro*-Fertilisation (IVF) bzw. der ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion), das Milieu, u. a. die Osmolarität, eine wesentliche Rolle. Diese Methoden können wiederum neben dem Einsatz in der Nutztierzucht beim Erhalt bedrohter Tierarten oder bei der Nachzucht in Zoologischen Gärten Anwendung finden.

5 Zusammenfassung

Voltage-dependent anion channels (VDACs) besitzen eine Molekularmasse von 30-36 kDa und kommen in der äußeren mitochondrialen Membran, in der Plasmamembran von Eukaryoten und in der Bakterienzellmembran vor. Bisher sind drei VDAC-Subtypen bekannt, VDAC1, VDAC2 und VDAC3. Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen mit rekombinantem VDAC1- und 2-Protein wurden den Ionenflux regulierende, porenbildende Eigenschaften nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Vorkommen und die mögliche physiologische Bedeutung der drei VDAC-Subtypen VDAC1, VDAC2 und VDAC3, im bovinen und im Marmoset-Ovar untersucht. Mit Hilfe der RT-PCR konnte die Expression VDAC-kodierender Gene in bovinen Oozyten für VDAC1, 2, und 3 und erstmals in *Callithrix jacchus*-Oozyten für VDAC1 und 3 gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden jeweils durch Sequenzierung der Amplifikate bestätigt. Ebenfalls konnte VDAC-Protein mit Hilfe von subtypspezifischen anti-VDAC-Antikörpern (anti-VDAC1, -2 und -3) immunhistochemisch im bovinen und zum ersten Mal im Marmoset-Ovar nachgewiesen werden. In den untersuchten Ovarien zeigten sich sowohl speziesspezifische als auch vom Follikelstadium abhängige Unterschiede in der Lokalisation und in der Intensität der Immunreaktion der nachgewiesenen VDAC-Proteine. VDAC1- und VDAC3-Protein wurde in bovinen Oozyten und Follikelzellen aller Follikelstadien (Primordial- bis Tertiärfollikel) gefunden. VDAC2 konnte im bovinen Ovar hingegen nicht detektiert werden. Im Marmoset-Ovar wurde VDAC1 in Oozyten und Follikelzellen aller Follikelstadien (Primordial- bis Tertiärfollikel) nachgewiesen, während VDAC2 ausschließlich in Oozyten von Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln vorkam. VDAC3-Protein konnte mit dem subtypspezifischen anti-VDAC3-Antikörper AS P31 nicht visualisiert werden. Ergänzend zu den immunhistochemischen Experimenten bestätigten immunzytochemische Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie das Vorhandensein von VDAC1- und VDAC3-Protein in bovinen Oozyten. VDAC1 konnte mit dieser Methode sowohl in der Plasmamembran als auch intrazytoplasmatisch, VDAC3 ausschließlich intrazytoplasmatisch lokalisiert werden.

Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der durch die Antikörper detektierten VDAC-Epitope wurden Untersuchungen zur Volumenregulation, speziell zum „Regulatory Volume Decrease“ (RVD), nach hypotoner Stimulation an bovinen Oozyten durchgeführt. Die Oozyten wurden vor der digitalphotographischen Volumenmessung entweder in einem subtypspezifischen anti-VDAC-Antikörperserum präinkubiert, oder die Antiseren wurden direkt in die Oozyten injiziert. Ein statistisch signifikanter inhibierender Effekt auf das RVD konnte sowohl nach der Injektion des anti-VDAC2-Antiserums AS P45 als auch nach der Injektion bzw. Inkubation des anti-VDAC3-Antiserum AS P31 beobachtet werden. Weder die

Inkubation noch die Injektion von anti-VDAC1-Antiserum AS P6 oder die Inkubation mit AS P45 führten zu einer negativen Beeinflussung des RVD. Die erzielten Ergebnisse der Arbeit und Daten aus der Literatur weisen darauf hin, dass eine Interaktion von VDAC mit Komponenten des Zytoskeletts verantwortlich für das RVD sein könnte. Weitere Studien sind notwendig, um diese Hypothese zu unterstützen.

Die im Rahmen der Dissertation erzielten Ergebnisse zur Synthese, Lokalisation und Funktion von VDAC-Isoformen im Ovar von Rind und Marmoset (*Callithrix jacchus*) können Ausgangspunkt für weitere wissenschaftliche (z.B. funktionelle Bedeutung von VDAC-Proteinen in der Physiologie der Fortpflanzung von Säugetieren) und klinische Fragestellungen (z. B. bei der künstlichen Befruchtung) sein. Die Ergebnisse können sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin wichtige Hinweise zum Verständnis der Biologie der Fortpflanzung geben.

6 Summary

Voltage-dependent anion channels (VDAC) are abundant not only in mitochondria but also in mammalian plasma membranes. Little is known about the presence and the function of VDAC- isoforms in mammalian ovaries. In this study the expression of VDAC genes in bovine and *Callithrix jacchus* oocytes was evaluated by the identification of oocyte mRNA using the RT-PCR technique. Transcripts of VDAC1, 2, and 3 were detected in oocytes of both species. Sequencing of amplification products obtained from bovine oocytes confirmed that they represent VDAC1, 2 and 3. Using marmoset oocytes sequencing revealed the abundance of VDAC1 and VDAC3.

In order to determine whether VDAC proteins are present in bovine and marmoset ovary cells, immunohistochemical studies were performed using isoform-specific anti-VDAC-antibodies. In result, clear staining could be obtained for VDAC1 and VDAC3 in bovine oocytes as well as in follicle cells of all follicular stages (primordial – tertiary follicles). While RT-PCR transcription of VDAC2 was shown, no VDAC2 protein could be detected by immunohistochemical methods.

In the marmoset, anti-VDAC1-antibodies demonstrated the presence of cytoplasmatic VDAC1 protein in oocytes and in follicle cells. VDAC2 but not VDAC3 protein could be identified in oocytes. Although gene expression was demonstrated for VDAC3, no VDAC3 protein could be detected in the marmoset ovary using immunohistochemical methods.

For further investigations for the determination of sub cellular distribution of the VDAC-proteins in isolated bovine oocytes immunocytochemical studies and confocal microscopy was performed. The results are in agreement with those obtained by conventional immunohistochemistry. At the protein level only VDAC1 and VDAC3 could be detected. VDAC1 was found in both, in the plasma membrane and in the ooplasm. VDAC3 was exclusively identified in the ooplasm.

In order to evaluate the physiological relevance of VDAC epitopes, functional studies, in particular concerning the „Regulatory Volume Decrease“ (RVD), were performed with bovine oocytes. The cells were challenged with hypotonic stimulation and subtype specific anti-VDAC-antibodies were used. Prior to hypotonic stimulation the oocytes were incubated or injected with the specific anti-VDAC-antibodies. Incubation of oocytes with anti-VDAC1- or with anti-VDAC2-antibodies did not influence the capacity of bovine oocytes to recover from hypotonic stimulation.

However, oocytes injected with anti-VDAC2-antibodies or treated (injected and incubated) with anti-VDAC3-antibodies showed a tendency of a delayed recovery from hypotonic challenge. The results obtained and data from literature suggest that the interaction of VDAC

with components of the cytoskeleton could be responsible for the regulation of bovine oocyte RVD. However, further studies need to be performed to strengthen this hypothesis.

The data presented in this thesis concerning synthesis, localization und function of VDAC proteins in bovine and *Callithrix jacchus* ovaries could be the basis for further scientific investigations (e.g. physiological relevance of VDAC protein in the reproduction of mammals). However, so far unsolved questions in daily medical practice could also be answered leading to the improvement of oocyte *in vitro* fertilization. Thus, the results obtained could be important for practitioners in veterinarian and human medicine as well as for the general understanding of the biology of reproduction.

7 Literaturverzeichnis

Abbott D H, Hearn J P. Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil 1978; (53): 155-166.

Aiello R, Messina A, Schiffler B, Benz R, Tasco G, Casadio R, De P, V. Functional characterization of a second porin isoform in *Drosophila melanogaster*. DmPorin2 forms voltage-independent cation-selective pores. J Biol Chem 2004; (279): 25364-25373.

Aires V, Wunsch A, Schneider X, Hinsch E, Hinsch KD. Localisation of porin subtypes in bovine spermatozoa. Vet Med Austria 2003a, (90).

Aires V A, Hinsch K D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology 2003b; (60): 269-279.

Akanda N, Elinder F. Biophysical properties of the apoptosis-inducing plasma membrane voltage-dependent anion channel. Biophys J 2006; (90): 4405-4417.

Anderson R G. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; (90): 10909-10913.

Babel D, Walter G, Gotz H, Thinner F P, Jurgens L, Konig U, Hilschmann N. Studies on human porin. VI. Production and characterization of eight monoclonal mouse antibodies against the human VDAC "Porin 31HL" and their application for histotopological studies in human skeletal muscle. Biol Chem Hoppe Seyler 1991; (372): 1027-1034.

Baltz J M. Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. Curr Top Dev Biol 2001; (52): 55-106.

Barkoff A F, Dickson K S, Gray N K, Wickens M. Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. Dev Biol 2000; (220): 97-109.

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.

Benz R. Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1988; (42): 359-393.

Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1994; (1197): 167-196.

Bettegowda A, Smith G W. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front Biosci* 2007; (12): 3713-3726.

Betz H. Structure and function of inhibitory glycine receptors. *Q Rev Biophys* 1992; (25): 381-394.

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

Blachly-Dyson E, Peng S, Colombini M, Forte M. Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel: structural implications. *Science* 1990; (247): 1233-1236.

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.

Bogner K, Hinsch K D, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E. Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod* 2004; (10): 481-488.

Brdiczka D. Function of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1994; (1187): 264-269.

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.

Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; (25): 169-193.

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

Chamberlin M E, Strange K. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol* 1989; (257): C159-C173.

Chandra D, Choy G, Daniel P T, Tang D G. Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2. *J Biol Chem* 2005; (280): 19051-19061.

Colman A, Jones E A, Heasman J. Meiotic maturation in *Xenopus oocytes*: a link between the cessation of protein secretion and the polarized disappearance of Golgi apparatus. *J Cell Biol* 1985; (101): 313-318.

Colombini M. Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. *Ann N Y Acad Sci* 1980; (341): 552-563.

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

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; (341 (Pt 2)): 233-249.

De Pinto V, Ludwig O, Krause J, Benz R, Palmieri F. Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1987; (894): 109-119.

De Pinto V, al Jamal J A, Benz R, Genchi G, Palmieri F. Characterization of SH groups in porin of bovine heart mitochondria. Porin cysteines are localized in the channel walls. *Eur J Biochem* 1991; (202): 903-911.

De Pinto V, Messina A, Accardi R, Aiello R, Guarino F, Tomasello M, Tomassino M, Tasco G, Casadio R, Benz R, De Giorgi F, Ichas F, Baker M, Lawen A. New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC). *Ital J Biochem* 2003; (52): 17-24.

Dermietzel R, Hwang T K, Buettner R, Hofer A, Dotzler E, Kremer M, Deutzmann R, Thinner F P, Fishman G I, Spray D C. Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; (91): 499-503.

Deutsch C, Chen L Q. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; (90): 10036-10040.

Ducibella T, Duffy P, Buetow J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 1994; (50): 467-473.

Dumoulin J C, Evers J L, Bras M, Pieters M H, Geraedts J P. Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; (94): 373-380.

Eckert J, Niemann H. Effects of platelet-derived growth factor (PDGF) on the *in vitro* production of bovine embryos in protein-free media. *Theriogenology* 1996; (46): 307-320.

Elinder F, Akanda N, Tofighi R, Shimizu S, Tsujimoto Y, Orrenius S, Ceccatelli S. Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli. *Cell Death Differ* 2005; (12): 1134-1140.

Fair T, Hyttel P, Lonergan P, Boland M P. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. *Biol Reprod* 2001; (64): 1516-1525.

Gilchrist R B, Nayudu P L, Nowshari M A, Hodges J K. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod* 1995; (52): 1234-1243.

Gruber A D, Elble R C, Ji H L, Schreur K D, Fuller C M, Pauli B U. Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel proteins. *Genomics* 1998; (54): 200-214.

Guarino F, Specchia V, Zapparoli G, Messina A, Aiello R, Bozzetti M P, De P, V. Expression and localization in spermatozoa of the mitochondrial porin isoform 2 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; (346): 665-670.

Guibert B, Dermietzel R, Siemen D. Large conductance channel in plasma membranes of astrocytic cells is functionally related to mitochondrial VDAC-channels. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; (30): 379-391.

Guo X W, Mannella C A. Conformational change in the mitochondrial channel, VDAC, detected by electron cryo-microscopy. *Biophys J* 1993; (64): 545-549.

Hermoso M, Satterwhite C M, Andrade Y N, Hidalgo J, Wilson S M, Horowitz B, Hume J R. ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 2002; (277): 40066-40074.

Hickey T E, Marrocco D L, Amato F, Ritter L J, Norman R J, Gilchrist R B, Armstrong D T. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 2005; (73): 825-832.

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.

Hoodbhoy T, Talbot P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 1994; (39): 439-448.

Hurteau G J, Spivack S D. mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts. *Anal Biochem* 2002; (307): 304-315.

Hussein T S, Froiland D A, Amato F, Thompson J G, Gilchrist R B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 2005; (118): 5257-5268.

Jentsch T J, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch* 1999; (437): 783-795.

Johnson M H, Everitt B. *Essential Reproduction*. Blackwell Science, USA 1995.

Junqueira, L.C., Carneiro, J.: *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 586-587, 1996.

Jurgens L, Ilsemann P, Kratzin H D, Hesse D, Eckart K, Thinnes F P, Hilschmann N. Studies on human porin. IV. The primary structures of "Porin 31HM" purified from human skeletal muscle membranes and of "Porin 31HL" derived from human B lymphocyte membranes are identical. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; (372): 455-463.

Jurgens L, Kleineke J, Brdiczka D, Thinnes F P, Hilschmann N. Localization of type-1 porin channel (VDAC) in the sarcoplasmic reticulum. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; (376): 685-689.

Kelly S M, Butler J P, Macklem P T. Control of cell volume in oocytes and eggs from *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1995; (111): 681-691.

Kerrigan M J, Hall A C. Stimulation of regulatory volume decrease (RVD) by isolated bovine articular chondrocytes following F-actin disruption using latrunculin B. *Biorheology* 2005; (42): 283-293.

Killian G J, Chapman D A, Kavanaugh J F, Deaver D R, Wiggin H B. Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1989; (86): 419-426.

Kusano H, Shimizu S, Koya RC, Fujita H, Kamada S, Kuzumaki N, Tsujimoto Y. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene* 19 (42), 4807-4814. 2000.

Lehmann T, Volkl A, Fahimi H D. The importance of tissue fixation for light microscopic immunohistochemical localization of peroxisomal proteins: the superiority of Carnoy's fixative over Baker's formalin and Bouin's solution. *Histochem Cell Biol* 1995; (103): 187-195.

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

Liu W, Saint D A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002; (302): 52-59.

Mannella C A. Structural analysis of mitochondrial pores. *Experientia* 1990; (46): 137-145.

Mannella C A, Forte M, Colombini M. Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1992; (24): 7-19.

McEnery M W, Snowman A M, Trifiletti R R, Snyder S H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; (89): 3170-3174.

Moor R M, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; (40): 197-210.

Morita Y, Tilly J L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999; (213): 1-17.

Nakae T. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; (71): 877-884.

Nakatsuji N, Chuma S. Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. *Int J Dev Biol* 2001; (45): 541-548.

- Nishi Y, Takeshita T, Sato K, Araki T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. *J Nippon Med Sch* 2003; (70): 408-415.
- Okada S F, O'Neal W K, Huang P, Nicholas R A, Ostrowski L E, Craigen W J, Lazarowski E R, Boucher R C. Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. *J Gen Physiol* 2004; (124): 513-526.
- Orsi N M, Gopichandran N, Leese H J, Picton H M, Harris S E. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction* 2005; (129): 219-228.
- Pedersen S F, Hoffmann E K, Mills J W. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; (130): 385-399.
- Peng S, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M. Large scale rearrangement of protein domains is associated with voltage gating of the VDAC channel. *Biophys J* 1992; (62): 123-131.
- Pique M, Lopez J M, Mendez R. Cytoplasmic mRNA polyadenylation and translation assays. *Methods Mol Biol* 2006; (322): 183-198.
- Qi H, Williams Z, Wassarman P M. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell* 2002; (13): 530-541.
- Rahmani Z, Maunoury C, Siddiqui A. Isolation of a novel human voltage-dependent anion channel gene. *Eur J Hum Genet* 1998; (6): 337-340.
- Reymann S, Florke H, Heiden M, Jakob C, Stadtmuller U, Steinacker P, Lalk V E, Pardowitz I, Thinnies F P. Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem Mol Med* 1995; (54): 75-87.
- Reymann S, Haase W, Krick W, Burckhardt G, Thinnies F P. Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels. *Pflugers Arch* 1998; (436): 478-480.
- Riordan J R. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* 1993; (55): 609-630.
- Roman I, Figys J, Steurs G, Zizi M. *In vitro* interactions between the two mitochondrial membrane proteins VDAC and cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 2005; (44): 13192-13201.

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

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. Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics* 1996a; (33): 283-288.

Sampson M J, Lovell R S, Davison D B, Craigen W J. A novel mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel gene localizes to chromosome 8. *Genomics* 1996b; (36): 192-196.

Sathananthan A H, Selvaraj K, Girijashankar M L, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson A O. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech* 2006; (69): 396-407.

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.

Schnorr B. *Embryologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart 1996.

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.

Schwarzer C, Becker S, Awni L A, Cole T, Merker R, Barnikol-Watanabe S, Thinner F P, Hilschmann N. Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; (32): 1075-1084.

Seguin D G, Baltz J M. Cell volume regulation by the mouse zygote: mechanism of recovery from a volume increase. *Am J Physiol* 1997; (272): C1854-C1861.

Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 2001; (152): 237-250.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; (399): 483-487.

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.

Sinowatz F, Kollé S, Topfer-Petersen E. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 2001; (168): 24-35.

Smith G B, Olsen R W. Functional domains of GABA-A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1995; (16): 162-168.

Steinacker P, Awni L A, Becker S, Cole T, Reymann S, Hesse D, Kratzin H D, Morris-Wortmann C, Schwarzer C, Thinnés F P, Hilschmann N. The plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes contains voltage-dependent anion-selective porin channels. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; (32): 225-234.

Sternlicht A L, Schultz R M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool* 1981; (215): 191-200.

Stojkovic M, Machado S A, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves P B, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; (64): 904-909.

Sun Q Y, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006; (131): 193-205.

Tarazona A M, Rodriguez J I, Restrepo L F, Olivera-Angel M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim* 2006; (41): 5-11.

Thinnés F P. Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eucaryotic cells. *J Bioenerg Biomembr* 1992; (24): 71-75.

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.

Thinnes F P, Hellmann K P, Hellmann T, Merker R, Brockhaus-Pruchniewicz U, Schwarzer C, Walter G, Gotz H, Hilschmann N. Studies on human porin XXII: cell membrane integrated human porin channels are involved in regulatory volume decrease (RVD) of HeLa cells. *Mol Genet Metab* 2000a; (69): 331-337.

Thinnes F P, Hellmann K P, Hellmann T, Merker R, Schwarzer C, Walter G, Gotz H, Hilschmann N. Studies on human porin XXI: gadolinium opens Up cell membrane standing porin channels making way for the osmolytes chloride or taurine-A putative approach to activate the alternate chloride channel in cystic fibrosis. *Mol Genet Metab* 2000b; (69): 240-251.

Thinnes F P, Reymann S. New findings concerning vertebrate porin. *Naturwissenschaften* 1997; (84): 480-498.

Thomas F H, Vanderhyden B C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; (4): 19.

Thomas L, Blachly-Dyson E, Colombini M, Forte M. Mapping of residues forming the voltage sensor of the voltage-dependent anion-selective channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; (90): 5446-5449.

Torner H, Brussow K P, Alm H, Ratky J, Pohland R, Tuchscherer A, Kanitz W. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 2004; (61): 1675-1689.

Tosti E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; (4): 26.

Triphan X, Menzel V A, Petrunkina A M, Cassara M C, Wemheuer W, Hinsch K D, Hinsch E. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflugers Arch* 2008; (455): 677-686.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000; (466): 6-10.

Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 2002; (84): 187-193.

Vaskivuo T E, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde E R, Stenback F, Heikinheimo M, Tapanainen J S. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; (86): 3421-3429.

Veenman L, Gavish M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther* 2006; (110): 503-524.

Voronina E, Wessel G M. The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* 2003; (58): 53-110.

Wolters J, Immelmann K. Krallenaffen. Kindler Verlag GmbH München, 120ff. 1988.

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.

Xu X, Forbes J G, Colombini M. Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *J Membr Biol* 2001; (180): 73-81.

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

Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. *Theriogenology* 2003; (59): 1421-1433.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. E. Hinsch und Herrn Prof. Dr. K. - D. Hinsch für die Überlassung des interessanten Themas und die umfassende Betreuung meiner Dissertationsarbeit. Ihre immerwährende Hilfe in allen, nicht nur den wissenschaftlichen Belangen, ihr Verständnis und die vielen fruchtbaren Diskussionen waren eine große Stütze. Vielen Dank für Ihr persönliches Interesse an der sowohl wissenschaftlichen als auch persönlichen Weiterentwicklung ihrer Doktoranden. Die Arbeit mit Ihnen machte viel Spaß.

Herrn Prof. Dr. Dr. R. Leiser danke ich für die Betreuung und die Vertretung meiner Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle für die Möglichkeit der Durchführung der Elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der JLU Gießen bedanken, ganz besonders bei Frau Kettner für ihre Anleitung, tatkräftige Unterstützung und Hilfe.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Niemand, Frau PD Dr. Wrenzycki und das FAL-Team in Mariensee für ihre freundliche Aufnahme und gute Unterstützung bei den konfokalmikroskopischen Experimenten.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. P. Nayudu vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen. Unter ihrer Anleitung erfolgte die Gewinnung des Gewebes und der Zellen der Marmoset-Affen.

Ebenso vielen Dank an Herrn PD L. Konrad, der mir freundlicherweise die von ihm konzipierten humanen VDAC-Primer für meine Arbeit zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. Failing danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der funktionellen Versuche dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Labors: Caro, Yvonne, Simone und Viviana, die mir anfangs nette Arbeitskollegen waren, mittlerweile gute Freunde sind. Es war eine schöne Zeit mit Euch, ihr fehlt mir! Dir Caro auch nochmal vielen Dank für deine

Geduld, mir die Molekularbiologie nahezubringen und gemeinsam den Versuchsmarathon in Mariensee durchzustehen.

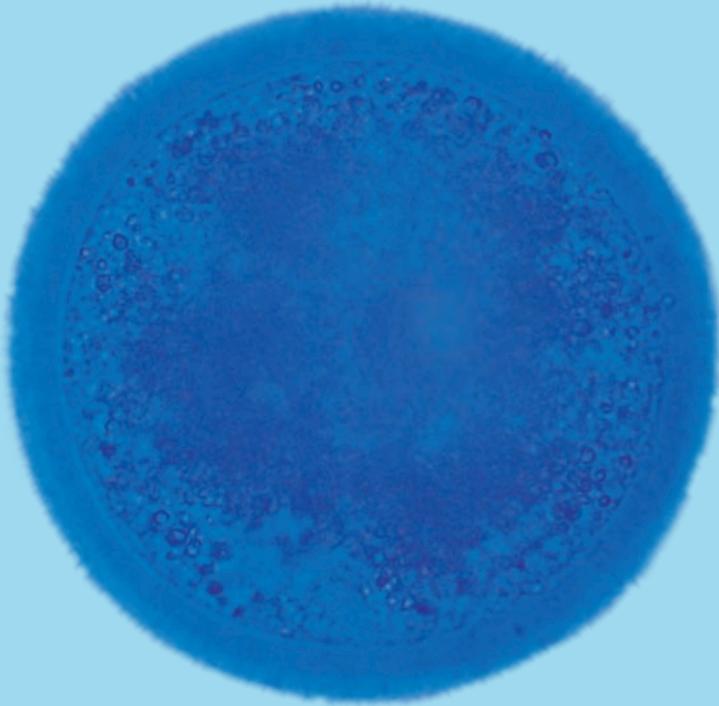
Zum Schluss möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium in Gießen ermöglichten, zu jeder Zeit voll und ganz hinter mir stehen und mir helfen, wo sie nur können. Danke dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt, mich stets motiviert und bei Problemen immer hilfreich zur Seite steht.

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

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.

Spiesen - Elversberg, Februar 2008



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5285-4



9 783835 1195285 0