

Untersuchungen
zur Lokalisation und Funktion von
Voltage-dependent Anion Channel (VDAC)
1, 2 und 3 in bovinen Spermatozoen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Xenia Triphan, geb. Schneider
aus Wetzlar

Gießen 2007

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Hautklinik
Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Mayser
des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen**

Gutachter: Frau Prof. Dr. E. Hinsch

Gutachter: Herr Prof. Dr. K. Steger

Tag der Disputation: 07.04.2008

meinen Eltern

und

Jörg

Abkürzungen

Affi	affinitätsgereinigter Antikörper
AK	Antikörper
AR	Akrosomreaktion
AS	Antiserum
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
H258	Hoechst 33258 bisBenzimide
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
ODF	outer dense fibers, Mantelfasern
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-buffered-saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin
RT	Raumtemperatur
RVD	regulatory volume decrease
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethyldiamid
Tween 20	Polyoxiethylensorbitanmonolaurat
VDAC	voltage-dependent anion channel
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
ZP	Zona pellucida

1. EINLEITUNG	7
1.1. DIE BEDEUTUNG VON VDAC (VOLTAGE-DEPENDENT ANION CHANNEL)	7
1.2. GRUNDLAGEN DER FERTILISATION	9
1.2.1. <i>Morphologie von Spermatozoen</i>	11
1.2.2. <i>Physiologie der Spermienbewegung</i>	12
1.2.3. <i>Kapazitation</i>	14
1.2.4. <i>Grundlagen der Akrosomreaktion (AR)</i>	15
1.3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
2. MATERIALIEN UND METHODEN	22
2.1. MATERIALIEN	22
2.1.1. <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	22
2.1.2. <i>Medien und Pufferlösungen</i>	25
2.1.3. <i>Verwendete Kits</i>	29
2.1.4. <i>Geräte</i>	30
2.2. METHODEN	31
2.2.1. <i>Gewinnung des Untersuchungsmaterials</i>	31
2.2.2. <i>Das Swim-up-Verfahren</i>	31
2.2.3. <i>Anti-VDAC Antikörper</i>	32
2.2.4. <i>Immunbiochemischer Nachweis von VDAC in bovinen Spermatozoen</i>	36
2.2.5. <i>Immunzytochemischer Nachweis von VDAC in bovinen Spermatozoen</i>	38
2.2.6. <i>Untersuchungen zum Einfluss von anti-VDAC Antikörpern auf die Funktion boviner Spermatozoen</i>	41
2.2.7. <i>Elektronenmikroskopie</i>	46
2.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG	47
3. ERGEBNISSE	48
3.1. CHARAKTERISIERUNG DER ANTI-VDAC ANTIKÖRPER	48
3.1.1. <i>Proteinbestimmung der affinitätsgereinigten Antikörper</i>	48
3.1.2. <i>Überprüfung der Antigen-Antikörper-Reaktion mittels ELISA</i>	48
3.1.3. <i>Bestimmung der Spezifität der Antikörper</i>	52
3.2. LOKALISATION DER VDAC ISOFORMEN IN BOVINEN SPERMATOZOEN	53
3.2.1. <i>Nachweis von VDAC Subtypen mittels Immunbiochemie</i>	53
3.2.2. <i>Nachweis von VDAC Subtypen mittels Immunzytochemie</i>	55
3.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON VDAC IN BOVINEN SPERMATOZOEN	61
3.3.1. <i>Effekt von anti-VDAC Antikörper auf das Akrosom</i>	61
3.3.2. <i>Untersuchung der morphologischen Veränderungen der Spermatozoen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie</i>	65

3.3.3. Effekt von anti-VDAC Antikörper auf die Spermatozoenmotilität	69
4. DISKUSSION	72
4.1. STAND DER FORSCHUNG ZUR LOKALISATION UND FUNKTION DER DREI VDAC ISOFORMEN	72
4.2. GEWINNUNG VON ISOFORM-SPEZIFISCHEN ANTI-VDAC ANTIKÖRPER	75
4.3. LOKALISATION DER VDAC ISOFORMEN IN BOVINEN SPERMATOZOEN	76
4.4. EINFLUSS VON VDAC AUF DIE SPERMATOZOENMOTILITÄT	81
4.5. DIE BEDEUTUNG VON VDAC FÜR DIE MORPHOLOGISCHE INTEGRITÄT DES AKROSOMS	83
4.6. VDAC IM ZUSAMMENHANG MIT DER VOLUMENREGULATION VON SPERMATOZOEN	85
4.7. ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG	89
5. ZUSAMMENFASSUNG	91
6. SUMMARY	93
7. LITERATURVERZEICHNIS	94
8. ANHANG	105
8.1. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	105
8.2. DANKSAGUNG	106
8.3. VERÖFFENTLICHUNG VON ORIGINALARBEITEN IM RAHMEN DER DOKTORARBEIT	107

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung von VDAC (voltage-dependent anion channel)

VDAC (voltage-dependent anion channel) ist ein kleines transmembranäres, Poren-formendes Protein mit apparenten Molekularmassen von 30-35 kDa, das in Eukaryoten auch synonym als Porin bezeichnet wird. In der Abbildung 1 ist VDAC als ein 3D-Modell dargestellt. Aufgrund von Computer-Berechnungen der primären Aminosäuresequenz und experimenteller Versuche wird angenommen, dass VDAC aus einer α -Helix und 13, 16 oder 19 transmembranären β -Faltblättern besteht (Shoshan-Barmataz und Gincel 2003). Der jeweilige VDAC Kanal wird von einem einzigen VDAC Protein gebildet, das aus etwa 285 Aminosäuren (30-32 kDa) besteht. In offenem Zustand beträgt der Durchmesser des Kanals ca. 2,5-3,0nm, im geschlossenen dagegen ca. 1,9nm (Blachly-Dyson und Forte 2001).

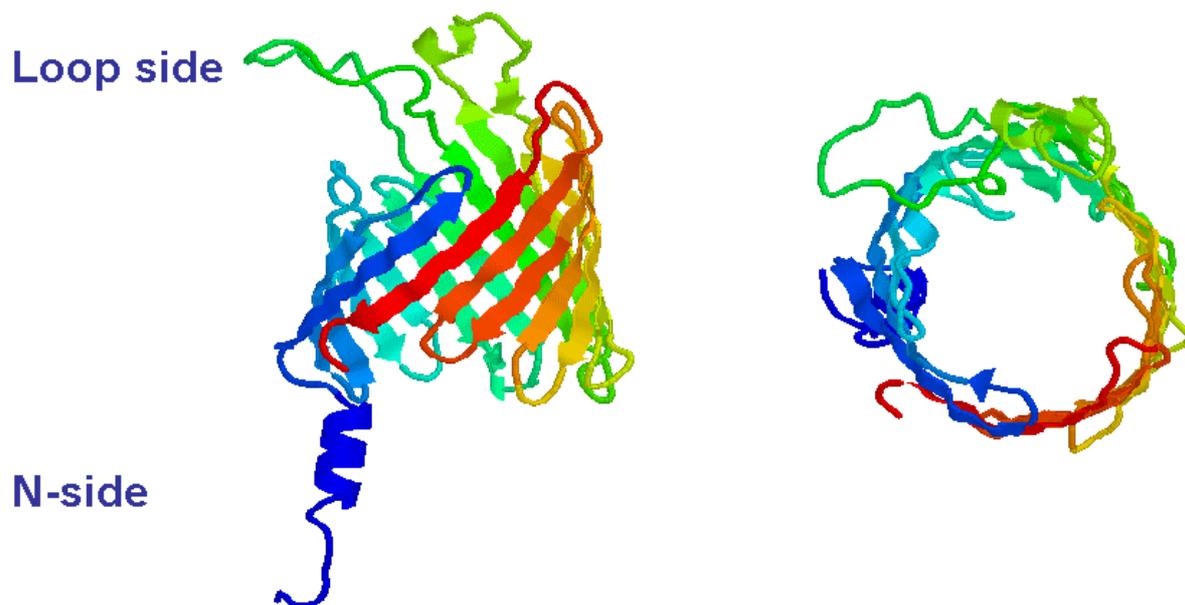


Abbildung 1. Berechnete 3D-Struktur des *N. crassa* VDAC (Casadio *et al.* 2002)

Erstmals wurde VDAC in der äußeren mitochondrialen Membran von *Paramecium aurelia* (Schein *et al.* 1976), später dann auch in den meisten eukaryotischen Organismen, von Hefe (Mihara und Sato 1985) über Tiere (Linden *et al.* 1982; De Pinto *et al.* 1987) bis hin zu Pflanzen (Heins *et al.* 1994; Abrecht *et al.* 2000) nachgewiesen.

Die Existenz von extramitochondrialem VDAC wurde 1983 von der Arbeitsgruppe F. P. Thinner beschrieben (Thinner *et al.* 1983; Thinner *et al.* 1989). Nach Isolierung einer 31

kDa-Proteinbande aus einer Rohmembranfraktion menschlicher B-Lymphozyten und darauf folgender Sequenzierung stellte sich aufgrund der hohen Homologie zu bekannten VDAC Sequenzen heraus, dass dieses Protein zur VDAC-Gruppe zu zählen ist. Später wurde die Expression des Proteins auch auf cDNA-Ebene bestätigt (Blachly-Dyson und Forte 2001). Neuere Untersuchungen verfestigen die Erkenntnis, dass VDAC auch in Plasmamembranen lokalisiert ist: 1) eine Splice-Variante von VDAC (pI-VDAC) führt durch eine veränderte Anfangssequenz zur Lokalisation von VDAC in der Plasmamembran (Buettner *et al.* 2000), 2) VDAC konnte in Caveolen lokalisiert werden (Bathori *et al.* 1999) und 3) VDAC ist ein Rezeptor für Plasminogen Kringle 5 auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen (Gonzalez-Gronow *et al.* 2003)

Wie aus der Namensgebung schon erkenntlich, handelt es sich bei VDAC um einen spannungsabhängigen Kanal, der in verschiedenen Öffnungszuständen existiert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der Kanal bei Spannungen um 0mV am weitesten geöffnet ist. In diesem Zustand ist der Kanal selektiv für negativ geladene Stoffe wie Succinat, Malat und ATP. Bei Spannungen größer als 20mV zeigt sich jedoch eine veränderte Permeabilität und es kommt zu einer Selektivität für Kationen (Benz und Brdiczka 1992; Rostovtseva und Colombini 1996). Es wurde daher angenommen, dass dieser Mechanismus zur Regulation mitochondrialer Funktionen beiträgt. Mitochondriales VDAC ist mit ATP sowie Hexo-, Glycerol- und Kreatin-Kinasen assoziiert und dadurch am Metabolitenhaushalt der Zelle beteiligt (Adams *et al.* 1991; Beutner *et al.* 1998; Crompton *et al.* 2002; Kottke *et al.* 1988; Ludwig *et al.* 1986; Rostovtseva und Colombini 1997).

VDAC-Subtypen, die in Eukaryoten nachgewiesen wurden, haben eine Ausschlussgrenze von etwa 3000 Dalton. Sie unterstützen den Metabolitenaustausch zwischen den Mitochondrien und dem Zytosol (Benz 1988).

Bei Mensch, Ratte und Maus wurden drei verschiedene VDAC Gene, die für drei verschiedene Isoformen (VDAC1, 2 und 3) codieren, beschrieben (Blachly-Dyson *et al.* 1997; Sampson *et al.* 1997). Ihre Promoter-Region ist Guanin und Cytosin reich und enthält keine klassischen TATA-Elemente. Die VDAC Isoformen weisen innerhalb ihrer Familie ausgeprägte Sequenzhomologien auf, aber es bestehen deutliche Unterschiede im Vergleich der Gen-Sequenzen von Pflanzen und Tieren. Bisher ist es nicht gelungen, die VDAC2 und 3 Isoformen aus tierischem Gewebe zu isolieren. Die Informationen über ihre Funktion beruhen daher auf Studien an rekombinanten Proteinen (Xu *et al.* 1999). Diese Experimente zeigen,

dass VDAC1 und VDAC2 in Phospholipid-Doppelschichtmembranen Poren formen, wohingegen VDAC3 keine Fähigkeit zur Poren-Bildung zeigte (Xu *et al.* 1999). Es wird daher angenommen, dass jede VDAC Isoform eine spezifische, möglicherweise unterschiedliche physiologische Rolle spielt.

Die Beteiligung von mitochondrialem VDAC an der Regulation der Apoptose wurde ebenfalls untersucht. VDAC ist offenbar Teil eines mitochondrialen Proteinkomplexes, der als „permeability transition pore“ (PTP) an der Auslösung der apoptotischen Caspase-Kaskade mitwirkt (Bernardi *et al.* 2001; Gincel und Shoshan-Barmataz 2004; Vyssokikh und Brdiczka 2004; Zalk *et al.* 2005). Weitere Untersuchungen zeigten, dass VDAC mit anderen zellulären Proteinen, insbesondere mit Proteinen des Zytoskeletts, interagieren kann (Tsujimoto und Shimizu 2002; Linden und Karlsson 1996; Krimmer *et al.* 2001; Xu *et al.* 2001).

Über das Vorhandensein und die Funktion von VDAC in Spermatozoen von Säugetieren ist bisher sehr wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass männliche VDAC3 knockout Mäuse außer einer Infertilität keine weiteren gesundheitlichen Beeinträchtigungen aufweisen. Diese Tiere zeigten bei normaler Spermatozoenkonzentration eine verringerte Spermatozoenmotilität. Diese lässt sich auf strukturelle Defekte im Flagellum zurückführen (Sampson *et al.* 2001). In einer anderen Untersuchung konnte mittels Immunhistochemie an bovinen Hoden demonstriert werden, dass VDAC2 in Spermatozyten, Spermatiden und Spermatozoen vorkommt. VDAC1 konnte dagegen nur in Sertoli-Zellen nachgewiesen werden (Hinsch *et al.* 2001).

1.2. Grundlagen der Fertilisation

Die Fertilisation ist ein komplexer biochemischer Prozess, bei dem es zur Bildung einer entwicklungsfähigen Zygote durch Fusion weiblicher und männlicher Gameten mit jeweils haploidem Chromosomensatz kommt. Hierzu erfolgt bei den weiblichen Gameten zunächst die Oogenese der diploiden Urkeimzellen im Ovar mit anschließender Follikelreifung. Die Entwicklung der männlichen Gameten besteht aus der Spermatogenese. Diese bezeichnet die Entwicklung bzw. Differenzierung von den Spermatogonien zu den reifen Spermatozoen. Sie gliedert sich in Mitose, Meiose und Spermiogenese. Die Spermiogenese beinhaltet die Reifung der runden Spermatiden zu den reifen Spermatozoen. Nach der Ejakulation und

anschließende Passage durch den weiblichen Genitaltrakt, kommt es zur Kapazitation, bei der die Spermatozoen ihre volle Befruchtungsfähigkeit erlangen. Die Spermatozoen müssen sich aktiv auf die Oozyte zu bewegen. Von entscheidender Bedeutung bei der Fertilisation ist die Imprägnation, das aktive Eindringen des Spermatozoons in die Oozyte. Dieser Vorgang beginnt mit der festen Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida, welche die Oozyte umgibt (Wassarman 1995), in dessen Folge die akrosomale Reaktion des Spermatozoons induziert wird (Saling *et al.* 1979). Die Bindung des Spermatozoons an die Oozyte und die Akrosomreaktion sind somit entscheidend für eine erfolgreiche Befruchtung (Abbildung 2). Nach Fusion der Plasmamembranen von Spermatozoon und Oozyte erfolgt die Initiation der zygotischen Entwicklungsprozesse (Yanagimachi 1994).

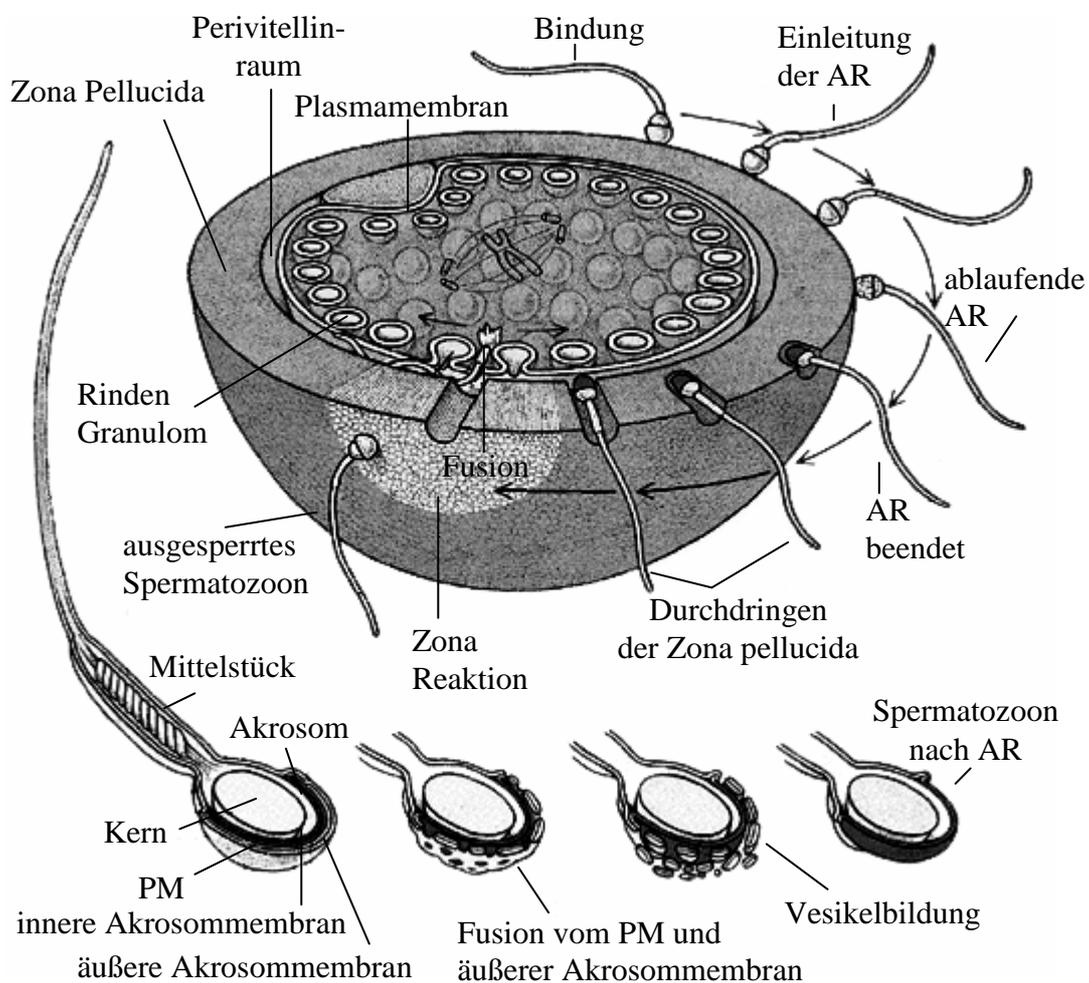


Abbildung 2. Zusammenfassende schematische Darstellung der Vorgänge, die zur Gametenfusion bzw. Befruchtung führen.

PM: Plasmamembran; AR: Akrosomreaktion.

Abbildung modifiziert nach Wassarman (1989).

1.2.1. Morphologie von Spermatozoen

Jedes morphologisch normale Säugetier- Spermatozoon ist im Ganzen von einer Plasmamembran umgeben und kann in Kopf und Flagellum, welches der Fortbewegung dient, unterschieden werden (Abbildung 3). Das Flagellum wird weiterhin in vier Regionen unterteilt: Hals, Mittelstück, Hauptstück und Endstück.

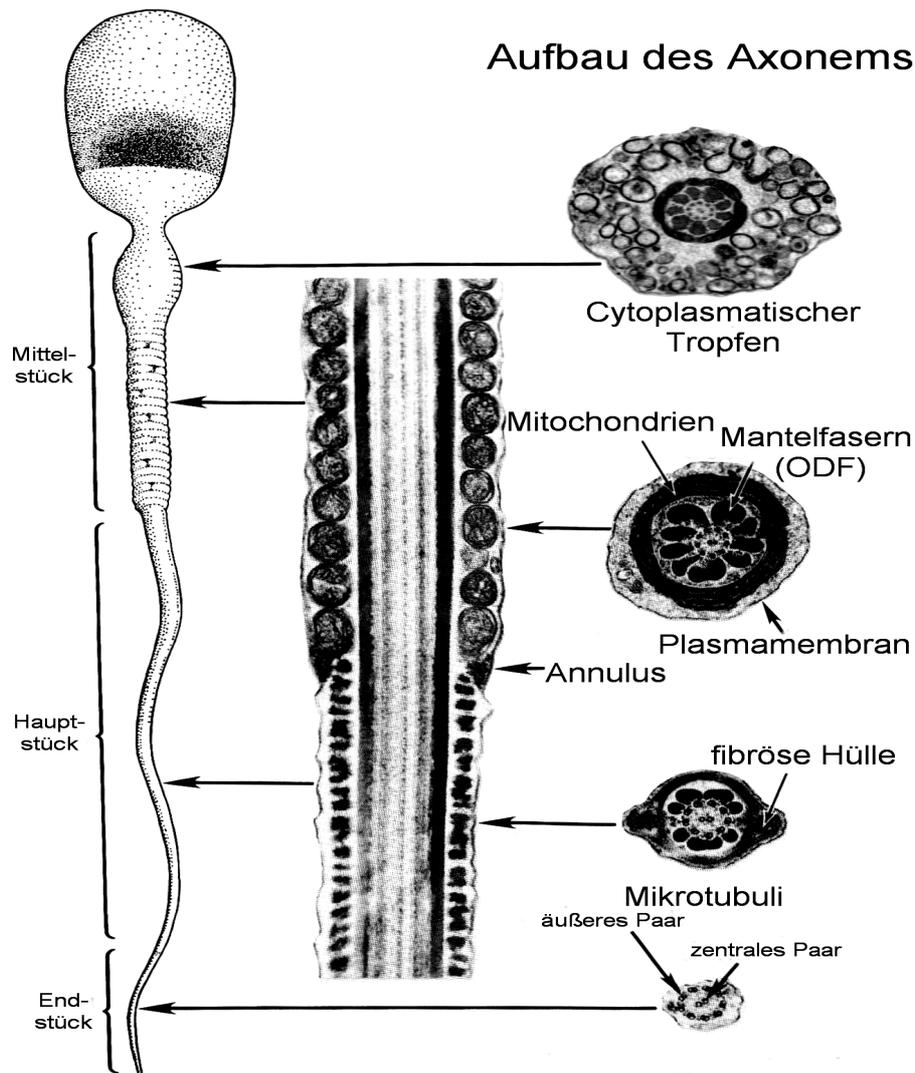


Abbildung 3. Schematische Darstellung eines Spermatozoons. Abbildung modifiziert nach Russel *et al.* (1990).

Der **Spermatozookopf** besitzt bei Säugern unterschiedliche Formen und Größen. Bovine Spermatozoen weisen einen flachovalen Kopf von ca. 8µm Länge, 4,5µm Breite und einer Dicke von 1µm Dicke auf (Rüsse und Sinowatz 1991). Beherrschend ist der verdichtete Kern. Die vorderen 2/3 des Kopfes sind von der Kopfkappe, dem Akrosom, bedeckt. Das Akrosom

besteht aus zwei Membranen, die am Äquator des Kopfes in einander übergehen. Das Akrosom enthält granuläres Material und zahlreiche Enzyme, die bei der Akrosomreaktion freigesetzt werden (Yanagimachi 1994). Kaudal vom Akrosom (postakrosomal), wo bei der Befruchtung die Fusionierung von Spermien- und Oozytenmembran beginnt, befindet sich unter der Zellmembran eine schmale, verdichtete Schicht (postakrosomale Scheide). Noch weiter kaudal verschmelzen Zell- und Kernmembran in einem ringförmigen Bereich. Hier hat der Kern eine grubenförmige Vertiefung, die Implantationsgrube, die der Befestigung des Flagellums dient. Diese Stelle wird als Hals (Verbindungsstück, connecting piece) des Spermatozoons bezeichnet.

Der bovine **Spermatozoenschwanz** ist etwa 63µm lang und besteht aus vier Abschnitten (Hals, Mittelstück, Hauptstück und Endstück). Die Bewegungsfähigkeit der Spermien beruht auf der Struktur und Funktion des Spermatozoenschwanzes. Radiär angeordnete Mikrotubuli durchziehen den Spermischwanz in seiner vollen Länge. Entsprechend dem Aufbau von Zilien und Geißeln anderer Zellen sind neun äußere Doppeltubuli und zwei zentrale einzelne Mikrotubuli angeordnet (9 x 2 + 2 Anordnung). Die Mikrotubulstruktur wird als Axonem bezeichnet. Die Doppeltubuli sind untereinander durch Seitenarme aus Dynein verbunden.

Die übrigen Bestandteile des Spermatozoenschwanzes sind in den jeweiligen Abschnitten unterschiedlich. Der Hals ist das Verbindungsstück zwischen dem Kopf und den folgenden Schwanzabschnitten. Hier inserieren die Mikrotubuli sowie die Mantelfasern (Outer Dense Fibers, ODF), die sich dann durch das Mittelstück und den Hauptteil des Schwanzes ziehen. Im Mittelstück des Flagellums sind Mitochondrien in Form einer Helix um das Axonem herum angeordnet. Ihnen kommt die Aufgabe zu, Energie in Form von ATP zu erzeugen, die für die Bewegung der Mikrotubuli benötigt wird. Im Hauptstück werden das Axonem und die ODF von der fibrösen Hülle umgeben (Fawcett 1975; Oko 1988). Hierbei handelt es sich um ringförmig verlaufende, untereinander verbundene Fibrillen. Diese stehen durch zwei längsverlaufende, sich gegenüberliegende Leisten miteinander in Kontakt. Die ODF enden in unterschiedlicher Höhe des Hauptstücks. Das Endstück beginnt abrupt am Ende der fibrösen Hülle.

1.2.2. Physiologie der Spermienbewegung

Eine der zentralen Veränderungen der Spermatozoen während der Reifung im Epididymis ist die Erlangung der Motilität. Testikuläre Spermatozoen sind entweder bewegungsunfähig oder

allenfalls schwach beweglich. Völlig gereifte Spermatozoen aus der Cauda epididymidis beginnen dagegen, sich aktiv zu bewegen, wenn sie in eine physiologische Salzlösung gegeben werden. Die Unfähigkeit der testikulären Spermatozoen zur Bewegung begründet sich zumindest zum Teil in einer spezifischen Konfiguration der Plasmamembran. Dennoch konnte gezeigt werden, dass demembranierte testikuläre Spermatozoen, denen ATP, cAMP und Mg^{2+} hinzugegeben wurde, sich nicht so rasch bewegen, wie demembranierte reife Spermatozoen. Dies lässt die Vermutung zu, dass einige feine Veränderungen (wie z.B. Modifikationen der Dynein-ATPase) während der epididymalen Reifung stattfinden und zur Erlangung der Motilität beitragen (Yanagimachi 1994).

Die Spermatozoenmotilität ist abhängig zum einen von der strukturellen Integrität des Flagellums und zum anderen von der Energie für die aktive Bewegung des Flagellums, die von den Mitochondrien in Form von ATP zugeführt wird (Cooper und Yeung 2000; Yanagimachi 1994). Das im Axonem enthaltene zytoskelettäre System (vergl. 1.2.1) wurde grundlegend untersucht: Die durch Seitenarme aus Dynein untereinander verbundenen Doppeltubuli bewirken eine Bewegung nach dem Prinzip des Filamentgleitmodells. Das kontraktile Protein ist Dynein. Dieses Protein zeigt eine ATPase-Aktivität und ist abhängig von zweiwertigen Kationen. Die Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, so dass es an den nächsten Tubulusabschnitt binden kann. Nach der Abspaltung der Produkte nimmt es wieder die alte Konformation an und verschiebt dabei die Filamente gegeneinander. Eine erneute Bindung von ATP wiederholt den Vorgang.

Über die molekulare Regulation von Flagellenbewegungen ist dagegen bisher wenig bekannt. Es wird angenommen, dass die Motilität durch verschiedene Faktoren geregelt wird. Vermutet wird ein Einfluss von Calcium, Bikarbonat und dem Status der Proteinphosphorylierung. Extrazelluläres Calcium scheint notwendig zu sein für die Motilitätsentwicklung und die Hyperaktivierung (Si und Okuno 1999). Der intrazelluläre Calciumspiegel muss dagegen niedrig sein, um die Spermien zu aktivieren (Luconi *et al.* 1996). Die Wirkung von Calcium findet vermutlich indirekt über eine Phosphodiesteraseaktivierung statt, wodurch es wiederum zu einem Absinken des cAMP- Spiegels kommt (Luconi und Baldi 2003). Es wurde auch gezeigt, dass Phosphodiesterasehemmstoffe die Beweglichkeit stimulieren (Lefievre *et al.* 2000; Fisch *et al.* 1998). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass cAMP als „second messenger“ einen direkten Einfluss auf die Bewegung des Flagellums hat.

Bicarbonat führt zu einem Anstieg der Motilität verbunden mit einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung durch Aktivierung der Adenylzyklase (Visconti *et al.* 1999). Die Proteinphosphorylierung scheint in einem direkten Zusammenhang mit der

Motilitätsentwicklung zu stehen. Hierbei sind mehrere Enzyme involviert. Die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) katalysiert die Phosphorylierung (Visconti *et al.* 1997). Die so genannten „A Kinase Anchoring Proteins“ (AKAPs) verankern die PKA in der fibrösen Hülle des Flagellums. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Phosphatasen Calcineurin und Protein Phosphatase 1 eine negative Wirkung auf die Motilitätsentwicklung haben. Auch die Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase wirkt sich negativ auf die Motilität aus (Luconi und Baldi 2003).

Entscheidend für die erfolgreiche Befruchtung der Eizelle ist auch die Hyperaktivierung der Spermatozoen. Nach der Ejakulation zeigen die Spermatozoen zunächst eine deutlich progressive und lineare Vorwärtsbewegung. Dieser Bewegungsablauf ändert sich während der Kapazitation und resultiert schließlich in der hyperaktivierten Bewegung (Yanagimachi 1994). Zuerst wurde die Änderung des Schwanzschlages im Zusammenhang mit der Kapazitation an Hamsterspermien beobachtet (Yanagimachi 1994). Die Hyperaktivierung ist gekennzeichnet durch eine heftige peitschenschlagähnliche Bewegung des Spermischwanzes, größerer Schlagamplitude und eher zirkulären Schwimmbahnen mit achterspuren-zeichnender Kopfbewegung. Auch die laterale Kopfauslenkung und die Frequenz der Kopfbewegung nehmen zu. Es ist beschrieben, dass hyperaktive Spermatozoen erfolgreicher den *Cumulus oophorus* und die *Zona pellucida* penetrieren können (Ho und Suarez 2001). Als Stimuli für die Hyperaktivierung der Spermatozoen werden Ionen und Sekrete des Eileiters vermutet. Für humane Follikelflüssigkeit wurde ein Dosis-abhängiger stimulatorischer Effekt auf die Hyperaktivierung nachgewiesen (Fabbri *et al.* 1998). Voraussetzung für die Hyperaktivierung ist die vermehrte Calciumaufnahme der Spermatozoen im Bereich des Eileiters (Ho und Suarez 2001). Einem Anstieg des pH-Wertes folgt eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegel, was wiederum die Hyperaktivierung begünstigt (Marquez und Suarez 2006).

1.2.3. Kapazitation

Nachdem die Spermatozoen den Nebenhoden passiert haben, sind sie zur aktiven Bewegung befähigt (1.2.2). Dennoch sind sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Lage, an eine Eizelle zu binden und diese zu befruchten. Die Kompetenz hierzu erlangen die Spermatozoen erst während der Passage durch den weiblichen Genitaltrakt (Yanagimachi 1994). Dieser

Reifungsprozess der Spermatozoen wird als Kapazitation bezeichnet (Austin 1967; Chang 1951; Chang 1955; Brewis *et al.* 2005).

Bei der Kapazitation kommt es zu biochemischen Veränderungen, die unter anderem zu einer Reorganisation und Modifikation der Plasmamembran sowie der mit ihr assoziierten Proteine führen (Eddy und O'Brien 1994; Baldi *et al.* 2000; Baldi *et al.* 1996). Die genauen Mechanismen der Kapazitation sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutet wird, dass der Anstieg von intrazellulärem Calcium und cAMP im Spermatozoon zu einer Aktivierung verschiedener Proteinkinasen mit folgender Proteinphosphorylierung führt (Leclerc und Gagnon 1996; Breitbart und Naor 1999; Baldi *et al.* 2000; Visconti *et al.* 1995a). Interessanterweise erfolgt der Anstieg von Tyrosinphosphorylierungen über eine cAMP vermittelten Anstieg der PKA Aktivität (Visconti *et al.* 1995b; Galantino-Homer *et al.* 1997; Breitbart *et al.* 2006).

Für eine Kapazitation *in vitro* ist neben Energielieferanten wie beispielsweise Glucose, Laktat und Pyruvat die Anwesenheit von Albumin bei jeder Spezies obligat. Die Kapazitationsdauer variiert dagegen, je nach Spezies, zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden (Kanitz 1994; Yanagimachi 1994; Dalvit 1996; Visconti *et al.* 1999).

Einheitliche Parameter zur Definition des Kapazitationsstatus von Spermatozoen konnten bisher noch nicht aufgestellt werden. Das Ende der Kapazitation zeichnet sich bei allen Säugetieren dadurch aus, dass das Spermatozoon den *Cumulus oophorus* passiert und die Zona pellucida zu durchdringen vermag (Yanagimachi 1994). Die Fähigkeit der Spermatozoen zur spontanen Akrosomreaktion, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch Effektoren wie Progesteron oder Zona pellucida-Proteine und das Auftreten eines hyperaktiven Bewegungsmusters des Flagellums werden als Parameter für eine erfolgte Kapazitation gewertet (Harrison 1996).

1.2.4. Grundlagen der Akrosomreaktion (AR)

Die Oozyten von Säugetieren sind ummantelt von einer dicken Glycoproteinhülle, der Zona pellucida. Zum Zeitpunkt der Ovulation ist die Zona pellucida außerdem vom *Cumulus oophorus* umgeben, welcher aus Kumulus-Zellen und deren Matrix besteht. Bei den meisten Spezies sind akrosomreagierte Spermatozoen fähig, die Zona pellucida zu durchdringen und mit der Oozyte zu fusionieren (Primakoff und Myles 2002; Yanagimachi 1994). Es wird zwischen einer durch die Zona pellucida induzierten und einer spontanen Akrosomreaktion

(AR) unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass spontan akrosomreagierte Mausempermatozoen nicht in der Lage sind, an die Zona pellucida zu binden und somit auch die Oozyte nicht befruchten können (Kopf und Gerton 1991). Hieraus wird erkenntlich, dass nicht nur der Vorgang der AR selbst, sondern auch die genaue zeitliche und örtliche Abfolge von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Fertilisation ist.

Bedford (1969) hat als erster die morphologischen Details der „echten“ AR, die sich von der unspezifischen akrosomalen Degeneration unterscheidet, beschrieben.

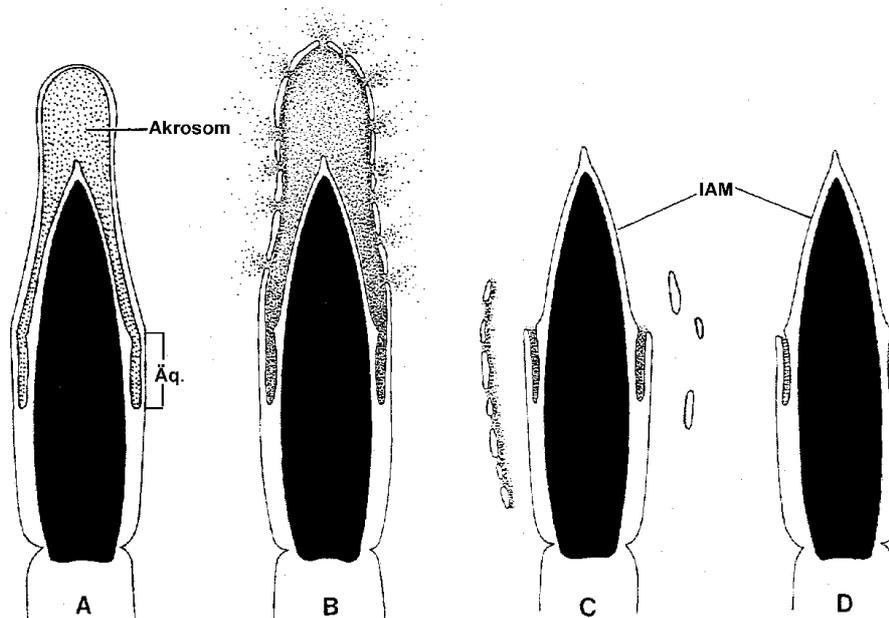


Abbildung 4. Schematischer Ablauf der Akrosomreaktion im Säugetierspermatozoon. **A:** Spermatozoonkopf mit intaktem Akrosom **B:** Partielle Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran, die so genannte Fenestrierung beginnt. **C - D:** Vollständige Ablösung der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran mit Resten akrosomalen Inhaltes im Bereich der Umschlagfalte. Äq: äquatoriales Segment; IAM: innere akrosomale Membran. Modifiziert nach (Yanagimachi 1994).

Die AR entspricht einer Exozytose (Abou-Haila und Tulsiani 2000). Es kommt zu multiplen Fusionen der äußeren akrosomalen Membran mit der darüber liegenden Plasmamembran im apikalen Spermatozoonkopfbereich (Yanagimachi 1994; Harrison 1996; Wassarman *et al.* 2005) (Abbildung 4.). Diese Vorgänge führen zu einer Fenestrierung und Vesikulisierung der Membranen. Das äquatoriale Segment ist in diese Vorgang nicht mit eingeschlossen. Diese Membranfusionen führen zur Freisetzung des akrosomalen Inhaltes. Nach der AR bleibt die innere akrosomale Membran über dem Nukleus erhalten (Brackett *et al.* 1978). Die AR

unterscheidet sich von anderen Exozytosevorgängen dadurch, dass sie sehr langsam und asynchron in der Spermienpopulation abläuft. Zwischen der Stimulation der AR und der Membranfusion können mehrere Minuten vergehen.

Bei der AR werden diverse Enzyme freigesetzt. Die Hyaluronidase befindet sich in einer löslichen Fraktion des Akrosoms und wird während der AR an die Umgebung abgegeben. Sie unterstützt das Durchdringen der Kumuluszellschicht der Oozyte, deren Matrix aus Hyaluronsäure besteht. Hauptbestandteil des Akrosoms ist Akrosin/Proakrosin, welches für die sekundäre Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida verantwortlich sein soll. Akrosin ist eine Serinprotease, die im intakten Akrosom fast völlig in einer inaktiven Form (Proakrosin) vorliegt. Akrosin ermöglicht zusammen mit anderen proteolytischen Enzymen die Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida.

Als physiologische Induktoren der AR gelten Zona pellucida C-Protein (ZPC-Protein) und das von Kumuluszellen sezernierte Progesteron (Patrat *et al.* 2000; Melendrez *et al.* 1994; Wassarman *et al.* 2005). Als Rezeptor für das ZPC-Protein werden spezieabhängig verschiedene Proteine auf Seiten des Spermatozoons diskutiert. So wurden im Maus-Modell als Adhäsionsproteine für ZPC die β -1,4-Galakotsyltransferase, das murine Protein p95 und das am Spermatozoonkopf lokalisierte sp56-Protein detektiert (Snell und White 1996). Dagegen wird beim Menschen ein Mannose-bindendes Protein diskutiert (Foster 1997; Sinowitz *et al.* 1998). In anderen Studien wurden auch p47 (Ensslin 1998) und Zonaadhesin (Hickox 2001) als mögliche Adhäsionsproteine postuliert.

Durch die Bindung von Spermatozoon und Eizelle kommt es zur Aktivierung eines Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteins (vermutlich G_i) (Endo *et al.* 1987; Kopf *et al.* 1986; Ward *et al.* 1994a; Ward *et al.* 1994b). Bisher war es allerdings nicht möglich, den G-Protein regulierten ZPC-Rezeptor eindeutig zu identifizieren. Durch die Aktivierung des G-Proteins, werden komplexe molekulare Mechanismen in Gang gesetzt. Eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, die z. T. untereinander verzahnt sind, soll hierin involviert sein. Einen Überblick über die hypothetischen Vorstellungen zum molekularen Ablauf der AR gibt Abbildung 5.

Ca²⁺-abhängiger Signaltransduktionsweg

Ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration während der durch Zona pellucida induzierten AR wurde in Maus-Spermatozoen beobachtet. Hierfür wird die Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen (VOCC) des T-Typs verantwortlich gemacht (Arnoult *et*

al. 1998; Darszon *et al.* 1999; Darszon *et al.* 2006). Es gibt einige Hinweise auf die Beteiligung von Ca^{2+} -Speichern in Spermatozoen (Dragileva *et al.* 1999), dennoch ist ihre Existenz umstritten.

Cl⁻-Kanäle

Neuronale Glycin-Rezeptor/Cl⁻-Kanäle (GlyR) wurden in der Plasmamembran von Spermatozoen identifiziert. Diese sind bei den initialen Vorgängen der durch Zona pellucida induzierten AR beteiligt (Llanos *et al.* 2001). GlyR-Agonisten induzieren konzentrationsabhängig die AR (Melendrez und Meizel 1995; Turner *et al.* 1997). Die Aktivierung der Kanäle kann zu einem Cl⁻-Efflux aus dem Spermatozoon und somit zur Hyperpolarisierung führen; dabei können dann VOCCs aktiviert werden (Garcia und Meizel 1999). Weiterhin wird diskutiert, dass beim Progesteron-induzierten Ca^{2+} -Einstrom ein γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor/Cl⁻-Kanal involviert sein könnte. Denn GABA induziert in Dosis-abhängiger Weise die AR humaner Spermatozoen (Calogero *et al.* 1999). Es wurde gezeigt, dass während der Progesteron-induzierten AR ein Cl⁻-Efflux stattfindet. Ähnlich wie bei dem Zona pellucida/GlyR-System kann die sich daraus ergebende Hyperpolarisierung der Spermatozoenmembran die VOCCs aktivieren. Es gibt auch Hinweise dafür, dass die Aktivierung von GABA Rezeptoren eine Zunahme der Aktivität des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Co-Transporters hervorrufen kann, die zu einer Erhöhung der intrazellulären HCO_3^- -Konzentration führt (Turner und Meizel 1995).

cAMP-abhängiger Signaltransduktionsweg

Die Beteiligung von cAMP bei der durch Zona pellucida induzierten AR konnte in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden (Leclerc und Kopf 1995). Durch die Inhibition von Proteinkinase A (eine Serin-Threonin-Kinase), die in diesem Signaltransduktionsweg aktiviert wird, kann die AR gehemmt werden (Bielfeld *et al.* 1994). Zur Rolle des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges bei der AR ist jedoch noch vieles unklar.

Phospholipase-Aktivierung

Bei der AR kommt es zur Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) (Roldan 1998). Vor allem nach einer Induktion der AR durch Progesteron führt die aktivierte PLA2 zur Produktion von Arachidonsäure, Lysophosphatidylcholin und "platelet-activating factor" (PAF) (Baldi *et al.* 1993; Ali *et al.* 2007).

Weiterhin kommt es bei der AR zu einer Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipase C und dadurch zum Anstieg der intrazellulären Konzentration der "second messenger" Inositol-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Roldan 1998; De Blas *et al.* 2002). In somatischen Zellen fördert IP_3 die Freisetzung von Ca^{2+} aus Ca^{2+} -Speichern. Da, wie bereits beschrieben, das Vorkommen von Ca^{2+} -Speichern in Spermatozoen noch unklar ist, ist auch die physiologische Bedeutung von IP_3 bei der AR umstritten. DAG ist der physiologische Aktivator der Proteinkinase C (PKC).

Kinase-abhängige Signaltransduktionswege

Die Inkubation von Spermatozoen mit Zona pellucida oder Progesteron führt zu einer Zunahme der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine. Außerdem führt eine Inhibition der Tyrosinkinase zu einer Hemmung der, durch den entsprechenden Agonisten induzierten, AR (Burks *et al.* 1995). Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass die Aktivierung von Tyrosinkinase in Zusammenhang mit den Progesteron- und Zona pellucida-induzierten Ca^{2+} -Einstrom steht (Bonaccorsi *et al.* 1995; Tesarik *et al.* 1996).

Auch die Beteiligung einer Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade während der AR wird diskutiert. Neben PKA wurde auch PKC in Spermatozoen nachgewiesen. Diese Enzyme scheinen in der Regulation der AR über die Phosphorylierung von Proteinen involviert zu sein (Bielfeld *et al.* 1994; Bonaccorsi *et al.* 1998), da durch die Inhibition von PKA und PKC die Induktion der AR gehemmt wird (De Jonge *et al.* 1993).

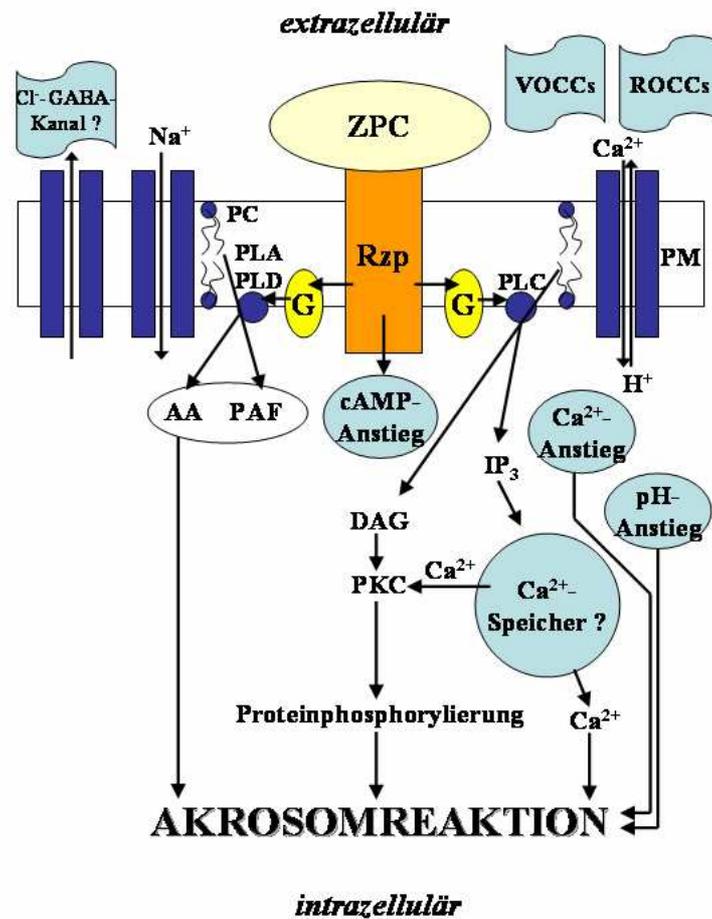


Abbildung 5. Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen, die zur Zona pellucida induzierten Akrosomreaktion führen.

AA: Arachidonsäure; DAG: Diacylglycerol; G: G-Protein; IP₃: Inositol-Triphosphat; PAF: platelet-activating factor; PIP₂: Phosphatidyl-Inositol-Biphosphat; PK-C: Proteinkinase C; PLA: Phospholipase A₂; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D; PM: Plasmamembran; Rzp: Rezeptor; ROCCs: Rezeptor-gesteuerte Calcium-Kanäle; VOCCs: Spannungsabhängige Calcium-Kanäle; ZPC: Zona pellucida 3-Protein.
 Modifiziert nach Kopf und Gerton (1991) sowie nach Baldi *et al.* (2002).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnten verschiedene Proteine in Extrakten aus bovinen ODF nachgewiesen werden. Unter anderem wurde ein Polypeptid mit einer Molekularmasse von 30-32 kDa als VDAC identifiziert (Hinsch *et al.* 2004). Das Vorhandensein von VDAC in Spermatozoen, insbesondere in den ODF, einer nicht membranären Struktur, war Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Eine im Jahr 2001 erschienene Arbeit von Sampson *et al.* verdeutlicht, dass VDAC offenbar für die Motilität von Spermatozoen von Bedeutung ist. So konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass männliche VDAC3 knockout Mäuse infertil waren, darüber hinaus aber keine zusätzlichen phänotypischen Auffälligkeiten aufweisen. Die Tiere zeigten bei normaler Spermatozoenkonzentration eine verringerte Spermatozoenmotilität, die auf strukturelle Defekte im Flagellum zurückzuführen waren (Sampson *et al.* 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von anti-VDAC Antikörpern die Präsenz der verschiedenen VDAC Subtypen in unterschiedlichen Spermatozonenkompartimenten zu untersuchen. Weiterhin sollten funktionelle Untersuchungen unter Verwendung der anti-VDAC Antikörper dazu beitragen, die physiologische Relevanz der VDAC Subtypen bezüglich wichtiger Spermatozoen-Eigenschaften (z.B. Motilität und Akrosomreaktion) aufzuklären. Mit diesen Untersuchungen sollte die physiologische Bedeutung von VDAC in Samenzellen des Säugers für die Befruchtungsfähigkeit aufgedeckt werden.

Es wurden folgende konkrete Arbeitsziele festgelegt:

- 1.) Reinigung spezifischer anti-VDAC Antikörper aus den vorhandenen Antiseren und Charakterisierung dieser Antikörper bezüglich ihrer Affinität zum Antigen und ihrer Subtyp-Spezifität
- 2.) Lokalisation von VDAC1, 2, und 3 in bovinen, ejakulierten Spermatozoen mittels biochemischer und immunzytochemischer Methoden
- 3.) Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der VDAC Subtypen auf die Spermatozoenmotilität und bezüglich des akrosomalen Status mit Hilfe der anti-VDAC Antikörper

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

ECLTM Western Blot Detection Kit

Nitrozellulosemembran

Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA:

Falcon[®] Zentrifugenröhrchen 15ml; 50ml

Biochrom AG, Berlin

PBS-Dulbecco ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

Bio-Rad, München

Acrylamid/Bis

Abstandhalter für Gel-Elektrophorese-Platten

Ammoniumpersulfat

Biotinylierter Gel-Elektrophorese Standard

β-Mercaptoethanol

Precision Plus ProteinTM Standard (Dual Color)

Protein Assay Standard I (Bovine Plasma Gamma Globulin)

SDS

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

Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl

Fuji, Düsseldorf

Röntgenfilme

Röntgenfilmkassette

Glaswerk Wertheim, Wertheim

Küvetten

Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenrot:

Pasteurpipetten aus Plastik, 3ml

Kalensee, Giessen

Zählkammer nach Neubauer

Lucerne, Oakland, CA, USA:

Fettfreies Milchpulver

Menzel-Gläser, Braunschweig

Deckgläser

Objektträger

Merck, Darmstadt

Aceton

Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat

di-Natriumhydrogenphosphat

EDTA

EGTA

Essigsäure 100% (Eisessig)

Glycerin

Isopropanol

Kaliumdihydrogenphosphat

Natronlauge

Paraformaldehyd

Pikrinsäure

Salzsäure

Tris

Wasserstoffperoxid

Nunc, Kamstrup, Dänemark

96-Loch-Kunststoffmodule (Micro Well), Maxisorp F-20 mit hochaffiner Proteinbindungskapazität für ELISA

Pierce, Bonn

HEPES Puffer

Plano, Wetzlar

Citifluor

Riedel-de Haën, Seelze

Ethanol

Methanol

Trichlormethan (Chloroform)

Roth, Karlsruhe

Glycin

Natriumchlorid

Tris-Base

Serva, Heidelberg

Coomasie-Blau R 250

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Anti-Kaninchen IgG biotinyliert

Avidin-FITC

bis-Benzamidine (Höchst 33258)

Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V)

Bromphenolblau

FITC-PSA

Gluteraldehyd

Kaninchen-IgG

L-Glutamin-Lösung 200mM

OPD (o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid)

Penicillin/Streptomycin-Lösung
Ponceau S
PVP (Polyvinylpyrolidon)
Teleost-Gelatine
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)

WU, Mainz

Pasteur-Kapillarpipetten

2.1.2. Medien und Pufferlösungen

Cacodylat-Puffer

4,28g Cacodylsäure-Natriumsalz
100ml Aqua dest
pH 7,4 mit NaOH

Coomassie-Blau-Färbelösung für Polyacrylamidgele

0,25% w/v Coomasie-Blau
10% v/v Essigsäure 100% (Eisessig)
45% v/v Methanol
45% v/v Aqua dest

EM-Fixans nach Ito und Karnovsky

1,25% Paraformaldehyd
2,5% Glutraldehyd
0,05% Pikrinsäure
ad 0,1M Cacodylatpuffer
pH 7,3

Elutionspuffer

0,1 M Glycin,
pH 2,8

Entfärbelösung für Coomassie-Blau

10% v/v Essigsäure 100% (Eisessig)

45% v/v Methanol

45% v/v Aqua dest

Geltrocknungslösung

50% v/v Methanol

2% Glycerin

HAM'S F10 Zellkulturmedium

100ml Nutrient Mixture F-10 HAM

0,5ml 200mM L-Glutamin

1ml Penicillin/Streptomycinslösung

0,3% Bovines Serum Albumin

Kryopreservanz für Spermatozoen

Andromed[®] (Firma Minitüb, Tiefenbach)

Laufpuffer für die Protein Elektrophorese

190 mM Glycerin

0,1% w/v SDS

25 mM Tris

pH 8,3

Methacarn-Fixierlösung

60% v/v Methanol

30% v/v Chloroform

10% v/v Essigsäure 100% (Eisessig)

ODF-Puffer

5% (w/v) SDS
5% β -Mercaptoethanol
Proteasehemmstoffe
20mg/ml Trasylol
20mM Tris-HCl
pH 7,2

PBS (Phosphate-buffered-saline)

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

Probenpuffer für die Protein Gel-Elektrophorese (6x Laemmli)

7ml 4x Tris/SDS pH 6,8
3ml Glycerin
1g SDS
1,2mg Bromphenolblau
Aqua dest bis 10ml

Proteasehemmstoffe:

1 mM EDTA
10 mM Benzamidin
2 mM Dithiotreitol
0,2 mM PMSF

Proteinextraktionspuffer

150mM NaCl
1mM CaCl₂
1mM MgCl₂
1mM KCl
Proteasehemmstoffe
50mM Tris-HCl
pH 7,4

Sammelgel 4%ig

1,3ml 30% Acrylamidlösung
2,5ml Sammelgelpuffer
6,1ml Aqua dest.
10µl TEMED
50µl 10% w/v Ammoniumpersulfatlösung

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris, pH 6,8

TBS (*Tris buffered saline*)

25 M Tris-Base
150 M Natriumchlorid
pH 7,4

4x Tris/SDS

6,05g Tris-Base in 40ml Aqua dest.
pH 6,8 einstellen
Aqua dest. hinzufügen bis 100ml
0,4g SDS

T-TBS (*Tween-Tris buffered saline*)

0,05% v/v Tween 20 in TBS
pH 7,4

Trenngel 10%ig

- 3,3ml 30% Acrylamidlösung
- 2,5ml Trenngelpuffer
- 4,1ml Aqua dest.
- 5µl TEMED
- 50µl 10% w/v Ammoniumpersulfatlösung

Trenngelpuffer:

- 1,5 M Tris, pH 8,8

Western Blot Puffer

- 250 mM Glycerin
- 0,01% w/v SDS
- 20% v/v Methanol
- 40 mM Tris

2.1.3. Verwendete Kits

BioRad, München

- Protein Assay Kit (Micro Assay)

Pierce, Perbio, Bonn

- AminoLink® Plus Immobilization Kit

2.1.4. Geräte

Beckmann Microfuge 12, Glenrothes, Großbritannien

Bender&Hobein AG,

Zürich, Schweiz: Vortex Genie 2 TM

Bio-Rad, München: Gelkammer Mini Protean II TM

Mini Trans Blot TM

Hettich GmbH & Co. KG: Hettich Universal 30F, Zentrifuge

Heraeus, Hanau:

Begasungsbrutschrank

Minifuge, Sepatech, Rotor BS4402/A

Suprafuge 22, Rotor HFA 22.50

Janke&Kunkel, Staufen:

IKA-Schüttler MTS 4

IKAMAGR RET-Magnetrührer

IKA-Combimag RCT

Joun GmbH, Unterhaching: Trockenschrank

Leybold-Heraeus, Hürth: Lyovac GT2

Knick, Berlin: Digital-pH-Meter 761 Calimatic

Sefi Med, Tel Aviv, Israel: Markler Counting Chamber

Mika Medical, Rosenheim: Cell Motion Analyzer

Millipore, Eschborn: Wasseraufbereiter

Philipps : Raster-Elektronenmikroskop PSEM 500

Tecan : ELISA-Reader Sunrise

Zeiss: Axioskop

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Für die Untersuchungen wurden Ejakulate von geschlechtsreifen Bullen (14 bis 16 Monate alt; Deutsche Holsteins, Schwarzbunt), welche mit Hilfe einer künstlichen Vagina abgesamt wurden, verwendet. Es wurden sowohl frische Ejakulate als auch kryokonservierte Spermatozoen eingesetzt.

2.2.1.1. Frische Ejakulate

Für einen Teil der durchgeführten Versuche wurden frische bovine Ejakulate verwendet. Diese stammten von Bullen der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen und wurden freundlicherweise für diese Versuche zur Verfügung gestellt.

2.2.1.2. Kryokonservierte Spermatozoen

Für einige der Untersuchungen wurden kryokonservierte, bovine Spermatozoen von Zuchtbullen der „Zentralen Besamungsunion Hessen eG“ oder von Bullen aus dem Tierärztlichen Instituts Göttingen verwendet. Das Untersuchungsmaterial, 20×10^6 Spermatozoen/ Portion in 200µl Verdünner (AndroMed, MiniTüb), wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Müller-Schlösser und Herrn Dr. Wemheuer zur Verfügung gestellt.

Für die Versuche wurden die Proben in 39°C warmem Wasser für 30 Sekunden erwärmt. Das aufgetaute Ejakulat wurde in ein 15ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Je nach Versuchsanordnung wurde dann das Sperma mit bestimmten Puffern versetzt und durch Zentrifugation gewaschen, um das Seminalplasma zu entfernen.

2.2.2. Das Swim-up-Verfahren

Um eine höhere Konzentration intakter und motiler Spermatozoen zu erhalten, wurde für die funktionellen Untersuchungen das *Swim-up*-Verfahren durchgeführt.

Zu dem aufgetauten kryokonservierten Ejakulat wurden je 2ml HAM's F-10 mit HEPES/0,3% BSA pro 20×10^6 Spermatozoen gegeben. Zur Entfernung des Seminalplasmas wurde das Untersuchungsmaterial 2×5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, das Sediment in 2ml HAM's F-10 mit HEPES/0,3% BSA resuspendiert und der Waschschrift wiederholt.

Im Anschluss hieran wurde das eigentliche *Swim-up*-Verfahren durchgeführt: Das die Spermatozoen enthaltende Sediment wurde hierbei mit $600 \mu\text{l}$ HAM's F-10 mit HEPES/0,3% BSA vorsichtig überschichtet, in einem 45° Winkel in einen Ständer gestellt und für 45 min in einem Brutschrank bei $38,5^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Die motilen Spermatozoen konnten sich nun aktiv aus dem Sediment lösen und in den Überstand schwimmen. Der Überstand wurde abpipettiert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Konzentration der Spermatozoen wurde mit Hilfe eines Computerassistierten Samenanalyse-Systems (CASA) bestimmt und auf $20 - 30 \times 10^6$ Spermatozoen pro ml eingestellt. Für die funktionellen Studien wurden nur Spermatozoen verwendet, deren Parameter bezüglich Konzentration, Morphologie und Ausgangsmotilität im Normbereich lagen (Rosenberger 1990). Bei sämtlichen Versuchen stammten die Test- und die Kontroll spermatozoen aus derselben Spermatozoensuspension.

2.2.3. Anti-VDAC Antikörper

2.2.3.1. Auswahl der Peptide und der polyklonalen Antiseren

In Vorversuchen wurden in ODF-Extrakten boviner Spermatozoen Peptide gefunden (Tabelle 1), die eine spezifische Sequenz für VDAC2 und VDAC3 aufwiesen (Hinsch *et al.* 2004).

Für weiterführende Untersuchung wurden polyklonale anti-Peptid-Antiseren von Kaninchen gewonnen, deren Antigen (Peptidsequenz) einerseits von den identifizierten VDAC2 bzw. VDAC3 Aminosäuresequenzen abgeleitet oder von cDNA-Klonen hergeleitet wurden, die für Säugetier-VDAC1, 2 und 3 kodieren (Tabelle 1, Abbildung 6). Die entsprechenden Antiseren wurden mir von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. Übersicht der in ODF-Extrakten identifizierten Peptide und die zur Antikörperherstellung verwendeten Peptidsequenzen

Antiserum	Peptid-Sequenz
AS P1/6	GHKLGLGLEFQA
AS P2/45	YQLDPTASISAK
AS P3/31	SVFNKGYGFM
AS P _{common}	GHKVGLGFEL

Rot: Peptid 1 aus ODF-Extrakt

Blau: Peptid 2 aus ODF-Extrakt

Dunkelgrün: Peptid 4 aus ODF-Extrakt

Hellgrün: Peptid aus Aminosäuresequenz von VDAC1 abgeleitet (vergl. Abbildung 6)

Pink: Peptid aus Aminosäuresequenz von VDAC3 abgeleitet (vergl. Abbildung 6)

VDAC1	MAVVRPYADL	GKSARDVFTK	GYGFGLIKLD	LKTKSENGLE	FTSSGSANTE
VDAC2	MATHGQNCARP	MCIPPSYADL	GKAARDIFNK	GFGFGLVKLD	VKTKSCSGVE
VDAC3	MCNTPTYCDL	GKAAK	VFNK	GYGF	GMVKID
					LRTKSCSGVE
					FSTSGHAYTD
VDAC1	TTKVTGSLET	KYRWTEYGLT	FTEKWNTDNT	LGTEITVEDQ	LARGLKLTFD
VDAC2	TGKVTGTLET	KYKWCEYGLT	FTEKWNTDNT	LGTEIAIEDQ	ICQGLKLTFD
VDAC3	TGKASGNLET	KYKICNYGLT	FTQKWNTDNT	LGTEISWENK	LAEGLKLTLD
					TIFVPNTGKK
VDAC1	NAKIKTGYKR	EHINLGCDVD	FDIAGPSIRG	ALVLGYEGWL	AGYQMFETA
VDAC2	SGKIKSSYKR	ECINLGCDVD	FDFAFPAIHG	SAVFGYEGWL	AGYQMTFDSA
VDAC3	SGKLGASYKR	DCFSLGSNVD	IDFSGPTIYG	WAVLAFEGWL	AGYQMSFDA
					KSKLSQNNFA
VDAC1	VGYKTDEFQL	HTNVNDGTEF	GGSIYQKVNK	KLETAVNLAW	TAGNSNTRFG
VDAC2	VGYRTGDFQL	HTNVNDGTEF	GGSIYQKVCE	DLDTSVNLAW	TSNTNTRFG
VDAC3	LGKAAADFQL	HTNVNDGTEF	GGSIYQKVNE	KIETSINLAW	TAGNSNTRFG
					IAAKYKIDPD
					IAAK YQLDPT
					IAAKYKIDCR
VDAC1	ACFSAKVNS	SLIGLGYTQT	LKPGIKLTLS	ALLDGKNVNA	GHKLGLGLE FQA
VDAC2	ASISAK	SLIGVGYTQT	LRPGVKLTLS	ALVDGKSINA	GGHKLGLPLE
VDAC3	TLSAKVNNA	SLIGLGYTQT	LRPGVKLTLS	ALIDGKNFNA	GHKVGLGFE LEA

Abbildung 6. Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von bovinem VDAC1, VDAC2 und VDAC3. Farblich markiert sind die Peptidsequenzen, die als Antigen zur Herstellung der polyklonalen Antisera verwendet wurden.

Hellgrün: Peptidsequenz für AS P 1/6

Dunkelgrün: Peptidsequenz für AS P 2/45

Rot + Blau: Peptidsequenz für AS P 3/31

Pink: Peptidsequenz für AS P_{common})

2.2.3.2. Affinitätschromatographische Reinigung der anti-VDAC Antikörper

In Antiseren sind außer Antikörper Bestandteile enthalten, deren Auswirkungen auf funktionellen Untersuchungen unbekannt waren. Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden für die geplanten funktionellen Studien affinitätschromatographisch gereinigte anti-VDAC Antikörper eingesetzt.

Herstellung der affinitätschromatographischen Säulen

Die Antikörper (AS P1/6, AS P2/45, AS P3/31) wurden mit Hilfe von Affinitätssäulen, an deren Gelmatrix das jeweilige korrespondierende synthetische Peptid gebunden wurde, aus den Antiseren gereinigt. Die Herstellung der Säulen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Pierce, Perbio, Bonn). Um das Austrocknen der Säulenmatrix zu verhindern, wurde diese bis zur Verwendung in einem Aufbewahrungspuffer (PBS, pH 7,4, entgast) bei 4°C gelagert.

Die affinitätschromatographische Reinigung von AS P_{common} wurde durch die Firma Squarix GmbH, Marl, durchgeführt.

Reinigung von Antikörpern mittels Affinitätschromatographie

Die Säulen wurden mit 8ml PBS gewaschen. Dann wurde 1ml Antiserum mit 1ml PBS pH 7,4 verdünnt, 30 sec bei 13800xg abzentrifugiert und der Überstand auf die Säule (Matrixvolumen 2ml) gegeben. Nach einer Stunde Inkubation der Antikörper mit der Säulenmatrix bei Raumtemperatur wurden die Säule mit 12ml 1 M NaCl gewaschen und anschließend mit 5ml PBS gespült, um Reste des NaCl zu entfernen. Die gebundenen anti-VDAC Antikörper wurden mittels eines Elutionspuffers (0,1 M Glycin, pH 2,8) von ihrem Antikörper-Peptid-Komplex getrennt. Die eluierten Antikörper wurden in Fraktionen von 500µl in mit 20µl 1M Tris pH 9,6 vorbereiteten Reaktionsgefäßen gesammelt und der pH Wert sofort mit 3M HCL bzw. 1M Tris pH 9,5 neutralisiert. Insgesamt wurden 20 Fraktionen pro Reinigung gesammelt.

2.2.3.3. Charakterisierung der Antiseren und der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper

Die gewonnenen Antikörper-Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt mit Hilfe des BioRad Protein Assay Kit und ihre spezifischen anti-VDAC Antikörpergehalt mit Hilfe des ELISAs untersucht. Fraktionen mit ähnlichem Proteingehalt und Antiköpertiter wurden vereinigt und lyophilisiert bzw. bei -20°C aufbewahrt. Von diesen vereinigten Fraktionen wurden nochmals

eine Proteinbestimmung und ein ELISA durchgeführt, um auszuschließen, dass es durch den Vorgang des Lyophilisierens bzw. des Einfrierens zu einer Veränderung der Eigenschaften der Antikörper kam.

Titerbestimmung mit Hilfe des Enzyme linked immunoabsorbent assays (ELISA)

Um spezifische Antikörper nachzuweisen, wurde ein ELISA im wesentlichen nach dem von (Engvall and Perlmann 1972) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Synthetische Peptide, gegen welche die Antikörper gerichtet waren, wurden in Aqua dest. gelöst. Von dieser Lösung wurden je 100µl pro Kavität eines Micro Well-Immuno-Moduls mit hochaffiner Proteinbindungskapazität aufgetragen. Dies entsprach einer Proteinmenge von 0,5µg pro Vertiefung. Es folgte eine Inkubation der Module bei 37°C im Trockenschrank über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kunststoffmodule für je 5min 2 x mit PBS/0,05% Tween, pH 7,4, und 1 x mit PBS, pH 7,4, gewaschen, um nicht adsorbiertes Antigen zu entfernen. Anschließend wurde für 1h eine Präinkubation mit einer 1% BSA/PBS-Lösung (100µl/Vertiefung) durchgeführt, um mögliche unspezifische Antikörperbindungen an das Kunststoffmaterial zu verhindern. Von den Antiseren bzw. den affinitätsgereinigten Antikörper wurden absteigende Verdünnungsreihen (in 1% BSA/PBS) vorbereitet und hiervon 100µl pro Vertiefung aufgetragen. Die Module wurden für 1h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Hierauf folgte wieder ein Waschschrift (2x in PBS/0,05% Tween und 1x in PBS für je 5 min). Als Zweitantikörper wurde Peroxidase-gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:3000 (in 1% BSA/PBS) eingesetzt. Auch diese Inkubation erstreckte sich über einen Zeitraum von 1h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte nach einem weiteren intensiven Waschschrift mit OPD (O-Phenylenediamine) als Substrat. Die Farbreaktion wurde mit 50µl 3 M Salzsäure abgestoppt.

Der Antikörpertiter wurde über die Extinktionswerte (OD) bei einer Wellenlänge von 492nm mit einem Photospektrometer (Tecan) bestimmt. Hierbei wurde definiert, dass die größtmögliche Verdünnung, deren Extinktionswert noch über dem doppelten Maximalwert des entsprechenden Präimmunserums lag, den Titer darstellt.

Proteinbestimmung

Von den affinitätsgereinigten Antikörpern wurde mit Hilfe des BioRad Protein Assay Kit eine Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Es wurde der Micro Assay für Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers (BioRad) verwendet. Als

Standardprotein wurde Kaninchen-IgG in Konzentrationen von 10µg/ml bis 80µg/ml eingesetzt. Der Proteingehalte der Antikörper wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620nm mit einem Photospektrometer bestimmt.

2.2.4. Immunbiochemischer Nachweis von VDAC in bovinen Spermatozoen

Zum Nachweis von VDAC1, 2 und 3 Protein in bovinen Spermatozoen wurde eine Proteinextraktion durchgeführt. Der gewonnene Zellextrakt wurde mit Hilfe des Immunblot-Verfahrens immunbiochemisch untersucht. Als Positivkontrolle und zur Feststellung der Subtyp-Spezifität wurden rekombinante VDAC Proteine verwendet, die von Herrn Prof. Vito De Pinto, Abteilung für Chemie, Universität Catania, Italien, zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.4.1. Extraktion boviner Spermatozoenproteine

Für die Extraktion von Spermatozoenproteinen wurden seminalplasmafreie, in PBS pH 7,4 gewaschene, bovine Spermatozoen verwendet (Hinsch et.al. 2003).

Die Spermatozoenkonzentration wurde auf 180×10^6 /ml eingestellt und in 0,6M NaCl in PBS aufgenommen. Hierdurch sollte noch an der Spermatozoenoberfläche vorhandene adhärente Proteine entfernt werden. Es folgte eine Extraktion mit 0,2% Triton X-100 in Proteinextraktionspuffer für 1h bei 4°C. Die Spermatozoen wurden anschließend bei 6000xg für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Das Sediment wurde dann in einem Proteinextraktionspuffer mit 2% Triton X-100 aufgenommen und für 1h bei 4°C inkubiert. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation für 30 min bei 6000xg. Auch dieser Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Als Kontrollproteine wurde mir ein Proteinextrakt aus gereingte ODF (Hinsch *et al.* 2004) zur Verfügung gestellt.

2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die aus bovinen Spermatozoen extrahierten Proteine wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden 12%ige Trenngele und 6%ige Sammelgele zur optimalen Auftrennung der Proteine benutzt. Auf das polymerisierte Gel wurden die in 20µl Probenpuffer aufgenommenen Proteine (TritonX-100-Extrakt: 60µgSpermatozoenprotein/Spur; ODF-Extrakt: 86µg Spermatozoenprotein/Spur)

sowie 10µl „Precision Plus ProteinTM Standard“ und 10µl biotinylierter Standard als Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer bei einer konstant gehaltenen Spannung von 200V für ca. 45min bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine entweder auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert, oder das Gel wurde zur Darstellung der Proteinbanden mit einer Coomassie-Blau Lösung 30min lang gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Coomassie-Blau-Entfärbelösung über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gele kurz in eine Gel Trocknungslösung gelegt und in einer Kunststoffolie luftgetrocknet aufbewahrt.

2.2.4.3. Western Blot

Die in der SDS-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen getrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert (Towbin *et al.* 1979). Der Elektrotransfer wurde bei einer Spannung von 70V für 1,5 Stunden vorgenommen. Der Erfolg des Proteintransfers wurde mit Hilfe einer Proteinfärbung der Nitrozellulosemembran mit einer 2%igen Ponceau S-Lösung überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Nitrozellulosemembranen bei Raumtemperatur aufbewahrt

2.2.4.4. Immunbiochemische Identifizierung von VDAC durch das Chemilumineszenzverfahren

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Nitrozellulosemembran in 5%iger Teleostgelatine/T-TBS für 1h präinkubiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein. Verwendet wurden geeignete Verdünnungen von anti-VDAC Antiseren und affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörper in 3% Milchpulver/T-TBS. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran 3x in T-TBS für 5min unter leichtem Schütteln gewaschen. Als „Zweitantikörper“ wurde anschließend Peroxidase markiertes Protein A (1:3000 in 3% Milchpulver/T-TBS verdünnt) eingesetzt. Die Membran wurde mit dem Protein A für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte (5x 10 min in T-TBS), um nicht-gebundenes Protein A zu entfernen. Zum Nachweis spezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran entsprechend der Herstellerangaben mit dem Substrat ECL überschichtet, 1min inkubiert, in eine Klarsichtfolie gelegt, in eine Röntgenfilmkassette gegeben und ein geeigneter Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde je nach Intensität der

Reaktion zwischen wenigen Sekunden und 30min belichtet und anschließend entwickelt und fixiert (Abbildung 7).

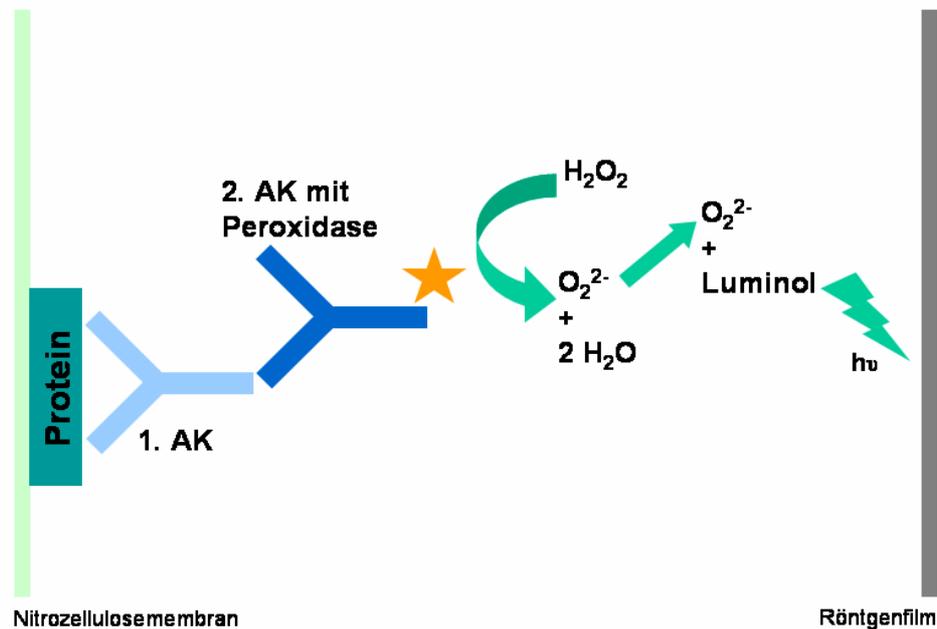


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Chemilumineszenzverfahrens.

AK = Antikörper, H_2O_2 = Wasserstoffperoxyd, O_2^{2-} = Sauerstoffradikale, $h\nu$ = Energie der emittierten Lichtquanten.

2.2.5. Immunzytochemischer Nachweis von VDAC in bovinen Spermatozoen

2.2.5.1. Vorbereitung der Spermatozoen mit verschiedenen Detergenzien bzw. Verwendung unterschiedlicher Fixierungen

Für nachfolgende immunzytochemische Untersuchungen wurden sowohl frische als auch kryokonservierte bovine Spermatozoen mit verschiedenen Detergenzien behandelt oder mit Hilfe verschiedener Lösungen fixiert. Diese unterschiedliche Behandlung der Spermatozoen diente dazu, eine möglichst optimale Antigenpräsentation für die Antikörper zu erzielen.

Behandlung der Spermatozoen mit 2% Triton X-100

Es wurden bei 39°C aufgetaute kryokonservierte bovine Spermatozoen bzw. frische bovine Ejakulate nach dem Protokoll von Oko (1988) behandelt. Die Spermatozoen wurden 3x für je 5min mit je 1ml PBS pro Pajette bei 300xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2ml 2% Triton X-100 pro Pajette zweimal für 15min auf Eis inkubiert. Nach jedem Extraktionsschritt

erfolgte bei 4°C eine 10minütige Zentrifugation bei 1000xg. Das Sediment wurde dann 2x in je 1ml 50mM Tris-HCl (pH 9) gewaschen (1000xg, 10min, 4°C). Mit dem in 100µl PBS resuspendierten Sediment wurden Ausstriche auf Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträgern angefertigt.

Weitere Spermatozoen-Fixierungen für die immunzytochemischen Untersuchungen

Kryokonservierte bovine Ejakulate wurden bei 39°C aufgetaut und 3x für je 5min mit je 1ml PBS pH 7,4 pro Pajette bei 1500xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift diente zur Entfernung des Seminalplasmas und Kryoprotektivum. Das letzte Sediment wurde in 500µl PBS resuspendiert. Für die Versuche wurden verschieden Fixierungen verwendet. So wurde zum einen mit unfixierten Proben gearbeitet, zum anderen wurde die Spermatozoensuspension im Eppendorf-Gefäß 3x in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 38°C wieder aufgetaut. Dieses Verfahren sollte zur Perforation der Plasmamembran der Spermatozoen führen. Auf Chromalaun-Gelatine-beschichteten Objektträgern wurden dann Spermatozoenausstriche angefertigt. Zum Teil wurden die Objektträger, mit den mehrmals eingefrorenen Spermatozoen zusätzlich mit Methanol oder Methacarn fixiert. Hierfür wurden die Objektträger für je 3min in die entsprechende Lösung gegeben.

2.2.5.2. Immunzytochemischer Nachweis

Zur Lokalisation der verschiedenen VDAC Subtypen in bovinen Spermatozoen wurden immunzytochemische Untersuchungen vorgenommen. Es wurden Spermatozoenausstriche verwendet, die nach den oben genannten Methoden zuvor behandelt wurden. Die Objektträger wurden zunächst für 3min in PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde in 1% Milchpulver/PBS bei Raumtemperatur präinkubiert. Als nächster Schritt folgte die Zugabe des anti-VDAC Antikörpers in geeigneter Verdünnung (in 1% BSA/PBS), mit welchem die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach dem sich anschließenden Waschschrift (1x kurz und 2x 5min in PBS und 1x kurz in 1% Milchpulver/PBS) wurde der 2. Antikörper für 30min bei Raumtemperatur zugegeben. Als 2. Antikörper wurden sowohl biotinylierte anti-Kaninchen Antikörper in verschiedenen Verdünnungen als auch Protein A-Biotin verwendet. Die besten Resultate wurden mit den biotinylierten anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:2000 in 1% BSA/PBS erreicht. Dies wurde dann auch für alle weiteren Versuche als 2. Antikörper eingesetzt. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die Spermatozoen nach einem weiteren, wie bereits beschriebenen, Waschschrift mit 100µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem Avidin (Stocklösung

1mg/ml; Verdünnung 1:400 in 1% BSA/PBS) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Es folgte ein abschließender Waschschrift. Die Objektträger wurden dann mit einem Tropfen Citifluor® beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) ausgewertet und dokumentiert (Abbildung 8).

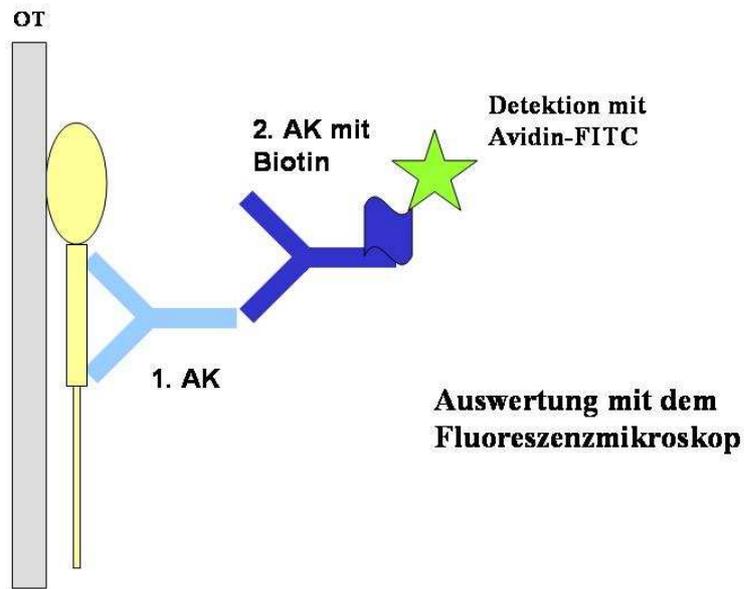


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Immunzytochemie. OT: Objektträger, AK: Antikörper.

2.2.6. Untersuchungen zum Einfluss von anti-VDAC Antikörpern auf die Funktion boviner Spermatozoen

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war der Einfluss von anti-VDAC Antikörpern auf die Funktion boviner Spermatozoen. Hierzu wurden nach Inkubation der Spermatozoen mit affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern, bzw. mit den entsprechenden Negativkontrollen, folgende Parameter überprüft:

- 1.) Die Gesamtmotilität und
- 2.) die Vitalität und der akrosomale Status der Spermatozoen.

2.2.6.1. Motilitätsparameter

Computerassistierte Samenanalyse (Computer Assisted Semen Analysis-CASA)

Das computerassistierte Samenanalyse-System (CASA) dient zur objektiven Evaluierung von Ejakulaten und liefert eine statistische Auswertung der Motilitätsparameter. Hierfür werden die Bewegungen der Zellen durch die Optik eines Mikroskops (Nikon Optiphot-2, Düsseldorf) mit einem Phasenkontrastobjektiv (Vergrößerung x 20) auf eine Videokamera (Kappa CF 8/1) übertragen und computerunterstützt (Computer mit Intel® Pentium III Prozessor) ausgewertet (Abbildung 9).

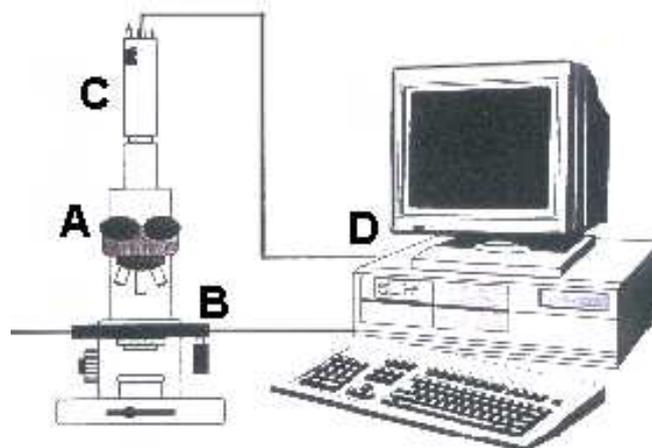


Abbildung 9. Schematische Darstellung eines CASA Systems. A: Mikroskop, B: heizbarer Objektisch, C: Videokamera, D: Computer und Monitor

Das Computerprogramm des CASA Systems unterscheidet Spermatozoen von Artefakten indem es zunächst die beweglichen Objekte als Spermatozoen annimmt und bezogen auf vorher definierte Parameter, eine mittlere Kopfgröße berechnet. Diese Kopfgröße vergleicht das Programm dann mit der Größe und der Form unbeweglicher Objekte. Dabei wird auch im Umfeld des Kopfes nach einem Flagellum gesucht. Das Computerprogramm ist durch die Detektion eines Schwanzes in der Lage, immotile Spermatozoen (mit Schwanz) von Artefakten (z. B. Spermatogenezellen oder Leukozyten) zu unterscheiden.

Für einen Messvorgang wurden 5µl der Spermatozoensuspension in eine auf 38,5°C vorgewärmte Maklerkammer[®] pipettiert und aus vier verschiedenen Arealen mindestens 200 Spermatozoen statistisch erfasst. Die ermittelten Motilitätsparameter wurden in einem Spermogramm zusammengefasst und ausgedruckt.

Motilitätsmessung boviner Spermatozoen nach Zugabe von anti-VDAC Antikörpern

Kryokonservierte bovine Spermatozoen wurden wie zuvor beschrieben im *Swim-up*-Verfahren aufbereitet. Die Spermatozoenkonzentration in der gewonnenen Suspension wurde auf eine Zellzahl von 20-30x 10⁶/ml eingestellt. Die Spermatozoensuspension wurde in folgende Untersuchungsgruppen aufgeteilt:

- a) Kontrolle I (Spermatozoensuspension ohne Behandlung)
- b) Kontrolle II mit TE-Puffer (Spermatozoensuspension mit Tris-Elutionspuffer)
- c) Kontrolle III (Spermatozoensuspension + Kaninchen IgG, mit gleichem Proteingehalt wie die affinitätsgereinigten Antikörper)
- d) Test (Spermatozoensuspension + affinitätsgereinigte anti-VDAC Antikörper).

Bei der Aufteilung der Untersuchungsgruppen wurde in der Form vorgegangen, dass jeweils eine Verdünnung der Spermatozoensuspension durch die zugefügte Substanz (z.B. dem anti-VDAC Antikörper) von 1:10 erfolgte. Die Auswertung der Motilität erfolgte nach einer Inkubationszeit bei RT von 0h, 0,5h, 2h und 4h (Abbildung 10).

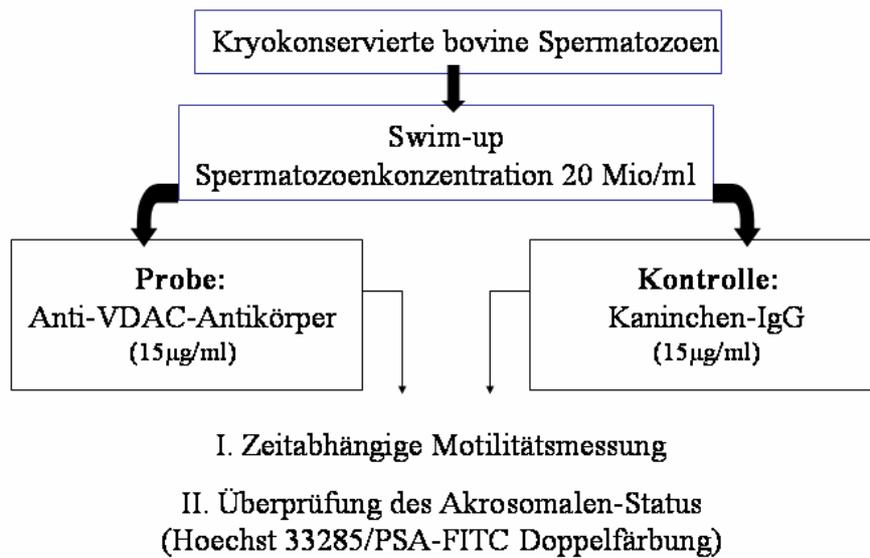


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Aufbaus der funktionellen Versuche.

2.2.6.2. Vitalitätsuntersuchung und Evaluierung des akrosomalen Status von bovinen Spermatozoen nach Zugabe von anti-VDAC Antikörper

Zur Untersuchung der Vitalität sowie des akrosomalen Status der bovinen Spermatozoen wurde eine PSA-FITC/Hoechst 33258 Doppelfärbung durchgeführt (Cross und Meizel 1989). Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff bis-Benzamide 33258 (Hoechst 33258). Der Farbstoff dringt in membrangeschädigte Spermatozoen ein, und bindet dort irreversibel an die im Spermatozoenkopf befindliche DNA. Somit können tote Spermatozoen im Fluoreszenzmikroskop durch eine leuchtend blaue Fluoreszenzfärbung im Kopfbereich von lebenden Spermatozoen, die nicht oder nur schwach markiert sind, unterschieden werden. Nach Zugabe der Antikörper und entsprechenden Kontrollen (siehe oben), wurden 50µl der Spermatozoensuspension mit einer Endkonzentration von 1µg/ml Hoechst 33258 über 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff wurden die Spermatozoen 2x 5min bei 700xg mit 2% PVP/PBS gewaschen und sedimentiert. Die anschließend in 20µl PBS resuspendierten Spermatozoen wurden auf zwei Objektträger ausgestrichen und bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Die getrockneten Spermatozoenausstriche wurden 30s lang mit 100%igem Methanol fixiert, dann 2x 5min in Aqua dest. gewaschen und bei Raumtemperatur erneut getrocknet.

Zur Untersuchung des akrosomalen Status wurden die Spermatozoen mit PSA-FITC (*Pisum sativum* Agglutinin-Fluoreszeinisothiocyanat) gefärbt. Bei fixierten und membranpermeabilisierten Spermatozoen mit intaktem Akrosom, bindet PSA im Bereich der Kopfkappe an Glykoproteine der inneren akrosomalen Membran und an die akrosomale Matrix. Durch den an PSA gebundenen Farbstoff FITC kommt es zu einer intensiven grün-gelben Färbung an der vorderen Hälfte des Spermatozoenkopfes. Die akrosomreagierten Spermatozoen zeigen dagegen nur im Bereich des äquatorialen Kopfbandes eine grün-gelbe Fluoreszenzfärbung oder erscheinen sonst vollständig dunkel (Cross und Meizel 1989).

Zur Detektion akrosomreagierter und akrosomintakter Spermatozoen wurden die Spermatozoenausstriche dann in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 25min lang mit der PSA-FITC-Lösung (30µg/ml) überschichtet und unter Lichtausschluss gehalten. Nach zwei Waschvorgängen in Aqua dest. von je 5min wurden die noch feuchten Spermatozoenausstriche mit dem Spezialmedium Citifluor[®] beschichtet, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verlangsamen. Danach wurden die Spermatozoen mit einem Deckglas abgedeckt und bis zur Auswertung im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zum Abschluss wurden die mit PSA-FITC und H258 gefärbten Spermatozoen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) untersucht (Anregung für Hoechst 33258: 365nm und PSA-FITC: 450-490nm). Es wurden jeweils 200 Spermatozoen aus verschiedenen Bereichen des Objektträgers ausgewertet und nach ihren Färbungsmustern in folgende Kategorien eingeteilt:

- a) akrosomintakt und lebend (AIL): PSA-FITC positiv, H258 negativ;
- b) akrosomreagiert und lebend (ARL): PSA-FITC negativ, H258 negativ;
- c) akrosomintakt und tot (AIT): PSA-FITC positiv, H258 positiv
- d) akrosomreagiert und tot (ART): PSA-FITC negativ, H258 positiv.

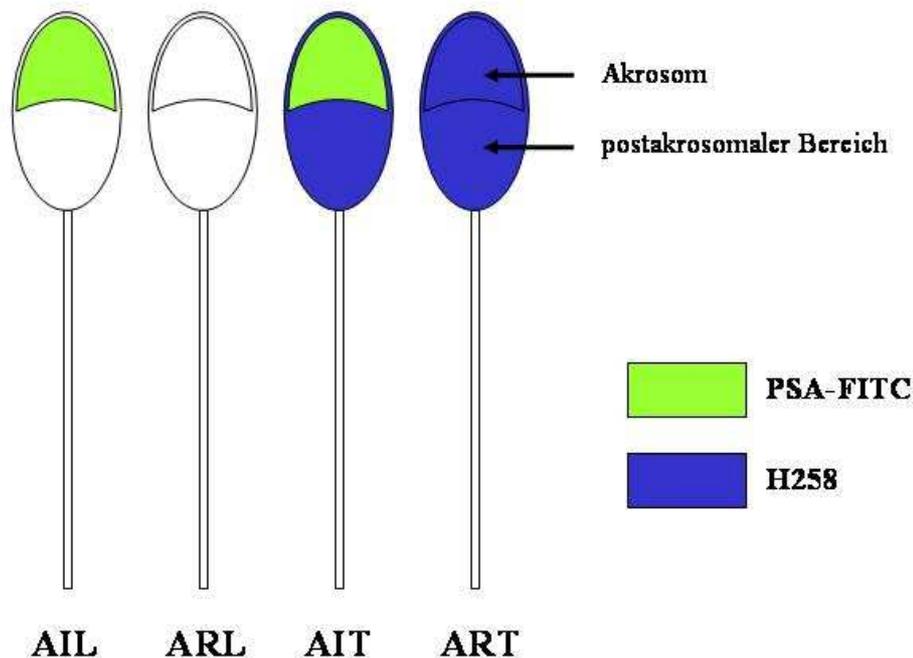


Abbildung 11. PSA-FITC/H258-Doppelfärbung zur Auswertung des akrosomalen Status und der Vitalität der Spermatozoen. AIL: akrosomintakt lebend, ARL: akrosomreagiert lebend, AIT: akrosomintakt tot und ART: akrosomreagiert tot.

Die Auswertung erfolgte „einfach-blind“ und wurde regelmäßig durch einen zweiten Experimentator validiert.

2.2.6.3. Immunzytochemische Untersuchungen boviner Spermatozoen im Anschluß an funktionelle Experimente mit anti-VDAC Antikörpern

Nach der vierstündigen Inkubation der Spermatozoensuspension mit den anti-VDAC Antikörpern wurde ein Teil der angefertigten Ausstriche auch für immunzytochemische Untersuchungen genutzt. Hierzu wurden die Ausstriche 5min in PBS, pH 7,4 gewaschen, kurz in 1% BSA/PBS gegeben und dann mit einem 2. Antikörper (biotinylierte anti-Kaninchen Antikörper, 1:2000 in 1% BSA/PBS) für 1h inkubiert. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die Spermatozoen nach einem Waschschrift (einmal kurz und 2x 5min in PBS, pH 7,4) mit 100µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem Avidin (Stocklösung 1mg/ml; Verdünnung 1:400 in 1% BSA/PBS) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Es folgte ein abschließender Waschschrift. Die Objektträger wurden mit

einem Tropfen Citifluor[®] beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.7. Elektronenmikroskopie

Für bestimmte Fragestellungen, die lichtmikroskopisch nicht ausreichend geklärt werden konnten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgenommen.

2.2.7.1. Transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung der Spermatozoenmorphologie nach Behandlung mit 2% Triton X-100

Bovine Spermatozoen wurden wie oben beschrieben (vergl. 2.2.5.1) mit 2% Triton X-100 in Anlehnung an das Protokoll von Oke (1988) behandelt. Anstelle der Resuspendierung in PBS erfolgte eine Aufnahme des Sediments in Formaldehyd-Glutaraldehyd-Fixans nach Ito und Karnovsky (1968). Die Suspension wurde für 1min bei 20000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wieder in Fixans gelöst. Die Proben wurden 2min bei 12000xg abzentrifugiert, die Sedimente wurden 3x für 5min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumhexacyanoferrat II für 45min osmiert. Vor dem Einbetten in Kunstharz wurden die Proben mit Cacodylatpuffer (2min bei 12000xg) gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96% Ethanol je 5min, 100% Isopropanol 4x 10min) entwässert.

Die entwässerten Proben wurden in EPON eingebettet. Hierzu wurden sie für 10min in Propylendioxid inkubiert und anschließend in eine EPON/Propylendioxidmischung (1:1) überführt. Nach 45min Einwirkzeit wurde eine 16stündige Inkubation in EPON durchgeführt. Die Proben wurden dann 30min bei 12000xg zentrifugiert, das Harz abgegossen und die Sedimente in mit EPON gefüllte Gelatine kapseln eingebettet. Das Harz polymerisiert bei 60°C innerhalb von 24h. Die fertigen Blöckchen wurden in einem Pyramitom angetrimmt. Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser an einem Ultramikrotom hergestellt und die Schnitte auf Kupfer-Netzchen überführt. Zur Kontrastierung wurden diese 5min bei Raumtemperatur in einem Tropfen Uranylacetat inkubiert, mit Aqua dest. gespült und 5min mit einem Tropfen Bleicitrat kontrastiert.

Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden in einem Zeiss Elektronenmikroskop untersucht und fotodokumentiert.

2.2.7.2. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Spermatozoenmorphologie im Anschluss an funktionelle Experimente mit anti-VDAC Antikörpern

Zur besseren Darstellung von morphologischen Veränderungen der bovinen Spermatozoen nach Inkubation mit anti-VDAC Antikörpern wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ausgewählt. Die im *Swim-up* Verfahren gewonnen Spermatozoen (ca. 20×10^6 /ml) wurden für 4h mit den anti-VDAC Antikörpern P1/6, P2/45, P3/31 und P_{common} inkubiert. Die finale Proteinkonzentration der Antikörper betrug hierbei 15µg/ml. Es wurde mit einem Volumen von 100µl gearbeitet. Nach der 4stündigen Inkubation wurden die Proben 1x für 5min mit PBS, pH 7,4 bei 700xg gewaschen. Das Sediment wurde in 30µl PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Deckgläschen, welche auf Aluminiumhaltern befestigt waren, pipettiert. Nach 20min Sedimentation bei Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt. Die Proben dann für die REM vorbereitet, in dem zunächst eine initiale Fixierung mit 1% Glutardialdehyd/PBS für 10min erfolgte. Nach zwei jeweils 5minütige Waschschritten mit PBS, pH 7,4, erfolgte die 30 min Fixation in 0,5% OsO₄/0,1 M Phosphatpuffer. Nach zwei Waschschritten mit PBS, pH 7,4 und drei weiteren Waschschritten mit Aqua dest. wurden die Proben mit 2,2-Dimethoxypropan dehydriert und in eine Anlage zur kritischen Punkt-Trocknung gegeben. Im Anschluss hieran wurden die Proben in einem Sputter-Gerät mit Goldstaub besprüht und danach mit Hilfe eines Raster-Elektronenmikroskops (Philipps) begutachtet. Zur quantitativen Analyse der morphologischen Veränderungen wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet.

2.3. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Motilität, der Akrosomreaktion und der beobachteten Veränderungen in der Rasterelektronenmikroskopie wurden in MS-Excel-Tabellen erfasst. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms InStat 3TM von Graph Pad[®] (San Diego, USA). Die Daten in Prozent wurden mit Hilfe der Formel: $y = \arcsin(\sqrt{x/100})$ transformiert und als Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels one-way oder two-way ANOVA. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Tukey post-Test errechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der anti-VDAC Antikörper

3.1.1. Proteinbestimmung der affinitätsgereinigten Antikörper

Von den einzelnen Fraktionen der Affinitätschromatographischen Reinigung der anti-VDAC Antiseren wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt (nicht gezeigt). Fraktionen, mit ähnlichem Proteingehalt und ähnlicher Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion im ELISA wurden vereinigt. Von diesen wurde anschließend erneut eine Proteinbestimmung durchgeführt (Tabelle 2). Die Kenntnis über den Proteingehalt der Antikörpersuspensionen war vor allem für die funktionellen Studien von Bedeutung. Denn hier wurde zum einen von jedem Antikörper die gleiche Proteinmenge eingesetzt und zum anderen musste die Negativkontrolle, also das Kaninchen-IgG, an diesen Proteingehalt angepasst werden.

Tabelle 2. Proteingehalt der verwendeten affinitätsgereinigten Antikörpersuspensionen

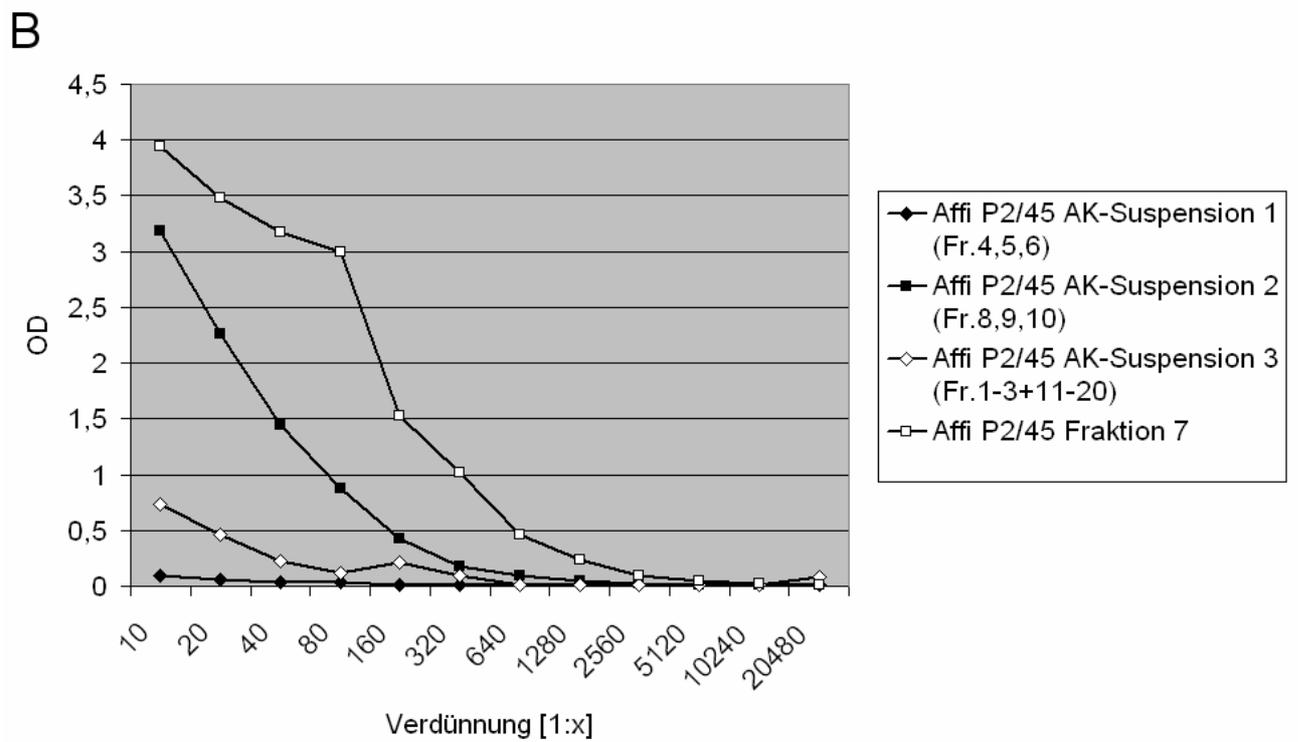
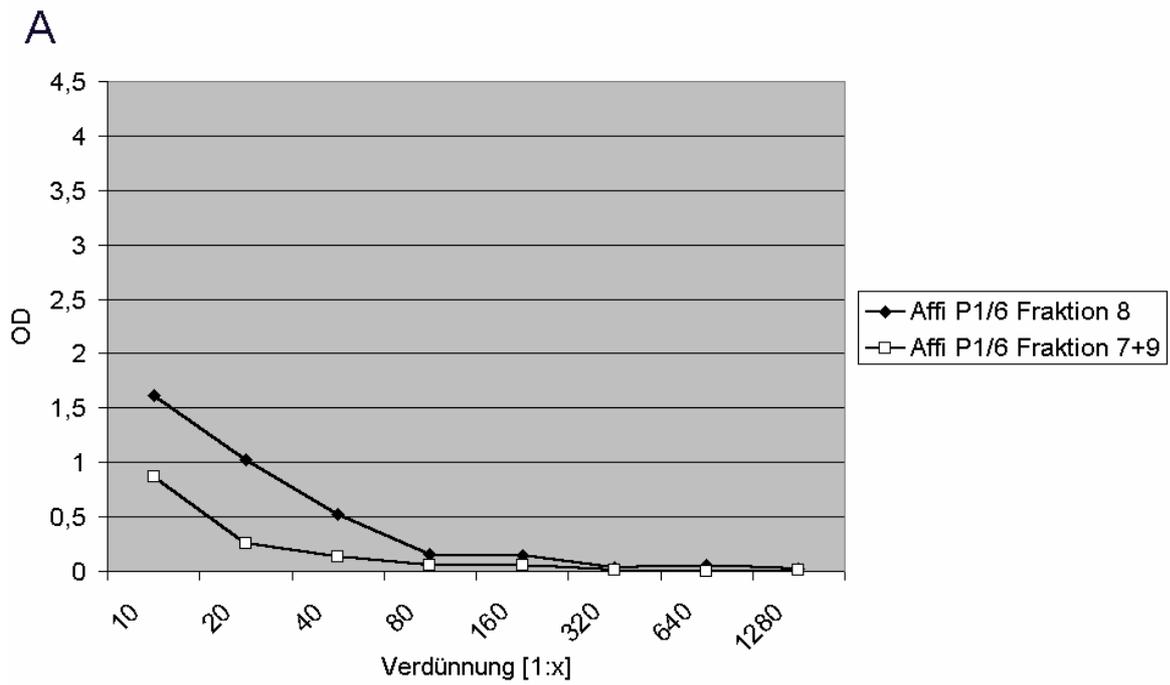
Affinitätsgereinigter Antikörper	Proteingehalt
P1/6	20 µg/ml
P2/45	150 µg/ml
P3/31	50 µg/ml
P _{common}	514 µg/ml

3.1.2. Überprüfung der Antigen-Antikörper-Reaktion mittels ELISA

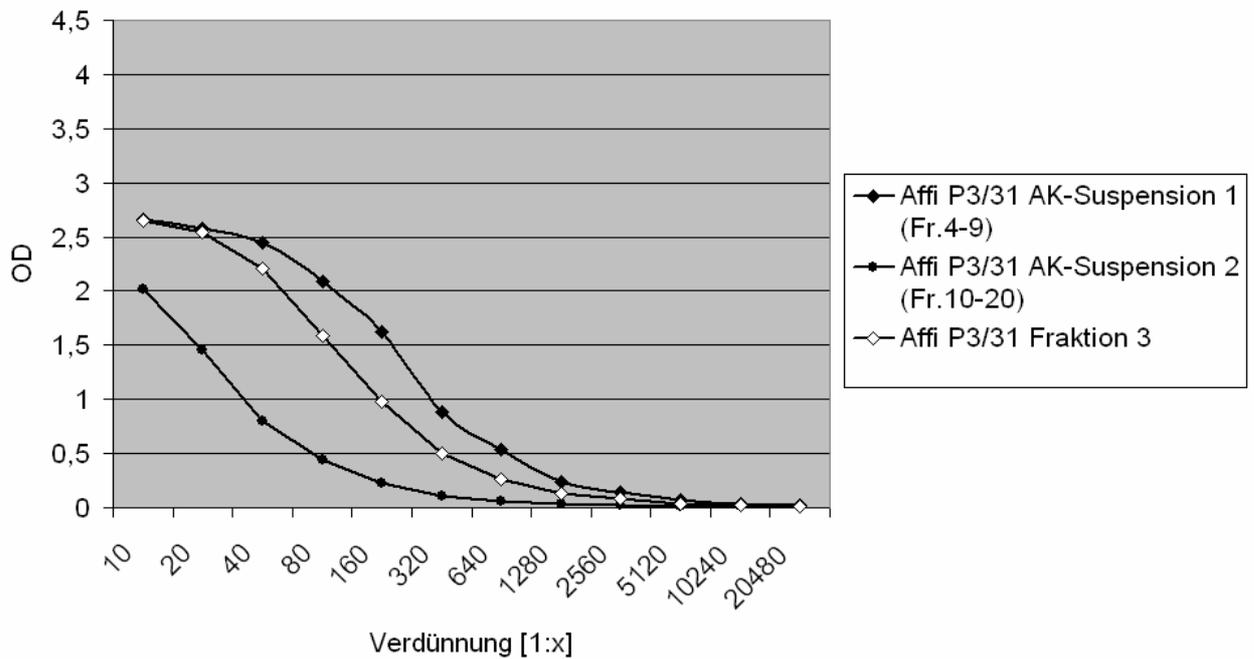
Zunächst wurden die Antiseren P1/6, P2/45, P3/31 und P_{common} orientierend im ELISA getestet. Hierzu wurden die Werte des jeweiligen Antiserums (AS) mit denen des Präimmunserums (PI) als Negativkontrolle verglichen, um feststellen zu können, ob die Antiseren spezifische Antikörper für das jeweilige Peptid enthalten (nicht gezeigt). Es wurde festgestellt, dass alle vier AS deutlich höhere Extinktionswerte als die entsprechenden PIs aufwiesen. Der Wert der Negativkontrollen war unwesentlich höher als der Leerwert. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die AS spezifische anti-VDAC Antikörper enthalten.

Die AS wurden wie oben beschrieben affinitätschromatographisch aufgereinigt, um eventuell störende Bestandteile zu entfernen. Das Eluat der Reinigungen wurde in Fraktionen von je 500µl aufgefangen. Diese einzelnen Fraktionen jeder Reinigung wurden zunächst im ELISA untersucht und das Elutionsprofil ermittelt (nicht gezeigt).

Fraktionen, die sich sowohl von ihrem Antikörpergehalt im ELISA als auch in ihrem Proteingehalt ähnelten, wurden vereinigt. Von den vereinigten Antikörpersuspensionen wurden Verdünnungsreihen angefertigt und im ELISA getestet. Die Extinktionswerte dieser Titrationsreihen, gemessen bei einer Wellenlänge von 492 nm in Abhängigkeit vom Verdünnungsfaktor, sind in Abbildung 12 A-D dargestellt. Deutlich wurde sowohl die unterschiedliche Immunreaktivität der einzelnen gereinigten Antikörper gegen ihr Antigen (Peptid) als auch die unterschiedliche Affinität der einzelnen Antikörpersuspensionen bzw. Fraktionen. So liegt das Maximum der Immunreaktivität der Antikörper P2/45 bzw. P_{common} (Abbildung 12 B und D) deutlich höher als das der Antikörper P1/6 oder P3/31 (Abbildung 12 A und C). Innerhalb eines AS, beispielsweise bei P2/45 kann man deutlich den Unterschied in der Immunreaktivität zwischen den verschiedenen Antikörpersuspensionen, z.B. Fraktion 7 im Vergleich zur Antikörpersuspension 1, erkennen (Abbildung 12 B). Diese Unterschiede wurden bei der Festlegung der Antikörperverdünnungen für die immunbiochemischen Versuche beachtet und mit der Antikörperfraktion gearbeitet, die im ELISA die stärkste Antigen-Antikörper-Reaktion aufwies.



C



D

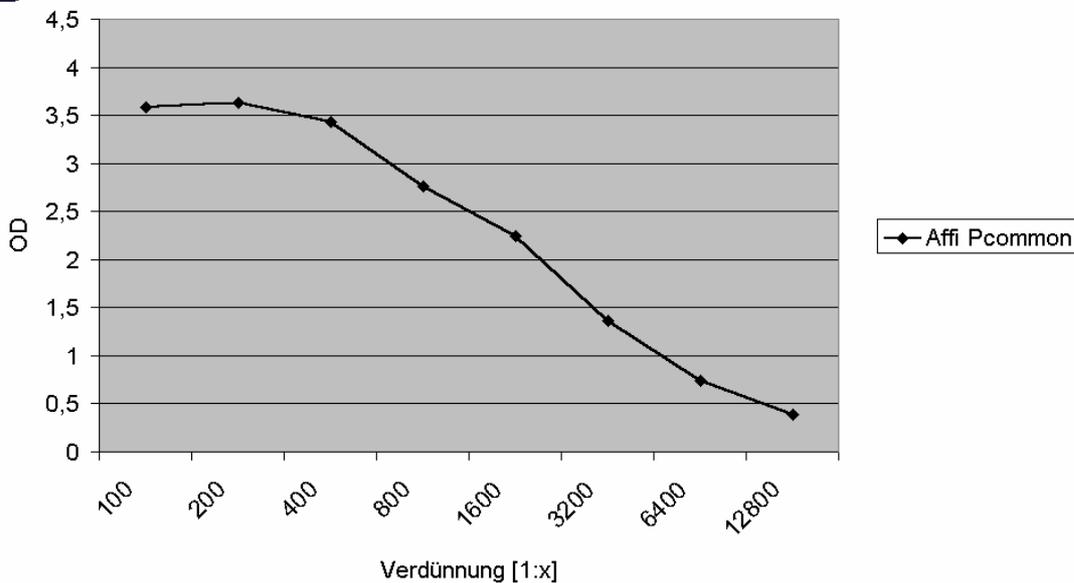


Abbildung 12. Abhängigkeit der Extinktionswerte (OD) bei 492 nm (Ordinate) von den Verdünnungsstufen (Abszisse) der affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörper **A:** Affi P1/6; **B:** Affi P2/45; **C:** Affi P3/31; **D:** Affi P_{common}. Als Antigen wurden je 0,5 µg Peptid pro Vertiefung in Immuno-Module mit hochaffiner Bindungskapazität eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:3000 und OPD als Substrat nachgewiesen.

3.1.3. Bestimmung der Spezifität der Antikörper

Zunächst sollte festgestellt werden, ob die affinitätsgereinigten Antikörper (Affi) Subtypen spezifisch mit einer bestimmten VDAC Isoform reagierten. Hierzu wurden Immunblots mit rekombinanten Proteinen für VDAC1, 2 und 3 durchgeführt (Abbildung 13).

Die erste Spur von jeder der vier Membranen in Abbildung 13A-D enthält jeweils 1µg rekombinantes VDAC1, die 2. Spur 1µg VDAC2 und die 3. Spur 1µg VDAC3. Mit diesen Membranen wurden die verschiedenen anti-VDAC Antikörper inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen.

In der Abbildung 13A ist ersichtlich, dass der Antikörper Affi P1/6 nur in Spur 1 eine Bande im Bereich von ca. 34 kDa markierte. Dies entsprach der Molekularmasse von VDAC1. Rekombinantes VDAC2 und VDAC3 wurden nicht erkannt (Abbildung 13A, Spur 2, 3).

Der Antikörper Affi P2/45 erkannte eine Proteinbande mit einer Molekularmasse von ca. 33 kDa im rekombinanten VDAC Typ 2 (Abbildung 13B, Spur 2). VDAC1 und 3 wurden von diesem Antikörper jedoch nicht detektiert (Abbildung 13B, Spur 1, 3).

Wie in Abbildung 13C dargestellt, konnte eine spezifische Reaktion zwischen dem Antikörper Affi P3/31 und einer Bande im Molekularmassenbereich von etwa 32 kDa mit rekombinantem VDAC3 nachgewiesen werden (Abbildung 13C, Spur 3). Keine spezifische Markierung wurde mit dem rekombinanten VDAC1 und 2 beobachtet (Abbildung 13C, Spur 1, 2).

Bei allen drei rekombinanten VDAC Proteinen kam es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Antikörper Affi P_{common} (Abbildung 13D, Spur 1-3). In Spur 1 wies diese Bande eine Molekularmasse von 34 kDa (VDAC1), in Spur 2 von etwa 33 kDa (VDAC2) und in Spur 3 von ca. 32 kDa (VDAC3) auf.

Die für eine Isoform spezifischen anti-VDAC Antikörper wiesen auch nach langer Exposition der Filme keine Kreuzreaktionen mit den jeweils anderen VDAC Isoformen auf.

Somit stand für die weiteren Untersuchungen je ein spezifischer Antikörper für jede der drei VDAC Isoformen zur Verfügung. Darüberhinaus konnten mit dem Antikörper P_{common} alle drei VDAC Isoformen gleichzeitig detektiert werden.

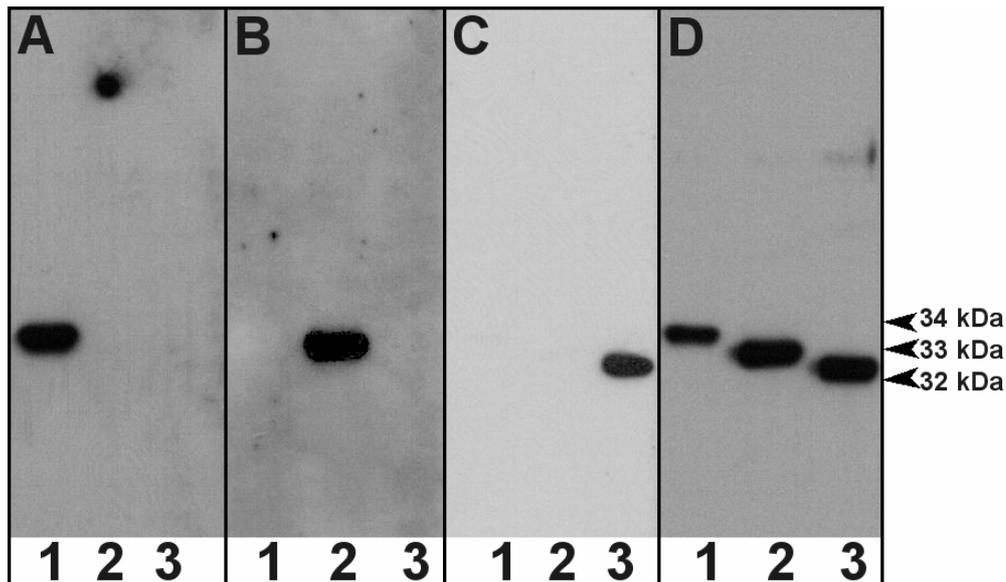


Abbildung 13. Immunbiochemischer Nachweis der VDAC Subtypenspezifität der anti-VDAC Antikörper mit Hilfe von rekombinantem VDAC Protein.

Spur 1: 1 μ g VDAC1; **Spur 2:** 1 μ g VDAC2; **Spur 3:** 1 μ g VDAC3. **A:** Affi P1/6 (0,7 μ g/ml); **B:** Affi P2/45 (1,3 μ g/ml); **C:** Affi P3/31 (3,6 μ g/ml); **D:** Affi P_{common} (2,6 μ g/ml). Zum Nachweis wurde Peroxidase-gekoppeltes Protein A (1:3000) eingesetzt und die spezifisch gebundenen Antikörper mit dem ECL System detektiert.

3.2. Lokalisation der VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen

3.2.1. Nachweis von VDAC Subtypen mittels Immunbiochemie

Nachdem die Spezifität der affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörper für die VDAC Isoformen überprüft worden war, konnten diese Antikörper dazu verwendet werden, mittels Immunblot die VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen-Extrakten zu identifizieren (Abbildung 14). Die mit TX bezeichnete Spur enthält eine 2% Triton X-100 Proteinextraktion (TX, 30 μ g/Spur) in der hauptsächlich membranäre und mitochondriale Proteine enthalten sind. Die mit SDS markierte Spur (SDS, 20 μ g/Spur) beinhaltet schwerer lösliche Proteine, die hauptsächlich aus den ODF stammen.

Mit Hilfe des Antikörpers Affi P1/6 (spezifisch für VDAC1) konnte weder im Triton X-100 Extrakt noch in der ODF-Protein Fraktion eine Immunreaktion detektiert werden (Abbildung 14A).

Wie in der Abbildung 14B dargestellt, kam es nach der Inkubation des Triton-Extraktes mit dem Antikörper Affi P2/45 zu einer sehr starken Markierung einer Proteinbande im Molekularmassenbereich von etwa 33kDa. Zusätzlich wurden zwei Proteine mit einer

Molekularmasse von etwa 36 und 60 kDa detektiert. Im SDS Extrakt kam es zu einer deutlichen Reaktion mit zwei Proteinen von ca. 33 und 60 kDa (Abbildung 14B).

Nach Einsatz von affinitätsgereinigten anti-VDAC3 Antikörpern (Affi P3/31) wurde eine ca. 32 kDa schwere Protein-Bande im Triton X-100 Extrakt und in der SDS Protein Fraktion detektiert. Die Reaktion im Triton X-100 Extrakt war hierbei sehr stark, im SDS Extrakt hingegen vergleichsweise schwach ausgeprägt (Abbildung 14C).

Die affinitätsgereinigten Antikörper P_{common} markierten im Triton X-100 Extrakt hauptsächlich Polypeptide mit einer Molekularmasse von 32 und 33 kDa, und ein 36 kDa Polypeptid (Abbildung 14D). Einige, wahrscheinlich unspezifische Proteinbanden mit Molekularmassen über 36 kDa wurden ebenfalls dargestellt. Im SDS Extrakt reagierten die P_{common} Antikörper mit Proteinbanden von 32 kDa und 33 kDa und mit einem Polypeptid, welches ein Molekulargewicht von weit über 60 kDa besitzt und zur Zeit noch unbekannt ist.

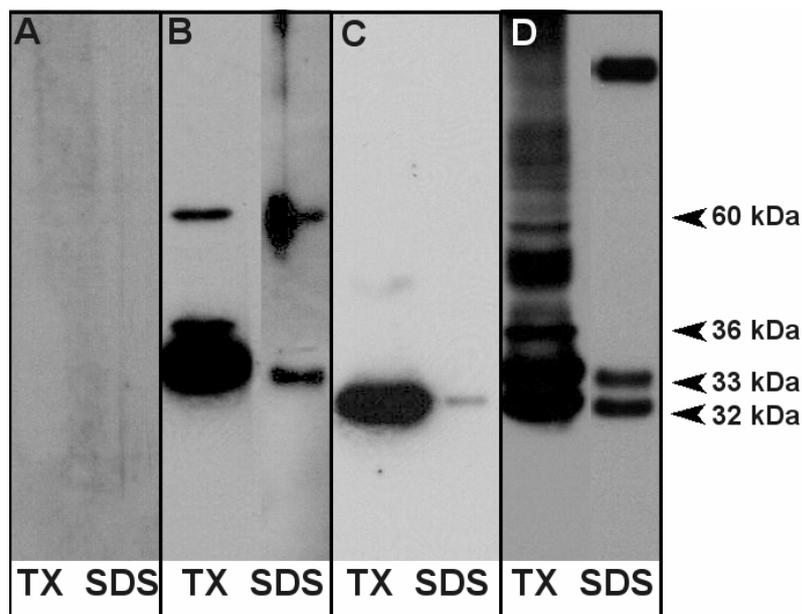


Abbildung 14. Immunbiochemischer Nachweis von VDAC Proteinen in bovinen Spermatozoenextrakten. 2% Triton X-100 Extrakt (TX, 30 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) und SDS-Extrakt (SDS, 20 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Diese wurden mit den affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern **A:** Affi P1/6 (0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), **B:** Affi P2/45 (1,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), **C:** Affi P3/31 (3,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. **D:** Affi P_{common} (2,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Als Zweitantikörper diente Peroxidase-gekoppeltes Protein A (1:3000). Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen.

3.2.2. Nachweis von VDAC Subtypen mittels Immunzytochemie

Neben der oben beschriebenen Nachweismethode zur Lokalisation der VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen wurde auch die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Diese Methode sollte näheren Aufschluss darüber geben, ob die unterschiedlichen VDAC Isoformen in verschiedenen Spermatozoenkompartimenten zu finden sind. Hierzu wurden bovine kryokonservierte Spermatozoen unterschiedlich behandelt, um möglichst viele verschiedene Epitope aufdecken zu können. Der Nachweis einer spezifischen Antikörperbindung erfolgte mit Hilfe von biotinyliertem anti-Kaninchen IgG und Avidin-FITC. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Immunzytochemie zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3. Lokalisation der verschiedenen VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen mit Hilfe der Immunzytochemie

Verwendeter anti-VDAC Antikörper	Vorbehandlung der Spermatozoen	Akrosom	Flagellum	Bemerkungen
AS P1/6 (VDAC1)	unfixiert	+	-	
	3x eingefroren	++	-	
	Methacarn-Fixierung	-	-	
	2% Triton X-100	-	++	Hauptstück markiert (Abbildung 15)
Affi P1/6 (VDAC1)	unfixiert	-	-	keine spezifischen Reaktionen im Vergleich zur Kontrolle
	3x eingefroren	-	-	
	Methacarn-Fixierung	-	-	
	2% Triton X-100	-	-	
AS P2/45 (VDAC2)	unfixiert	-	-	bestätigt Ergebnis mit Affi P2/45
	3x eingefroren	++	-	
	Methacarn-Fixierung	-	++	
	2% Triton X-100	-	-	
Affi P2/45 (VDAC2)	unfixiert	+	-	Abbildung 16
	3x eingefroren	+	-	
	Methacarn-Fixierung	-	+++	
	2% Triton X-100	-	-	
AS P3/31 (VDAC3)	unfixiert	+	+	deutliche Markierung der ODF (Abbildung 18)
	3x eingefroren	-	-	
	Methacarn-Fixierung	-	-	
	2% Triton X-100	-	+++	
Affi P3/31 (VDAC3)	unfixiert	-	-	keine Reaktion zu beobachten
	3x eingefroren	-	-	
	Methacarn-Fixierung	-	-	
	2% Triton X-100	-	-	
AS P _{common} (VDAC 1, 2, 3)	unfixiert	-	-	v.a. Mittelstück markiert leichte Markierung der ODF
	3x eingefroren	++	+	
	Methacarn-Fixierung	-	++	
	2% Triton X-100	-	+	
Affi P _{common} (VDAC 1, 2, 3)	unfixiert	-	-	v.a. Mittelstück markiert leichte Markierung der ODF
	3x eingefroren	+	++	
	Methacarn-Fixierung	-	+++	
	2% Triton X-100	-	+	

Verwendet wurden sowohl anti-VDAC Antiseren als auch die affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörper. Um unterschiedliche Epitope für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Spermatozoen unterschiedlich vorbehandelt (unfixiert, 3x eingefroren, Methacarn-Fixierung, Behandlung mit 2% Triton X-100). Der Nachweis einer spezifischen Antikörperbindung erfolgte über biotinyliertes anti-Kaninchen IgG und Avidin-FITC. Als Negativkontrolle wurde das jeweilige Präimmenserum bzw. Kaninchen-IgG verwendet.

+++ = sehr starke Reaktion, ++ = starke Reaktion, + = Reaktion, - = keine Reaktion.

Auf einzelne Ergebnisse, die die Lokalisation besonders deutlich zeigten, wird im Folgenden näher eingegangen.

In Abbildung 15A ist der immunfluoreszenzoptische Nachweis von VDAC1 mit Hilfe des AS P1/6 dargestellt. Teil B dieser Abbildung enthält die entsprechende Negativ-Kontrolle mit dem PI 1/6. Die Spermatozoen wurden in diesem Fall vor Zugabe des Antikörpers mit 2% Triton X-100 behandelt.

Nach Einsatz des AS P1/6 konnte eine deutliche Fluoreszenz und damit eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion im akrosomalen Bereich des Kopfes (Abbildung 15A) und im Bereich des Hauptstückes detektiert werden (Abbildung 15A Pfeile). Das als Negativkontrolle eingesetzte entsprechende PI wies eine leichte unspezifische Markierung des äquatorialen Segments, des postakrosomalen Bereichs und des Mittelstücks auf (Abbildung 15B).

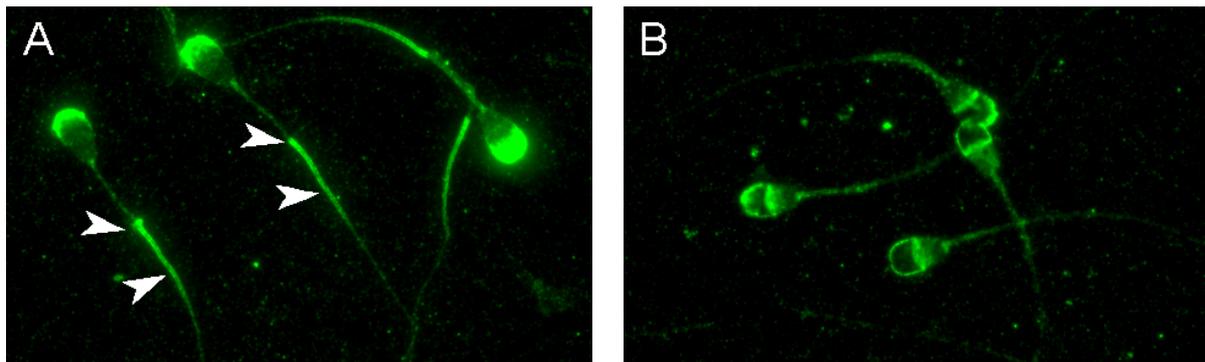


Abbildung 15. Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC1 Protein in bovinen Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden mit 2% Triton X-100 vorbehandelt. **A:** AS P1/6 (1:50); **B:** PI 1/6 (1:50). Gebundene Antikörper wurden mit biotinylierten anti-Kaninchen IgG (1:2000) und mit FITC-markiertem Avidin (1:400) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Die Pfeile in **A** kennzeichnen eine spezifische Markierung des Hauptstückes des Flagellums durch das AS P1/6. Originalvergrößerung X 630.

Mit Methacarn fixierte bovine Spermatozoen wurden mit affinitätsgereinigten P2/45 Antikörpern inkubiert. Die typische Immunfluoreszenzmarkierung ist in Abbildung 16A dargestellt. Es konnte eine deutliche Antikörperreaktion im gesamten Spermatozoenschwanz ohne Betonung des Mittelstückes, in welchem sich die Mitochondrien befinden, oder des Hauptstückes nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine schwache Fluoreszenz des akrosomalen und postakrosomalen Bereichs im Spermatozoenkopf beobachtet werden, wobei das äquatoriale Segment unmarkiert blieb (Abbildung 16A).

Als Negativkontrolle wurde nicht relevantes Kaninchen-IgG mit identischer Proteinkonzentration (15 µg/ml) wie der affinitätsgereinigte P2/45 AK eingesetzt. Hier war nur eine dezente unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar (Abbildung 16B).

Mit den Antiseren AS P3/31 und AS P1/6 konnte nach Anwendung der Methacarn-Fixierung keine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden.

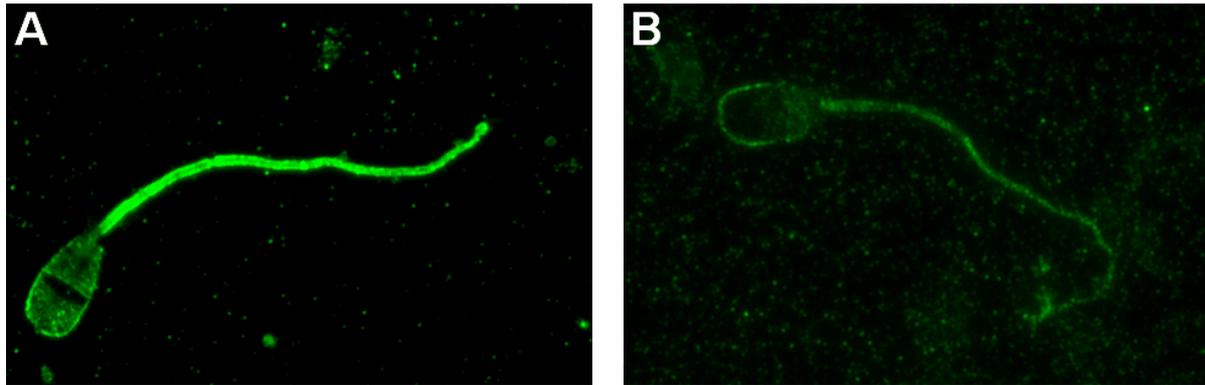


Abbildung 16. Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC2 Protein in bovinen Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden mit Methacarn fixiert. **A:** Affi P2/45 (15 µg/ml); **B:** Kaninchen IgG (15 µg/ml). Gebundene Antikörper wurden mit biotinylierten anti-Kaninchen IgG (1:2000) und mit FITC-markiertem Avidin (1:400) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Originalvergrößerung X 630.

Für die Detektion von VDAC3 mit Hilfe von AS P3/31 wurden mit 2% Triton X-100 vorbehandelte bovine Spermatozoen verwendet. Durch diese Vorbehandlung sollten die Mitochondrien abgelöst und damit die ODF im Bereich des Mittelstücks freigelegt werden. Um zu überprüfen, ob die Mitochondrien durch 2% Triton X-100 entfernt wurden, wurde ein Teil der Probe transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 17).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass im Gegensatz zu unbehandelten bovinen Spermatozoen (Abbildung 17A+C) bei zuvor mit 2% Triton X-100 behandelten Spermatozoen (Abbildung 17B+D) im Bereich des Mittelstücks nur noch das Axonem und die ODF vorhanden waren (Abbildung 17D). Die Mitochondrien und die Plasmamembran waren dagegen in diesem Bereich abgelöst und somit die ODF für die zugegebene Antikörper leichter zugänglich.

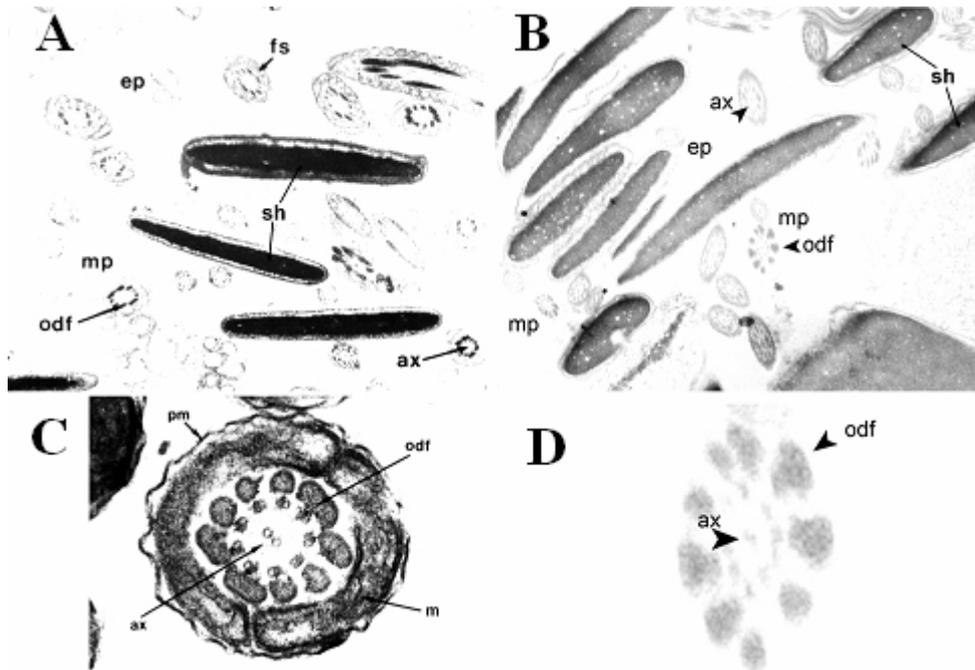


Abbildung 17. Transmissionselektronenmikroskopische Überprüfung der Morphologie von unbehandelten bzw. mit 2% Triton X-100 vorbehandelten Spermatozoen. **A+C:** unbehandelte bovine Spermatozoen mit Axonem, ODF, Mitochondrien und Plasmamembran im Bereich des Mittelstücks; **B+D:** Zuvor mit 2% Triton X-100 behandelte Spermatozoen mit Axonem und ODF. ax: Axonem; ep: Endstück; fs: fibröse Hülle; m: Mitochondrien; mp: Mittelstück; odf: outer dense fibres; pm: Plasmamembran; sh: Spermatozoenkopf
Originalvergrößerung A, B: X 11500; C, D: X 12000.

Wie in Abbildung 18A und B dargestellt, banden die anti-VDAC3 Antikörper (AS P3/31) an filamentäre Strukturen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die ODF handelt.

Annähernd alle der mit 2% Triton X-100 behandelten Spermatozoen wiesen eine Veränderung des Mittelstücks mit deutlich fluoreszenzmarkierten filamentären Strukturen auf (Abbildung 18A). Bei höherer Vergrößerung konnten neun Filamente unterschieden werden (Abbildung 18B). Im Bereich des Hauptstücks wurde keine Fluoreszenz beobachtet.

Als Kontrolle in diesen Versuchen diente das entsprechende PI (Abbildung 18C und D). Hier wurde nur eine geringe Hintergrundfärbung des Spermatozoenschwanzes beobachtet. Im Kopfbereich war kein Unterschied im Vergleich von mit AS P3/31 behandelten Zellen zu den Kontrollspermatozoen zu beobachten.

Weder mit den Antikörper gegen VDAC1 noch VDAC2 konnte bei mit 2% Triton X-100 vorbehandelten Spermatozoen eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden.

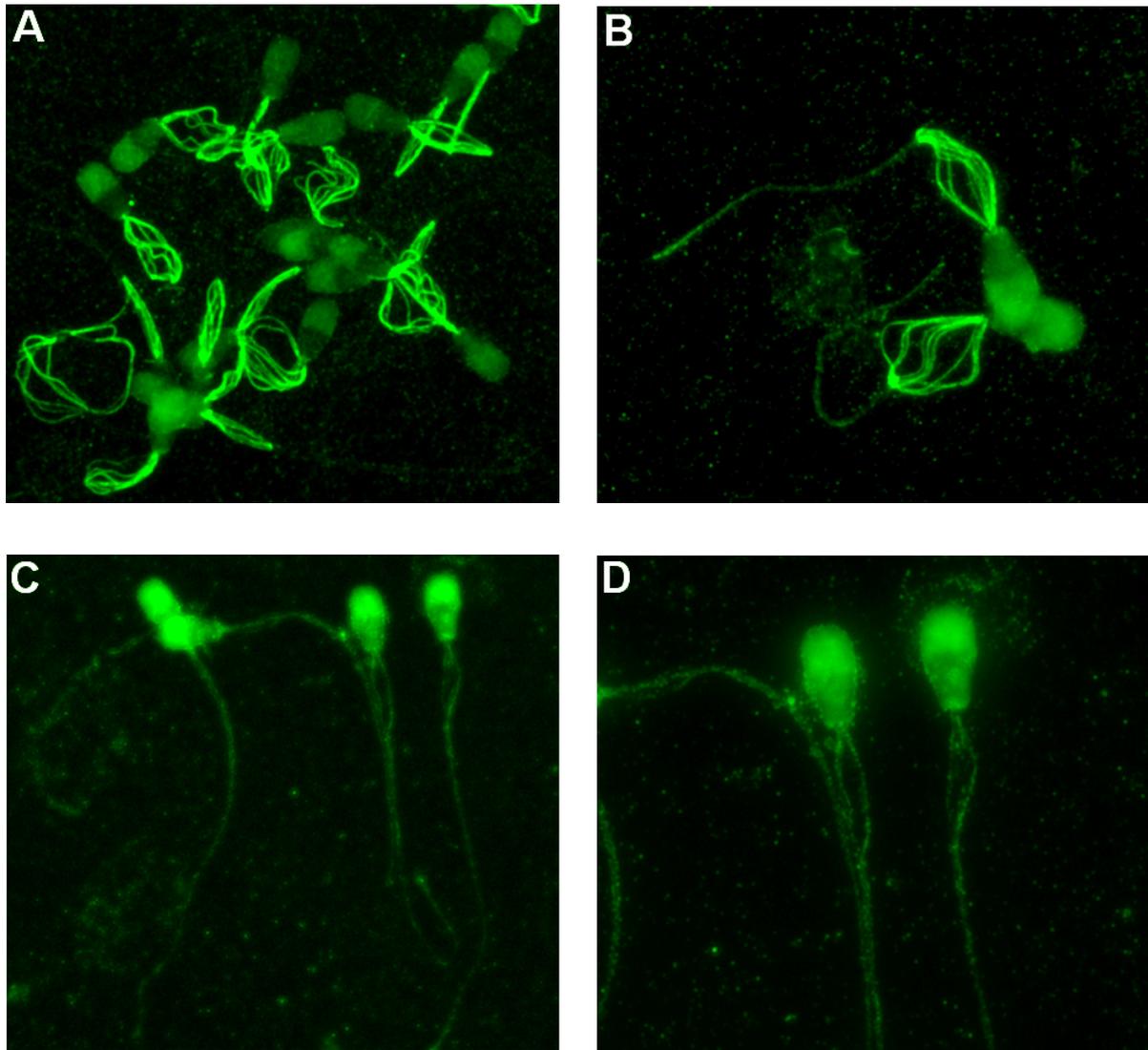


Abbildung 18. Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von VDAC3 Protein in bovinen Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden zuvor mit 2% Triton X-100 behandelt. **A+B:** AS P3/31 (1:50); **C+D:** Kontrolle mit PI 3/31 (1:50). Gebundene Antikörper wurden mit biotinylierten anti-Kaninchen IgG (1:2000) und FITC-markiertem Avidin (1:400) immunfluoreszenzoptisch dargestellt. Originalvergrößerung A, C: X 400; B, D: X 630.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass mit Hilfe der Immunzytochemie alle drei VDAC Subtypen in bovinen Spermatozoen nachgewiesen werden konnten, wobei verschiedene Vorbehandlungsmethoden zur Optimierung der Darstellung zum Einsatz kamen. Es wurde eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung der einzelnen VDAC Subtypen im Spermatozoon beobachtet. VDAC1 konnte mit Hilfe des AS P1/6 vor allem im Hauptstück des Flagellums detektiert werden. Mit dem affinitätsgereinigten Antikörper Affi P2/45 lies sich VDAC2 dagegen im Bereich des gesamten Flagellums nachweisen. Nach Einnsatz von AS P3/31 konnte VDAC3 in den ODF lokalisiert werden.

3.3. Untersuchungen zur Funktion von VDAC in bovinen Spermatozoen

Kryokonservierte bovine Spermatozoen wurden mit dem Swim-up-Verfahren behandelt, um einen höheren Anteil an vitalen und motilen Spermatozoen zu erhalten. Die Spermatozoenkonzentration wurde auf $20 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und die Suspension dann in Probe bzw. Kontrolle aufgeteilt. Zur Probe wurden die jeweiligen affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC Antikörper so zugegeben, dass durch die Verdünnung mit der Spermatozoensuspension eine finale Proteinkonzentration der Antikörper von $15 \mu\text{g/ml}$ entstand. In gleicher Konzentration wurde nicht relevantes Kaninchen-IgG zur Kontroll-Suspension gegeben. Es erfolgte eine zeitabhängige Überprüfung der Spermatozoen-Gesamtmotilität mit Hilfe des CASA-Systems sowie eine Überprüfung des akrosomalen Status mit Hilfe der Hoechst 33285/PSA-FITC Doppelfärbung ebenfalls über die Zeit.

3.3.1. Effekt von anti-VDAC Antikörper auf das Akrosom

Die Überprüfung des akrosomalen Status zeigte, dass die mit anti-VDAC Antikörpern inkubierten Spermatozoen im zeitlichen Verlauf einen zunehmenden Verlust an Akrosomen aufwiesen. Nach 2h und 4h war dieser Akrosomenverlust höher als bei den Kontroll spermatozoen (Abbildung 19). Außer bei der Probe, die mit anti-VDAC3 Antikörpern (Affi P3/31) behandelt wurde, war dieser Effekt auch nach 2h schon statistisch signifikant. Vor allem mit anti-VDAC2 Antikörper (Affi P2/45) behandelte Spermatozoen zeigten mit $15,47\% \pm 1,13\%$ lebend akrosomloser Spermatozoen im Vergleich zur Kontrolle mit $4,21\% \pm 0,45\%$ schon nach 2h einen ausgeprägten Verlust des Akrosoms. Die Anzahl der lebenden Spermatozoen ohne Akrosom stieg nach 4h auf $16,79\% \pm 1,57\%$, was aber eine unwesentliche Steigerung im Vergleich zum 2h-Wert bedeutete. Dennoch fiel bei der Probe mit Affi P2/45 die Reaktion stärker aus als bei den Spermatozoen nach Zugabe von anti-VDAC1 und anti-VDAC3 Antikörpern. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

Die Proben, die mit den anti-VDAC1 (Affi P1/6) und anti-VDAC3 (Affi P3/31) Antikörpern behandelt wurden, zeigten eine vermehrte Reaktion nach 4 h. Zum Zeitpunkt 4 h besteht somit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und allen drei Proben (Abbildung 19).

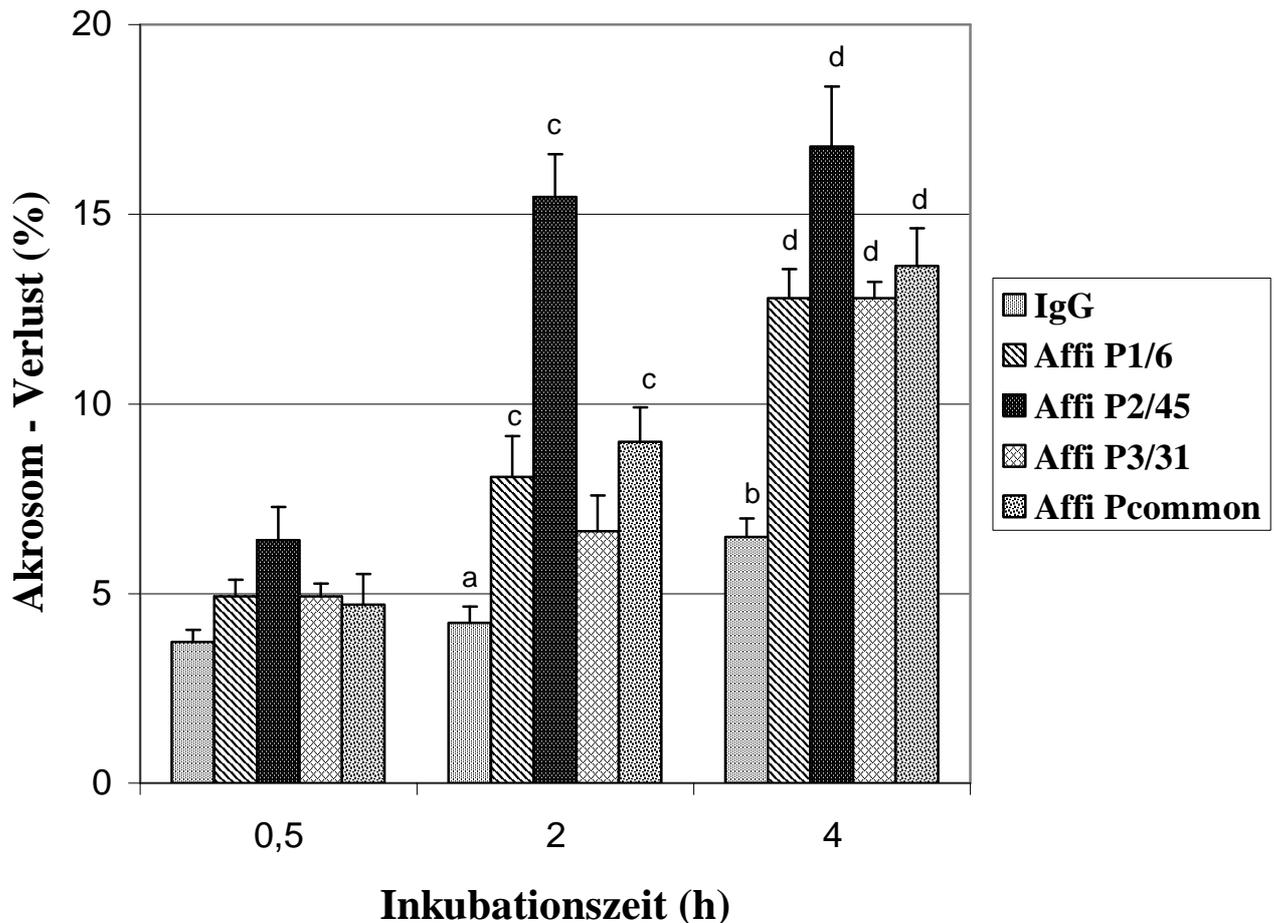


Abbildung 19. Einfluss von affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC Antikörpern auf den Verlust des Akrosoms boviner Spermatozoen. Dargestellt ist der Verlust des Akrosoms (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse) nach Inkubation mit jeweils 15 µg/ml anti-VDAC1 (Affi P1/6), anti-VDAC2 (Affi P2/45), anti-VDAC3 (Affi P3/31) und anti-VDAC1, 2, 3 (P_{common}) bzw. Kaninchen IgG als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=6. a vs. c: p < 0,01, b vs. d: p < 0,01.

Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde in Abbildung 19 auf die Kennzeichnung der statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb einer Behandlung während der verschiedenen Zeitpunkte verzichtet. Diese Signifikanzen sind stattdessen in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Einfluss von affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC Antikörpern auf den Verlust des Akrosoms boviner Spermatozoen. Signifikanz der Unterschiede innerhalb einer Behandlung bezüglich der verschiedenen Zeitpunkte.

	0,5h vs. 2h	0,5h vs. 4h	2h vs. 4h
IgG-Kontrolle	keine statistisch signifikanten Unterschiede	keine statistisch signifikanten Unterschiede	keine statistisch signifikanten Unterschiede
anti-VDAC1 (P 1/6):	keine statistisch signifikanten Unterschiede	P < 0,01.	P < 0,01.
anti-VDAC2 (P 2/45):	P < 0,01.	P < 0,01.	keine statistisch signifikanten Unterschiede
anti-VDAC3 (P 3/31):	keine statistisch signifikanten Unterschiede	P < 0,01.	P < 0,01.
anti-VDAC1,2,3 (P _{common}):	P < 0,01.	P < 0,01.	P < 0,01.

Da nach Einsatz von anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) der Verlust des Akrosoms am deutlichsten war, sollte hier eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit überprüft werden. Die Versuche wurden mit verschiedenen finalen Proteinkonzentrationen (10, 5, 2,5 und 1,25 µg/ml) des affinitätsgereinigten Affi P2/45 durchgeführt (Abbildung 20). Dargestellt ist die Differenz an Akrosomverlusten der jeweiligen Probe zur Kontrolle. Es wurde eine deutliche Abhängigkeit des Effektes von der Konzentration des eingesetzten anti-VDAC2 Antikörpers beobachtet. Bei Verringerung der eingesetzten anti-VDAC2 Konzentration (15 µg/ml – 11% ± 1,57%; 10 µg/ml – 8,8% ± 0,65%; 5 µg/ml – 6,2% ± 0,51%; 2,5 µg/ml – 4,1% ± 0,7%; 1,25 µg/ml – 4,75% ± 1,65%) kam es zu einer Reduzierung des Akrosomverlustes bei lebenden bovinen Spermatozoen. Der Verlust des Akrosoms bei einer Proteinkonzentration des Affi P2/45 von 10 µg/ml im Vergleich zu 2,5 µg/ml bzw. 1,25 µg/ml war statistisch signifikant.

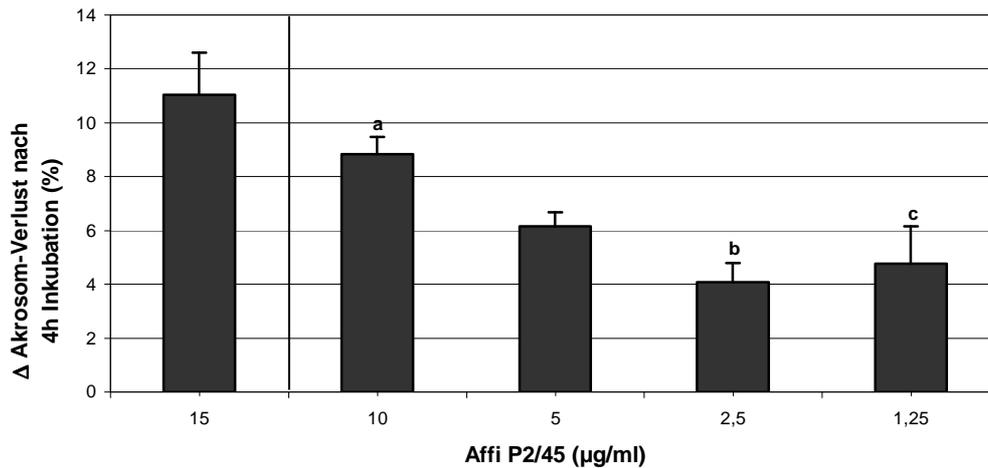


Abbildung 20. Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit von anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) auf den Verlust des Akrosoms boviner Spermatozoen. Dargestellt ist jeweils das Delta an Akrosomverlusten in % (Ordinate) in Abhängigkeit zur eingesetzten anti-VDAC2 Antikörperkonzentration (Abszisse). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Die Ergebnisse nach Zugabe von 15 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper stammen aus einer anderen Versuchsreihe und flossen daher nicht in die statistische Auswertung mit ein. $n=6$. a vs. b: $p < 0,01$, a vs. c: $p < 0,05$.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle mit anti-VDAC Antikörpern behandelte Proben sowie die Kontrolle nach 4h Inkubation auf morphologische Veränderungen hin in der Immunzytochemie untersucht. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von biotinyliertem anti-Kaninchen IgG (1:2000) und mit FITC-markiertem Avidin (1:400).

Wie in Abbildung 21 am Beispiel von Affi P2/45 gezeigt, kam es nach einer 4stündigen Inkubation zu bläschenförmigen morphologischen Veränderungen im akrosomalen Bereich der Spermatozoen (Abbildung 21, Pfeil). Diese Veränderungen konnten auch nach Inkubation der Spermatozoen mit den anderen anti-VDAC Antikörpern (Affi P1/6, Affi P3/31 und Affi P_{common}), wenn auch in etwas geringerem Ausmaß, festgestellt werden. Bei den Kontrollspermatozoen war ein solches Phänomen nur sehr selten zu beobachten (Abbildung 21B).

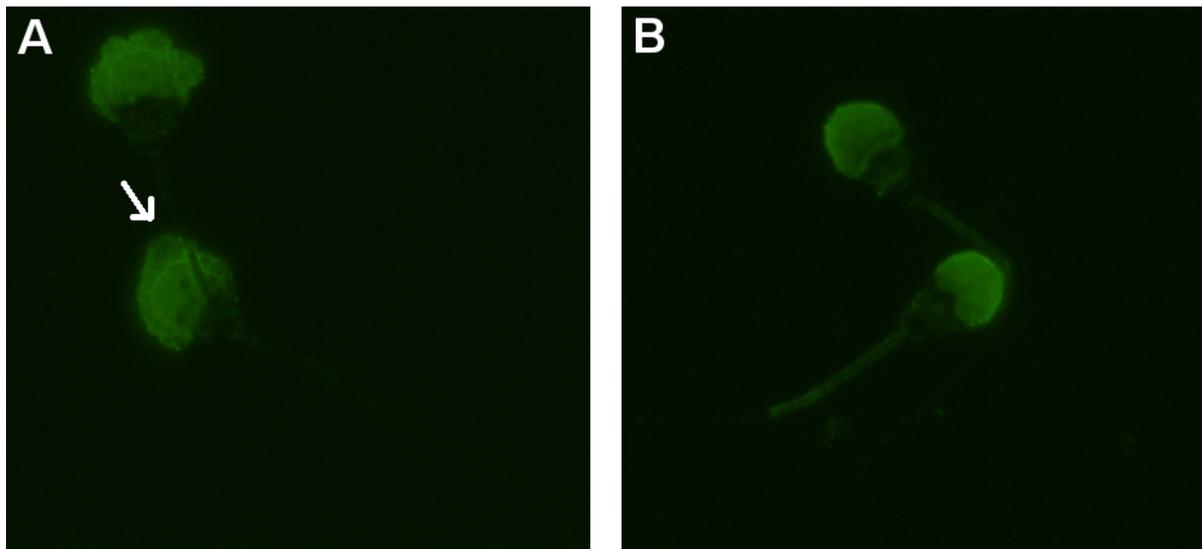


Abbildung 21. Immunfluoreszenzoptischer Nachweis der morphologischen Veränderungen am Akrosom. Die Spermatozoen wurden für 4h mit **A:** Affi P2/45 (15 $\mu\text{g/ml}$) bzw. zur Kontrolle mit **B:** Kaninchen-IgG (15 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von biotinyliertem anti-Kaninchen IgG (1:2000) und mit FITC-markiertem Avidin (1:400). Originalvergrößerung X 1000.

Die Untersuchungen zeigten, dass anti-VDAC Antikörper einen Effekt auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen hatten. Nach einer vierstündigen Inkubation mit den affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC Antikörpern kam es zu einem signifikant höheren Verlust des Akrosoms im Vergleich zu den Kontrollspermatozoen. Außerdem konnte in weiteren Experimenten mit dem Affi P2/45 eine Dosisabhängigkeit für diesen Effekt nachgewiesen werden.

In Versuchen zu möglichen morphologischer Veränderungen zeigten sich nach einer 4stündigen Inkubation der Spermatozoen mit den anti-VDAC Antikörpern bläschenförmigen Veränderungen im akrosomalen Bereich. Diese Veränderungen waren nach Inkubation der Spermatozoen mit Affi P2/45 am stärksten ausgeprägt, aber auch nach Inkubation mit den anderen anti-VDAC Antikörpern zu beobachten. Bei den Kontrollspermatozoen wurde ein solches Phänomen nur sehr selten festgestellt.

3.3.2. Untersuchung der morphologischen Veränderungen der Spermatozoen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie

Um die oben beschriebenen bläschenförmigen morphologischen Veränderungen im akrosomalen Bereich der Spermatozoen nach Inkubation mit anti-VDAC Antikörpern genauer

beurteilen zu können, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Spermatozoen wurden wiederum für 4h mit 15 µg/ml affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörper bzw. mit 15 µg/ml nicht relevantem Kaninchen-IgG als Kontrolle inkubiert und anschließend für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) aufbereitet.

Die REM konnte die bereits in der Immunzytochemie beobachteten akrosomalen Veränderungen bestätigen. In Abbildung 22A ist ein Spermatozoenkopf aus der mit nicht-relevantem Kaninchen-IgG behandelten Kontroll-Suspension dargestellt. Der Kopf wirkt glatt und unauffällig. Im Bereich des Akrosoms war ein dezentes Ablösen einer Membran, höchstwahrscheinlich die Plasmamembran, zu beobachten (Abb. 22A, Pfeil). Der Übergang zwischen Spermatozoenkopf und Flagellum, sowie die Endstücke der Flagella waren ohne besondere Auffälligkeiten (Abbildung 22A, Ausschnitt).

Abbildung 22B stellt exemplarisch ein mit anti-VDAC1 Antikörpern (Affi P1/6) behandeltes Spermatozoon dar. Hier zeigte sich im Gegensatz zur Kontrolle im Bereich des Akrosoms ein wesentlich deutlicheres Ablösen der Membran. Einerseits wies der akrosomale Teil des Kopfes faltige Strukturen (Pfeile) auf und andererseits gab es benachbarte Bereiche, in denen die Membran offenbar völlig abgelöst war. Bemerkenswert war bei dieser Probe weiterhin, dass ein hoher Anteil an Flagella-Endstücken aufgerollt war (Abbildung 22B, Ausschnitt).

Die Probe, die mit anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) inkubiert wurde, zeigte im Kopfbereich kraterartige morphologische Veränderungen. Hierbei erschien die Membran, bis auf geringe Reste, größtenteils abgelöst (Abbildung 22C, Pfeile markieren die kraterartigen Veränderungen). Bei diesen Kratern handelte es sich vermutlich um Bläschen, wie auch in der Immunfluoreszenz gezeigt (Abbildung 21), die im Laufe der Aufbereitung der Proben für die REM zusammengefallen waren. Die Köpfe waren häufig breit, platt und schuhsohlenartig konfiguriert. Der Übergang zwischen Kopf und Flagellum zeigte bei dieser Probe keine besonderen Auffälligkeiten. Auch hier gab es Spermatozoen mit einem „engerollten“ Flagellum-Endstück (Abbildung 22C, Ausschnitt), jedoch nicht so häufig wie bei der Probe mit anti-VDAC1 Antikörpern (Abbildung 24).

Die Spermatozoen, die mit Antikörpern gegen VDAC3 (Affi P3/31) behandelt wurden, zeigten ebenfalls ein deutliches Ablösen der Membran im Bereich des vorderen Spermatozoenkopfes (Abbildung 22D, Pfeil). Diese Kopfdefekte waren zwar prozentual nicht so häufig wie bei Affi P2/45 (Abbildung 23), dafür aber oft noch deutlicher ausgeprägt und erstreckten sich über das gesamte Akrosom bis hin in den postakrosomalen Bereich.

Zusätzlich fiel eine Unregelmäßigkeit im Übergang zwischen Kopf und Flagellum (connecting piece) auf. Dieser Übergang wirkte aufgeraut, faserig und z.T. diskontinuierlich (Abbildung 22D, Pfeil). Die Endstücke der Schwänze waren jedoch zum größten Teil unauffällig und ähnlich denen der Negativkontrolle (Abbildung 22D, Ausschnitt).

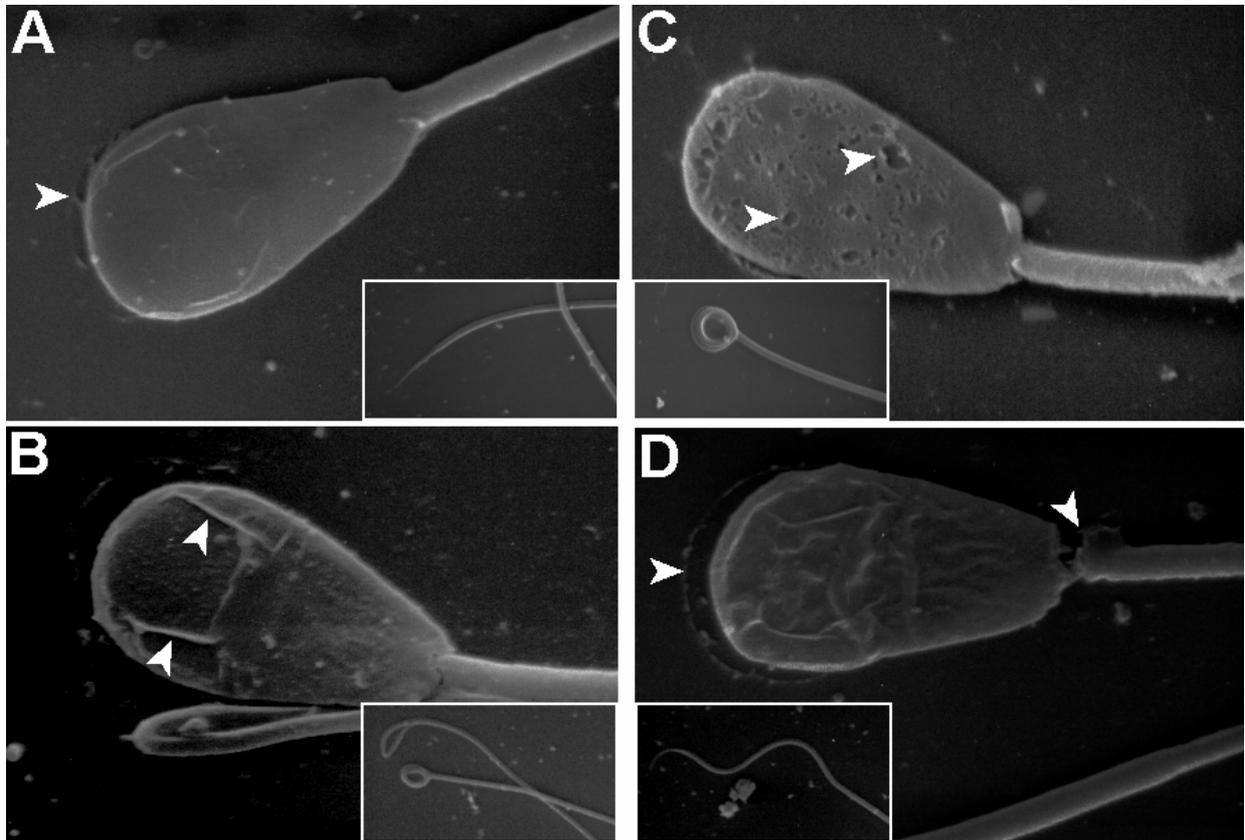


Abbildung 22. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Darstellung der morphologischen Veränderungen nach 4h Inkubation mit affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern. **A:** Kontrolle mit Kaninchen-IgG (15µg/ml). **B:** Affi P1/6 (15 µg/ml). **C:** Affi P2/45 (15 µg/ml). **D:** Affi P3/31 (15 µg/ml). Originalvergrößerung der Spermatozoenköpfe X 2750 und des Ausschnittes X 705.

Zur Objektivierung der beschriebenen morphologischen Veränderungen wurden diese durch Auszählung quantitativ erfasst. Hierfür wurden die Proben bei einer Bildschirmvergrößerung von X 4000 meanderförmig um ca. 2 Bildfelder versetzt abgefahren und sämtliche darin liegende Spermatozoen ausgewertet (insgesamt 100/Ansatz). Die Ergebnisse sind für die Veränderungen an den Spermatozoenköpfen in Abbildung 23 und für die Veränderungen an den Schwänzen in Abbildung 24 dargestellt.

In Abbildung 23 wird deutlich, dass sich in der Negativkontrolle relativ wenige morphologische Kopfveränderungen zeigten. Besonders ausgeprägte Veränderungen waren

dagegen bei mit anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) behandelten Spermatozoen nachweisbar. Aber auch die mit anti-VDAC3 Antikörpern (Affi P3/31) inkubierten Spermatozoen wiesen im Vergleich zur Negativkontrolle statistisch signifikant häufiger Veränderungen an den Köpfen auf. Der anti-VDAC1 Antikörper (Affi P1/6) bewirkte unter diesen Versuchsbedingungen keine signifikanten morphologischen Veränderungen am Spermatozoenkopf (Abbildung 23).

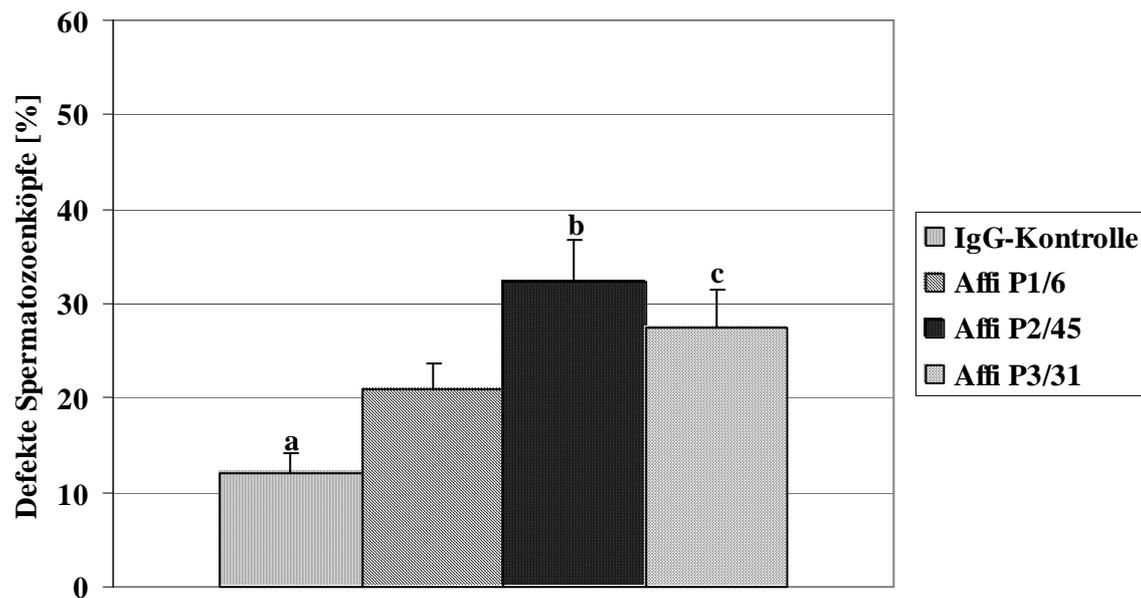


Abbildung 23. Morphologische Veränderungen der bovinen Spermatozoenköpfe nach 4stündiger Inkubation mit den affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern bzw. mit nicht relevantem Kaninchen-IgG. Die beobachteten morphologischen Veränderungen im Rasterelektronenmikroskop wurden bei einer Vergrößerung von X 4000 ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=5$. a vs. b: $p < 0,001$; a vs. c: $p < 0,01$

Wie in Abbildung 24 dargestellt, waren die Veränderungen am Flagellum sowohl bei mit anti-VDAC1 Antikörpern (Affi P1/6) als auch bei mit anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) behandelten Spermatozoen signifikant häufiger zu beobachten als bei der Negativkontrolle (nicht relevantes Kaninchen-IgG). Die anti-VDAC3 Antikörper (Affi P3/31) hatten keinen signifikanten Einfluss in Hinblick auf mögliche Veränderungen des Spermatozoenschwanzes (Abbildung 24).

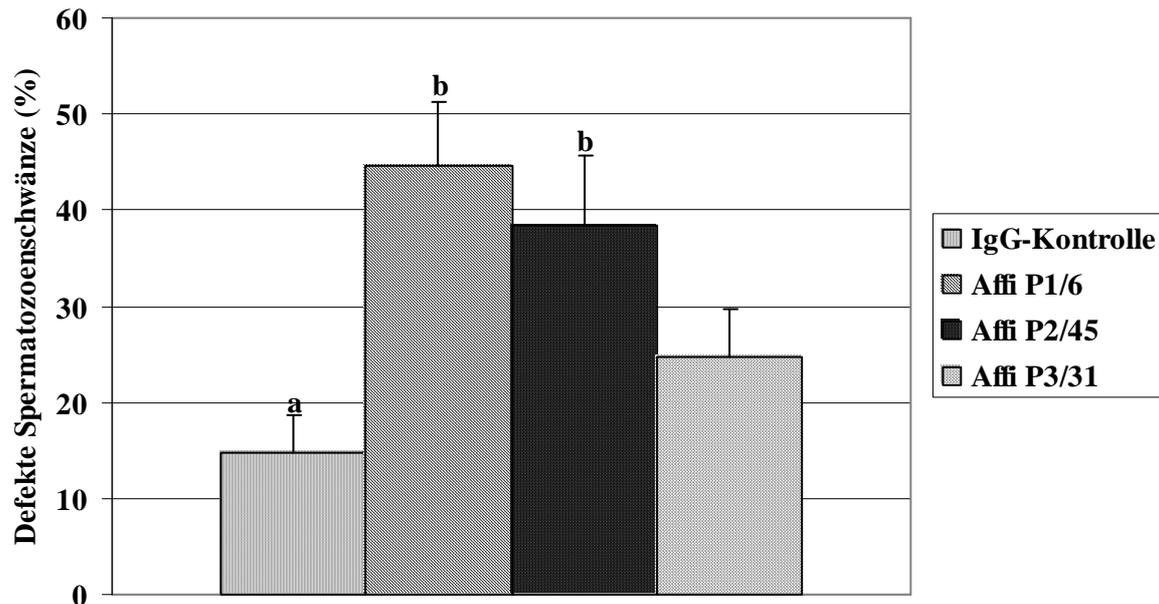


Abbildung 24. Morphologische Veränderungen der bovinen Spermatozoenschwänze nach 4stündiger Inkubation mit den affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern bzw. mit nicht relevantem Kaninchen-IgG. Die beobachteten morphologischen Veränderungen im Rasterelektronenmikroskop wurden bei einer Vergrößerung von X 4000 ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n=5. a vs. b: $p < 0,01$

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bereits immunfluoreszenzoptisch beobachteten morphologischen Veränderungen der bovinen Spermatozoen nach 4stündiger Inkubation mit den anti-VDAC Antikörpern sich durch die REM bestätigen und quantifizieren lassen. Die REM-Untersuchungen zeigten, dass die affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC2 (Affi P2/45) und anti-VDAC3 (Affi P3/31) Antikörper signifikant häufiger zu Veränderungen im Kopfbereich führten als bei den Kontrollspermatozoen (vergl. Abbildung 23). Morphologische Veränderungen im Bereich des Flagellums traten dagegen statistisch signifikant häufiger nach Inkubation der Spermatozoen mit anti-VDAC1 (Affi P1/6) und anti-VDAC2 (Affi P2/45) auf.

3.3.3. Effekt von anti-VDAC Antikörper auf die Spermatozoenmotilität

Weitere Untersuchungen sollten klären, ob anti-VDAC Antikörper einen Einfluss auf die Motilität der bovinen Spermatozoen haben. Hierzu wurden von den oben beschriebenen Proben bei 0h, 0,5h, 2h und 4h nach Zugabe von jeweils 15 $\mu\text{g/ml}$ der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper Motilitätsmessungen mit Hilfe des CASA-Systems vorgenommen. Als Negativkontrolle diente wiederum Kaninchen IgG in

einer Konzentration von 15 µg/ml. Nach Zugabe von Affi P1/6, Affi P3/31 bzw. Affi P_{common} zur Spermatozoenprobe wurde keine statistisch signifikanten Veränderungen der Motilität gegenüber der Negativkontrolle beobachtet (nicht gezeigt). Bei der Probe, die mit Affi P2/45 (gerichtet gegen VDAC2) inkubiert wurde, konnte jedoch nach 2h und nach 4h eine statistisch signifikante Verringerung ($p < 0,01$) der Gesamtmotilität im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden (Abbildung 25).

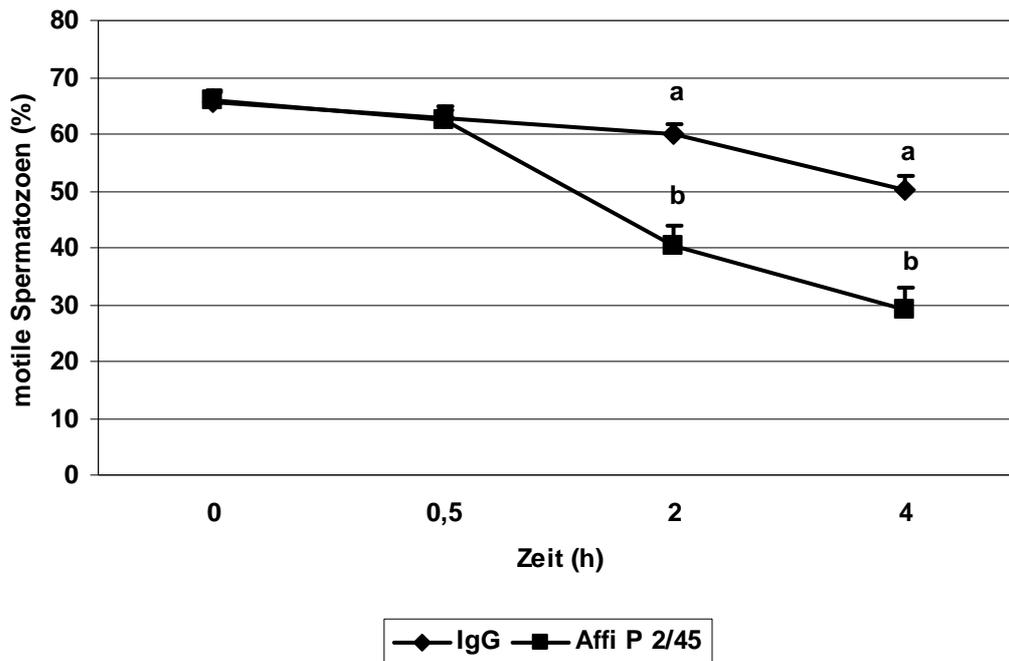


Abbildung 25. Einfluss von affinitätsgereinigten anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) auf die Gesamtmotilität boviner Spermatozoen. Gezeigt ist der Effekt nach Inkubation mit Affi P2/45 (15 µg/ml) im Vergleich zur Negativkontrolle (Kaninchen IgG, 15 µg/ml) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=9$. a vs. b: $p < 0,01$

Ähnlich wie bei den Experimenten zum akrosomalen Status, sollte auch hier eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit überprüft werden. Untersucht wurde der Einfluss auf die Gesamtmotilität nach Zugabe des Affi P2/45 Antikörpers (anti-VDAC2) in folgenden finalen Konzentrationen: 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Der Anteil immotiler Spermatozoen ist auf der Ordinate aufgetragen, die Abzisse gibt die Proteinkonzentration der eingesetzten affinitätsgereinigten Antikörper Affi P2/45 an. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass es mit der Abnahme des Proteingehalts des anti-VDAC2 Antikörpers von 10µg/ml auf 1,25 µg/ml auch zu einer statistisch signifikanten Verringerung der immotilen Spermatozoen von 62,4 % auf 49,5 % kam.

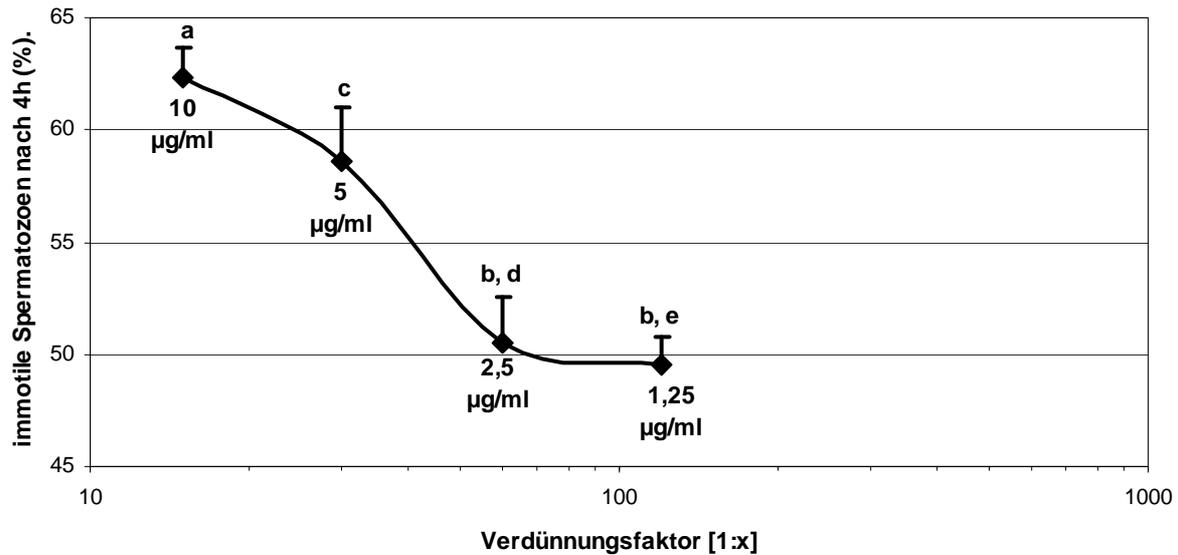


Abbildung 26. Einfluss der Dosis von affinitätsgereinigten anti-VDAC2 Antikörpern (Affi P2/45) auf den Anteil immotiler Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden für 4h mit den Antikörpern inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n=9. a vs. b: $p < 0,001$; c vs. d: $p < 0,01$; c vs. e: $p < 0,001$

Zusammenfassend dargestellt, konnte mit Hilfe der Untersuchungen zum Einfluss der anti-VDAC Antikörper auf die Gesamtmotilität boviner Spermatozoen gezeigt werden, dass zumindest die affinitätschromatografisch gereinigten Antikörper gegen VDAC2 (Affi P2/45) nach 2h und 4h Inkubationsdauer eine deutliche, statistisch signifikante Verringerung ($p < 0,01$) der Gesamtmotilität im Vergleich zur Negativkontrolle bewirkten. Auch eine Dosisabhängigkeit dieses Effektes lies sich für Affi P2/45 nachweisen.

Die Zugabe der affinitätschromatografisch gereinigten Antikörpern gegen die VDAC Isoformen 1 (Affi P1/6) und 3 (Affi P3/31) bewirkte keine signifikante Veränderung der Gesamtmotilität der bovinen Spermatozoen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation und Funktion der drei VDAC Isoformen (VDAC1, 2 und 3) mit Hilfe von Subtyp-spezifischen anti-VDAC Antikörpern in bovinen Spermatozoen zu untersuchen.

Zunächst sollten hierfür spezifische, affinitätschromatographisch gereinigte anti-VDAC Antikörper aus vorhandenen Antiseren gewonnen werden. Mittels ELISA und immunbiochemischer Methoden (Immunblot) sollten diese Antikörper bezüglich ihrer Affinität und ihrer Subtyp-Spezifität charakterisiert werden. Als Antigene dienten hierfür rekombinante VDAC1, 2 und 3 Proteine. Es folgten Untersuchungen zur Lokalisation von VDAC1, 2, und 3 in bovinen, ejakulierten Spermatozoen mittels biochemischer und immunzytochemischer Methoden. Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der VDAC-Subtypen, insbesondere zur Spermatozoenmotilität und des akrosomalen Status boviner Spermatozoen.

4.1. Stand der Forschung zur Funktion der drei VDAC Isoformen

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung der VDAC1, VDAC2 und VDAC3 Isoformen von Mäusen, die in einem Hefestamm exprimiert wurden, dem das VDAC Gen fehlte, wurden einige Unterschiede in dem spannungsabhängigen Öffnen der Kanäle beschrieben. VDAC1 und 2 ließen sich problemlos in künstliche Phospholipidmembranen einbringen und formten dort Poren. Sie zeigten eine normale Öffnungsaktivität, wobei VDAC2 in zwei verschiedenen Formen existiert, von denen eine Form eine geringere Leitfähigkeit und geringere Selektivität haben könnte. Im Gegensatz dazu ließ sich VDAC3 nicht ohne weiteres in Phospholipidmembranen integrieren und wies keine eindeutigen porenformenden Eigenschaften auf (Xu *et al.* 1999). Eine direkte Zuordnung unterschiedlicher Verhaltenscharakteristika in Bezug auf eine spezifische physiologische Bedeutung der einzelnen Isoformen gelang in dieser Studie nicht. Daher kann nur vermutet werden, dass jede Isoform eine unterschiedliche physiologische Bedeutung hat (Xu *et al.* 1999).

Um die physiologische Rolle der verschiedenen VDAC Isoformen näher zu definieren, wurden VDAC defiziente Zellen sowie VDAC knockout Mäuse untersucht.

Es wurden lebensfähige embryonale Stammzellen von Mäusen hergestellt, denen jeweils eine VDAC Isoform fehlte (Xu *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999). Diese Zellen zeigten einen um 30% verringerten Sauerstoffverbrauch. Des Weiteren war die Cytochrom *c* Aktivität in den VDAC1 und VDAC2 defizienten Zellen teilweise reduziert. Eine eingeschränkte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran für kleine Metaboliten, welche für die Phosphorylierung notwendig sind, könnte für die verringerte Respiration ursächlich sein (Xu *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999). Zellen, denen mehr als nur eine VDAC Isoform fehlte, waren nicht lebensfähig. Dies lässt vermuten, dass sich die verschiedenen VDAC Isoformen nur zum Teil ergänzen können und lässt bestimmte Funktionen für jede einzelne Isoform vermuten (Xu *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999).

Weiterhin wurden Untersuchungen an VDAC1 und VDAC3 defizienten Mäusen durchgeführt. VDAC1 knockout Mäuse waren lebensfähig und fertil, die Geburtenfrequenz jedoch im Vergleich zum Wildtyp verringert. Dies lässt eine vermehrte embryonale Letalität vermuten. Außerdem zeigten VDAC1 defiziente Mäuse eine reduzierte mitochondriale Permeabilität im Skelettmuskel (Anflous *et al.* 2001).

Veränderungen im Flagellum der Spermatozoen von VDAC3 knockout Mäusen führen zu einer verringerten Spermatozoenmotilität und letztlich zur Infertilität. Diese ziliaren Veränderungen, welche aus dem Verlust eines Mikrotubulipaares bestanden, waren allerdings auf das Axonem der Spermatozoen beschränkt und konnten bei den Zilien der Atemwege und den Zilien im Innenohr nicht beobachtet werden (Sampson *et al.* 2001).

Bei doppelt defizienten Mäusen (VDAC1/3) kam es häufiger zum embryonalen Tod der Mäuse. Diese Mäuse zeigten außerdem eine deutliche Wachstumsretardierung (Weeber *et al.* 2002). Es wurde auch berichtet, dass VDAC1, VDAC3 und VDAC1/3-knockout Mäuse Defekte im Lernverhalten und in der Plastizität der Synapsen zeigten. Die Effekte waren bei beiden Isoformen unterschiedlich, wodurch vermutet werden kann, dass VDAC1 und VDAC3 unterschiedliche Aufgaben bei den zerebralen Funktionen wahrnehmen (Weeber *et al.* 2002).

Von VDAC2 wird angenommen, dass es eine spezifische Rolle bei der Regulation der Apoptose spielt. Hierbei interagiert es mit dem pro-apoptotischen Protein Bak und verhindert dadurch dessen Aktivierung und somit die vom Mitochondrium ausgehende Apoptose (Cheng *et al.* 2003). Die pro-apoptotischen Moleküle Bak oder Bax sind für den mitochondrialen Weg der Apoptose notwendig. Aktiviertes oligomerisiertes Bak oder Bax führen zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und bewirken so eine Freisetzung von Proteinen. Zu diesen freigesetzten Proteinen zählt auch Cytochrom *c*, welches eine Caspase-Kaskade auslöst und somit die Apoptose initialisiert. In den Untersuchungen von

Cheng *et al.* (2003) konnte gezeigt werden, dass VDAC2, aber nicht VDAC1 oder VDAC3, mit Bak interagieren. So zeigten Zellen mit einer VDAC2 Defizienz eine verstärkte Bak-Oligomerisation und waren äußerst anfällig für Apoptose. Eine Interaktion von VDAC2 mit Bax konnte dagegen ausgeschlossen werden. VDAC2 reguliert also die Aktivität von Bak und stellt somit eine Verbindung zwischen der Mitochondrien-Physiologie und dem zentralen Zelltod dar.

Eine durch Hypoxie induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von VDAC1 und VDAC2 konnte in Synapsen des Gehirns von Meerschweinchen demonstriert werden. Dies könnte wesentlich für die Modulation der Protein-Protein-Interaktionen sein, die beispielsweise zur Apoptose führen (Liberatori *et al.* 2004).

Auch beim Menschen wurden Beteiligungen von VDAC Proteinen an der Regulation physiologischer Vorgänge beschrieben. So wurde von einem Patienten mit einer VDAC1 Gen Defizienz berichtet, bei dem eine psychomotorische Retardierung, ausgeprägte Muskelschwäche und leichtgradige Fehlbildungen auffielen (Huizing *et al.* 1996).

In einer Studie an *post mortem* Gehirnen von Alzheimer- und Trisomie 21-Patienten wurde gezeigt, dass die Menge an hVDAC1 und hVDAC2 Protein verändert war (Yoo *et al.* 2001). Alzheimer Patienten zeichneten sich durch einen verminderten hVDAC1 Proteingehalt im frontalen Cortex und im Thalamusbereich aus. Im temporalen Cortex wurde eine Erhöhung von hVDAC2 Protein beobachtet (Yoo *et al.* 2001). Bei Trisomie 21-Patienten konnte gezeigt werden, dass im Cerebellum hVDAC1 Protein signifikant erhöht war, hVDAC2 Protein war dagegen in diesem Bereich nicht signifikant verändert (Yoo *et al.* 2001).

Auch bei den Pathomechanismen, die zur Cystischen Fibrose führen, wird eine Beteiligung von VDAC diskutiert. An der Cystischen Fibrose sind zwei Cl⁻-Kanäle beteiligt: der CFTR-Kanal (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) und der ORCC-Kanal (outwardly rectifying chloride channel), welcher im gesunden Zustand durch den CFTR-Kanal kontrolliert wird. Es wurde postuliert, dass VDAC an diesem ORCC-Kanal beteiligt sein soll und es wird gegenwärtig untersucht, ob es durch Beeinflussung von VDAC zu Veränderungen dieses Kanals und damit der Cystischen Fibrose kommen kann (Thinnes *et al.* 1990; Schwarzer *et al.* 2000; Thinnes *et al.* 2000b).

Die hier beschriebenen multilokalen Lokalisationen von VDAC, die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen VDAC Isoformen sowie die durch Vorarbeiten gestützte Vermutung, dass VDAC in bovinen Spermatozoen vorhanden sein könnte, waren der Anlass, die Verteilung der VDAC Isoformen und deren funktionelle Bedeutung in bovinen Spermatozoen zu untersuchen.

4.2. Gewinnung von Isoform-spezifischen anti-VDAC Antikörpern

Wie bereits zu Beginn der Diskussion dargestellt, war die Zielsetzung dieser Arbeit VDAC1, 2 und 3 in bovinen Spermatozoen nachzuweisen und eine eventuell unterschiedliche Verteilung der VDAC Isoformen in den Kompartimenten des Spermatozoons zu beschreiben. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von subtypspezifischen anti-VDAC Peptid Antikörpern durchgeführt. Als Antigene für die Antikörperherstellung dienten hierfür synthetische Peptide, deren Sequenzen sich von der Aminosäuresequenz der VDAC1, 2 bzw. 3 cDNA ableiten. So wurde für das Antiserum AS P1/6 eine Peptidsequenz von 12 Aminosäuren, abgeleitet von der VDAC1 Polypeptidsequenz ausgewählt. Entsprechend wurden für das Antiserum AS P2/45 ebenfalls 12 Aminosäuren der Polypeptidsequenz von VDAC2 gewählt. Für das Antiserum AS P3/31 wurden 8 Aminosäuren von VDAC3 festgelegt und für das Antiserum AS P_{common} wurden 10 Aminosäuren aus der Sequenz von VDAC3 ausgewählt (Hinsch *et al.* 2004).

Die gewonnenen anti-VDAC Antiseren wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt, auf ihre Immunreaktivität im ELISA untersucht und ihr Proteingehalt festgestellt. Sie wurden mit Hilfe des Immunblot Verfahrens und rekombinanten VDAC1, 2 und 3 Proteinen auf ihre Isoform Spezifität hin untersucht.

Der Antikörper Affi P1/6 markierte im Immunblot nur mit dem rekombinanten VDAC1 als Antigen eine Bande im Bereich von ca. 34 kDa. Dies entspricht der bekannten Molekularmasse von VDAC1. Eine Immunreaktion mit VDAC2 und VDAC3 wurde nicht festgestellt.

Nur bei Verwendung von rekombinanten VDAC2 erkannte der Antikörper Affi P2/45 eine Proteinbande von 33 kDa (entspricht der Molekularmasse von VDAC Typ 2).

Affi P3/31 ging mit dem rekombinanten VDAC3 eine Antigen-Antikörper-Reaktion im Molekularmassenbereich von 32 kDa ein, was der Molekularmasse von VDAC3 entspricht. VDAC1 und 2 wurden nicht.

Bei allen drei rekombinanten VDAC Proteinen wurden vom Affi P_{common} Proteine in den zu erwartenden Molekularmassen (VDAC1 34 kDa, VDAC2 33kDa, VDAC3 32 kDa) erkannt. Einer der ersten Hinweise auf die Molekularmasse von VDAC wurde durch den Nachweis der Existenz von extramitochondrialem VDAC 1983 durch die Arbeitsgruppe F. P. Thinnes beschrieben (Thinnes *et al.* 1983;Thinnes *et al.* 1989). Nach Isolierung einer 31 kDa Proteinbande aus einer Rohmembranfraktion menschlicher B-Lymphozyten und darauf folgender Sequenzierung stellte sich aufgrund der hohen Homologie zu bekannten VDAC

Sequenzen heraus, dass dieses Protein zur VDAC Gruppe zu zählen ist. Später wurde die Expression des Proteins auch auf cDNA Ebene bestätigt. Die Molekularmasse der VDAC Isoformen ließ sich aufgrund der nun bekannten Aminosäuresequenz berechnen (Blachly-Dyson und Forte 2001).

Durch den Einsatz der rekombinanten VDAC Proteine konnte gezeigt werden, dass sowohl für VDAC1 mit dem Affi P1/6, für VDAC 2 mit Affi P2/45 als auch für VDAC 3 mit Affi P3/31 subtypspezifische Antikörper zur Verfügung standen (Hinsch *et al.* 2004). Mit diesen Antikörpern als Marker bestand somit die Möglichkeit, die verschiedenen VDAC Subtypen in Spermatozoen zu detektieren und zu lokalisieren.

Außerdem konnte, durch Verwendung der Antikörper, auch der Fragestellung nachgegangen werden, ob anti-VDAC Antikörper wichtige Spermatozoenfunktionen, wie Motilität und Akrosomreaktion, beeinflussen können.

Soweit bekannt, sind dies die ersten monospezifischen Antikörper gegen alle drei VDAC Isoformen. Zwar wurden schon monoklonale und polyklonale anti-VDAC Antikörper beschrieben (Babel *et al.* 1991), doch ihre Spezifität konnte nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden. Der Arbeitsgruppe von Yamamoto gelang es lediglich einen monospezifischen polyklonalen Antikörper gegen die VDAC1 Isoform von Ratten, nicht aber gegen die VDAC2 und 3 Isoformen herzustellen (Yamamoto *et al.* 2006). Die Arbeitsgruppe von Craigen konnte dagegen erfolgreich spezifische polyklonale Antikörper sowohl gegen VDAC2 als auch gegen VDAC3 herstellen, jedoch nicht gegen die VDAC1 Isoform (Decker und Craigen 2000; Anflous *et al.* 2001).

4.3. Lokalisation der VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen

Auf die Charakterisierung der anti-VDAC Antikörper aufbauend, wurden Untersuchungen zur Lokalisation der VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoen vorgenommen. Zur Validierung der Ergebnisse wurden zwei unterschiedliche Verfahren ausgewählt.

Zunächst wurde eine Proteinextraktion aus Spermatozoen durchgeführt, wobei in verschiedenen Extraktionen jeweils Proteine aus unterschiedlichen Zellkompartimenten gewonnen wurden. Im 2% Triton X-100 Extrakt sind hauptsächlich membranäre und mitochondriale Proteine enthalten; der SDS-Extrakt stellt dagegen eine ODF-Protein Extraktion dar (Hinsch *et al.*, 2003). Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnte bestätigt werden, dass bei Spermatozoen nach Behandlung mit 2% Triton X-100 die

noch ODF vorhanden sind. Im Gegensatz dazu sind sowohl das Akrosom, die Plasmamembran als auch intrazelluläre und mitochondriale Strukturen abgelöst. Das bestätigen von Oko 1988 publizierte Untersuchungen.

Diese Proteinextrakte wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Da die Spezifität der anti-VDAC Antikörper für die VDAC Isoformen geklärt war, konnten diese Antikörper dazu verwendet werden, mittels Immunblot die VDAC Isoformen in bovinen Spermatozoenextrakten zu identifizieren.

Mit dem Affi P1/6 Antikörper (spezifisch für VDAC1) konnte weder im Triton X-100 Extrakt noch in der ODF-Protein Fraktion eine Immunreaktion detektiert werden. Allerdings zeigte das entsprechende Antiserum P1/6 eine deutliche Reaktion mit einem 34 kDa Polypeptid (somit vermutlich VDAC1) im Triton X-100 Extrakt (Hinsch *et al.* 2004). Diese Diskrepanz der Ergebnisse lässt sich nicht vollständig erklären. Möglicherweise ist es durch die affinitätschromatographische Reinigung zur Selektion einer Subpopulation von Antikörpern gekommen, die eine niedrige Affinität zu VDAC1 in der hier als Antigen präsentierten Form hat.

Der Antikörper Affi P2/45 (spezifisch für VDAC2) zeigte im Triton-Extrakt eine starke Immunreaktion im Molekularmassenbereich von etwa 33kDa, wobei es sich vermutlich um VDAC2 handelt.

Zusätzlich wurden durch den Antikörper Affi P2/45 zwei Proteine mit einer Molekularmasse von ca. 36 und 60 kDa detektiert. Bei dem 36 kDa Protein handelt es sich offenbar um VDAC2, wie die Sequenzierung zeigte, welche in Nachfolgeexperimenten zu dieser Arbeit durchgeführt wurde. Die Identität des 60 kDa Proteins ist dagegen weiter ungeklärt. Auch im SDS Extrakt wurden zwei Proteine von ca. 33 und 60 kDa markiert. Aufgrund der bekannten Molekularmasse von VDAC2 und der entsprechenden Markierung des rekombinanten VDAC2 Proteins durch den Affi P2/45 Antikörper ist somit davon auszugehen, dass VDAC2 sowohl im Triton-Extrakt als auch im SDS-Extrakt, der ODF-Protein Extraktion, vorhanden war. Mittels Western Blot Analyse konnte in einer neuen Studie zur Lokalisation von VDAC2 in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass VDAC2 in Spermatozoen dieser Spezies ebenfalls im Flagellum lokalisiert ist (Guarino *et al.* 2006). Eine Sublokalisation von VDAC2 in bestimmte Strukturen des Flagellums, wie z.B. die ODF, erfolgte hier jedoch nicht.

Der Antikörper Affi P3/31 (spezifisch für VDAC3) detektierte sowohl im Triton X-100 Extrakt als auch in der SDS Protein Fraktion eine ca. 32 kDa schwere Bande, bei der es sich vermutlich um VDAC3 handelt. Entsprechend der Ergebnisse für VDAC2 kann auch hier aufgrund der bekannten Molekularmasse von VDAC3 und der entsprechenden Markierung

des rekombinanten VDAC3 Proteins durch den Affi P3/31 Antikörper von einem Nachweis von VDAC3 im Triton-Extrakt und in der ODF-Protein Extraktion ausgegangen werden. Die affinitätsgereinigten Antikörper Affi P_{common} markierten im Triton X-100 Extrakt hauptsächlich 32 und 33 kDa schwere Polypeptide, wobei es sich höchstwahrscheinlich um VDAC2 und 3 handelt. Damit lies sich das Vorhandensein von VDAC2 bzw. 3 im Triton X-100 Extrakt durch den Affi P_{common} bestätigen. Des Weiteren markierte Affi P_{common} auch ein Polypeptid mit einer Molekularmasse von ca. 36 kDa. Hierbei handelte es sich ebenfalls um VDAC2, was in Nachfolgeexperimenten zu dieser Arbeit durch Sequenzierungsuntersuchungen bestätigt wurde.

Im SDS Extrakt kam es zu einer Markierung einer 32 kDa und einer 33 kDa schweren Bande durch Affi P_{common} Antikörper. Hierbei handelte es sich vermutlich um VDAC3 (32 kDa) und VDAC2 (33 kDa). Dies bestätigt die Ergebnisse, die mit den Antikörpern Affi P2/45 und Affi P3/31 gewonnen wurden. Weiterhin kam es zu einer Immunreaktion mit einem Polypeptid einer relativ hohen Molekularmasse von etwa 45 kDa, welches zurzeit noch unbekannt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VDAC1 vermutlich nicht im SDS-Extrakt und somit nicht in den ODF vorhanden ist. Über das Vorhandensein von VDAC1 im Triton X-100 Extrakt liegen derzeit keine eindeutigen Ergebnisse vor. Auch in der Literatur ist hierzu bisher noch nichts beschrieben worden, so dass momentan über die Existenz von VDAC1 keine definitive Aussage möglich ist.

VDAC2 und VDAC3 konnten dagegen in beiden Extrakten sowohl mit dem Antikörper Affi P_{common} als auch mit dem Antikörpern Affi P2/45 bzw. Affi P3/31 nachgewiesen werden. In der Literatur lagen hierüber bisher noch keine Erkenntnisse vor. Somit gelang in dieser Arbeit erstmals der biochemische Nachweis von VDAC2 und 3 Proteinen in den ODF von Spermatozoen.

Als weitere Methode zur Lokalisation von VDAC Proteinen kam die indirekte Immunfluoreszenz (Immunzytochemie) zum Einsatz. Diese Methode wurde insbesondere deswegen ausgewählt, um eine mögliche Kontamination des SDS-Extrakts mit mitochondrialen Proteinen auszuschließen. Die Spermatozoen wurden vor der Zugabe der Antikörper mit unterschiedlichen Detergenzien behandelt bzw. auf verschiedene Weise fixiert, um das Antigen auf unterschiedliche Weise präsentieren zu können.

Es stellte sich heraus, dass für eine erfolgreiche Antigen-Antikörper-Reaktion mit den verschiedenen anti-VDAC Antikörper unterschiedliche Vorbehandlungen notwendig waren.

Mit Hilfe der Immunzytochemie konnte deutlich die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der VDAC Isoformen demonstriert werden.

Eine Detektion von VDAC1 durch die Antikörper P1/6 gelang besonders gut in bovinen Spermatozoen, die zuvor mit 2% Triton X-100 behandelt wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass VDAC1 im akrosomalen Bereich des Kopfes und im Bereich des Hauptstückes des Flagellums vorkommt. Bei der Markierung im Bereich des Hauptstückes handelt es sich vermutlich um die fibröse Hülle, da

- a) nicht die sich im Mittelstück befindenden Mitochondrien markiert sind, weil diese bei der Behandlung durch Triton abgelöst wurden (Oko, 1988);
- b) es sich nicht um die ODF handeln kann, denn die ODF liegen in diesem Fall im Bereich des Mittelstückes frei (Oko, 1988), aber sie dort nicht durch die Antikörper markiert wurden.

Mit diesen Ergebnissen ließ sich, ähnlich wie bei den biochemischen Versuchen mit dem Antikörper Affi P1/6, kein Nachweis von VDAC1 in den ODF erbringen. Die Reaktion im akrosomalen Bereich des Spermatozookopfes lässt eine Membranlokalisation vermuten und würde die Ergebnisse von Hinsch *et al.* (2004) bezüglich des Nachweises einer 34 kDa schweren Bande im Triton-Extrakt durch das Antiserum P1/6 bestätigen.

Somit ist eine Lokalisation von VDAC1 in der Plasmamembran und/oder der akrosomalen Membran des Spermatozookopfes bzw. in der Plasmamembran und/oder der fibrösen Hülle des Spermatozoenschwanzes möglich. In der Literatur finden sich bereits einige Hinweise auf die Lokalisation von VDAC in der Plasmamembran. So konnte die Arbeitsgruppe von Bathori VDAC in Caveolae, welche aus Ratten- und Rindergehirnzellen sowie Lungengewebe des Hundes isoliert wurden, nachweisen (Bathori *et al.* 1999). Caveolae sind spezialisierte, cholesterol- und sphingolipidreiche Regionen der Plasmamembran mit vielen integralen Membranproteinen sowie einem hohen Anteil an Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankern (GPI-Anker). Man nimmt an, dass diese Region wichtig für die Signaltransduktion, Transzytose und den Cholesteroltransport ist (Bathori *et al.* 2000). In der Plasmamembran von humanen Endothelzellen konnte VDAC ebenfalls nachgewiesen werden und ist dort vermutlich ein Rezeptor für Plasminogen Kringle 5 (Gonzalez-Gronow *et al.* 2003). Kürzlich publizierte Daten berichten über VDAC als Kanal im sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskelzellen, wo es wahrscheinlich als Transporter für Ca^{2+} , ATP und andere Metabolite dient (Shoshan-Barmatz und Israelson 2005).

Aus der Lokalisation von VDAC1 in der Plasmamembran des Spermatozoenkopfes und der in der Literatur beschriebenen Beteiligung von VDAC am Cholesterol- sowie am Ca^{2+} -Transport lässt sich eine mögliche funktionelle Bedeutung von VDAC1 bei der akrosomalen Reaktion ableiten. Dies wird im Zusammenhang mit dem Einfluss der anti-VDAC Antikörper und der akrosomalen Integrität noch gesondert diskutiert.

Weiterhin konnte in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen VDAC2 eindeutig im Spermatozoenschwanz nachgewiesen werden. Es kam nach Inkubation von mit Methacarn fixierten bovinen Spermatozoen mit P2/45 Antikörpern zu einer spezifischen Markierung des gesamten Spermatozoenschwanzes ohne Betonung des Mittelstückes oder Hauptstücks. Welche subzellulären Strukturen hier jedoch genau markiert wurden, war lichtmikroskopisch und mit dieser Fixierung nicht eindeutig zu klären. Aufgrund der biochemischen Versuche lag jedoch die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine Immunreaktion mit den ODF handelte. Mit einer ebenfalls durchgeführten Immuntransmissions-Elektronenmikroskopie konnte dann das Vorhandensein von VDAC2 in den ODF zusätzlich betätigt werden (nicht gezeigt) (Hinsch *et al.* 2004). In der Literatur finden sich bisher noch keine weiteren Angaben über die Existenz von VDAC in ODF, allerdings konnte in einer neuen Studie zur Lokalisation von VDAC2 in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass VDAC2 in Spermatozoen dieser Spezies ebenfalls im Flagellum lokalisiert ist (Guarino *et al.* 2006).

In Untersuchungen an mit 2% Triton X-100 vorbehandelten Spermatozoen, was ein Herauslösen der Mitochondrien zur Folge hat, kam es durch den Antikörper P3/31 zu einer deutlichen Reaktion mit filamentären Strukturen im Mittelstück. Bei diesen filamentären Strukturen handelt es sich vermutlich um die ODF (Oko, 1988). Im Bereich des Hauptstückes erfolgte keine Markierung. Dies lässt vermuten, dass hier das entsprechende Epitop durch Strukturen, die die ODF im Hauptstück bedecken, wie z. B. die fibröse Hülle, nicht für die Antikörper zugänglich war. Diese Vermutung wird unterstützt durch Untersuchungen, bei denen die ODF in ihrer gesamten Länge durch das AS P3/31 markiert wurden, nach dem die fibröse Hülle durch andere Detergenzien entfernt wurde (Brito 1986), (nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist zum einen ein Vorhandensein von VDAC1 in den ODF, durch die immunbiochemischen und immunzytochemischen Versuche unwahrscheinlich. Die Ergebnisse lassen jedoch die Vermutung einer Lokalisation von VDAC1 in anderen Strukturen wie z.B. der Plasmamembran des Spermatozoenkopfes bzw. in der Plasmamembran und/oder in der fibrösen Hülle des Spermatozoenschwanzes zu. Zum

anderen bestätigen die Resultate der Immunzytochemie den biochemischen Nachweis von VDAC2 und 3 Proteinen in den ODF von bovinen Spermatozoen.

ODF sind subzelluläre Strukturen, die nur in Säugetierspermatozoen vorkommen. Biochemische und immunologische Studien haben ergeben, dass bovine ODF Keratine enthalten (Hinsch *et al.* 2003) und vor allem aus zytoskellären Proteinen bestehen und keine Membranen besitzen. Daher ist dieser erste Nachweis von VDAC2 und 3 in ODF zugleich das erste Mal, dass VDAC in einer nicht membranären Struktur gefunden wurde.

Eine Lokalisation von VDAC2 und VDAC3 im Bereich des Spermatozoenkopfes war mit den hier durchgeführten Experimenten nicht eindeutig zu bestätigen. Trotz unterschiedlicher Protokolle gelang es in den Kontrollexperimenten nicht unspezifische Reaktionen im Kopfbereich des Spermatozoon ganz zu vermeiden. Es bedarf daher weiterführender Untersuchungen zur Lokalisation von VDAC2 und VDAC3 Isoformen im Spermatozoenkopf. Aufgrund der Ergebnisse der funktionellen Studien, bei denen es nach Inkubation der Spermatozoen mit den VDAC Antikörpern zu deutlichen morphologischen Veränderungen im Bereich des Akrosoms kam, besteht jedoch die Annahme, dass alle drei VDAC Isoformen auch im Bereich des Spermatozoenkopfes vorhanden sein könnten.

4.4. Einfluss von VDAC auf die Spermatozoenmotilität

Ein weiterer wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der physiologischen Relevanz von VDAC für essentielle Funktionen boviner Spermatozoen, wie die Motilität.

Es konnte gezeigt werden, dass zumindest die affinitätschromatografisch gereinigten Antikörper gegen VDAC2 (Affi P2/45) nach 2h und nach 4h eine deutliche, statistisch signifikante Verringerung ($p < 0,01$) der Gesamtmotilität der Spermatozoen im Vergleich zur Negativkontrolle bewirkten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Reduktion der Spermatozoenmotilität dosisabhängig war. So kam es mit Abnahme der Proteinmenge des anti-VDAC2 Antikörpers von 10 μ g/ml auf 1,25 μ g/ml auch zu einer statistisch signifikanten Verringerung der immotilen Spermatozoen von 62,4 % auf 49,5 %.

Nach Einsatz der affinitätschromatografisch gereinigten Antikörpern gegen die VDAC Isoformen 1 und 3 konnte dies nicht beobachtet werden, was jedoch nicht zwingend den Rückschluss erlaubt, dass VDAC1 bzw. 3 keine Relevanz für die Motilität besitzen.

Möglicherweise konnten bei diesen Versuchen die Antikörper aus sterischen Gründen ihr Antigen nicht erreichen und somit keinen Einfluss auf die Motilität nehmen. In den Experimenten zur Lokalisation der Isoformen konnte gezeigt werden, dass je nach Antikörper sehr unterschiedliche Vorbehandlungen der Spermatozoen notwendig waren, um eine eindeutige Reaktion zu erhalten. In einer Publikation der Arbeitsgruppe von Sampson (2001) wurde außerdem gezeigt, dass VDAC3 knockout Mäuse außer einer Infertilität keine weiteren gesundheitlichen Beeinträchtigungen aufweisen. Diese Infertilität ließ sich auf eine verringerte Spermatozoenmotilität zurückführen, die wiederum auf einen Defekt des Axonems in epididymalen Spermatozoen beruhte. Interessanter Weise war dieser Defekt des Axonems bei testikulären Spermien kaum zu beobachten (Sampson *et al.* 2001). Dies unterstützt die Hypothese, dass VDAC für die Integrität des Zytoskeletts des Flagellums von Bedeutung ist.

Möglicherweise steht der Effekt der anti-VDAC2 Antikörper auf die Spermatozoenmotilität auch mit dem Vorhandensein von VDAC2 in den ODF in Zusammenhang. Genaue Erkenntnisse über die eigentliche Funktion der ODF liegen bisher nicht vor. Wie bereits erwähnt, bestehen die ODF hauptsächlich aus zytoskelettären Proteinen und besitzen keine Membranen. Es ist jedoch in einer Vielzahl von Untersuchungen darüber berichtet worden, dass VDAC mit zytoskelettären Proteinen interagiert. Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAPs) binden *in vitro* an spezifische Stellen der äußeren mitochondrialen Membran von gereinigten Mitochondrien des Gehirns. Dort vermitteln sie eine Verbindung zwischen den Mitochondrien und den Mikrotubuli (Linden *et al.* 1982). MAP2 und VDAC können aus der äußeren mitochondrialen Membran koextrahiert werden. Außerdem verursacht MAP2 Veränderungen in der Umgebung der äußeren mitochondrialen Membran und kann dadurch die Extraktion VDAC teilweise verhindern. Diese Beobachtungen lassen eine Assoziation zwischen VDAC und der Membrandomäne, die für die Verbindung von Mitochondrien und Mikrotubuli verantwortlich ist, vermuten (Linden und Karlsson 1996; Leterrier *et al.* 1994).

Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung von VDAC und den Mikrotubuli stammt aus Untersuchungen von Schwarzer *et al.* (2002). Hier konnte eine Interaktion von VDAC1 mit der leichten Dynein-Kette Tctex 1 gezeigt werden. Tctex 1 ist eine Komponente des Dynein Motorkomplexes und somit in den Transportmechanismus von membranösen Zellorganellen und Proteinkomplexen entlang des Zytoskeletts involviert (Lane und Allan 1998). Tctex Proteine sind auch im Axonem von Mäuse-Spermatozoen vorhanden (Harrison *et al.* 1998).

Da die ODF in direktem Kontakt zum Axonem stehen, welches die leichte Dynein-Kette Tctex 1 und die Mikrotubuli enthält, ist eine Beteiligung von VDAC Proteinen an der

Regulation der Spermienmotilität oder Aufrechterhaltung der Strukturintegrität des Spermatozoenschwanzes durch eine Interaktion mit Tctex Proteinen oder MAPs denkbar.

Es ist auch bekannt, dass VDAC eine ATP-Bindungsstelle besitzt und zum ATP Transport befähigt ist (Florke *et al.* 1994; Rostovtseva und Bezrukov 1998). Eine Hypothese könnte daher sein Eine Hypothese ist daher, dass die VDAC Proteine in den ODF für die Aufrechterhaltung von ATP Levels im Flagellum von Bedeutung sind. Dies könnte den ATP Transport von den Mitochondrien des Mittelstücks bis zu den weit entfernten Dynein ATPasen des Hauptstücks umfassen. Zwar konnte eine anaerobe ATP Produktion im Spermatozoenschwanz gezeigt werden, aber beim Eber führten diese anaeroben Bedingungen zu einem Verlust der progressiven Motilität (Mann und Lutwak-Mann 1982). Daher erscheint eine permanente Versorgung der Dynein ATPasen durch die Mitochondrien in Form von ATP als essentiell für die Spermatozoenmotilität. Aufgrund ihrer nahen Lokalisation zum Axonem lässt sich also eine Art „Batteriefunktion“ für die ODF vermuten. Hiermit ist eine Versorgung des Axonems mit ATP durch die ODF gemeint. Durch ihren relativ hohen Anteil als Flagellumprotein und ihre Fähigkeit zur ATP Bindung und zum ATP Transport wäre es weiterhin denkbar, dass VDAC2 und 3 hieran beteiligt sein könnten.

In jedem Fall lassen die bisherigen Ergebnisse die Aussage zu, dass VDAC2 und 3 in den ODF wahrscheinlich eine andere Funktion haben, als die bisher bekannte Kanalbildung von VDAC (Hinsch *et al.* 2004).

4.5. Die Bedeutung von VDAC für die morphologische Integrität des Akrosoms

Weiterhin konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass alle drei VDAC Isoformen für die morphologische Integrität des Akrosoms von großer Bedeutung sind. So wurde eine Bläschenbildung im Bereich des Akrosoms nach vierstündiger Inkubation mit den affinitätsgereinigten anti-VDAC Antikörpern beobachtet.

Zur Untersuchung der Vitalität sowie des akrosomalen Status wurde eine PSA-FITC/Hoechst 33258 Doppelfärbung durchgeführt (Cross und Meizel 1989). Hier wurde nach der vierstündigen Inkubation mit den affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC Antikörpern ein, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant höherer Anteil an Spermatozoen mit Verlust der akrosomalen Kappe festgestellt.

- Bei den mit anti-VDAC2 (Affi P2/45) behandelten Spermatozoen fiel mit ca. 15% lebend akrosomloser Spermatozoen im Vergleich zur Kontrolle mit ca. 4 % schon nach 2 Stunden ein ausgeprägter Verlust des Akrosoms auf ($p < 0,01$). Die Anzahl der lebenden Spermatozoen ohne Akrosom stieg nach 4 Stunden auf annähernd 17%, was aber eine unwesentliche Steigerung im Vergleich zum 2 Stunden Wert bedeutete.
- Bei den Proben, die mit anti-VDAC1 (Affi P1/6) bzw. mit anti-VDAC3 (Affi P3/31) Antikörpern behandelt wurden, war ebenfalls ein deutlicher Verlust an Akrosomen zu vermerken. Nach einer 4 stündigen Inkubation war nach Zugabe von Affi P1/6 bei ca. 13 % der lebenden Spermatozoen das Akrosom abgelöst ($p < 0,01$), bei Zugabe von Affi P3/31 Antikörpern betrug dieser Anteil ebenfalls ca. 13% ($p < 0,01$).
- Auch bei den Spermatozoen, zu denen der Affi P_{common} Antikörper zugefügt wurde, kam es mit annähernd 14% zu einem signifikanten Akrosomenverlust ($p < 0,01$).

Weitere Experimente zeigten, dass der Effekt von VDAC2 Antikörpern auf den Verlust des Akrosoms dosisabhängig war.

Die hier verwendete Methode (PSA-FITC/Hoechst 33258 Doppelfärbung) dient prinzipiell der Überprüfung des akrosomalen Status von Spermatozoen und kann somit auch zum Nachweis der durch physiologische Induktoren, wie beispielsweise Zona pellucida oder Progesteron hervorgerufene Akrosomreaktion, verwendet werden. Die akrosomale Reaktion ist eine fundamentale Voraussetzung für die erfolgreiche Befruchtung einer Eizelle. Da es aber bisher noch keine eindeutigen Hinweise auf die Beteiligung von VDAC an der physiologisch ablaufenden Akrosomreaktion (AR) gibt, wurde im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Experimenten nicht von „Akrosomreaktion“, sondern allgemein von einem „Akrosomverlust“ gesprochen.

Dennoch lässt sich eine Beteiligung von VDAC an dem physiologischen Vorgang der AR nicht ausschließen. Calogero *et al.* (1999), zeigten, dass Progesteron die AR durch Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor/Cl⁻-Kanal Komplex auslöst, da GABA in Dosis abhängiger Weise die Akrosomreaktion humaner Spermatozoen induziert. Ein möglicher Kandidat für den Cl⁻-Kanal in einem postulierten GABA_A Rezeptor/Cl⁻-Kanal Komplex ist das integrale Membranprotein VDAC. In somatischen Zellen (neuronalen Zellen) wurden GABA_A-Rezeptoren und der Cl⁻-Kanal VDAC kopurifiziert (Bureau *et al.* 1992). VDAC soll Bestandteil von Cl⁻-Kanal Komplexen in der Plasmamembran somatischer Zellen sein, somit ist auch eine Beteiligung dieses Komplexes an der Regulation von Spermatozoenfunktionen denkbar (Asmarinah 2002).

Weiterhin ist denkbar, dass eine Stimulation der AR durch die anti-VDAC Antikörpern auch mit der Aktivierung von VDAC in der Spermatozoenplasmamembran zusammenhängen könnte. Beispielsweise dann, wenn VDAC aktiv an dem Ca^{2+} Einstrom in das Zytosol des Spermatozoons, welcher die AR triggert, beteiligt wäre. Bekannt ist, dass mitochondriales VDAC eine wesentliche Rolle beim Ca^{2+} Efflux aus den Mitochondrien in das Zytosol spielt und es daher wichtig für die Ca^{2+} Homöostase der Zelle ist (Shoshan-Barmatz *et al.* 2006; Shoshan-Barmatz *et al.* 2006). Weiterhin wurde das Vorhandensein von VDAC in den Membranen des endoplasmatischen und des sarcoplasmatischen Reticulums (ER/SR) und die Beteiligung von VDAC beim ATP-Transport in das Lumen des SR demonstriert (Shoshan-Barmatz *et al.* 1996; Shoshan-Barmatz und Israelson 2005). Es wird auch vermutet, dass VDAC an der Aufnahme und der Freisetzung von Ca^{2+} in das SR, einem bekannten Ca^{2+} Speicher, beteiligt ist (Shoshan-Barmatz *et al.* 1996; Shoshan-Barmatz und Israelson 2005). In Spermatozoen wird das Akrosom als intrazellulärer Calciumspeicher diskutiert (Herrick *et al.* 2005; De Blas *et al.* 2002; Herrick *et al.* 2005; De Blas *et al.* 2002). Die Akrosomreaktion wird durch einen Ca^{2+} Einstrom in das Cytosol getriggert, wobei verschiedene, in Spermatozoen bereits beschriebene, Calciumkanäle involviert sein sollen (Yanagimachi 1994; Jimenez-Gonzalez *et al.* 2006; Jimenez-Gonzalez *et al.* 2006).

Obwohl es durch Versuche mit Thapsigargin, einem Inhibitor der sarcoplasmatischen Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), Hinweise auf einen nicht-mitochondrialen intrazellulären Ca^{2+} Speicher in Spermatozoen gibt, konnte das Vorhandensein der SERCA in Spermien bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. In einer 2005 erschienenen Arbeit zeigten Herrick *et al.*, dass in kapazitierten Mauspermatozoen eine Kombination aus Ca^{2+} Efflux aus intrazellulären Speichern (Akrosom) und ein Ca^{2+} Influx durch Plasmamembrankanäle für die AR notwendig sind.

Die Summe dieser Hinweise lässt die Vermutung zu, dass das Akrosom als intrazellulärer Ca^{2+} Speicher in Spermatozoen in ähnlicher Weise funktionieren könnte wie das ER/SR in somatischen Zellen. Somit könnte VDAC in Spermatozoen analog zu seiner Funktion im ER/SR am ATP und Ca^{2+} Transport zwischen Akrosom und Zytoplasma beteiligt sein.

4.6. VDAC im Zusammenhang mit der Volumenregulation von Spermatozoen

Bei der Auswertung des akrosomalen Status wurden einige morphologische Veränderungen im Bereich des Spermatozoenkopfes beobachtet. Um diese Veränderungen näher

klassifizieren zu können, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Bei den Spermatozoen kam es nach Inkubation mit affinitätschromatographisch gereinigten anti-VDAC Antikörpern an der Oberfläche der Köpfe zu unterschiedlich stark ausgeprägte Falten- und Kraterbildungen, zu abgelösten Membranen und aufgerollten Schwänzen. Die Veränderungen der Köpfe und Schwänze wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet. Anti-VDAC2 ($p < 0,001$) und anti-VDAC3 Antikörper ($p < 0,01$) veränderten im Vergleich zur IgG Kontrolle signifikant die Morphologie der Spermatozoenköpfe. Des Weiteren bewirkten die anti-VDAC1 und anti-VDAC2 Antikörper eine signifikante Veränderung des Spermatozoenschwanzes ($p < 0,01$). Diese hier beobachteten Phänomene des Spermatozoenschwanzes wiesen Ähnlichkeiten mit den aufgerollten Flagellaenden auf, die durch hypoosmotische Volumentests hervorgerufen werden. Dies wiederum bekräftigt die Hypothese, dass VDAC möglicherweise in den Vorgang der Volumenregulation von bovinen Spermatozoen involviert sein könnte.

Wenn Zellen in eine hypo- oder hypertotonische Umgebung kommen, neigen sie dazu, zu schwellen bzw. zu schrumpfen - je nachdem, ob Wasser aufgrund des osmotischen Gradienten in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus strömt. Die daraus entstehende Konzentrationsveränderung der intrazellulären Komponenten kann deutlichen Einfluss auf die Zellfunktionen haben (Lang *et al.* 1998). Studien zeigten, dass viele Tierzelltypen ihr Volumen nach einer osmotischen Veränderung aufrechterhalten können und dadurch die Folgen von exzessiven Volumenveränderungen vermeiden (Hoffmann und Dunham 1995).

Gerade das Spermatozoon erfährt frappierende Veränderungen in seiner osmotischen Umgebung, insbesondere während der Reifung im Epididymis und bei der Ejakulation (Cooper 1986; Cooper und Yeung 2003). Aufgrund der hierbei auftretenden hypotonen Veränderung ist die Fähigkeit zur regulatorischen Volumen Verminderung (RVD = regulatory volume decrease) besonders wichtig. So schwellen die Spermatozoen in einer hypotonen Umgebung zunächst an. Als Reaktion hierauf kommt es zu einem Verlust von Cl^- , K^+ , von organischen Osmolyten und dem osmotisch gebundenen Wasser (Kulkarni *et al.* 1997; Petrunkina *et al.* 2001a). Dieser Verlust resultiert in einem wiederhergestellten Zellvolumen - dieser Vorgang wird als RVD bezeichnet.

Wenn die Spermatozoen nicht zur Volumenregulation fähig sind, bleibt die Zelle im angeschwollenen Zustand. Dies manifestiert sich, je nach Spezies, in einem abgewinkelten oder zusammengerollten Flagellum (Cooper und Yeung 2003).

Das bestätigt die Hypothese, dass der Effekt der anti-VDAC1 und 2 Antikörper auf die Spermatozoen mit der Beeinflussung der Volumenregulation in Zusammenhang stehen könnte.

Die Fähigkeiten zur Volumenregulation sind entscheidend für eine natürliche Fertilität. So wurde gezeigt, dass humane Spermatozoen mit eingeschränkter Fähigkeit zur Volumenregulation nicht in der Lage waren, den Mucus zu durchqueren (Yeung und Cooper 2001). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Störung in der Volumenregulation die Ursache für die Infertilität von transgenen Mäusen (*c-ros* Tyrosinkinase knockout Mäuse) war (Yeung *et al.* 2000). Weiterhin wurde eine lineare Korrelation zwischen Veränderungen des humanen Spermiovolumens und simultan gemessenen Veränderungen verschiedener Bewegungsparametern berichtet (Yeung *et al.* 2003). Hierbei kam es nicht zu einer Veränderung in der Summe an motilen Spermatozoen, sondern die so genannte „straight-line velocity“ (VSL) nahm bei zunehmendem Zellvolumen ab. Auch andere Untersuchungen an Spermatozoen verschiedener Spezies führten zur Hypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Volumenregulation und Fertilität geben könnte (Petrunkina *et al.* 2004a; Petrunkina *et al.* 2001b). Im Primatenmodell (*Macaca fascicularis*) konnte gezeigt werden, dass die Spermatozoen während der Reifung im Epididymis ihre Fähigkeit zur Volumenregulation erlangen (Yeung *et al.* 2004).

Verschiedene Untersuchungen beschäftigen sich mit den an der Volumenregulation beteiligten Ionen und den entsprechenden Kanälen. Dennoch ist hierüber bisher relativ wenig bekannt. Kulkarni *et al.* (1997) berichteten vom Vorhandensein nicht-selektiven Poren in bovinen Spermatozoen, durch welche es zur K^+ Freisetzung bei hypotonem Stimulus kommt. Durch Inhibition dieser Kanäle mit Quinin konnte gezeigt werden, dass sie eine wesentliche Rolle bei der Antwort auf ein Anschwellen von bovinen, porcinen und humanen Spermien spielen (Kulkarni *et al.* 1997; Petrunkina *et al.* 2001b; Petrunkina *et al.* 2001b; Petrunkina *et al.* 2001a; Yeung und Cooper 2001). Da bei dem Efflux der K^+ Ionen jedoch die elektrochemische Neutralität aufrechterhalten bleibt, muss es zu einem gleichzeitigen Ausstrom von Anionen kommen. Hierfür werden vor allem Cl^- Ionen verantwortlich gemacht. Eine Bestätigung für das Vorhandensein von Cl^- Kanälen brachten Untersuchungen von Petrunkina *et al.* (2004a). Die molekulare Identität dieser Kanäle ist jedoch noch unklar. Als mögliche Kandidaten werden ClC-3 und ClC-2 Kanäle favorisiert (Jentsch *et al.* 2002). Diese Kanäle interagieren wiederum mit verschiedenen anderen Proteinen (Jin *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Weylandt *et al.* 2001).

In einer weiteren Untersuchung wurde festgestellt, dass ein intaktes Zytoskelett eine wesentliche Voraussetzung für die Volumenregulation von Eberspermatozoen ist (Petrunkina *et al.* 2004b). Spermatozoen, die in der Gegenwart von Zytochalsin B, welches zur Zerstörung des Zytoskeletts führt, unter kapazitierenden Bedingungen inkubiert wurden, zeigten am Ende der Inkubationszeit eine verringerte Fähigkeit zur Volumenregulation. Das mikrofilamentäre Netzwerk scheint also wichtig für die Volumenregulation zu sein, wo hingegen intakte Mikrotubuli für eine osmotisch induzierte RVD offenbar nicht notwendig sind. Denn eine Inkubation mit Colchicin, welches zur Zerstörung der Mikrotubuli führt, zeigte keine veränderte Volumenregulation der Spermien.

Im Gegensatz zu Spermatozoen wurde für andere Zellen schon ein Zusammenhang zwischen VDAC und der Volumenregulation gezeigt. So konnte für gesunde B-Lymphozyten und HeLa-Zellen bereits eine Bedeutung von VDAC im Zusammenhang mit der Volumenregulation demonstriert werden (Thinnes *et al.* 2000b; Thinnes *et al.* 2000a). Hier konnte durch Zugabe von anti-hVDAC1 Antikörpern spezifisch die in isotoner Kochsalzlösung durch Gadolinum induzierte Volumenzunahme inhibieren. Darüber hinaus konnte bei HeLa-Zellen nach hypotoner Stimulation die sich normalerweise anschließende Volumenabnahme auf den Ausgangszustand (RVD) durch die Präinkubation der Zellen mit hVDAC1 Antikörpern blockiert werden.

Von anderen Untersuchern wird vermutet, dass VDAC ein Teil des Maxi-Cl⁻-Kanals sein könnte und somit über den Cl⁻ Strom Einfluss auf die Volumenregulation nehmen könnte (Bahamonde *et al.* 2003). Neueste Untersuchungen zeigten jedoch, dass keine Korrelation zwischen der Expression einer der drei Isoformen von VDAC Protein und der Maxi-Cl⁻-Kanal-Aktivität besteht und es sich daher um unabhängige Proteine handeln muss (Sabirot *et al.* 2006). Somit wurde die langjährige Hypothese, dass der Maxi-Cl⁻-Kanal die Plasmamembranform von VDAC darstellt, widerlegt. Diese Studie widerspricht jedoch nicht der Möglichkeit eines Vorhandenseins von VDAC in der Plasmamembran (Sabirot *et al.* 2006).

Eine Untersuchung von Okada *et al.* (2004) zeigte, dass das initiale Anschwellen von trachealen und nasalen Epithelzellen als Reaktion auf hypotone Stimulation bei VDAC1 knockout Mäusen und den Wildtyp Mäusen gleich war. Aber die VDAC1 knockout Mäuse zeigten eine signifikant langsamere RVD als die Zellen der Wildtyp-Mäuse. Es wurde geschlussfolgert, dass VDAC1 eine physiologische Rolle bei der RVD-Antwort auf hypotone Stimulation spielt, in dem VDAC1 extrazelluläres ATP freisetzt.

Wie bereits erwähnt, wurde bisher kein Zusammenhang zwischen VDAC und der Volumenregulation von Spermatozoen in der Literatur beschrieben. Um unsere Hypothese zu bestätigen, wurden daher in Kooperation mit Frau Dr. Petrunkina von der Tierärztlichen Hochschule in Hannover Experimente vorgenommen (Triphan *et al.* 2007). Es wurde die Reaktion des Zell-Volumens boviner Spermatozoen nach Zugabe der in dieser Arbeit charakterisierten und verwendeten anti-VDAC Antikörper untersucht. Dabei hatte sich gezeigt, dass der Antikörper gegen VDAC1 schon nach 10 Minuten eine Tendenz zu einer Veränderung des Spermatozoenvolumens zeigte. Nach 120 Minuten Inkubation hatten die Spermatozoen, die mit dem anti-VDAC1 Antikörper inkubiert wurden, ein signifikant größeres Zellvolumen als die Kontrollen (Puffer und Präimmenserum). Die Antikörper gegen VDAC2 und VDAC3 zeigten unter diesen experimentellen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf das Zellvolumen.

Sowohl diese Ergebnisse als auch die Erkenntnislage aus der Literatur bekräftigen die Hypothese, dass zumindest VDAC1 einen Einfluss auf die Volumenregulation boviner Spermatozoen haben könnte.

4.7. Abschließende Betrachtung

Es ist mit dieser Arbeit erstmals gelungen, subtypspezifische anti-VDAC Antikörper für jede der drei VDAC Isoformen zu generieren, zu reinigen und zu charakterisieren.

Mit Hilfe dieser Antikörper gelang es, das Vorhandensein von VDAC1 im Kopfbereich boviner Spermatozoen und die Beteiligung von VDAC2 bei essentiellen Funktionen des Spermatozoons wie der Motilität zu zeigen. Weiterhin konnte eine Beteiligung von VDAC an der strukturellen Integrität des Akrosoms demonstriert werden und Hinweise zu einer möglichen Beteiligung von VDAC an der Volumenregulation boviner Spermatozoen gesammelt werden. Eine These dieser Arbeit ist daher, dass die Inkubation boviner Spermatozoen mit anti-VDAC Antikörpern zu Veränderungen in der intrazellulären Ionenzusammensetzung führt. Dies könnte wiederum Veränderungen des Zellvolumens und daraus folgend eine Destabilisation des Zytoskeletts und letztlich den Verlust der akrosomalen Kappe und eine verringerte Motilität bewirken. Zur Untermauerung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen zur Rolle von VDAC bei der Volumenregulation boviner

Spermatozoen notwendig. Auch sind weiterführende Versuche geplant, um zu klären, welche Ionen hierbei involviert sind und wie VDAC *in vivo* reguliert wird.

Des Weiteren wurde mit dieser Arbeit erstmals das Vorkommen von VDAC2 und VDAC3 in den ODF des Spermatozoons demonstriert. Dies ist zugleich das erste Mal, dass eine extramembranäre Lokalisation von VDAC beschrieben wurde. Die mögliche Funktion von VDAC in den ODF wurde diskutiert, ist aber zurzeit nur hypothetisch. Zur Klärung dieser Frage sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig.

5. Zusammenfassung

VDAC (voltage-dependent anion channel) ist ein kleines, Poren-formendes Protein, welches synonym als Porin bezeichnet wird. Es kommt sowohl in Bakterien, als auch in der äußeren mitochondrialen Membran sowie in der Plasmamembran somatischer Zellen vor.

Die Ziele dieser Arbeit waren 1.) Reinigung spezifischer anti-VDAC Antikörper und deren Charakterisierung bezüglich ihrer Affinität und ihrer Isoform-Spezifität, 2.) Lokalisation von VDAC1, 2, und 3 in bovinen ejakulierten Spermatozoen und 3.) Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von VDAC für die Spermatozoenmotilität und bezüglich des akrosomalen Status mit Hilfe der anti-VDAC Antikörper.

Die Spezifität der Antikörper wurde durch Immunoblots mit rekombinantem VDAC1, 2 und 3 überprüft. Soweit bekannt, sind mit dieser Arbeit die ersten mono-spezifischen AK gegen alle drei VDAC Isoformen charakterisiert worden.

Die immunzytochemischen Untersuchungen zeigten, dass VDAC1 im akrosomalen Bereich und in der fibrösen Hülle des Flagellum-Hauptstücks lokalisiert werden konnte. VDAC2 wurde im Flagellum und VDAC3 in den Mantelfasern (ODF = outer dense fibers) detektiert. Die Präsenz von VDAC2 und 3 in den ODF konnte mit Hilfe des Immunoblots bestätigt werden. Alle drei VDAC Isoformen konnten somit in bovinen Spermatozoen lokalisiert werden und zwar wie beschrieben in unterschiedlichen Kompartimenten. Der Nachweis von VDAC2 und 3 in den ODF ist zugleich der erstmalige Nachweis von VDAC in einer nicht membranären Struktur. Dies lässt die Hypothese zu, dass es sich bei VDAC nicht nur um ein Kanal bildendes Protein handeln könnte und es in ODF eine andere Funktion als in Mitochondrien oder Plasmamembranen haben könnte.

Die Analyse der Spermatozoenmotilität zeigte nach Inkubation mit anti-VDAC2 Antikörper eine statistisch signifikante Abnahme der Gesamtmotilität. Für diesen Effekt konnte eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit gezeigt werden.

Weiterhin riefen alle drei anti-VDAC Antikörper unterschiedlich stark ausgeprägte morphologische Veränderungen im akrosomalen Bereich des Kopfes hervor: Nach 4h Inkubation zeigte sich ein höherer Verlust an intakten Akrosomen im Vergleich zur Kontrolle. VDAC scheint somit wichtig für die Spermatozoenmotilität und die morphologische Integrität des Akrosoms zu sein.

In der Rasterelektronenmikroskopie konnten die durch anti-VDAC Antikörper hervorgerufene Veränderungen der Spermatozoenköpfe in Form von Membranablösungen und einer

Bläschenbildung im Bereich des Akrosoms bestätigt werden. Die distalen Anteile des Flagellums waren häufig eingerollt. Dies sind Hinweise darauf, dass VDAC in die Volumenregulation von Spermatozoen involviert sein könnte.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die die physiologische Bedeutung von VDAC in Spermatozoen näher zu definieren.

6. Summary

VDACs (voltage-dependent anion channels) or porins are small pore-forming proteins first identified in outer mitochondrial membranes. VDAC was also found in bacterial membranes as well as in the plasma membrane of somatic cells.

The aims of this study were 1) to purify and subsequently characterise specific anti-VDAC antibodies, 2) to localise VDAC1, 2 and 3 in ejaculated bovine spermatozoa and 3) to determine the effect of anti-VDAC antibodies upon bovine sperm function, e.g. motility and acrosomal status.

The specificity of the antibodies was demonstrated by immunoblotting using recombinant VDAC1, 2 and 3. The results obtained in this thesis revealed that monospecific antibodies for all three VDAC isoforms were generated. Immunofluorescence microscopy suggests that VDAC1 protein is present in the sperm acrosome and in the fibrous sheath of the flagellum. The data showed that anti-VDAC2 and anti-VDAC3 antibodies bound to the sperm flagellum, in particular to the ODF (= outer dense fibers). The presence of VDAC2 and 3 in ODF was strengthened by immunoblotting results. All three VDAC isoforms could be identified in bovine spermatozoa and were located in different sperm compartments. Extra membranous localisation of VDAC2 and 3 in the ODF of the sperm flagellum could be demonstrated for the first time. We propose that VDAC might have different physiological functions in ODF than in mitochondria or cell plasmamembranes.

Sperm motion analysis after incubation with anti-VDAC2 antibodies yielded a decrease of sperm motility. A dose-dependency could be demonstrated for this effect.

After incubation of spermatozoa with anti-VDAC antibodies it could be observed that antibodies against all three VDAC isoforms caused morphological alterations at the acrosome that finally led to an acrosomal loss.

These morphological changes of the acrosome observed in light microscopy studies could be confirmed by scanning electron microscopical studies. Furthermore, morphological alterations of the sperm tail were apparent. "Pig tail"-like structures at the tip of the flagellum, commonly seen when spermatozoa are subjected to hypoosmotic conditions, suggest that VADAC might be involved in sperm volume regulation.

It can be concluded that VDAC Isoformes in bovine spermatozoa are involved in regulation of different sperm functions, e.g. the maintenance of acrosomal integrity and possibly in sperm volume regulation. However, the potential functional roles of VDACs in spermatozoa need to be evaluated further and will be subject of future scientific investigations.

7. Literaturverzeichnis

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

Abrecht H, Wattiez R, Ruysschaert JM, Homble F. Purification and characterization of two voltage-dependent anion channel isoforms from plant seeds. 2000. 1181-90.

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

Ali A, Virirak KT, Benkhalifa M, Miron P. Essential role of platelet-activating factor in male reproduction: a review. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 250-255.

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

Arnoult C, Villaz M, Florman HM. Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 1104-1111.

Asmarinah. Lokalisation und Relevanz von Porin Subtypen im bovinen Hoden. Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen; 2002. 1-96.

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

Babel D, Walter G, Gotz H. 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.

Bahamonde MI, Fernandez-Fernandez JM, Guix FX, Vazquez E, Valverde MA. Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated maxi Cl^{-} currents in C1300 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 33284-33289.

Baldi E, Falsetti C, Krausz C. Stimulation of platelet-activating factor synthesis by progesterone and A23187 in human spermatozoa. *Biochem J* 1993; 292: 209-216.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 121-131.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1996; 1: d189-d205.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* 2000; 5: E110-E123.

- Bathori G, Parolini I, Szabo I. Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 79-89.
- Bathori G, Parolini I, Tombola F. Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* 1999; 274: 29607-29612.
- Bedford J.M. Morphological aspects of sperm capacitation in mammals. *Schering Symp Adv Biosci* 1969; 4: 35-48.
- Benz R. Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1988; 42: 359-393.
- Benz R, Brdiczka D. The cation-selective substate of the mitochondrial outer membrane pore: single-channel conductance and influence on intermembrane and peripheral kinases. 1992. 33-9.
- Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 112-117.
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368: 7-18.
- Bielfeld P, Faridi A, Zaneveld LJ, De Jonge CJ. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases. *Fertil Steril* 1994; 61: 536-541.
- Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC channels. *IUBMB Life* 2001; 52: 113-118.
- Blachly-Dyson E, Song J, Wolfgang WJ, Colombini M, Forte M. Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5727-5738.
- Bonaccorsi L, Krausz C, Pecchioli P, Forti G, Baldi E. Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C-independent. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 259-268.
- Bonaccorsi L, Luconi M, Forti G, Baldi E. Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm. *FEBS Lett* 1995; 364: 83-86.
- Brackett BG, Hall JL, Oh YK. In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertil Steril* 1978; 29: 571-582.
- Breitbart H, Naor Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod* 1999; 4: 151-159.
- Breitbart H, Rubinstein S, Etkovitz N. Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252: 247-249.

- Brewis IA, Moore HD, Fraser LR. Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Hum Fertil (Camb)* 2005; 8: 253-261.
- Brito M. Phosphoproteins are structural components of bull sperm outer dense fiber. *Gamete Res* 1986; 15: 327-336.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3201-3206.
- Bureau MH, Khrestchatsky M, Heeren MA. Isolation and cloning of a voltage-dependent anion channel-like Mr 36,000 polypeptide from mammalian brain. *J Biol Chem* 1992; 267: 8679-8684.
- Burks DJ, Carballada R, Moore HD, Saling PM. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 1995; 269: 83-86.
- Calogero AE, Burrello N, Ferrara E, Hall J, Fishel S, D'Agata R. Gammaaminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil Steril* 1999; 71: 930-936.
- Casadio R, Jacoboni I, Messina A, De Pinto V. A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett* 2002; 520: 1-7.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
- Chang MC. Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature* 1955; 175: 1036-1037.
- Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003; 301: 513-517.
- Cooper TG. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilisation*. Springer Verlag, Berlin, Berlin pp.; 1986.
- Cooper TG, Yeung CH. Physiologie der Spermienreifung und Fertilisation. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrologie*. Berlin: Springer; 2000. p. 69-90.
- Cooper TG, Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 28-38.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 2002; 84: 143-152.
- Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 1989; 41: 635-641.
- Dalvit. Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. *Theriogenology* 1996; 44: 1051-1058.
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006; 131: 977-988.

- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 1999; 79: 481-510.
- De Blas G, Michaut M, Trevino CL. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 49326-49331.
- De Jonge CJ, Barratt CL, Radwanska E, Cooke ID. The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* 1993; 14: 359-365.
- De Pinto V, Prezioso G, Palmieri F. A simple and rapid method for the purification of the mitochondrial porin from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1987; 905: 499-502.
- Decker WK, Craigen WJ. The tissue-specific, alternatively spliced single ATG exon of the type 3 voltage-dependent anion channel gene does not create a truncated protein isoform in vivo. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 69-74.
- Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H. Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1999; 61: 1226-1234.
- Eddy E, O'Brien D. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JH, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd.; 1994. p. 29-78.
- Endo Y, Lee MA, Kopf GS. Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 1987; 119: 210-216.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; 109: 129-135.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer-Petersen E. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol Reprod*. 1998;58(4):1057-64.
- Fabbri R, Porcu E, Lenzi A, Gandini L, Marsella T, Flamigni C. Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1998; 69: 112-117.
- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975; 44: 394-436.
- Fisch JD, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod* 1998; 13: 1248-1254.
- Florke H, Thinnes FP, Winkelbach H. Channel active mammalian porin, purified from crude membrane fractions of human B lymphocytes and bovine skeletal muscle, reversibly binds adenosine triphosphate (ATP). *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375: 513-520.
- Foster JA, Friday BB, Maulit MT, Blobel C, Winfrey VP, Olson GE, Kim KS, Gerton GL. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse

- sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J Biol Chem.* 1997; 272(19):12714-22.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56: 707-719.
- Garcia M, Meizel S. Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigations of T-type calcium channels. *Biol Reprod* 1999; 60: 102-109.
- Gincel D, Shoshan-Barmataz V. Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36: 179-186.
- Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson CE, Gawdi G, Pizzo SV. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 27312-27318.
- Guarino F, Specchia V, Zapparoli G. Expression and localization in spermatozoa of the mitochondrial porin isoform 2 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 665-670.
- Harrison A, Olds-Clarke P, King SM. Identification of the t complex-encoded cytoplasmic dynein light chain tctex1 in inner arm II supports the involvement of flagellar dyneins in meiotic drive. *J Cell Biol* 1998; 140: 1137-1147.
- Harrison RA. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 581-594.
- Heins L, Mentzel H, Schmid A, Benz R, Schmitz UK. Biochemical, molecular, and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria. 1994. 26402-10.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 2005; 202: 663-671.
- Hickox JR, Bi M, Hardy DM. Heterogeneous processing and zona pellucida binding activity of pig zonadhesin. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41502-9.
- Hinsch E, Boehm JG, Groeger S, Mueller-Schloesser F, Hinsch KD. Identification of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibre fractions. *Reprod Domest Anim* 2003; 38: 155-160.
- Hinsch KD, Asmarinah, Hinsch E, Konrad L. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518: 329-333.
- Hinsch KD, De Pinto V, Aires VA, 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.
- Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 2001; 519-526.

Hoffmann E, Dunham P. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cyt* 1995; 161: 173-262.

Huizing M, Ruitenbeek W, Thinnes FP. Deficiency of the voltage-dependent anion channel: a novel cause of mitochondriopathy. *Pediatr Res* 1996; 39: 760-765.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-568.

Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 253-267.

Jin N, Kim J, Yang D. Fundamental role of CIC-3 in volume sensitive Cl⁻ channel function and cell volume regulation in AGS cells. *Am J Physiol* 2003; 285: G938-G948.

Kanitz vW. Biologische Grundlagen der Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. *Züchtungskunde* 1994.

Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM, editor. *Elements of mammalian Fertilization*. Boca Raton: CRC Press, Inc.; 1991. p. 153-203.

Kopf GS, Woolkalis MJ, Gerton GL. Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J Biol Chem* 1986; 261: 7327-7331.

Kottke M, Adam V, Riesinger I. Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points of hexokinase and creatine kinase location, and control of Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 1988; 935: 87-102.

Krimmer T, Rapaport D, Ryan MT. Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J Cell Biol* 2001; 152: 289-300.

Kulkarni S, Sauna Z, Somlata V, Sitaramam V. Volume regulation of spermatozoa by quinine-sensitive channels. *Mol Reproduction & Development* 1997; 46: 535-550.

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

Lane J, Allan V. Microtubule-based membrane movement. *BBA Rev Biomembr* 1998; 1376: 27-55.

Lang F, Busch G, Ritter M. Functional significance of cell volume regulatory mechanism. *Physiol Rev* 1998; 78: 247-306.

Leclerc P, Gagnon C. Phosphorylation of Triton X-100 soluble and insoluble protein substrates in a demembrated/reactivated human sperm model. *Mol Reprod Dev* 1996; 44: 200-211.

Leclerc P, Kopf GS. Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol Reprod* 1995; 52: 1227-1233.

Lefievre L, De Lamirande E, Gagnon C. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl* 2000; 21: 929-937.

Leterrier JF, Rusakov DA, Nelson BD, Linden M. Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. 1994. 233-61.

Liberatori S, Canas B, Tani C. Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. *Proteomics* 2004; 4: 1335-1340.

Linden M, Gellerfors P, Nelson BD. Purification of a protein having pore forming activity from the rat liver mitochondrial outer membrane. *Biochem J* 1982; 208: 77-82.

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

Llanos M, Ronco A, Aguirre M, Meizel S. Hamster sperm glycine receptor: evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 205-215.

Luconi M, Baldi E. How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2003; 49: 357-369.

Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; 55: 207-216.

Ludwig O, De P, V, Palmieri F, Benz R. Pore formation by the mitochondrial porin of rat brain in lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1986; 860: 268-276.

Mann T, Lutwak-Mann C. Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. 1982. 1-14.

Marquez B, Suarez SS. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca²⁺ Influx. *Biol Reprod* 2006.

Melendrez CS, Meizel S. Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol Reprod* 1995; 53: 676-683.

Melendrez CS, Meizel S, Berger T. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 433-438.

Mihara K, Sato R. Molecular cloning and sequencing of cDNA for yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein: a search for targeting signal in the primary structure. 1985. 769-74.

- Okada S, O'neal W, Huang P. Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP-release and cell volume regulation in murine cells. *J Gen Physiol* 2004; 124 (5): 513-526.
- Oko R. Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1988; 39: 169-182.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 2000; 92: 255-266.
- Petrunkina AM, Harrison RA, Ekhlesi-Hundrieser M, Topfer-Petersen E. Role of volume-stimulated osmolyte and anion channels in volume regulation by mammalian sperm. *Mol Hum Reprod* 2004a; 10: 815-823.
- Petrunkina A, Harrison R, Hebel M, Weitze K, Töpfer-Petersen E. Role of quinine sensitive channels in boar and bull sperm volume regulation. *Reprod* 2001a; 122: 327-336.
- Petrunkina A, Hebel M, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reprod* 2004b; 127: 105-115.
- Petrunkina A, Petzoldt R, Stahlberg S. Sperm cells volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with non-return rate. *Andrologia* 2001b; 33: 360-367.
- Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 2002; 296: 2183-2185.
- Roldan ER. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 1998; 3: D1109-D1119.
- Rosenberger G. *Die klinische Untersuchung des Rindes*. Blackwell; 1990.
- Rostovtseva T, Colombini M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1996; 271: 28006-28008.
- Rostovtseva T, Colombini M. VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J* 1997; 72: 1954-1962.
- Rostovtseva TK, Bezrukov SM. ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J* 1998; 74: 2365-2373.
- Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parcy, Berlin/Hamburg; 1991.
- Sabirov RZ, Sheiko T, Liu H, Deng D, Okada Y, Craigen WJ. Genetic demonstration that the plasma membrane maxi-anion channel and voltage-dependent anion channels are unrelated proteins. *J Biol Chem* 2006; 281: 1897-1904.
- Saling PM, Sowinski J, Storey BT. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. 1979. 229-38.
- Sampson MJ, Decker WK, Beaudet AL. Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem* 2001; 276: 39206-39212.

- Sampson MJ, Lovell RS, Craigen WJ. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J Biol Chem* 1997; 272: 18966-18973.
- Schein SJ, 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.
- Schwarzer C, Becker S, Awni LA. Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1075-1084.
- Shoshan-Barmataz V, Gincel D. The Voltage-Dependent Anion Channel. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2003; 39: 279-292.
- Shoshan-Barmatz V, Hadad N, Feng W. VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett* 1996; 386: 205-210.
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol* 2005; 204: 57-66.
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2249-2270.
- Si Y, Okuno M. Regulation of microtubule sliding by a 36-kDa phosphoprotein in hamster sperm flagella. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 328-334.
- Sinowatz F, Plendl J, Kolle S. Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat (Basel)* 1998; 161: 196-205.
- Snell WJ, White JM. The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 1996; 85: 629-637.
- Tesarik J, Carreras A, Mendoza C. Single cell analysis of tyrosine kinase dependent and independent Ca²⁺ fluxes in progesterone induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 225-232.
- Thinnes FP, Gotz H, Kayser H. 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 FP, Hellmann KP, Hellmann T. 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 FP, Hellmann KP, Hellmann T. 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 FP, Hilschmann N, Kayser H, Gotz H. Is the HLA-DR associated glycoprotein p31 a ubiquitous molecule? *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1983; 364: 1805-1811.

- Thinnes FP, Schmid A, Benz R, Hilschmann N. Studies on human porin. III. Does the voltage-dependent anion channel "Porin 31HL" form part of the chloride channel complex, which is observed in different cells and thought to be affected in cystic fibrosis? *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990; 371: 1047-1050.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
- Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, Cassara MC, Wemheuer W, Hinsch KD, Hinsch E. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflugers Arch* 2007.
- Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 2002; 84: 187-193.
- Turner KO, Meizel S. Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 774-780.
- Turner KO, Syvanen M, Meizel S. The human acrosome reaction is highly sensitive to inhibition by cyclodiene insecticides. *J Androl* 1997; 18: 571-575.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995a; 121: 1129-1137.
- Visconti PE, Johnson LR, Oyaski M. Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1997; 192: 351-363.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995b; 121: 1139-1150.
- Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 1999; 61: 76-84.
- Vyssokikh M, Brdiczka D. VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease. *Mol Cell Biochem* 2004; 256-257: 117-126.
- Wang G-X, Hatton W, Wang G. Functional effects of novel CIC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells. *Am J Physiol* 2003; 285: H1453-H1463.
- Ward CR, Kopf GS, Storey BT. Solubilization and partial purification from mouse sperm membranes of the specific binding activity for 3-quinuclidinyl benzilate, a potent inhibitor of the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 1994a; 39: 423-432.
- Ward CR, Storey BT, Kopf GS. Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* 1994b; 269: 13254-13258.
- Wassarman M. Die Besamung des Säuger-Eies. *Spektrum der Wissenschaft* 1989.

- Wassarman PM. Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 658-664.
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234: 95-103.
- Weeber EJ, Levy M, Sampson MJ. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *J Biol Chem* 2002; 277: 18891-18897.
- Weylandt K, Valverde MA, Nobles M. Human CIC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 17461-17467.
- Wu S, Sampson MJ, Decker WK, Craigen WJ. Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1452: 68-78.
- Xu X, Decker W, Sampson MJ, Craigen WJ, 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 JG, Colombini M. Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *J Membr Biol* 2001; 180: 73-81.
- Yamamoto T, Yamada A, Watanabe M. VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *J Proteome Res* 2006; 5: 3336-3344.
- Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd.; 1994. 189-317.
- Yeung CH, Anapolski M, Depenbusch M, Zitzmann M, Cooper TG. Human sperm volume regulation. Response to physiological changes in osmolality, channel blockers and potential sperm osmolytes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1029-1036.
- Yeung CH, Barfield J, Anapolski M, Cooper TG. Volume regulation of mature and immature spermatozoa in a primate model, and possible ion channels involved. *Hum Reprod* 2004; 19: 2587-2593.
- Yeung CH, Cooper TG. Effects of the ion-channel blocker quinine on human sperm volume, kinematics and mucus penetration, and the involvement of potassium channels. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 819-828.
- Yeung CH, Wagenfeld A, Nieschlag E, Cooper TG. The cause of infertility of *c-ros* tyrosine kinase knockout male mice. *Biol Reprod* 2000; 63: 612-618.
- Yoo BC, Fountoulakis M, Cairns N, Lubec G. Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Electrophoresis* 2001; 22: 172-179.
- Zalk R, Israelson A, Garty ES, Azoulay-Zohar H, Shoshan-Barmatz V. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2005; 386: 73-83.

8. Anhang

8.1. Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Triphan, geb. Schneider
Vorname:	Xenia
Adresse:	Gutenbergstr. 6 35584 Wetzlar
Geburtsdatum:	02. 11. 1979
Geburtsort:	Wetzlar
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, Ehemann Jörg Triphan, Medizinstudent
Werdegang:	
1985 – 1990:	Grundschule Wetzlar-Naunheim
1990 – 1996:	Kestnerschule Wetzlar
1996 – 1999:	Goetheschule Wetzlar
	08.06.1999 Allgemeine Hochschulreife
10/99 – 11/06:	Studium der Humanmedizin an der JLU Gießen
	31.08.2001 Ärztliche Vorprüfung
	29.08.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	06.09.2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	10/2005 - 09/2006 Praktisches Jahr:
	- Innere Medizin, Klinikum Wetzlar
	- Pädiatrie, Uni-Klinikum Gießen
	- Chirurgie, Spital Stans, Schweiz
	21.11.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/02 - 09/05:	Mitglied des DFG-Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ der Universitäten Gießen und Marburg
10/02 - 03/04:	DFG-Doktorandenstipendium im Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ der Universitäten Gießen und Marburg
seit 12/2006	Assistenzärztin für Innere Medizin in der Medizinischen Klinik I Wetzlar der Lahn-Dill-Kliniken GmbH

8.2. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. E. Hinsch sowie Herrn Prof. Dr. K.- D. Hinsch für die umfassende Betreuung meiner Dissertationsarbeit und insbesondere ihrer Diskussionsbereitschaft, den zahlreichen Anregungen und nicht zu letzt ihrem persönlichen Interesse.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. V. Menzel für die fachliche Betreuung und ihr immerwährendes Engagement. Sie stand mir im Laboralltag mit innovativen Vorschlägen zur Seite und half bei der Suche nach alternativen Methoden.

Bei Experimenten, die nicht in unserem Labor durchgeführt werden konnten, wurde ich durch Mitarbeiter anderer Institute unterstützt. Hier gilt mein Dank Frau Dammshäuser aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, der Universität Marburg für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie. Herrn Magdowski vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Giessen danke ich für die Unterstützung bei der Rasterelektronenmikroskopie.

Ein grosses Dankeschön für die motivierenden und Unterstützenden Gespräche auch an alle Mitarbeiter des Labors: Rina, Katja, Stefan, Carolina, Yvonne, Doro und Heidi.

Zum Schluss möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium erst ermöglichten, zu jeder Zeit voll und ganz hinter mir standen und immer an mich geglaubt haben. Ebenso vielen Dank an Jörg, der mich durch Höhen und Tiefen des Doktorandenlebens geduldig begleitet und durch sein stetiges Verständnis und seine liebevolle Unterstützung bei der Arbeit motiviert hat.

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

8.3. Veröffentlichung von Originalarbeiten im Rahmen der Doktorarbeit

Hinsch KD, De Pinto V, Aires VA, **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.

Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, Cassara MC, Wemheuer W, Hinsch KD, Hinsch E.

Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa.

Pflugers Arch. 2008 Jan;455(4):677-86. Epub 2007 Jul 24.

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.

Giessen im Oktober 2007