

Aus dem
Zentrum für Dermatologie und Andrologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Lokalisation und Relevanz von Porin Subtypen im bovinen Hoden

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Asmarinah
aus Jakarta, Indonesien

Gießen, 2002

Dekan : Prof. Dr. J. Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Clauß

2. Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Hinsch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2003

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

Wahrlich, in der Schöpfung der Himmel und der Erde und
in dem Wechsel der Nacht und des Tages,
liegen wahre Zeichen für die Verständigen,
die Allahs gedenken im Stehen und im Sitzen und (Liegen) auf ihren Seiten
und über die Schöpfung der Himmel und der Erde nachdenken
(Qur'an, Sura Al-Imran, 189-190)

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes, demineralisiertes Wasser
AR	Akrosomreaktion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
-COOH	Carboxyterminus
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
xg	Erdbeschleunigung
H258	bis-Benzimide, Hoechst 33258
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NH ₂ -	Aminoterminal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasenkettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tris	Tetra-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumeneinheit)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumeneinheit)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Porine	4
1.2	Grundlagen der Befruchtung	4
1.2.1	Spermatogenese und Spermiogenese	5
1.2.2	Spermatozoen Funktionen und Reifung.....	6
1.2.2.1	Motilität	7
1.2.2.2	Akrosomreaktion	7
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	9
2	Methoden	10
2.1	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	10
2.1.1	Bovines Hodenmaterial	10
2.1.2	Spermatozoen.....	10
2.2	RT-PCR (Polymerasenkettenreaktion nach reverser Transkription) aus bovinem Hodenmaterial.....	11
2.2.1	mRNA Isolierung	11
2.2.2	Auswahl der Primers	14
2.2.3	RT-PCR Reaktion	15
2.2.4	DNA Gelelektrophorese.....	17
2.3	Sequenzierung der Porin 2 cDNA	18
2.4	<i>In situ</i> Hybridisierung	18
2.4.1	Herstellung der Paraffinschnitte.....	19
2.4.2	Herstellung der Ribosonden von Porin 1 und 2	20
2.4.2.1	Linearisierung des Plasmids	21
2.4.2.2	Extraktion und Fällung des linearisierten Plasmides	22
2.4.2.3	Markierung der Ribosonden	22
2.4.2.4	Bestimmung der Ribosondenkonzentration.....	23
2.4.3	Durchführung der <i>in situ</i> Hybridisierung	23
2.5	Herstellung von anti-Porin-Antikörpern	25
2.5.1	Auswahl der Peptide	25
2.5.2	Polyklonale Antiseren	26
2.6	Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von Porin 1 und 2-Protein..	28
2.7	Affinitätschromatographische Reinigung der anti-Porin-Antikörper	28
2.7.1	Herstellung der affinitätschromatographischen Säulen	28
2.7.2	Reinigung der Antikörper	29
2.8	Charakterisierung der Antiseren und der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper	29
2.8.1	Titerbestimmung mit Hilfe des Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA).....	29
2.8.2	Proteinbestimmung	30
2.9	Immunbiochemischer Nachweis von Porin in bovinen Spermatozoen	30
2.9.1	Extraktion boviner Spermatozoenproteine	30
2.9.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	30
2.9.3	Western Blot	31
2.9.4	Immunlogischer Nachweis von Porin und Chemilumineszenzverfahren.....	31
2.10	Immuncytochemische Untersuchungen an bovinen Spermatozoen	33

2.11	Einfluss von anti-Porin 2 Antikörpern auf die Funktion boviner Spermatozoen.....	34
2.11.1	Motilitätsparameter	34
2.11.1.1	Computerassistierte Samenanalyse (<i>Computer Assisted Semen Analysis-CASA</i>)	34
2.11.1.2	Motilitätsmessung boviner Spermatozoen nach Zugabe von anti-Porin 2 Antikörper.....	35
2.11.2	Vitalitätsuntersuchung und Evaluierung des akrosomalen Status von bovinen Spermatozoen nach Zugabe von anti-Porin 2 Antikörper	35
2.12	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Untersuchungsmaterial	38
3.1.1	Bovines Hodenmaterial	38
3.1.2	Spermatozoen.....	38
3.1.3	mRNA Isolierung.....	38
3.2	RT-PCR aus bovinem Hodenhomogenat.....	38
3.2.1	Expression der Porin 1, 2 und 3 mRNA in bovinem Hoden	38
	Expression der Porin 1 und 2 mRNA in Hodenzelllinien	41
3.3	Bestimmung der bovinen Porin 2 cDNA Sequenz	43
3.4	<i>In situ</i> Hybridisierung	45
3.4.1	Ribosonde Porin 1 und 2	45
3.4.2	Lokalisation von Porin 1 mRNA in bovinem Hoden	46
3.4.3	Lokalisation von Porin 2 mRNA in bovinem Hoden	47
3.5	Nachweis von Porin 1 und Porin 2 Protein in bovinem Hodengewebe mit Antiseren... 48	
3.5.1	Bestimmung der Antiserentiter im ELISA	49
3.5.2	Immunbiochemische Untersuchungen mit anti-Porin Antikörpern an Proteinextrakten aus bovinen Spermatozoen.....	51
3.5.3	Immunhistochemische Untersuchungen	53
3.5.3.1	Lokalisation des Porin 1 Proteins in bovinem Hoden.....	53
3.5.3.2	Lokalisation des Porin 2 Proteins in bovinem Hoden.....	54
3.6	Immunzytologische Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenz an bovinen Spermatozoen	55
3.7	Reinigung der anti-Porin Antikörper durch eine affinitätschromatographische Säule 56	
3.7.1	Charakterisierung der affinitätschromatographisch gereinigte anti-Porin Antikörper	57
3.7.2	Proteinkonzentration der affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin 1 und anti Porin 2 Antikörper	57
3.7.3	Bestimmung des Antikörpertiters der affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin 1 und anti-Porin 2 Antikörper im ELISA	57
3.8	Einfluss der anti-Porin 2 Antikörper auf die Funktion boviner Spermatozoen	59
3.8.1	Einfluss der anti- Porin 2 Antikörper auf die Motilität boviner Spermatozoen.....	59
3.8.2	Einfluss der anti-Porin 2 Antikörper auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen.....	60
4	Diskussion	63
4.1	Porin.....	63
4.2	Nachweis und Lokalisation von Porin in Spermatozoen	68
4.3	Die Bedeutung von Porin für die Beweglichkeit der Spermatozoen	70
4.4	Der Einfluss von Porin auf die akrosomale Exozytose des Spermatozoons	72
4.5	Nachweis und Lokalisation von Porin 1 und 2 mRNA in bovinem Hoden.....	76
4.5.1	Genexpression während der Spermatogenese	76
4.5.2	Aufbau des Detektionssystems für den Nachweis der Expression von Porin Subtypen durch die RT-PCR.....	78
4.5.3	Nachweis von Porin mRNA in Zellisolaten und Zellkulturen sowie in bovinem Hodengewebe. 79	
4.5.4	Etablierung der <i>in situ</i> Hybridisierungstechnik zum Nachweis der Expression von Porin Subtypen	81
4.5.5	Lokalisation der Porin Subtypen 1 und 2 mRNA mittels <i>in situ</i> Hybridisierung	82

4.6	Nachweis von Porin Subtypen 1 und 2 Proteinen im bovinen Hoden.....	83
5	Zusammenfassung	85
6	Summary.....	86
7	Literaturverzeichnis	87
A.	Danksagung	97
B.	Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit	98
B.1	Originalarbeiten	98
B.2	Publizierte Abstrakts	98
C.	Lebenslauf.....	99

1 Einleitung

1.1 Porine

Porine sind spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC, voltage dependent anion channel). VDACs sind mit 3 Isoformen in Mitochondrien von Säugetierzellen nachgewiesen worden. Die Porin Subtypen weisen innerhalb ihrer Familie ausgeprägte Sequenzhomologien auf; deutliche Unterschiede gibt es aber im Vergleich der Gen-Sequenzen von Bakterien, Pflanzen und Tieren. Funktionell dient bakterielles Porin dazu, den Stoffaustausch zwischen dem Bakterium und seiner Umgebung zu regulieren (Benz, 1994; Blachly-Dyson und Forte, 2001). Im Bakterium ist die Pore für Stoffwechselprodukte und Nährstoffe bis zu einer Molekularmasse von 600 Dalton durchlässig (Nikaido, 1994). VDACs, die in Eukaryoten nachgewiesen wurden, haben im Gegensatz zu bakteriellen Porinen eine Ausschlussgrenze von etwa 3000 Dalton; sie unterstützen den Metabolitaustausch zwischen Mitochondrien und Cytosol (Benz, 1988). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Porine nicht nur in der äußeren Mitochondrienmembran sondern auch in der Plasmamembran nachzuweisen sind (Bathori et al., 2000; Reymann et al., 1995; Thinner, 1992).

Über das Vorkommen und die Funktion von Porinen im Hoden der Säugetiere ist nur sehr wenig bekannt. Da Porin in somatischen Zellen als Anionenkanal eine wichtige Rolle bei der Apoptose zu spielen scheint, kann es möglicherweise für die Regulation des programmierten Zelltodes während der Spermatogenese von Bedeutung sein (Hinsch et al., 2001; Tsujimoto und Shimizu, 2002). Porine könnten auch bei der Induktion der Akrosomreaktion von Säugetierspermatozoen eine Rolle spielen. Zwei Evidenzen sprechen für diese Vermutung: a) Die Aktivität von Progesteron aktivierten GABA_A Rezeptoren könnte als Proteinkomplex über Porin als Cl⁻ Kanal analog zum Nervensystem für die Regulation der Akrosomreaktion relevant sein (Meizel, 1997) und b) eine im Spermatozoonkopf identifizierte Hexokinase kann ähnlich wie in somatischen Zellen als Komplex mit Porin funktionell eine Rolle spielen (Visconti et al., 1996).

1.2 Grundlagen der Befruchtung

Die Befruchtung von Eizellen stellt das Ergebnis komplexer Interaktionen von Spermatozoen und Oocyten dar. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Imprägnation, das aktive Eindringen des Spermatozoonkerns in die Eizelle. Dieser Vorgang beginnt mit der festen Bindung des Spermatozoons an die Eizelle umgebende Zona pellucida. Die Bindung des

Spermatozoons an die Eizelle und die Akrosomreaktion sind entscheidend für eine erfolgreiche Befruchtung. Als Konsequenz durchdringt das Spermatozoon die Zona pellucida, und es kommt zur Fusion der Gameten (Yanagimachi, 1994).

1.2.1 Spermatogenese und Spermiogenese

Zur Bildung eines funktionsfähigen Spermatozoons im Hoden durchläuft die Zelle verschiedene Stufen eines komplexen Reifungsprozesses (Bergmann, 1998). Bei der Bildung der männlichen Gameten in den Hoden wird zwischen der Spermatogenese und der Spermiogenese unterschieden. Die Spermatogenese beinhaltet den gesamten Entwicklungsprozeß, der im Hoden des Säugetiers zur Bildung von elongierten Spermatiden führt; diese haben sich aus den Spermatogonien (hervorgegangen aus den männlichen Urkeimzellen), die über einen diploiden Chromosomensatz verfügen, entwickelt. Die primären Spermatozyten mit einem tetraploider Chromosomensatz werden nach der ersten Reifeteilung definitionsgemäß zu sekundären Spermatozyten, die einen diploiden Chromosomensatz haben, und die nach einer zweiten Reifeteilung als Spermatiden (mit einem haploidem Chromosomensatz) bezeichnet werden. Die Differenzierung von runden Spermatiden in reife Spermatozoen wird als Spermiogenese bezeichnet. Während der Spermiogenese führt der Austausch DNA-bindender Histone gegen Protamine zu einer Zunahme der Chromatinkondensation und schließlich zu einem Stopp der Transkription. Dies resultiert in einer stadienspezifischen Expression von mRNA und Protein, die durch eine für haploide Spermatiden typische Trennung von Transkription und Translation charakterisiert ist. Morphologisch führt die Spermiogenese zur Kernkondensation, zur Akrosombildung aus dem Golgi-Apparat und zur Bildung der Geißel aus den Zentriolen durch Wachstum der Axoneme; die fertige Geißel besteht aus dem Halsstück (enthält die Zentriolen), einem Mittelstück (enthält viele Mitochondrien), dem Hauptstück und dem Endstück (nur noch von einem Plasmalemm umgebenes Axonem). Testikuläre Spermatozoen sind infertil und erlangen erst während der Passage durch den Nebenhoden die Fähigkeit zur Vorwärtsbewegung. und erst dann sind sie in der Lage die Proteine der Zona pellucida zu erkennen und diese zu durchdringen. Ein wichtiger Aspekt des Reifungsprozesses ist die Tatsache, dass sämtliche Veränderungen der Spermien-Oberfläche nach Verlassen der Hoden nicht auf der Neusynthese von Membranproteinen beruhen, sondern stets auf die Modifikation und Umstrukturierung bereits bestehender Membranproteine zurückzuführen sind (Myles und Primakoff, 1997).

Von Bedeutung während der Reifung von Spermatozoen im Hoden sind physiologische Vorgänge, die zum programmierten Zelltod, der Apoptose, führen. Diese Zelluläre Eliminationsvorgänge treten bevorzugt in Geweben mit hohem Zellumsatz auf, da alte und funktionsunfähige Zellen beseitigt werden müssen, um Platz für neu gebildete zu machen. Eine besondere Bedeutung hat die Apoptose bei der Selektion von Keimzellen (Eizellen und Spermien). Jede krankhafte Veränderung im genetischen Material dieser Zellen würde sich unweigerlich auf die Nachkommen übertragen. Hier ist ein besonders strenges Kontrollsystem erforderlich. Daher degenerieren im Hoden des Säugetieres auch rund 75% der Keimzellen vor dem Erreichen ihrer Reife und werden resorbiert. Das genaue Vorkommen apoptotischer Vorgänge in adulten männlicher Keimzellen ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, insbesondere deshalb, weil nicht alle degenerierenden Keimzellen klassische Anzeichen von Apoptose aufweisen (Print und Loveland, 2000)

1.2.2 Spermatozoen Funktionen und Reifung

Nach Reifung, Ejakulation und aktiven Passieren des weiblichen Genitaltraktes wird infolge der Bindung des Spermatozoons an die Eizelle die akrosomale Reaktion ausgelöst. Das Akrosom ist im vorderen Kopfbereich des Spermatozoons lokalisiert und stellt ein mit proteolytischen Enzymen angefülltes Hohlorganell dar. Während der Akrosomreaktion verschmilzt die äußere akrosomale Membran mit der Plasmamembran des Spermatozoons und führt so zur Freisetzung der im Akrosom enthaltenen Enzyme. Die damit initiierte Proteolyse von Eiweißen, die das Zona pellucida-Netzwerk formieren, ermöglicht es dem Spermatozoon, die Zona pellucida zu penetrieren und die Plasmamembran der Eizelle zu erreichen (Primakoff und Myles, 2002; Yanagimachi, 1994).

In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf die Bedeutung von Porin in der Spermatozoenentwicklung und -funktion. In Analogie zu anderen Geweben, kann Porin einen Einfluss auf den Ablauf apoptotischer Prozesse während der Spermatogenese haben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Porin eine funktionelle Bedeutung für die Beweglichkeit des Spermatozoons und für die Regulation der Akrosomreaktion (akrosomaler Status und Induzierbarkeit) hat.

1.2.2.1 Motilität

Da die Spermatozoen den weiblichen Genitaltrakt bis in die Tubae durchwandern müssen, ist die Beweglichkeit der Spermatozoen eine unerlässlich für die Befruchtung der Eizelle. Die Spermatozoenmotilität ist abhängig a) von der strukturellen Integrität des Flagellums und b) von der durch die Mitochondrien in Form von ATP zugeführten Energie für die aktive Bewegung des Spermatozoenschwanzes (Cooper und Yeung, 2000; Yanagimachi, 1994). Während der mechanische Ablauf der Motilität über das im Axonem befindliche cytoskelläre System grundlegend erforscht wurde, ist über die molekulare Regulation von Flagellenbewegungen bisher wenig bekannt. Im Bereich der Speichenköpfe, die die Zentraltubuli mit den peripheren Tubulidoubletten verbinden, konnte histochemisch eine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (Alberts et al., 1990). Kalzium scheint keinen direkten Einfluss zu haben, wohingegen Phosphodiesterasehemmstoffe die Beweglichkeit stimulieren (Fisch et al., 1998; Lefievre et al., 2000)). So kann der Schluss zugelassen werden, dass cAMP als *second messenger* einen direkten Einfluss auf die Bewegung des Flagellums ausübt.

Neuste Ergebnisse mit „*knock-out* Mäusen“ weisen darauf hin, dass spezifische Porin Subtypen eine wichtige funktionelle Rolle bei der Beweglichkeit von Spermatozoen spielen. In der Maus sind bisher die cDNA von drei Porin Subtypen (VDAC1-3) isoliert worden. Bei VDAC1 „*knock-out* Mäusen“ wurde eine stamm-spezifische partielle Sterblichkeit und eine respiratorische Insuffizienz beschrieben (Blachly-Dyson und Forte, 2001). In Untersuchungen an männlichen VDAC3 $-/-$ Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Tiere zwar lebensfähig aber steril waren. Wildtyp (mVDAC3 $+/+$) bzw. heterozygoten Mäuse (mVDAC3 $-/+$) wiesen Spermatozoen mit einer Beweglichkeit von ca. 70% auf; im Gegensatz dazu wurden nur 17 % der Spermatozoen, von mVDAC3 $-/-$ -Tieren als freibeweglich klassifiziert. (Sampson et al., 2001). Der Phänotyp einer Maus-VDAC2 „*knock-out* Maus“ wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

1.2.2.2 Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion ist der Endpunkt eines obligatorischen Reifungsprozesses des Spermatozoons; als Konsequenz kommt es zur Durchdringung der Zona pellucida (ZP) der Eizelle und zur Fusion der Gameten. Die akrosomale Exocytose und die damit verbundene Freisetzung proteolytischer akrosomaler Enzyme wird nach Anlagerung des Spermatozoons

an die Zona pellucida induziert (Saling und Storey, 1979). Das ZP3-Protein ist der „Agonist“ für einen oder mehrere noch nicht eindeutig identifizierte Rezeptoren der Spermatozoenmembran. Über die nachfolgenden Mechanismen der transmembranären Signaltransduktion und der Regulation der Akrosomreaktion ist wenig bekannt. Die ZP3-induzierte Akrosomreaktion wird durch ein Pertussistoxin-sensitives G Protein (wahrscheinlich G_i) moduliert (Kopf, 1987).

Die Induktion der akrosomalen Exocytose durch Progesteron (Osman et al., 1989) erfolgt über eine alternative Signaltransduktionskaskade, in der keine Pertussistoxin-sensitiven G Proteine eingeschaltet sind (Tesarik et al., 1993). Nachgeschalteter „second messenger“ ist Ca^{2+} , dessen Konzentration im Cytosol der Spermatozoen nach Inkubation mit Progesteron ansteigt (Schuffner et al., 2002; Thomas und Meizel, 1988). Ein Signaltransduktionsweg über pharmakologisch und biochemisch identifizierte nicht-genomische Progesteronrezeptoren in der Plasmamembran der Samenzellen ist von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden (Baldi et al., 1999; Falkenstein et al., 1999; Gadkar et al., 2002; Rathi et al., 2003). Das Steroid Progesteron wird deshalb als Ligand für einen noch nicht identifizierten $GABA_A$ -ähnlichen Rezeptor in Spermatozoenmembranen diskutiert. In neuronalen Zellen sind $GABA_A$ -Rezeptoren und der Cl^- -Kanal Porin als Proteinkomplexe biochemisch angereichert worden (Bureau et al., 1992). Diese Cl^- Kanäle sind elektrophysiologisch den Porinen der mitochondrialen Außenmembran ähnlich. Porin könnte somit in der Spermatozoenplasmamembran dem Cl^- -Kanal des $GABA_A$ Rezeptor/ Cl^- -Kanal Komplexes entsprechen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der Nachweis und die Lokalisation von Porin (VDAC) Subtypen während der Spermatogenese und Spermiogenese sowie deren Bedeutung für Regulation von Spermatozoenfunktionen sind bisher weitestgehend unbekannt.

Ziel des Forschungsprojektes war es somit, die Expression von Porinen im bovinen Hoden und in ejakulierten Spermatozoen zu untersuchen und deren mögliche physiologische Relevanz für die molekularen Mechanismen der Regulation der Akrosomreaktion und der Motilität aufzudecken. Im einzelnen wurden folgende konkrete Zielstellungen definiert:

- Die Porin Subtypen 1 und 2 sollten mittels spezifischer Antikörper im bovinen Hoden nachgewiesen und lokalisiert werden.
- Die Expression von Porin Subtypen 1 und 2 mRNA im Zellen des Bullenhodens war zu identifizieren und zu lokalisieren.
- Mit Hilfe von anti-Porin Antikörpern sollte die funktionelle Bedeutung von Porin für die Akrosomreaktion und für die Motilität der Samenzelle untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

2.1.1 Bovines Hodenmaterial

Es wurde bovines Hodengewebe von adulten Bullen aus dem Schlachthof Giessen verwendet. Das entnommene Gewebe wurde in einer Kühlbox umgehend zum Labor transportiert. Dort erfolgte mit Hilfe einer sauberen Schere die Zerkleinerung des Gewebes in ca. 1cm³ große Stücke. Ein Teil der Gewebestücke wurde sofort in Bouin's-Fixierungslösung oder Methacarn- Fixierungslösung, der andere Teil in flüssigen Stickstoff (Harsco, Husam) bis zur Weiterverarbeitung verbracht. Das in der Bouin- oder Methacarn- Lösung fixierten Hodengewebe wurde für *in situ* Hybridisierungsversuche bzw. für immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Aus dem in flüssigem Stickstoff gelagerten Hodengewebe wurde mRNA isoliert und anschließend eine RT-PCR zum Nachweis von Porin mRNA durchgeführt..

Bouin's-Fixierungslösung

15 ml gesättigte Pikrinsäurelösung, 5 ml 37% Formaldehyd, 1 ml 100% Essigsäure

Methacarn-Fixierungslösung

60% v/v Methanol, 30% v/v Trichlormethan, 10% v/v Essigsäure 100%

2.1.2 Spermatozoen

Für die Untersuchungen wurden kryokonservierte, bovine Spermatozoen von geschlechtsreifen Zuchtbullen der „Zentralen Besamungsunion Hessen“ verwendet. Das Untersuchungsmaterial wurde uns in Portionen mit jeweils 20x10⁶ Spermatozoen in 200µl Verdünner von Herrn Dr. Müller-Schlösser zur Verfügung gestellt. Zur Gewinnung der Spermatozoen wurden die Proben zuerst in 38°C warmem Wasser für 30 Sekunden aufgetaut. Anschließend wurde das aufgetaute Sperma in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®, Becton Dickinson Labware, New Jersey) überführt und mit 2 ml HAM's F-10/1% BSA versetzt. Zur Entfernung des Seminalplasmas wurde das Untersuchungsmaterial 5 min bei 300xg zentrifugiert (Heraus Minifuge, Hanau). Der Überstand wurde abgezogen und verworfen, das Sediment in 2 ml HAM's F-10/1% BSA resuspendiert und der Waschschrift wiederholt. Um hauptsächlich motile Spermatozoen für die nachfolgenden Untersuchungen zu erhalten, wurde anschließend das sogenannte „Swim-up-Verfahren“ durchgeführt: Das die Spermatozoen enthaltende Sediment wurde hierbei mit 300 µl HAM's F-10/1% BSA

überschichtet und für 45 min in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Motile Spermatozoen, die sich in diesem Zeitintervall in den Überstand bewegten, wurden gewonnen und in den beschriebenen Experimenten verwendet. Die Konzentration der Spermatozoen (von ca. 20 Mio./ml bis ca. 30 Mio./ml) wurde mit Hilfe eines Computerassistierten Samenanalyse-Systems (CASA) (*Mika Medical Cell Motion Analyser*, Montreaux) bestimmt.

HAM'S F10 Zellkulturmedium

100 ml Nutrient Mixture F-10 HAM, 0,5 ml 200mM L-Glutamin,
1 ml Penicilin/Streptomycinslösung, 0,3% Bovines Serum Albumin

Kryopreservanz für Spermatozoen

Andromed[®] (Firma Minitüb, Tiefenbach)

2.2 RT-PCR (Polymerasenkettenreaktion nach reverser Transkription) aus bovinem Hodenmaterial

Um zu überprüfen, ob Porin Subtypen mRNA in bovinem Hoden exprimiert werden, wurde das Prinzip der RT-PCR Methode angewandt. RNA kann nach Umschreibung durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA, mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Die dabei entstandenen RNA-DNA-Heteroduplexe dienen als Ausgangsmaterial für eine Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerasenkettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaktion*). Die PCR ist eine *in vitro* Technik zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragments aus Desoxyribonukleinsäure (DNA, *deoxyribose nucleic acid*), das zwischen zwei Genomregionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt (Mullis und Faloona, 1987).

2.2.1 mRNA Isolierung

Gesamt-mRNA wurde aus Hodenzellen mit Hilfe von, an Magnetkügelchen gebundenem d(T)₂₅-biotin + streptavidin des MPG[®] Streptavidin Systems (*MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit*, CPG[®], Inc, Natutec, Frankfurt) isoliert. Das Isolierungsschema ist in Abb.1 dargestellt.

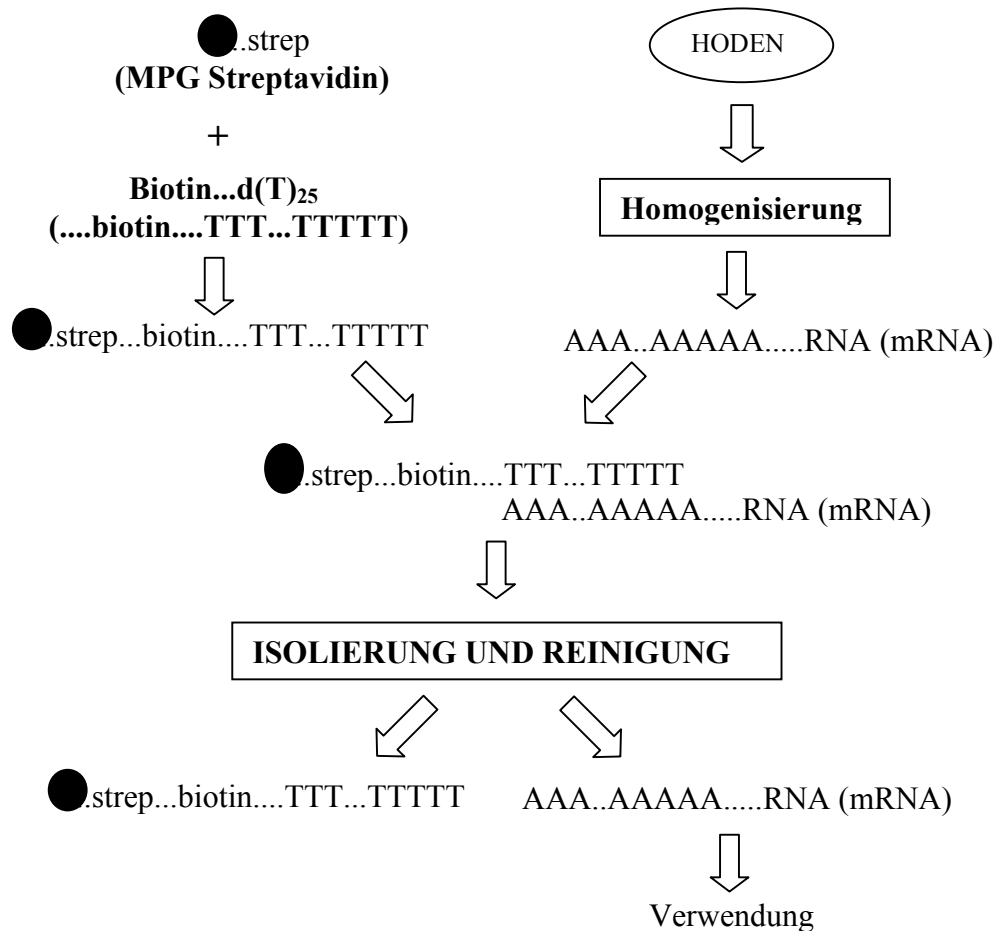


Abbildung 1. Schematische Darstellung der mRNA Isolierung durch das MPG-Guanidine Streptavidin System (modifiziert von CPG[®] MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit). ● Magnetkügelchen.

Die Isolierung erfolgte in 3 Schritten:

1. Vorbereitung des MPG Streptavidin Oligo d(T)₂₅

Zuerst wurden die an Streptavidin gebundenen Magnetkügelchen (MPG)-Lösung auf Raumtemperatur gebracht und mit einem Mischer (Benden & Hobein, Zürich) gemischt. Davon wurden 100 µl (1mg MPG Streptavidin) in ein 1,5 ml Nuclease-freies Reaktionsgefäß (Sarstedt) pipettiert, das mit Streptavidin gekoppelte MPG wurde mit Hilfe eines Magnetpartikelseparators (CPG[®] MPG, Natutec) 3 min lang magnetisch von der Lösung getrennt. Der erhaltene Überstand wurde verworfen. Die am Reaktionsgefäß haftenden Partikel wurden mit 100 µl *Probe Binding* Puffer resuspendiert, wieder magnetisch getrennt und der Überstand wiederum abgenommen. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Dann wurden 10 µl biotiningekoppeltem Oligo d(T)₂₅, 90 µl *Probe Binding* Puffer zugegeben. Diese Lösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gemischt, magnetisch getrennt (3 min) und der

Überstand verworfen. Das Biotin-Oligo d(T)₂₅ gekoppelte MPG Streptavidin wurde in *Probe Wash* Puffer in Suspension gebracht, gemischt, für 3 Minuten magnetisch getrennt und der Überstand abpipettiert. Dieser Waschschrift wiederholte sich zwei Mal. Die Partikel wurden danach mit 100 µl Gewebsextraktions- oder Hybridisierungspuffer resuspendiert und bis zum Einsatz in die dann folgenden Experimente bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2. Homogenisierung des Hodengewebes

Das im flüssigen Stickstoff gelagerte Hodengewebe wurde in Stickstoff mit einem sauberen Mörser pulverisiert. In das 4,5 ml Gewebsextraktions- bzw. Hybridisierungspuffer und 15 µl β-Mercaptoethanol enthaltende Nuclease-freie 15 ml Röhrchen wurde 0,25g Hoden-Gewebe-Pulver gegeben und durch mehrfaches Aufziehen in einer sterilen 5 ml Spritze (Braun, Melsungen) bestückt mit einer 20G Nadel (Neoject, Gelnhausen) über 2 Minuten homogenisiert. Das Hodenhomogenat wurde bei 13.800xg 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im nächsten Schritt weiterverarbeitet.

3. Direkte Isolierung der mRNA

Das vorbereitete Biotin-Oligo d(T)₂₅ gekoppelte MPG Streptavidin (Endschritt No. 1) wurde magnetisch von der Lösung getrennt, die lösliche Phase abpipettiert und 1,0 - 1,5 ml des Homogenats (Schritt No. 2) zu den verbleibenden Magnetpartikeln gegeben. Diese Suspension wurde 3 min bei Raumtemperatur gut gemischt und magnetisch (5 min) getrennt. Der Überstand wurde abgenommen. Die an der Wand des Reaktionsgefäßes haftenden nun mit mRNA gekoppelten Oligo d(T)₂₅-MPG Streptavidin Partikel wurden mit 1,0 -1,5 ml des Homogenats aus Schritt No. 2 wieder resuspendiert, 3 min gemischt, und über 5 min magnetisch voneinander getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt bis das Homogenat aus Schritt No.2 verbraucht war. Die MPG Streptavidin Partikel wurden mit *Hybridization Wash* Puffer drei Mal gewaschen, anschließend mit 20 µl *Release Solution* resuspendiert, gemischt und bei 65°C für 2 min in einem Wasser- und Ölbad (Memmert, Schwabach) erwärmt. Die Lösung wurde magnetisch getrennt und der Überstand vorsichtig in ein neues nuklease-freies Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, und die mRNA enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

Zur Langzeitlagerung der mRNA wurde die Lösung (ca. 40 µl) mit 100 µl Ethanol (absolut) und 15 µl 3M Natrium Azetat (pH 5,2) versetzt. Diese Lösung wurde gemischt und bei -80°C über 30 min zur Fällung belassen. Anschließend wurde die Probe bei 4°C und 13.800xg für

30 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge, Hanau). Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment luftgetrocknet, in nuklease-freiem Wasser und 1 µl RNase-Inhibitor resuspendiert, und bei -20°C gelagert.

Gewebeextraktions- oder Hybridisierungs- Puffer für mRNA Isolierung

100 mM Tris, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT, pH 8,0

Hybridisation Wash Puffer für mRNA Isolierung

10 mM Tris, 150 mM LiCl, 1mM EDTA, pH 8,0

Probe Binding Puffer für mRNA Isolierung

1 M KCl, pH 8,0

Probe Wash Puffer für mRNA Isolierung

2 M NaCl, pH 8,0

Release Solution für mRNA Isolierung

2 mM EDTA, pH 8,0

2.2.2 Auswahl der Primers

Die Oligonukleotide beeinflussen im hohen Maße den Erfolg einer PCR. Für die Auswahl der Primer wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Die Länge der Primer sollte 18 bis 35 Nukleotide umfassen.
- Die Basenzusammensetzung der Primer, das heißt der G/C-Gehalt sollte bei ca. 30-60% liegen
- Längere komplementäre Bereiche zwischen den Primern sollten vermieden werden, da sie zur Bildung von Primer-Dimeren führen können. Hierbei sind insbesondere die 3'- Enden der Primer als kritische Bereiche zu betrachten.
- Primer-Sequenzen mit signifikanten Sekundärstrukturen sollten vermieden werden.

Aus der VDAC1 mRNA Sequenz des Homo Sapiens (Acc. No. AF268464) wurden Primer für Porin 1 (Position 49-72, Position 655-674) ausgewählt (Tab.1). Die so von den Primern eingeschlossene Sequenz betrug 636 Basenpaare. Für Porin 2 wurden 3 Primerpaare ausgesucht, um die gesamte cDNA Sequenz von Porin 2 im bovinen Hoden zu ermitteln. Das erste Primerpaar für Porin 2 (P2A) wurde aus dem mehr am 5' Ende gelegenen Bereich der 1404 Nukleotide umfassenden VDAC2 mRNA Sequenz des Homo Sapiens (Acc. No. NM_003375 Position 62-79, Position 496-514) ausgewählt (Tab.1). Die von den Primern

eingeschlossene Sequenz betrug 453 Basenpaare. Das zweite Primerpaar für Porin 2 (P2M) wurde aus dem mittleren VDAC2 mRNA Sequenzbereich des Homo sapiens aber überlappend mit dem 3'-Ende des ersten Amplikons abgeleitet (Position 356-376 und Position 743-762) (Tab.1). Die von den Primern eingeschlossene Sequenz betrug 407 Basenpaare. Das dritte Primerpaar für Porin 2 (P2E) wurde aus dem 3' Endbereich der VDAC2 mRNA Sequenz und zwar, 22 Nukleotide umfassend in Position 721-742 sowie 22 Nukleotide umfassend von Position 1093-1114 abgeleitet (Tab.1); diese waren, ebenfalls überlappend mit dem 3'-Ende des vorhergehenden Amplikons. Die von den Primern eingeschlossene Sequenz betrug 394 Basenpaare. In Tabelle 1 aufgeführt ist das Primerpaar für Porin 3. Die Primer wurden aus der Mitte (Position 232-254, Position 445-467) der 1414 Nukleotide langen VDAC3 mRNA Sequenz des Homo Sapiens (Acc. No. NM_005662) ermittelt. Die von den Porin3-Primern eingeschlossene Sequenz betrug 237 Basenpaare.

	Bezeichnung	Primersequenz	Position	Größe (bp)
Porin 1	P1	5'-GTCTTCACCAAGGGCTATGGATTT 5'-CTGATACTTGGCTGCTATTCCGAA	49-72 655-674	636
Porin 2	P2A	5'-CATGGCGACCCACGGACA 5'-CCATGGATTGCAGGTCCAG	62-79 496-514	453
	P2M	5'-TGAAGACCAGATTGTCAAGG 5'-CTGCAATGCCAAAAGGAGTG	356-376 743-762	407
	P2E	5'-CTTGGACATCAGGTACCAACTG 5'-AACCAGCTAACAAGAAGTCTGTC	721-742 1093-1114	394
Porin 3	P3	5'-GGTCATGCTTACACTGATACAGG 5'-AAACAATCCCGTTTATAGGAGGC	232-254 445-467	237

Tabelle 1. Darstellung der verwendeten Primerpaare für die RT-PCR zum Nachweis der Expression von Porin 1, 2 und 3 mRNA im bovinen Hodenhomogenat.

2.2.3 RT-PCR Reaktion

Um RNA in DNA umzuschreiben, benötigt die Reverse Transkriptase, ähnlich wie die DNA-Polymerase, einen Primer in Form eines kurzen, an die RNA angelagerten Oligonukleotids. Diese Primer können eine spezifische, eine zufällige Sequenz (*Random-Primer*) haben oder als Oligo-d(T)_n vorliegen und sind meist zwischen 6 und 20 Nukleotide lang.

Es wurden 10 µl mRNA Lösung, 2 µl dNTP (jeweils 5mM) (GeneCraft, Münster), 2 µl 10x Transkriptions-Puffer (Qiagen, Hilden), 2µl Oligo d(T)₁₅ (5 mM) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 1 µl RNase Inhibitor (40 units, Stratagene, La Jolla, USA), 1 µl Reverse Transkriptase Enzym (Omniskript RT-ase 4 U/µl, Qiagen, Hilden) und 2 µl nuklease-freies Wasser (Qiagen, Hilden) in einem Endvolumen von 20 µl in einem 0,5 µl PCR Gefäß

(Biozym, Oldendorf) angesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C für eine Dauer von 60 min in einem *Peltier Thermal Cycler* (MJ Research, Watertown) durchgeführt.

Jede PCR stellt eine wiederholte Abfolge von Zyklen dar, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht:

1. Trennung des DNA-Doppelstranges (Denaturierung)

Durch Erhitzen auf eine Temperatur ca. 95°C werden die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen durch Hitze zerstört werden.

2. Anlagerung (*Annealing*)

Zwei Primer lagern sich über die Wasserstoffbrückenbindungen an die DNA-Einzelstränge an. Sie werden so ausgewählt, dass sie komplementär zum 5'- bzw. zum 3'-Ende der Zielsequenz sind. Die Anlagerungstemperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer. Zur Berechnung der Anlagerungstemperatur (T_a) bedient man sich folgender Faust-Formel:

$$T_a = [4x(\text{Anzahl G+C}) + 2x(\text{Anzahl A und T})] - 5^\circ\text{C}$$

3. Verlängerung (*Elongation*)

Die Primer dienen als Startpunkte für die DNA-Polymerase, die die matrizenabhängige Synthese des komplementären zweiten Stranges katalysiert. Diese thermostabile Polymerase ergänzt ausgehend vom 3'-Ende der an die Ziel-DNA gebundenen Primer die einzelsträngige Matrize durch Einbau der vier Nukleotide im Sinne einer komplementären Basenpaarung zu einen Doppelstrang. Die optimale Verlängerungstemperatur des Enzyms liegt bei ca. 72°C. Die Zyklen werden 25 bis maximal 35 mal wiederholt.

Es wurden 2 µl cDNA Lösung aus der RT-Reaktion, 5 µl NH₄ Puffer (10x, PAN Biotech, Aidenbach), 2 µl MgCl₂ (50 mM, PAN Biotech, Aidenbach), 1 µl dNTP (12,5 mM) (GeneCraft, Münster) und je 1 µl der zwei Primer (100 pmol/ml) (MWG Biotech, Ebersberg), 0,5 µl DNA Polymerase (PAN Taq Polymerase 5 U/µl, PAN Biotech, Aidenbach), und 37,5 µl Wasser im Endvolumen von 50 µl PCR-Reaktionsgemisch angesetzt. Die Denaturierungstemperatur betrug 94°C für 4 min und 94°C über 45 sec, die Anlagerungstemperatur lag bei 50°C (Porin 1 Primerpaare), 55°C (P2A = Porin 2 Anfang), 55°C (P2M = Porin 2 Mitte), 50°C (P2E = Porin 2 Ende), und 65°C (Porin 3 Primerpaare) für 45 sec, und die Elongation erfolgte bei einer Temperatur von 72°C für 1 min 30 sec bei 34 Durchgängen. Nach 34-Zyklen wurde eine Schlussverlängerung bei einer Temperatur von

94°C für 45 sec, einer entsprechenden Anlagerungstemperatur für 45 sec und bei 72°C für 5 min durchgeführt..

Um zu untersuchen in welchen Hodenzellen Porin 1 und 2 mRNA exprimiert werden, wurde eine RT-PCR aus Zellextraktionen verschiedener Maus- und Ratten-Hodenzelllinien mit den Primerpaaren Porin 1 (P1) und Porin 2 (P2E) durchgeführt. Die cDNA aus den unterschiedlichen Maus-Hodenzelllinien, „germ cell 1“(GC1) und „germ cell 2“ (GC2) (Hofmann und Millan, 1998; Wolkowicz et al., 1996), wie auch Ratten-Peritubulärzellen (PZ), primäre Ratten-Sertolizellen (SZ) (Konrad et al., 2000), immortale Ratten-Peritubulärzellen (RTC-8T12; (Hoeben et al., 1995; Roberts et al., 1995), und immortale Ratten-Sertolizellen ASC-17D (Roberts et al., 1995), SCIT-C8 (Konrad et al., unveröffentlicht) und SC-93RS2 (Jiang et al., 1997) wurden vom Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

2.2.4 DNA Gelelektrophorese

Zur Auswertung der PCR wurde eine DNA Gelelektrophorese durchgeführt. Das Produkt einer PCR-Reaktion besteht aus einem DNA-Fragment mit einer spezifischen Länge und Sequenz. Durch Auftrennung des PCR Produkts der Größe nach Basenpaaren (bp) in einem Agarose-Gel, kann das gesuchte Fragment identifiziert werden. Die Detektion erfolgt mittels eines dem Gel beigefügten Fluoreszenzfarbstoffs, z.B. Ethidiumbromid (EtBr). Interkaliert dieser in doppelsträngige DNA, kann das DNA-Stück im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Es wurde ein 1,5%-iges Agarose-Gel (Gibco, Hamburg) in TBE-Puffer zur Identifizierung der gewünschten Bandengröße zwischen 300 und 1000 Basenpaaren von Porin 1 cDNA (636), und 3 verschiedenen cDNA Fragmenten von Porin 2 (453 bp, 407 bp und 394 bp) eingesetzt, sowie ein 1,8%iges Agarose-Gel in TBE-Puffer für den Nachweis der cDNA Fragmente von Porin 3 (237 bp). Die Agarose wurde gekocht, auf ca. 70°C gekühlt, mit 5 µl 0,1 % Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetzt und zum Aushärten in eine Gelkammer mit Kamm (PeqLab, Erlangen) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90 Volt für 1 Stunde (Bio-Rad Power Supply, München). Das Gel wurde am Ende des Versuches direkt mit einer Sofortbildkamera (Polaroid, Offenbach) auf dem UV-Transilluminator fotografiert.

Laufpuffer für die DNA Elektrophorese (5x TBE, Tris Borat EDTA)

0,45 M Tris-Borat; 0,01 M EDTA, pH 8,0

Probenpuffer für die DNA Gelelektrophorese (6x Loading Buffer)

0,25% (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/w) Sucrose in A.dest

2.3 Sequenzierung der Porin 2 cDNA

Die im Agarose-Gel unter UV-Licht dargestellten Banden der partiellen Sequenz von Porin 1 cDNA, Porin 2 cDNA und Porin 3 cDNA wurden zügig mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, gewogen, und mit dem *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) weiter verarbeitet. Das Gel wurde mit QG Puffer (300 µl pro 100 mg Gel) im 50°C warmen Wasserbad über 10 min gelöst. Die Suspension wurde anschließend mit Isopropanol (100 µl/100 mg Gel) gemischt, um eine Erhöhung der Ausbeute zu erreichen. Anschließend wurde das Material auf eine Säule (*QIAquick spin column*) aufgetragen und bei Raumtemperatur mit 13.800xg für 1 min zentrifugiert. Die in der Membran der Säule gebundenen DNA Fragmente wurden mit PE Puffer gewaschen. Danach wurde das gebundene DNA Fragment mit 50 µl EB Puffer in ein sauberes Reaktionsgefäß eluiert. 10 µl der das DNA Fragment enthaltende Lösung wurden dann durch die DNA Gelelektrophorese daraufhin überprüft, ob dieses DNA Fragment in der richtigen Größe vorlag. Durch Vergleich mit einer DNA Mass ladder (Gibco, Hamburg) konnte die Menge der einzelnen Fragmente bestimmt werden. Der Rest der Lösung wurde zur Firma MWG Biotech (Ebersberg) geschickt und dort sequenziert.

2.4 *In situ* Hybridisierung

Um die genaue Lokalisation der mRNA-Expression der Porin Subtypen 1 und 2 im bovinen Hoden zu ermitteln, wurde eine *in situ* Hybridisierung (ISH) durchgeführt. Das Prinzip der *in situ* Hybridisierung beruht auf der spezifischen Bindung zwischen einer markierten einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz (der sogenannten „Ribosonde“) zu der komplementären einzelsträngigen Sequenz im fixierten Gewebe (Leitch et al., 1994).

Ein Überblick über den Ablauf der *in situ* Hybridisierung ist in Abb. 2 dargestellt:

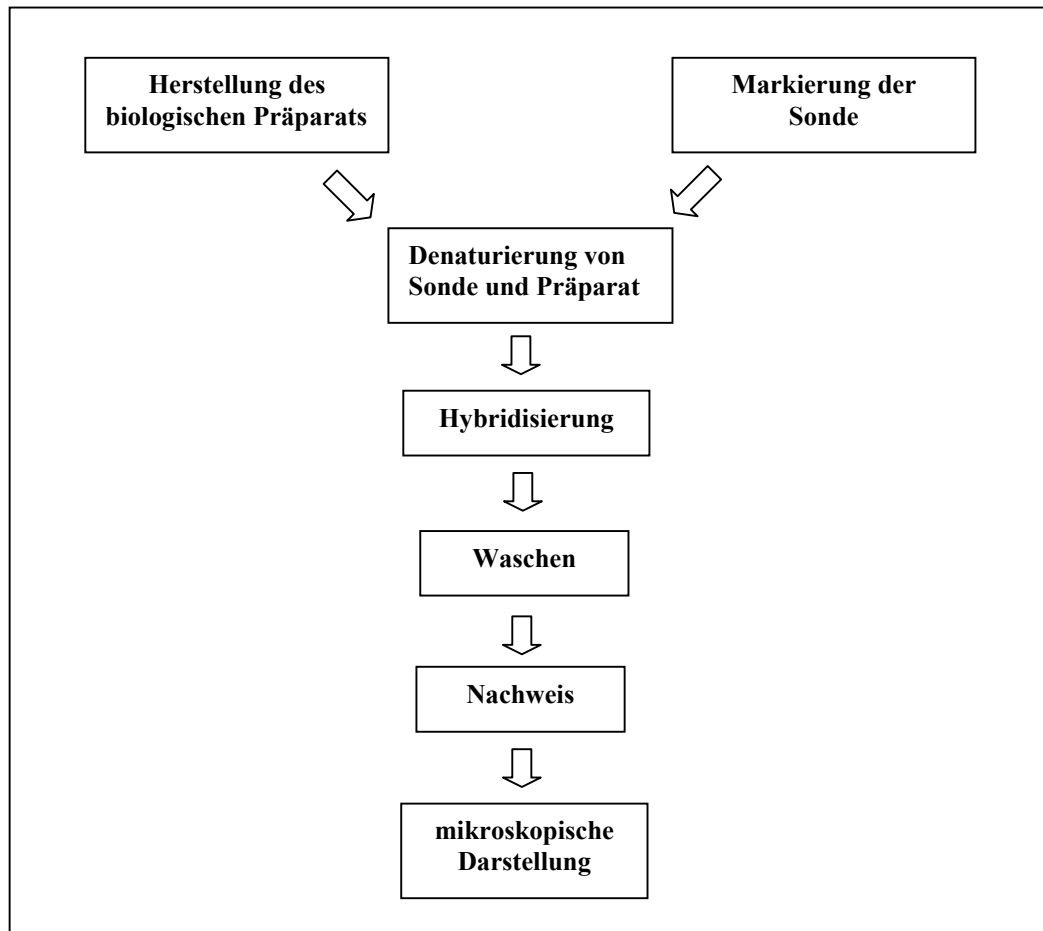


Abbildung 2. Übersichtsschema der *in situ* Hybridisierung (Leitch et al., 1994).

2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Nach 24 stündiger Fixierung in Bouin'scher Lösung wurde das Hodengewebe 3x in 80%igem Ethanol jeweils 30 min gewaschen. Danach wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe jeweils 30 min dehydriert, 1x für 30 min in Xylol verbracht und dann anschließend über Nacht in Xylol als Intermedium belassen. Das Gewebe wurde am nächsten Tag 2x in 60°C heißen flüssigem Paraffin für jeweils 3 Stunden inkubiert. Danach wurde das Gewebe in einen Metallblock gegossen und bis zum Aushärten in den Kühlschrank gestellt. Es wurden mit einem Mikrotom (Leitz, Wetzlar) 6 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf mit 3-Aminoprophyltriethoxysilane (APES) (Sigma, Taufkirchen) beschichteten Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht.

2.4.2 Herstellung der Ribosonden von Porin 1 und 2

Zur Herstellung der RNA Sonde (Ribosonde) wurden die genspezifischen cDNAs in einen Vektor (Plasmid) zwischen zwei geeignete Polymerase-Startsequenzen kloniert, von denen ausgehend die RNA Polymerase die Sonde synthetisieren kann. Das cDNA Fragment von Porin 1 wurde in das Plasmid pCR II-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg kloniert (Abb. 3). Das cDNA Fragment von Porin 2 wurde in das Plasmid pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, USA) bei der Firma GATC (Konstanz) kloniert (Abb. 4).

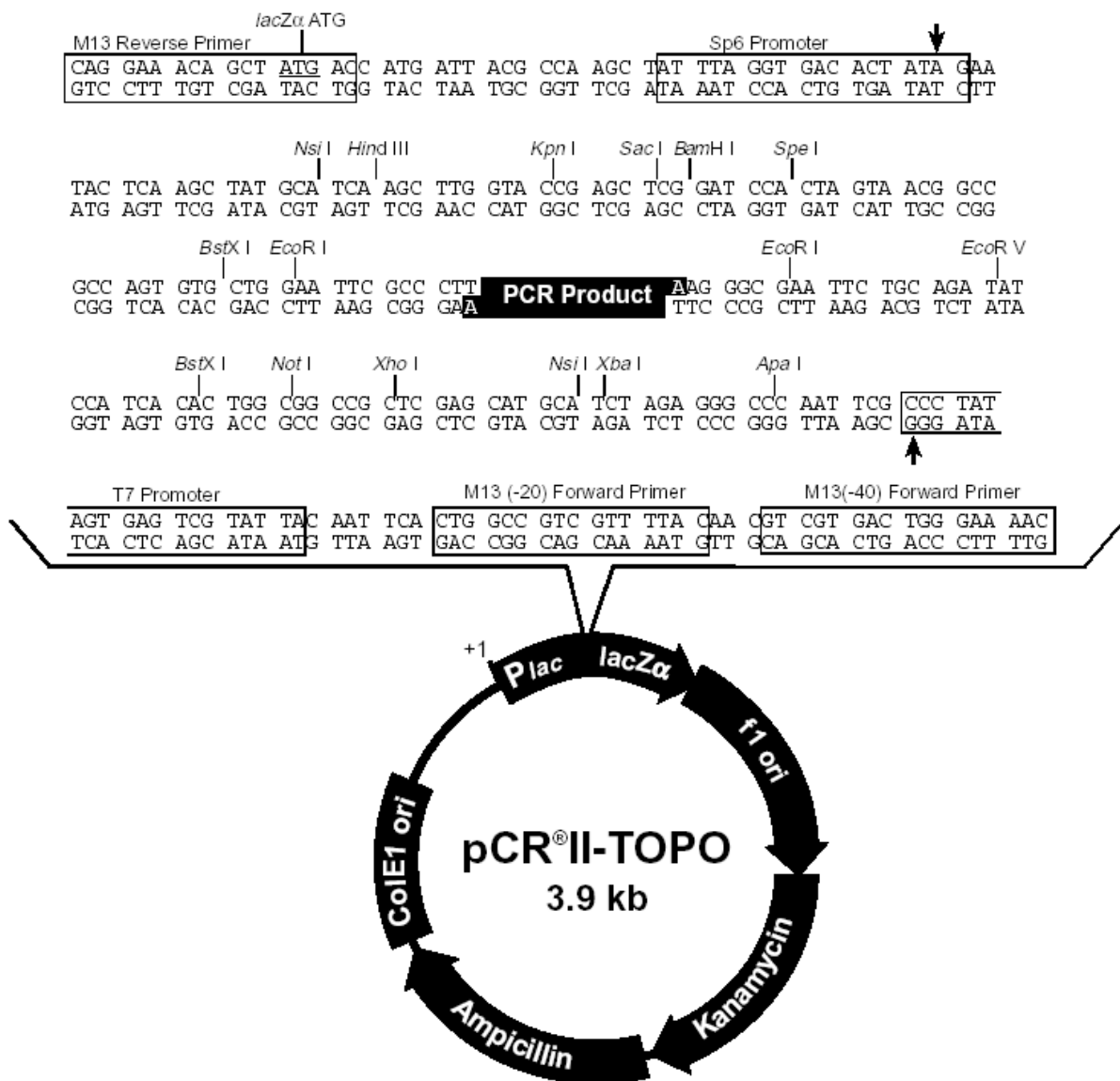


Abbildung 3. Darstellung der DNA Sequenz des Plasmids pCR[®]II- TOPO zur Herstellung der Porin 1 Ribosonde.

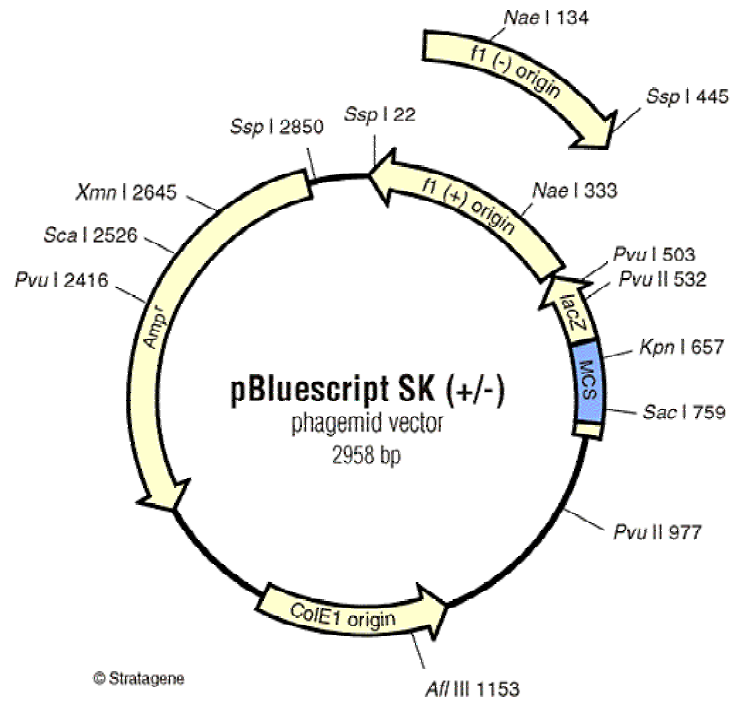


Abbildung 4. Darstellung des Plasmids pBluescript SK (+/-) zur Herstellung der Porin 2 Ribosonde.

Das mit dem cDNA Fragment von Porin 1 und 2 klonierte Plasmid wurde in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um dessen Konzentration zu bestimmen. Das Verfahren zur Herstellung einer Ribosonde, die sogenannten *in vitro* Transkription, besteht aus den nachfolgend beschriebenen 3 Schritten:

2.4.2.1 Linearisierung des Plasmids

Das mit dem cDNA Fragment von Porin 1 klonierte Plasmid (ca. 5 µg) wurde mit dem Restriktionsenzym BamH I (3 units/1µg) linearisiert. In einem weiteren Ansatz wurden ebenfalls 5 µg mit dem Restriktionsenzym Xba I (3 units/1µg) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geschnitten. Das mit dem cDNA Fragment von Porin 2 (ca. 5 µg) klonierte Plasmid wurde ebenfalls mit dem Restriktionsenzym BamH I (3 units/1 µg) und in einem unabhängigen Ansatz mit dem Restriktionsenzym Sal I (3 units/1 µg) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geschnitten. Die Linearisierung der oben genannten Plasmide erfolgte bei 37°C für 2 Stunden. Die Produkte wurden durch eine DNA Gelelektrophorese (1% w/v Agarose in 1x TBE) daraufhin überprüft, ob alle Plasmide korrekt linearisiert waren. War dies nicht der Fall, mussten diese Plasmide nochmals mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert werden. Nach der Linearisierung wurden die

Restriktionsenzyme bei einer Temperatur von 85°C für 30 min (BamH I), 60°C für 15 min (Xba I) und 65°C für 20 min (Sal I) inaktiviert.

2.4.2.2 Extraktion und Fällung des linearisierten Plasmides

Die linearisierten Plasmide wurden im Verhältnis 1:1 mit einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) Lösung extrahiert. Die Extraktion erfolgte bei 13.800xg und 4°C für 15 min. Zur Entfernung des verbliebenen Phenols wurde die obere Extraktionsphase anschließend in einem separaten Reaktionsgefäß 1:1 mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) gemischt und bei 13.800xg und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 100% Ethanol (vol 1:1), 2,5 µl 3 M Na Acetat pH 5,2 und 1,5 µl Glycogen (20 mg/ml) bei -20°C für 1 Stunde gefällt. Danach wurde die Lösung bei 13.800xg (4°C, 30 min) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit gekühltem 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend bei 13.800xg und 4°C für 5 min zentrifugiert und schließlich luftgetrocknet. Das Sediment wurde abschließend wieder in 20 µl autoklaviertem Wasser aufgenommen, um mittels DNA Gelelektrophorese Größe und Konzentration des linearisierten Plasmids zu bestimmen.

2.4.2.3 Markierung der Ribosonden

Zur Herstellung und Markierung der Ribosonden aus linearisiertem Plasmid, wurde eine *in vitro* Transkription mit dem RNA DIG-Markierungs Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) durchgeführt. Die entsprechende RNA-Polymerase synthetisiert in Gegenwart von DIG (Digoxigenin)-markierten und unmarkierten Nukleotiden einzelsträngige RNA-Sonden (Ribosonden). Um den komplementär zum kodierenden (*sense*) Strang der DIG-markierten Ribosonde für Porin 1 und 2 herzustellen, wurden 10 µl des, mit dem Restriktionsenzym BamH I linearisierten Plasmids (5 µg/µl), mit 2 µl T7 RNA-Polymerase (3 units/µg), 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 1 µl RNase Inhibitor (40 units), 2 µl NTP+DIG-UTP und 3 µl RNase-freies Wasser im Endvolumen von 20 µl angesetzt. Vom Xba I linearisierten Plasmid wurde der nichtkodierende (*antisense*) Strang der DIG-markierten Ribosonde für Porin 1 mit dem Enzym SP6 RNA-Polymerase (2 µl, 3 units/µl) und dem entsprechenden Transkriptionsgemisch identisch zur Markierung der *sense* Ribosonde für Porin 1 und 2, hergestellt. In gleicher Weise wurde mit dem durch Sal I linearisierten Plasmiden verfahren, wobei das *in*

in vitro Transkriptionsgemisch für den nichtcodierenden (*antisense*) Strang der DIG-markierten Ribosonde für Porin 2 mit T3 RNA-Polymerase (3 µl, 3 units/µl) versetzt wurde.

2.4.2.4 Bestimmung der Ribosondenkonzentration

Mittels eines *Dot Blot* Verfahrens, wurde die Konzentration der gewonnenen DIG-markierten Ribosonden Porin 1 und 2 *antisense* und *sense* bestimmt. Von den DIG-markierten Ribosonden Porin 1 und 2 wurden Verdünnungsreihen hergestellt und mit entsprechender DIG-markierter RNA bekannter Konzentration als Positivkontrolle (Roche, Mannheim) zur Konzentrationsbestimmung verglichen. Die Ribosonden wurden auf eine feuchte positiv geladene Nylonmembran (PALL BioSupport, Dreieich) mittels einer *Dot Blot Vacuum Pump* transferiert. Nach UV-Bestrahlung ($1,23 \text{ J/cm}^2$) mit einem UV Transluminator (UVP Incorporation, California) zur Bindung der Ribosonde, wurde die Membran in 0,05 M NaOH, 2x SSC, Waschpuffer (0,01 % Tween in Maleinsäurepuffer) gewaschen und anschließend in Blockierungslösung 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppeltem anti-DIG Reagenz (Roche, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 in der Blockierungslösung für 30 min bei Raumtemperatur belassen. Die Membran wurde dann in Puffer II gewaschen. Zur Detektion wurde CDP Substrat (PE Biosystems, Foster City, USA) in einer Verdünnung 1:50 in Puffer II gemischt, ein Röntgenfilm (Fuji, Düsseldorf) aufgelegt und anschließend für ca. 15 min entwickelt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Stärke der Banden von DIG-Ribosonde Porin 1 und 2 mit der Stärke von DIG-RNA der Kontrolle verglichen.

2.4.3 Durchführung der *in situ* Hybridisierung

Zum Nachweis von Porin 1 und 2 mRNA und deren Lokalisation in bovinen Hodenzellen, wurde eine RNA:RNA *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Alle Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert; die Glaswaren wurden 2 Stunden lang bei 180°C Heißluft-sterilisiert. Die detaillierte Durchführung wird im Folgenden beschrieben: Die, unter 2.4.1 beschriebenen Paraffinschnitte wurden zunächst 15 min lang in auf 60°C erhitztem Xylol und anschließend über 2x 5 min in Xylol bei RT entparaffiniert. Danach wurde das Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min) aus den Schnitten und schließlich in Aqua dest. und PBS jeweils für 5 min gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 10 µg/ml PBS Proteinase K Lösung (Sigma, Taufkirchen) auf die Schnitte

aufgetragen und 20 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 2 min wurde die Reaktion mit 0,2% Glycin/PBS (Sigma, Taufkirchen) abgestoppt. Die Hodenschnitte wurden in PBS gewaschen, mit 4°C kaltem 4%igem Paraformaldehyde (Merck, Darmstadt) nachfixiert und erneut 2x in PBS jeweils für 5 min gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte in Triethanolamine + Essigsäureanhydrid (Merck, Darmstadt) Lösung (200 ml + 0,5 ml, frisch angesetzt unter Rühren) zur Acetylierung belassen und dann mit PBS 5 min gewaschen.

Zur Prähybridisierung wurden die Hodenschnitte mit ca. 100 µl Prähybridisierungsmix bedeckt und bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C für Ribosonde Porin 1 und 48°C für Ribosonde Porin 2 in einer feuchten Kammer 2 Stunden lang inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungsmix mit 30 µl Ribosonde *antisense* bzw. 30 µl Ribosonde *sense* (Negativkontrolle) auf jeweils einen der Schnitte gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum (Marabu, Tamm) luftdicht verschlossen. Anschließend wurden die Objektträger auf 80°C für 10 min erhitzt, um die Nukleotide in den Hodenzellen zu denaturieren. Die Hybridisierung wurde bei einer Temperatur von 50°C für Ribosonde Porin 1 und 48°C für Ribosonde Porin 2 über Nacht durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte wie folgt gewaschen: Mit 2x SSC Lösung bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (HT) für 30 min, 1 Stunde lang in 1x SSC in 50 % Formamid bei HT, 2x mit 0,5x SSC jeweils 10 min, mit 0,2x SSC für 10 min und für 10 min mit Maleinsäurepuffer jeweils bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dann mit 100 µl Blockierungslösung bedeckt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 100 µl alkalische Phosphatase (AP) gekoppeltem anti- DIG-Antikörper (Fc-Fragmente, Roche, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:500 in der Blockierungslösung bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Es folgten 3 Waschschritte, 2x in Puffer I für jeweils 15 min und 1x in Puffer II über 5 min. Zum Nachweis des Hybridisierungserfolgs wurden jeweils 100 µl BCIP/NBT als Substrat (Kirkegaard & Perry Laboratories, Guildford) auf die Schnitte verbracht und in einer abgedunkelten feuchten Kammer bis zu 30 min belassen. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde in kurzfristigen Abständen unter dem Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) kontrolliert. Am Ende der Beobachtungszeit wurde die Substratreaktion mit Puffer II abgestoppt. Die Schnitte wurden mit Wasser gewaschen, anschließend mit Glycergel Eindeckmedium (DAKO, Hamburg) eingedeckt und mikroskopisch ausgewertet (Axioskop, Zeiss, Oberkochen).

PBS (*Phosphate buffered saline*)

120 mM NaCl, 4 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

Prähybridisierung -Mix für *in situ* Hybridisierung

100 mM Tris, 50 mM EDTA, 40 mM NaCl, pH 7,5 in 45 ml Wasser; 5 ml 50x Denhardt's Lösung (1% w/v Ficoll 400, 1% w/v Polyvinylpyrrolidon 10000, 1% w/v BSA, sterilfiltriert); und 25 mg tRNA in 50 ml Mixlösung. Die Gebrauchslösung wird 1:1 mit Formamid versetzt.

Hybridisierung-Mix für *in situ* Hybridisierung

50% Formamid (100%), 1x Grundmix (10x), 0,3 M NaCl (5 M), 10% Dextransulfat (50%), bei 95°C 5 min gekochte Ribosonde 5 - 10 ng/μl.

Grundmix (10x) für Hybridisierungsmix

200 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 5 mg/ml t-RNA, 1 mg/ml poly A-RNA, in 4 ml Wasser; 1ml 50x Denhardt's Lösung (1% w/v Ficoll 400, 1% w/v Polyvinylpyrrolidon 10000, 1% w/v BSA).

Maleinsäurepuffer für *in situ* Hybridisierung und „Dot Blot“ Verfahren

0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5

Blockierungslösung für *in situ* Hybridisierung und „Dot Blot“ Verfahren

2% Blockierungsreagenz (Roche), 0,5% sterilfiltriertes BSA in Maleinsäurepuffer

SSC (20x) für *in situ* Hybridisierung als Stocklösung

3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0

Puffer I für *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie

0,1 M Tris; 0,15 M NaCl, pH 7,5

Puffer II für *in situ* Hybridisierung, „Dot Blot“ Verfahren und Immunhistochemie

0,1 M Tris; 0,1 M NaCl, pH 9,5; kurz vor Gebrauch wird 0,05 M MgCl₂ zugegeben

2.5 Herstellung von anti-Porin-Antikörpern**2.5.1 Auswahl der Peptide**

Die als Antigen für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendeten Peptide wurden von Dr. Krause, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg synthetisiert. Von der Porin 1 Polypeptidensequenz (Acc. No. NP_003365) wurden 12 Aminosäuren am C terminalen Ende der Sequenz in Position 271 - 282 für das synthetische Peptid Porin 1b (P 1b) ausgewählt (Abb. 5A). Aus der Mitte der Polypeptidensequenz von Porin 2 (Acc. No. NP_003366), Position 224 - 235, wurden 12 Aminosäuren (Peptid H 1,

Abb. 5B); und 15 Aminosäuren am Ende der Polypeptidensequenzen von Porin 2 in Position 268 - 282 für das synthetische Peptid H 2 abgeleitet (Abb. 5C).

2.5.2 Polyklonale Antiseren

Die gegen die synthetischen Peptide 1b, H1 und H2 gewonnene Antiseren (Tab. 2), wurden mir von der Arbeitsgruppe Dres. Hinsch für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung gestellt.

Porin	Peptid	Antiserum
Porin 1	1b Gly-His-Lys-Leu-Gly-Leu-Gly-Leu-Glu-Phe-Gln-Ala	AS P6
Porin 2	H1 Tyr-Gln-Leu-Asp-Pro-Thr-Ala-Ser-Ile-Ser-Ala-Lys	AS P45
Porin 2	H2 Asn-Ala-Gly-Gly-His-Lys-Val-Gly-Leu-Ala-Leu-Glu-Leu-Glu-Ala	AS P20

Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten anti-Porin-Antiseren.

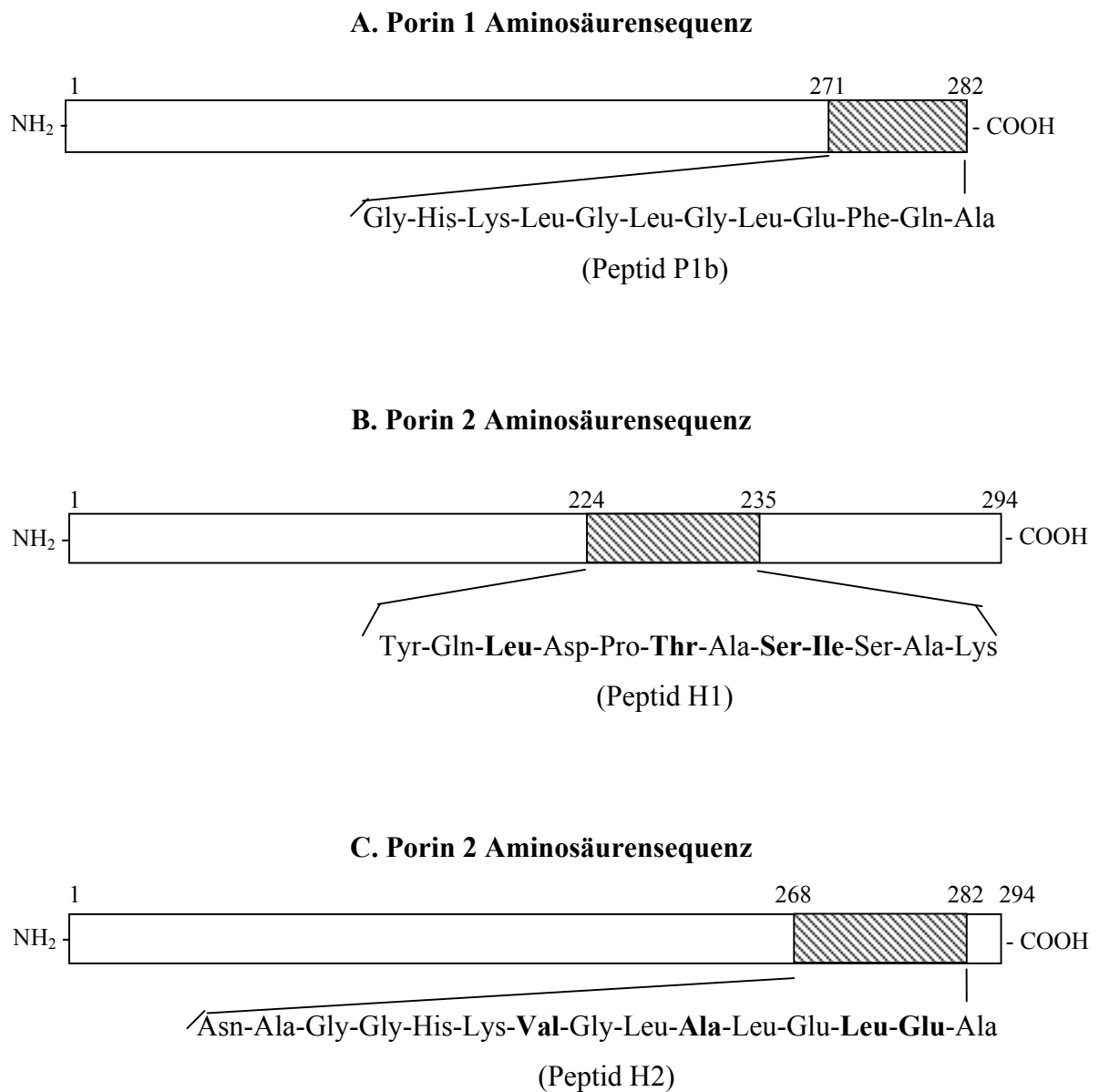


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des menschlichen Porin 1 und 2 mit Angabe der ausgewählten Peptide. **A:** P 1b (Porin1), **B:** H 1 (Porin 2) und **C:** H 2 (Porin 2), die als Antigen zur Produktion polyklonaler anti-Peptid-Antikörper verwendet wurden. Hervorgehobene Aminosäuren stellen Abweichungen zwischen den ausgewählten Porin 2-Peptidsequenzen (H1, H2) im Vergleich zur Porin 1b-Peptid-Aminosäuresequenz dar.

2.6 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von Porin 1 und 2-Protein

Mit Ausnahme der Fixierung entsprach die Herstellung der Paraffinschnitte für die immunhistochemischen Untersuchungen an bovinem Hodengewebe, der für die *in situ* Hybridisierung verwendeten Methode. In diesem Fall wurde Methacarn fixiertes Gewebe eingesetzt (s. 2.1.1 und 2.4.1). Die Schnitte wurden nach der Entparaffinierung (s. 2.4.3) mit 3% Milchpulver (Lucerne, Oakland, California) in PBS bei Raumtemperatur 1 Stunde lang präinkubiert. Danach wurden sie entweder mit den Antiseren, oder parallel dazu mit den Präimmunseren als Negativkontrolle (Verdünnungen: AS P6 1:100, AS P45 1:100, AS P20 1:50, PI entsprechend) bei Raumtemperatur 1 Stunde lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2x in PBS jeweils über 10 min und 1x in Puffer I für 10 min gewaschen. Als Zweitantikörper wurden mit alkalische Phosphatase gekoppelte anti-Kaninchen IgG, verdünnt in 3% Milchpulver/Puffer I (1:100) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte 2x in Puffer I jeweils 5 lang min und 1x in Puffer II für 5 min gewaschen. Als Substrat wurde BCIP/NBT nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Farbreaktion wurde nach ca. 30 Minuten mit Puffer II abgestoppt, die Schnitte in Aqua. dest. gewaschen und schließlich mit Glycergel eingedeckt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter einem Axioskop der Firma Zeiss und die Dokumentation mit der Kamera MC 80 (Zeiss, Oberkochen).

2.7 Affinitätschromatographische Reinigung der anti-Porin-Antikörper

2.7.1 Herstellung der affinitätschromatographischen Säulen

Die Antikörper (AS 6, AS 45, AS 20) wurden mit Hilfe von Affinitätssäulen (AminoLink® Plus Immobilization Kit, Pierce, Perbio, Bonn), an deren Gelmatrix das jeweilige korrespondierende synthetische Peptid (1b, H1, H2) gebunden wurde, aus den Antiseren gereinigt. Die Herstellung der Säulen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Um das Austrocknen der Säulenmatrix zu verhindern, wurde diese bis zur Verwendung in einem Aufbewahrungspuffer (1x PBS, pH 7,2, entgast) bei 4°C gelagert.

2.7.2 Reinigung der Antikörper

Zur Isolierung monospezifischer Antikörper wurden die Säulen zunächst 6x mit 2 ml PBS gewaschen, und danach mit 1 ml Antiserum 1:1 verdünnt in PBS pH 7,2 beschickt. Nach einer 1stündigen Inkubation der Antikörper mit der Säulenmatrix bei Raumtemperatur, wurde die Matrix 6x mit 2 ml 1 M NaCl gewaschen. Die Elution, der an das Peptid gebundenen Antikörper, erfolgte mit einem Elutionspuffer (1 M Glycin pH 2,5). Die eluierten Antikörper wurden in Fraktionen von 500µl in mit 20 µl 1 M Tris pH 9,6 vorbereiteten Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Antikörper enthaltene Fraktion wurden sofort nach Elution auf einen neutralen pH-Wert von 7,4 eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C bzw. bei -20°C aufbewahrt.

2.8 Charakterisierung der Antiseren und der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper

2.8.1 Titerbestimmung mit Hilfe des Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)

Die synthetischen Peptide wurden in Wasser gelöst, und 100 µl dieser Lösung (0,1µg P1b bzw. 1,5 µg H1, H2 pro Vertiefung) wurde in ein 96-Loch-Kunststoffmodul (hochaffiner Proteinbindungskapazität) pipettiert. Es folgte dann eine Inkubation der Module (Nunc, Dänemark) bei 37°C im Trockenschrank (Jouan, Unterhaching) über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kunststoffmodule 2x mit PBS/0,05% Tween, pH 7,4, jeweils 5 min lang und 1x mit PBS, pH 7,4, über 5 min gewaschen. Anschließend wurde eine 1stündige Präinkubation mit einer 1% BSA/PBS-Lösung (100µl/Vertiefung) durchgeführt. Die Antiseren bzw. affinitätsgereinigten Antikörper (100 oder 50 µl/Vertiefung) wurden in adäquaten Verdünnungen in 1% BSA/PBS pipettiert und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach 2maligem Waschen in PBS/0,05% Tween und 1x in PBS wurden als Zweitantikörper Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (Sigma, Taufkirchen) in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erstreckte sich über einen Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte mit OPD (O-Phenylenediamine, Sigma, Taufkirchen) als Substrat. Der Antikörpertiter wurde über die Extinktionswerte (OD) bei einer Wellenlänge von 492 nm mit einem Photospektrometer EAR 400 ATC (Titertek-Dynatech, Denkendorf) bestimmt.

2.8.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der affinitätsgereinigten Antikörperfraktionen wurde mit dem BioRad *Protein Assay Kit* (Micro Assay) (Bio-Rad, München) nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Als Standardprotein wurde BSA (bovines Serumalbumin) in Konzentrationen von 1 µg bis 21 µg eingesetzt. Die Proteingehalte der Antikörperfraktionen wurden fotometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm mit einem Photospektrometer EAR 400 ATC (Titertek-Dynatech, Denkendorf) bestimmt.

2.9 Immunbiochemischer Nachweis von Porin in bovinen Spermatozoen

Zum Nachweis von Porin 1 und 2 Protein in bovinen Spermatozoen wurde eine Zellextraktion durchgeführt. Der gewonnene Zellextrakt wurde mit Hilfe des Immunblot-Verfahrens immunbiochemisch untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine säulenchromatographisch angereicherte Porin 31 HL Fraktion aus menschlichen Lymphozyten eingesetzt. Das Material wurde uns von Herrn Dr. F.P. Thinnes, Max Planck Institut Göttingen, zur Verfügung gestellt.

2.9.1 Extraktion boviner Spermatozoenproteine

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

Die Extraktion erfolgte von ca. 5×10^6 Spermatozoen unter Zugabe eines Extraktionspuffers, der PBS und Proteasehemmstoffe enthielt. Die Suspension wurde für 3 min bei 22.000xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde in 30 µl Extraktionspuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und bei Raumtemperatur 3 min bei 22.000xg zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß transferiert. Zu dem Überstand wurde β-Mercaptoethanol (Bio-Rad) in einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend 1 min bei 22.000xg zentrifugiert. Der Extraktionspuffer mit den gelösten Proteinen wurde bis zu seiner Verwendung für die Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

2.9.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung der extrahierten Proteine aus bovinen Spermatozoen wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Bio-Rad, München) mit einem 12%igem Trenngel und einem

6%igem Sammelgel durchgeführt (Laemmli, 1970). Nach der Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurden die in 20 µl Probenpuffer aufgenommenen Proteine ($1,5 \times 10^6$ lysierte Spermatozoen/Spur) und 5 µl „Kaleidoskop Broad Range Proteinstandard“ (BioRad, München) sowie 5 µl biotinylierter Standard (BioRad, München) als Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Mini Protean II) der Firma BioRad (München) bei einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 45 min bei Raumtemperatur. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine entweder auf eine Nitrozellulosemembranen elektrotransferiert, oder das Gel wurde zur Darstellung der Proteinbanden mit 0,25%iger Coomassie-Blau Lösung (Serva, Heidelberg) 30 min lang gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Coomassie-Blau-Entfärberlösung über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gele kurz in eine Geltrockenlösung gelegt und abschließend in einer Kunststoffolie luftgetrocknet und aufbewahrt.

2.9.3 Western Blot

Die in der SDS-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen getrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) elektrotransferiert (Towbin et al., 1979). Das Polyacrylamidgel wurde in Western-Blot-Puffer auf die feuchte Nitrozellulosemembran, die sich zwischen zwei feuchten Filterpappen und zwei Schaumstoffscheiben befand, gelegt. Diese wurden zwischen zwei Kunststoffplatten gepresst und in eine Western-Blot-Kammer (BioRad, München) eingesetzt. Nach dem Elektrotransfer bei einer Spannung von 70 V für 1,5 Stunden, wurde die Nitrozellulosemembran entnommen, getrocknet und anschließend mit Ponceau S über 10 min gefärbt. Nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit Wasser konnten die transferierten Proteine dargestellt werden. Gleichzeitig diente die Anfärbung der Proteine als quantitativer Nachweis des Elektrotransfers aus dem Polyacrylamidgel.

2.9.4 Immunlogischer Nachweis von Porin und Chemilumineszenzverfahren

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Nitrozellulosemembran mit den transferierten Proteinen in 5%iger Teleostgelatine (Sigma, Taufkirchen)/T-TBS für 1 Stunde präinkubiert. Danach erfolgte eine 1stündige Inkubation mit den in 3% Milchpulver/T-TBS verdünnten Antikörpern. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die

Nitrozellulosemembran 3x in T-TBS für 5 min unter leichtem Schütteln gewaschen. Als Zweitantikörper wurden anschließend Peroxidase markierte anti-Maus IgG- (1:3.000 verdünnt) oder anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Sigma, Taufkirchen) bei einer Verdünnung 1:5.000 in T-TBS eingesetzt. Die Membran wurde mit dem Zweitantikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte (5x 10 min in T-TBS), um nicht-gebundene Zweitantikörper zu entfernen. Zum Nachweis spezifisch gebundener Antikörper wurde das Substrat ECL (Amersham, Freiburg) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Nitrozellulosemembran wurde mit diesem Substrat für 1 min überschichtet, in Klarsichtfolie verpackt und auf einen Röntgenfilm (Fuji, Düsseldorf) in einer Röntgenfilmkassette (Fuji, Düsseldorf) aufgelegt. Der Röntgenfilm wurde je nach Intensität der Reaktion zwischen 1 min und 15 min belichtet und abschließend entwickelt und fixiert.

Acrylamidgel

Trenngel 12%ig: 2,66 ml 30% w/v Acrylamid
Sammelgel 6%ig: 1,33 ml 30% w/v Acrylamid
3,33 ml Sammelgelpuffer
1,92 ml Aqua dest
25 µl Temed
50 µl 12,5% w/v Ammoniumpersulfatlösung

Coomassie-Blau-Färbelösung für Polyacrylamidgele

0,25% w/v Coomassie-Blau, 10% v/v Eisessig, 45% v/v Methanol, 45% v/v Aqua dest

Entfärbelösung für Coomassie-Blau

10% v/v Eisessig, 45% v/v Methanol, 45% v/v Aqua dest

Geltrocknenlösung

50% v/v Methanol, 2% Glycerin

Laufpuffer für die Protein Elektrophorese

190 mM Glycerin, 0,1% w/v SDS, 25 mM Tris, pH 8,3

Proteasehemmstoffe:

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

Sammelgelpuffer für Polyacrylamidgele

0,2% w/v SDS, 250 mM Tris, pH 6,8

TBS (*Tris buffered saline*)

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

T-TBS (Tween-Tris buffered saline)

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

Trenngelpuffer für Polyacrylamidgele

0,2% w/v SDS, 750 mM Tris, pH 8,8

Western Blot Puffer

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

Probenpuffer für die Protein Gelelektrophorese (6x Laemmli)

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

2.10 Immuncytochemische Untersuchungen an bovinen Spermatozoen

Immuncytochemische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Lokalisation von Porin Subtypen 1 und 2 im bovinen Spermatozoen geben. Hierzu wurden monoklonale anti-Porin 1 Antikörper (anti-Porin 31 HL, Calbiochem, Bad Soden) und anti-Porin 2 Antikörper (AS P45 und AS P20) in den Experimenten eingesetzt.

Die durch das „Swim-up“ Verfahren“ gewonnenen bovinen Spermatozoen (siehe 2.3.2) wurden in 500 µl PBS suspendiert. Die Zellen wurden dann zur Perforation der Plasmamembran nacheinander 3x in flüssigen Stickstoff eingefroren und 3x in 40°C warmem Wasser aufgetaut. Nach Zentrifugation bei 500xg für 5 min wurde das Sediment in 1% Milchpulver in PBS für 1 Stunde präinkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 1000xg für 5 min wurden die Spermatozoen mit den Antikörpern (1:50 in 1% Milchpulver/PBS) bei Raumtemperatur über 1 Stunde inkubiert. Nach 3maligem Waschen in PBS (1000xg) wurden die Spermatozoen 30 min lang mit biotinylierten anti-Kaninchen Antikörpern (Sigma, Taufkirchen) in einer Verdünnung von 1:200 in 1% Milchpulver gelöst in PBS bei Raumtemperatur versetzt. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die Spermatozoen nach einem weiteren wie bereits beschriebenen Waschschrift mit 50 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem Avidin (30 µg/ml in HEPES Puffer pH 8,2; Pierce) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Es folgte ein abschließender Waschschrift (s.o.). Das Sediment nach der letzten Zentrifugation wurde in 10 µl PBS pH 7,4 aufgenommen und mit einem Tropfen Citifluor (Plano, Wetzlar) auf einem Objektträger vermischt. Danach wurde die Suspension mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Filter 09, Axioskop, Zeiss, Oberkochen) ausgewertet und dokumentiert.

2.11 Einfluss von anti-Porin 2 Antikörpern auf die Funktion boviner Spermatozoen

Um den Einfluss der anti-Porin 2 Antikörper auf die Funktion boviner Spermatozoen zu untersuchen, wurden nach Inkubation mit affinitätsgereinigten anti-Porin Antikörpern bzw. mit der entsprechenden Negativkontrolle folgende Parameter überprüft:

1. Die Motilität der Spermatozoen und
2. die Vitalität und der akrosomaler Status der Samenzellen

2.11.1 Motilitätsparameter

2.11.1.1 Computerassistierte Samenanalyse (*Computer Assisted Semen Analysis-CASA*)

Das computerassistierte Samenanalyse-System (CASA; Mika Medical Cell Motion Analyser, (Montreaux) dient zur objektiven Evaluierung von Ejakulaten und liefert eine statistische Auswertung sowohl der Motilitäts- als auch der morphologischen Parameter. 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 (Abb. 6).

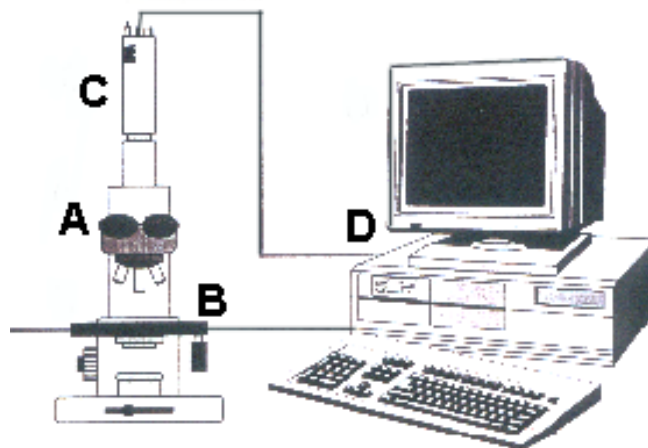


Abbildung 6. Schematische Darstellung eines CASA Systems. A: Mikroskop, B: heizbarer Objektisch, C: Videokamera, D: Computer und Monitor

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 5 µl der Spermatozoensuspension in eine auf 38,5°C vorgewärmte Maklerkammer[®] (Sefi Medical, Israel) pipettiert und aus vier verschiedenen Arealen mindestens 200 Spermatozoen statistisch erfasst. Die ermittelten Motilitätsparameter wurden in einem Spermiogramm zusammengefasst und ausgedruckt.

2.11.1.2 Motilitätsmessung boviner Spermatozoen nach Zugabe von anti-Porin 2 Antikörper

Kryokonservierte bovine Spermatozoen wurden wie zuvor beschrieben im „Swim-up-Verfahren“ aufbereitet. Die Spermatozoenkonzentration in der gewonnenen Suspension wurde auf eine Zellzahl von 20-30 Mio/ml eingestellt. Die Spermatozoen-Suspension wurde geteilt in: a) Kontrolle (ohne Behandlung), b) Kontrolle mit TEB Puffer (Tris-Elutionspuffer, s. 2.7.2), c) Negativkontrolle (Kaninchen IgG, mit gleichem Proteingehalt wie die affinitätsgereinigten Antikörper) und d) affinitätsgereinigte anti-Porin 2 Antikörper (37,5 µg/ml). Die Auswertung der Motilität erfolgte nach einer Inkubationszeit von 0 h, 1 h, 2 h und 4 h.

2.11.2 Vitalitätsuntersuchung und Evaluierung des akrosomalen Status von bovinen Spermatozoen nach Zugabe von anti-Porin 2 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; Sigma, Taufkirchen). Der Farbstoff dringt in membrangeschädigte (tote Spermatozoen) ein, und bindet dort irreversibel an die im Spermatozokopf 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 (s.o.), wurden 100 µl der Spermatozoen Suspension mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml Hoechst 33258 über 10 min bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff wurden die Spermatozoen 2 x 5 min bei 700xg 2% PVP in PBS gewaschen und sedimentiert. Die anschließend in 20 µl PBS resuspendierten Spermatozoen wurden auf zwei Objektträger ausgestrichen und bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Die getrockneten Spermatozoenausstriche wurden 30 s lang mit 100%igem Methanol fixiert, dann 2 x 5 min in Aqua dest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Untersuchung des akrosomalen Status wurden die Spermatozoen mit PSA-FITC (Pisum sativum Agglutinin-Fluoreszeinisothiocyanat) gefärbt. PSA ist ein Lektin der Erbse und hat die Eigenschaft, sich an bestimmte Glykoproteine, die sich im Akrosom des Spermatozoons befinden, zu binden. 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. Der an PSA gebundene Farbstoff FITC kann durch eine grün-gelbe Fluoreszenzfärbung mit dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Die akrosomreagierten Spermatozoen zeigen nur im Bereich des äquatorialen Kopfbandes eine grün-gelbe Fluoreszenzfärbung oder erscheinen sonst vollständig dunkel. Die akrosomintakten Spermatozoen können durch eine intensive grün-gelbe Färbung an der vorderen Hälfte des Spermatozoonkopfes identifiziert werden (Cross und Meizel, 1989).

Zur Detektion akrosomreagierter und akrosomintakter Spermatozoen wurden die Spermatozoenausstriche in einer feuchten Kammer bei RT 30min 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® (Plano, Wetzlar) beschichtet, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verlangsamen. Danach wurden die Spermatozoen mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt und bis zur Auswertung im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zum Abschluss wurden die mit PSA-FITC und H258 gefärbten Spermatozoen mit einem Mikroskop (Axioskop; Zeiss, Oberkochen), das mit einer Fluoreszenzeinrichtung und den entsprechenden Filtern (Zeiss, Oberkochen) ausgestattet war, untersucht (Anregung für H258: 365nm und PSA-FITC: 450-490nm). Durch Wechseln der Filter konnten in einem Blickfeld am selben Spermatozoon beide Färbungen beurteilt und fast zeitgleich dokumentiert werden.

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 positiv; c) akrosomintakt und tot (AIT): PSA-FITC positiv, H258 positiv und d) akrosomreagiert und tot (ART): PSA-FITC negativ, H258 positiv. Die Auswertung erfolgte „einfach-blind“ und wurde regelmäßig durch einen zweiten Experimentator validiert.

2.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Motilität und der Akrosomreaktion wurden in MS-Excel-Tabellen erfasst. Die Daten in Prozent wurden mit Hilfe der Formel: $y = \arcsin(\sqrt{x/100})$ transformiert. Mittelwerte und SEM wurden mit dem Programm InStat™ von Graph Pad® errechnet. Für den Vergleich mehrerer Daten wurde der Tukey Test nach two-way ANOVA angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Bovines Hodenmaterial

Das fixierte und in Paraffin eingebettete bovine Hodengewebe wurde bei Raumtemperatur gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Gewebeschnitte für die *in situ* Hybridisierung bzw. für die Immunhistochemie hergestellt und in die Versuche eingesetzt.

3.1.2 Spermatozoen

Nach Auftauen und Aufbereiten der Spermatozoen im „swim up-Verfahren“ lag eine Konzentration von 50 bis 70×10^6 Spermatozoen/ Milliliter vor. Für die Motilitätsuntersuchungen und die Überprüfung des akrosomalen Status wurde eine Konzentration von $20\text{--}30 \times 10^6$ Spermatozoen /ml verwendet.

3.1.3 mRNA Isolierung

Mit Hilfe von, an Magnetkügelchen gebundenem d(T)₂₅-Biotin + Streptavidin (MPG-Guanidine Streptavidin System) konnte mRNA der 3 Porin Subtypen aus bovinem Hodengewebe gewonnen werden. Diese mRNA diente als Ausgangspunkt für die Synthese der entsprechenden Porin cDNAs (Reverse Transkriptase Reaktion=RT-Reaktion). Direkt daran anschließend erfolgte die Polymerasekettenreaktion (Abb. 7).

3.2 RT-PCR aus bovinem Hodenhomogenat

Zum Nachweis der mRNA-Expression der Porin Subtypen 1, 2 und 3 wurde die RT-PCR mit bovinem Hodenhomogenat durchgeführt.

3.2.1 Expression der Porin 1, 2 und 3 mRNA in bovinem Hoden

Die Amplifikation von cDNA Fragmenten durch die PCR mit den Primern Porin 1 (P1), Porin 2 (P2E), und Porin 3 (P3) sind in der Abbildung 7 dargestellt:

Porin 1, 2 und 3 mRNA wurde mit Hilfe der eingesetzten Primer im bovinen Hodenhomogenat bei unterschiedlichen Fragmentgrößen nachgewiesen. Nach Einsatz des Primerpaars Porin1 (P1) konnte ein RT-PCR Produkt bei der Größe von 636 bp Nukleotiden

in der DNA Elektrophorese als eine sehr starke Bande nachgewiesen werden. (Abb. 7, Spur 1). Das Porin 2 RT- PCR Produkt wurde als deutliche Bande im Größenbereich von 394 bp Nukleotiden mit dem Primerpaar Porin 2E (P2E) detektiert (Abb. 7, Spur 2). Mit Hilfe des Primerpaars Porin 3 (P3) konnte das Porin 3 RT-PCR Produkt aus bovinem Hodenhomogenat bei einer Größe von 237 bp ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 7, Spur 3). Als Negativkontrolle wurde die PCR ohne Matrize (cDNA) durchgeführt. Hier zeigte sich, wie erwartet, keine Bande (Abb. 7, Ko).

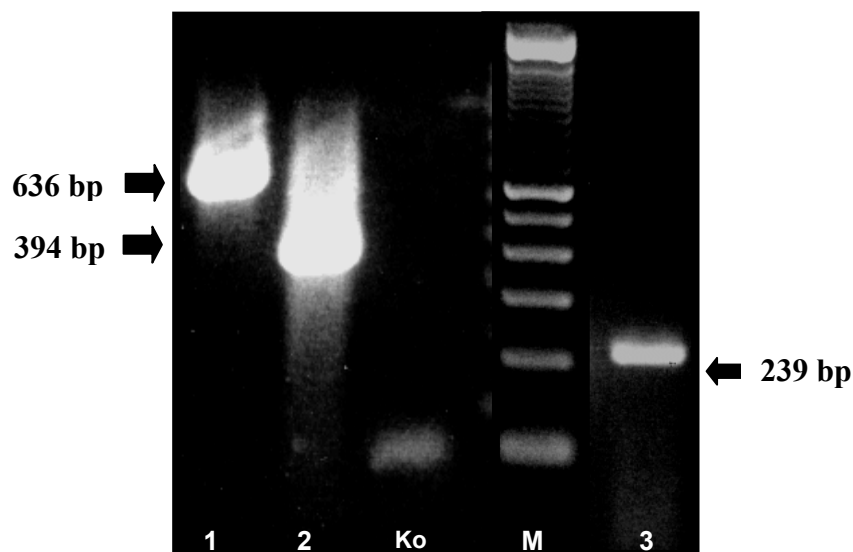


Abbildung 7. Gelelektrophorese von RT-PCR Produkten zum Nachweis der Porin 1, 2 und 3 mRNA Expression im bovinen Hodenhomogenat. 1=RT-PCR Produkt (636 bp) mit Primerpaar Porin 1 (P1); 2=RT-PCR Produkt (394 bp) mit Primerpaar Porin 2 (P2E); 3=RT-PCR Produkt (239 bp) mit Primerpaar Porin3 (P3); Ko=Negativkontrolle (RT-PCR ohne Matrize); M=Marker

Wie dargestellt, konnte mRNA von Porin Subtyp1, 2 und 3 in bovinem Hodenhomogenat eindeutig nachgewiesen werden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden die PCR- Produkte zur Sequenzierung der Firma MWG Biotech (Ebersberg) übergeben. Die überprüften Teilsequenzen von Porin 1 sind in Abbildung 8, die von Porin 2 in Abbildung 9 und die von Porin 3 in Abbildung10 dargestellt.

```
1  GTCTTCACCAAGGGCTATGGATTTGGCTTAATAAACTTGATCTGAAAACAAAATCTGAG
1  V F T K G Y G F G L I K L D L K T K S E

61  AATGGACTGGAATTTACGAGCTCAGGTTTCAGCCAACACCGAGACCACCAAAGTGACGGGC
21  N G L E F T S S G S A N T E T T K V T G

121  AGCCTGGAAACCAAGTACAGATGGACTGAATATGGTCTGACGTTTACAGAGAAATGGAAC
41  S L E T K Y R W T E Y G L T F T E K W N

181  ACTGACAACACGCTGGGCACGGAGATTACTGTGGAAGATCAGCTTGCACGTGGCCTGAAG
61  T D N T L G T E I T V E D Q L A R G L K

241  CTGACCTTCGATTTCATCCTTCTCACCAAACACTGGGAAAAAAAAATGCTAAAATCAAGACA
81  L T F D S S F S P N T G K K N A K I K T

301  GGGTACAAGCGGGAACATATCAACCTGGGCTGCGATGTGGATTTTGACATAGCTGGTCCT
101  G Y K R E H I N L G C D V D F D I A G P

361  TCCATCCGGGGCGCTCTGGTGCTGGGTTATGAAGGTTGGCTGGCTGGCTACCAGATGAAT
121  S I R G A L V L G Y E G W L A G Y Q M N

421  TTTGAGACTGCAAAGTCTCGAGTGAAGTCAAGCAACTTTGCAGTTGGCTACAAGACCGAT
141  F E T A K S R V T Q S N F A V G Y K T D

481  GAGTTCAGCTTCACACTAATGTAAATGATGGAACAGAGTTTGGTGGCTCCATTTATCAG
161  E F Q L H T N V N D G T E F G G S I Y Q

541  AAGGTGAACAAGAAGTTGGAGACCGCTGTTAATCTGGCCTGGACCGCAGGAAACAGCAAC
181  K V N K K L E T A V N L A W T A G N S N

601  ACTCGCTTCGGAATAGCAGCCAAGTACCAG
201  T R F G I A A K Y Q
```

Abbildung 8. Partielle Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des bovinen Porin 1 Gens, die durch RT-PCR mit Primerpaar P1 amplifiziert wurde. Die unterstrichenen Nukleotide entsprechen der Sequenz des Primers P1.

```

1   CTTGGACATCAGGTACCAACTGCACTCGCTTTGGAATTGCAGCTAAATATCAACTGGATC
1   Q   L   D   P   T   A   S   I   S   A   K   V   N   N   S   S   L   I   G   V

61  CCACTGCTTCCATTTCTGCAAAAGTCAACAACTCTAGTTTAATTGGAGTGGGCTATACTC
21  G   Y   T   Q   T   L   R   P   G   V   K   L   T   L   S   A   L   V   D   G

121 AGACTCTGAGGCCTGGTGTGAAGCTTACACTGTCTGCCCTGGTAGACGGGAAGAGCATT
41  K   S   I   N   A   G   G   H   K   L   L   A   L   E   L   E   A

181 ATGCTGGAGGCCACAACTTGGGCTTGCCCTGGAATTGGAGGCTTAATTCAGCTGAAAGA

241 AACCTCTGGAAATGGGTATCAGAAGATTGGCCTTAATATATTTCCAGTGTGACCAGCAG

301 GTTTCCCCACCCACCCCGAAGGTGATCAAAACAAAGGATGATCTAAACAAGAGCTG

361 TATTTTAAATATTTAGACAGTTCTTTGTTAGCTGGTT

```

Abbildung 9. Partielle Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des bovinen Porin 2 Gens, die durch RT-PCR mit Primerpaar P2E amplifiziert wurde. Die unterstrichenen Nukleotide entsprechen der Sequenz des Primers P2E.

```

1   GGTCAATGCTTACACTGATACAGGGAAAGCATCAGGCAACCTAGAGACCAAATACAAGAT
1   G   H   A   Y   T   D   T   G   K   A   S   G   N   L   E   T   K   Y   K   I

61  CTGTAACATATGGACTGACCTTCACGCAGAAGTGGAACACAGACAATACTCTTGGGACAGA
21  C   N   Y   G   L   T   F   T   Q   K   W   N   T   D   N   T   L   G   T   E

121 AATCTCTTGGGAGAATAAGTTGGCTGAAGGGTTGAACTGACTCTTGATACCATATTTGT
41  I   S   W   E   N   K   L   A   E   G   L   K   L   T   L   D   T   I   F   V

181 ACCGAACACAGGAAAGAAGAGTGGGAAATTGAAGGCCTCCTATAAACGGGATTGTTT
61  P   N   T   G   K   K   S   G   K   L   K   A   S   Y   K   R   D   C

```

Abbildung 10. Partielle Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des bovinen Porin 3 Gens, die durch RT-PCR mit dem Primerpaar P3 amplifiziert wurde. Die unterstrichenen Nukleotide entsprechen der Sequenz des Primers P3 .

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bovinem (*Bos taurus*) Porin 3 ist zu 97% identisch mit der des Menschen (*Homo sapiens*) und zu ca. 94% mit der von Maus (*Mus musculus*) oder Ratte (*Rattus norvegicus*).

3.2.2 Expression der Porin 1 und 2 mRNA in Hodenzelllinien

Um den Syntheseort von Porin genauer lokalisieren zu können, wurde die bereits beschriebene RT-PCR auch mit verschiedenen Hodenzelllinien der Maus und der Ratte durchgeführt. Es wurden die selben Primerpaare, wie unter 3.2.2 aufgeführt, verwendet.

Mittels Primerpaar P1 wurde ein RT-PCR Produkt von Porin 1 bei einer Größe von 636 bp in allen untersuchten Hodenzelllinien, nämlich Ratten-Peritubulärzellen, Ratten-Sertolizellen und frühe (GC1=Spermatogonien bis primäre Spermatozyten) sowie späte (GC2=Spermatiden) Stadien von Maus-Keimzelllinien nachgewiesen (Abb. 11, Spur 1-8). Ein RT-PCR Produkt von Porin 2 (P2E) konnte nur in frühen (GC1) und späteren Stadien (GC2) der Mauskeimzellen als schwache Bande bei 394 bp dargestellt werden (Abb. 12, Spur 5, 6). Als Positivkontrolle diente bovines Hodenhomogenat (Abb. 12, Spur 9). In der Negativkontrolle war kein Reaktionsprodukt nachzuweisen (Abb. 11, 12, Ko)

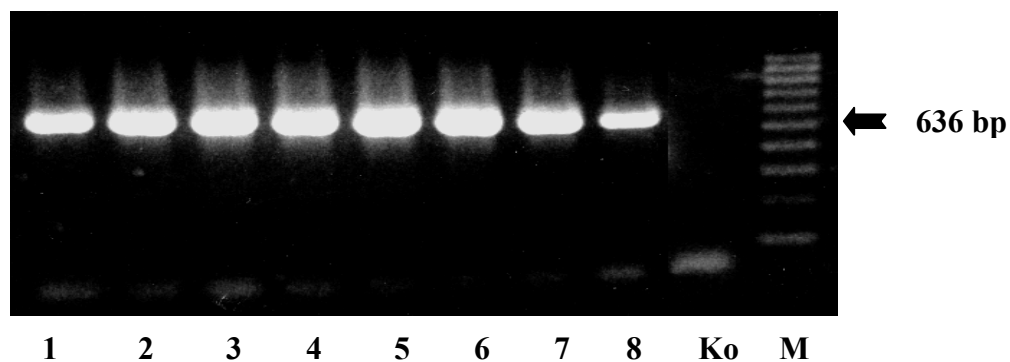


Abbildung 11. Gelelektrophorese von RT-PCR Produkten zum Nachweis der Porin 1 mRNA Expression (636 bp) in verschiedenen Hodenzelllinien. 1=Ratten-Peritubulärzelllinien (PZ); 2=Immortale Ratten-Peritubulärzelllinien (IPZ, RTC-8T12); 3=Ratten-Sertolizellen (SZ); 4=Immortale Ratten-Sertolizelllinien (ISZ, ASC-17D); 5=Maus-Keimzelllinien (GC1); 6=Maus Keimzelllinien (GC2); 7=Immortale Ratten-Sertolizelllinien (ISZ, SCIT-C8); 8=Immortale Ratten-Sertolizelllinien (ISZ, SC93RS2), Ko=Negativkontrolle; M=Marker.

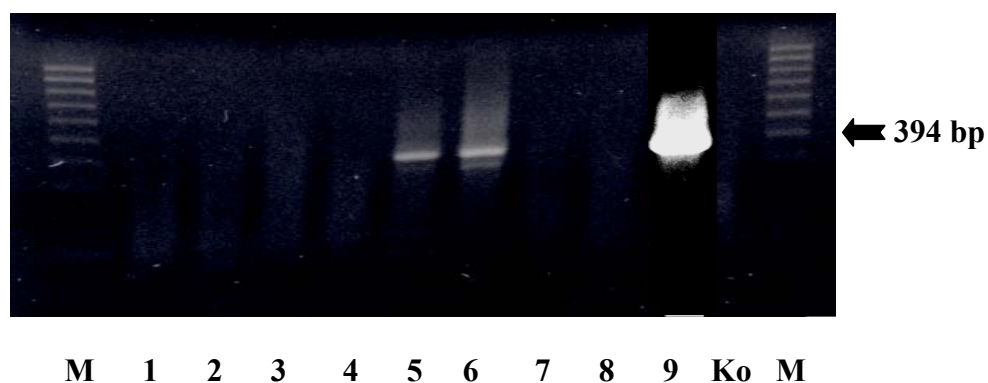


Abbildung 12. Gelelektrophorese von RT-PCR Produkten zum Nachweis der Porin 2 mRNA Expression (394 bp) in verschiedenen Hodenzelllinien. 1=Ratten-Peritubulärzelllinien (PZ); 2=Immortale Ratten-Peritubulärzelllinien (IPZ, RTC-8T12); 3=Ratten-Sertolizellen (SZ); 4=Immortale Ratten-Sertolizelllinien (ISZ, ASC-17D); 5=Maus-Keimzelllinien (GC1); 6=Maus Keimzelllinien (GC2); 7=Immortale Ratten-Sertolizelllinien (ISZ, SCIT-C8); 8=Immortale Ratten-Sertolizelllinien (ISZ, SC93RS2); 9=bovines Hodenhomogenat; Ko=Negativkontrolle; M=Marker.

3.3 Bestimmung der bovinen Porin 2 cDNA Sequenz

Mit Hilfe der drei Porin 2 Primerpaar, P2A, P2M. und P2E wurde eine PCR aus bovinem Hodenhomogenat durchgeführt. Es sollte damit die komplette Sequenz der bovinen Porin 2 cDNA ermittelt werden. Im Abb. 13 dargestellt, sind die drei Amplikons (PCR Produkte) nach der PCR aus bovinem Hodenhomogenat. Das Amplikon nach Verwendung des P2A Primerpaares konnte bei 453bp, mit dem P2M bei 407bp und dem P2E bei 394bp nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente die PCR ohne Matrize, hier wurde keine cDNA amplifiziert (Abb.13, Ko).

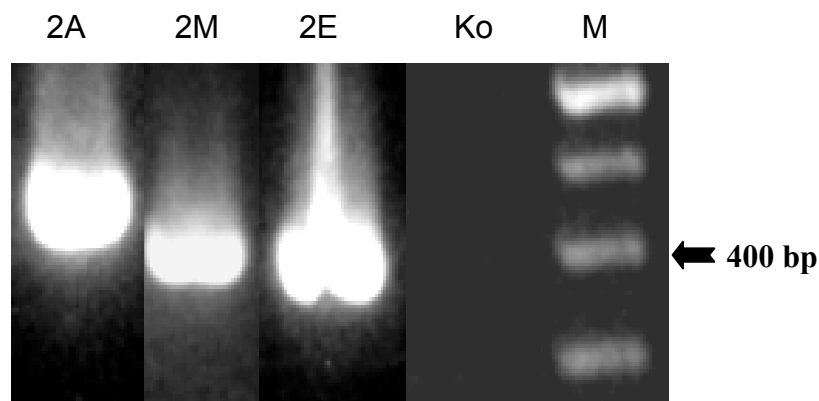


Abbildung 13. Gelelektrophoretische Darstellung der PCR Produkte zum Nachweis der kompletten Porin 2 cDNA Sequenz aus bovinem Hodenhomogenat. Verwendet wurden die Primerpaare P2A (453 bp), P2M (407 bp) und P2E (394 bp). Ko=Kontrolle, M=Marker

Nach der Sequenzierung der jeweiligen Amplikons durch die Firma MWG Biotech, konnte die vollständige Nukleotidsequenz des bovinen Porin 2 Gens definiert werden (Abb. 14).

```

1      ATGGCGACCCACGGACAGAACTGCGCGCGGCCAATGTGTATTCCTCCATCATATGCTGAC
1      M A T H G Q N C A R P M C I P P S Y A D

61     CTTGGCAAAGCTGCCAGAGATATATTCAACAAAGGATTTGGTTTTGGGTTGGTGAAACTG
21     L G K A A R D I F N K G F G F G L V K L

121    GATGTGAAAACAAAGTCGTGCAGTGGCGTGGAATTCTCAACATCTGGTTCATCTAATACA
41     D V K T K S C S G V E F S T S G S S N T

181    GACACTGGTAAAGTTACTGGGACCTTGGAGACCAAATATAAATGGTGTGAGTATGGTCTG
61     D T G K V T G T L E T K Y K W C E Y G L

241    ACTTTCACAGAAAAGTGGAACACTGATAACACTCTGGGAACAGAAATCGCTATTGAAGAC
81     T F T E K W N T D N T L G T E I A I E D

301    CAGATTTGCCAAGGTTTGAAACTGACATTTGATACCACCTTTTCACCAAACACAGGAAAG
101    Q I C Q G L K L T F D T T F S P N T G K

361    AAAAGTGGTAAATCAAGTCTTCTTACAAGAGGGAATGTATAAACCTCGGTTGTGATGTT
121    K S G K I K S S Y K R E C I N L G C D V

421    GGCTTTGATTTTGCTGGACCTGCAATCCATGGTTTCGGCTGTCTTCGGTTATGAGGGCTGG
141    G F D F A G P A I H G S A V F G Y E G W

481    CTTGCTGGGTACCAGATGACCTTTGACAGTGCCAAATCAAAGCTGACAAGGAATAACTTT
161    L A G Y Q M T F D S A K S K L T R N N F

541    GCAGTGGGCTACAGGACTGGGGACTTCCAGCTACACACTAATGTCAATGATGGTACAGAA
181    A V G Y R T G D F Q L H T N V N D G T E

601    TTTGGAGGATCAATTTATCAGAAAGTATGTGAAGATCTTGACACTTCAGTAAACCTTGCT
201    F G G S I Y Q K V C E D L D T S V N L A

661    TGGACATCAGGTACCAACTGCACTCGCTTTGGAATTGCAGCTAAATATCAACTGGATCCC
221    W T S G T N C T R F G I A A K Y Q L D P

721    ACTGCTTCCATTTCTGCAAAAGTCAACAACTCTAGTTTAATTGGAGTGGGCTATACTCAG
241    T A S I S A K V N N S S L I G V G Y T Q

781    ACTCTGAGGCCTGGTGTGAAGCTTACACTGTCTGCCCTGGTAGACGGGAAGAGCATTAAT
261    T L R P G V K L T L S A L V D G K S I N

841    GCTGGAGGCCACAAACTTGGGCTGCCCTTGGGAATTGGAGGCTTAA
281    A G G H K L G L P L E L E A

```

Abbildung 14. Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des bovinen Porin 2 Gens (Acc. No. AJ288914). Die farbig hervorgehobenen und unterstrichenen Nukleotide entsprechen der Sequenz der Primerpaare P2A (blau), P2M (rot) und P2E (grün)

Die abgeleitete Porin 2 Aminosäuresequenz von *Bos taurus* ist zu 98,6% identisch mit der des Menschen (*Homo sapiens*) und ca. 95% mit Maus (*Mus musculus*) oder Ratte (*Rattus norvegicus*).

3.4 *In situ* Hybridisierung

3.4.1 Ribosonde Porin 1 und 2

Die durch *in vitro* Transkription erhaltenen Ribosonden Porin 1 und 2, wurden mit DIG-markiert (2.4.2.3). Der Erfolg der Markierung und die Bestimmung der Konzentration wurde im *Dot-Blot* Verfahren überprüft. Es konnte eine Konzentration der DIG-markierten Ribosonde Porin 1 *sense* von 50 ng/μl ermittelt werden (Abb. 15). Für die DIG-markierte Ribosonde Porin 1 *antisense* wurde eine Konzentration von 40 ng/μl (Abb. 15), 200ng/μl für DIG-markierte Ribosonde Porin 2 *sense* und 300 ng/μl für DIG-markierte Porin 2 *antisense* nachgewiesen (Abb. 16).

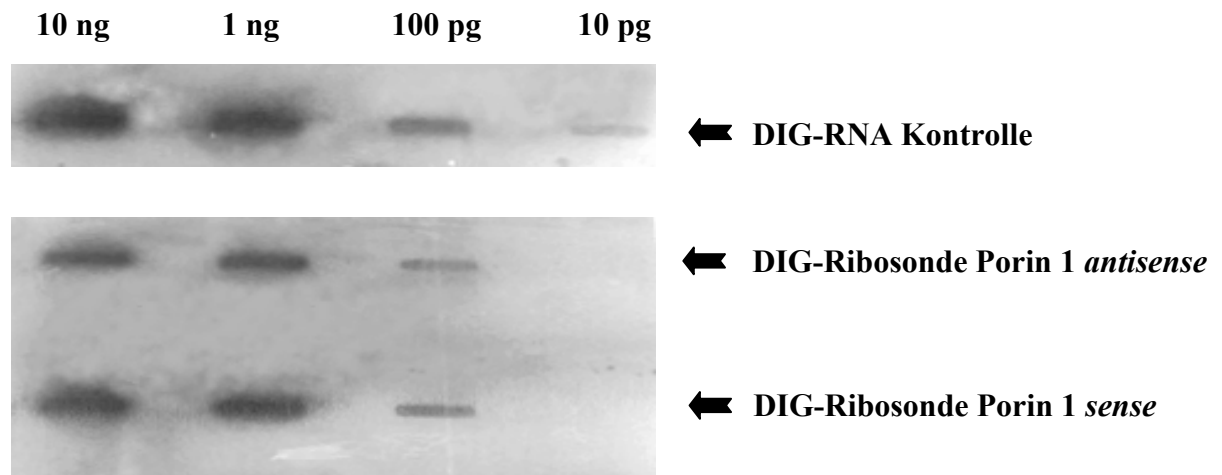


Abbildung 15. „Dot Blot“ zur Bestimmung der Konzentration von DIG-markierter Ribosonde Porin 1 *antisense* und *sense*.

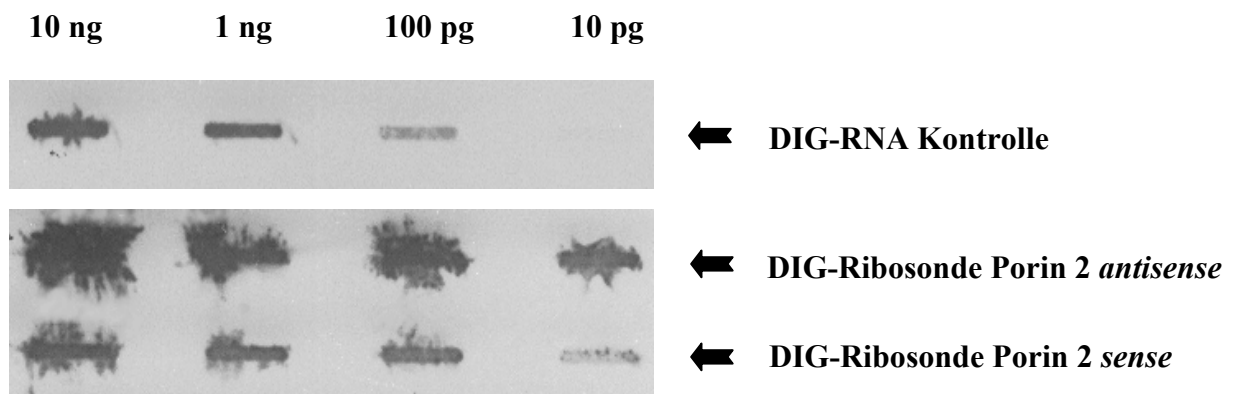


Abbildung 16. „Dot Blot“ zur Bestimmung der Konzentration von DIG-markierter Ribosonde Porin 2 *antisense* und *sense*.

3.4.2 Lokalisation von Porin 1 mRNA in bovinem Hoden

Um den Syntheseort von Porin besser lokalisieren zu können, wurde die *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Die Hodengewebeschnitte wurden mit 20 µg/ml Proteinase K, zur Permeabilisierung der Zellen behandelt und anschließend mit den entsprechenden Sonden inkubiert. Als Nachweis für ein Hybridisierungssignal wurde das NBT/BCIP-Detektionssystem eingesetzt. Im Fall einer positiven Hybridisierung kam es zu einem dunkelblauen bis braunem Farbniederschlag im Cytosol der Zellen. Somit war eine Detektion des Syntheseortes möglich.

Nach Einsatz von 5 ng/µl Ribosonde Porin 1 *antisense* konnte ein deutliches Farbsignal beobachtet werden (Abb. 17A). Eine Hybridisierung erfolgte im Cytoplasma von Spermatogonien (Spg), primären Spermatozyten (Spz) und auch in Sertolizellen (SZ). Zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien gab es Unterschiede im Hybridisierungssignal. Hier dargestellt sind beispielhaft die Tubuli seminiferi in den Spermatogenesestadien I-IV (Abb. 17 A, B) und VII-VIII (Abb. 17 A, B). Während im Spermatogenesestadium I-IV eine mRNA Expression sowohl in Sertolizellen als auch in Spermatogonien und in Spermatozyten zu finden war, wurde im Stadien VII-VIII kein Hybridisierungssignal in den Sertolizellen aber ein deutliches Hybridisierungssignal in Spermatogonien und Spermatozyten beobachtet. Im Stadium V-VI konnte ebenfalls ein Hybridisierungssignal in den Sertolizellen, Spermatogonien und Spermatozyten nachgewiesen werden. Kein Hybridisierungssignal wurde in Sertolizellen des Stadiums IX-XII gefunden, während mRNA auch diesem Stadium in Spermatogonien und Spermatozyten gefunden wurde. Im Gegensatz dazu wurde, wie zu erwarten, nach Verwendung von 5 ng/µl Ribosonde Porin 1 *sense* keine Farbreaktion und somit keine Hybridisierung von Porin mRNA in den Hodenzellen nachgewiesen (Abb. 17 B).

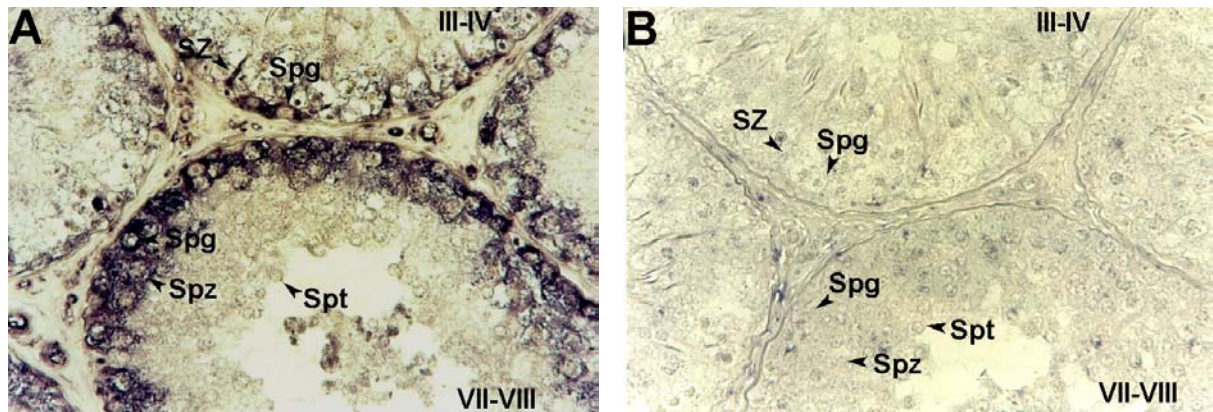


Abbildung 17: Lokalisation von Porin Typ 1 mRNA durch *in situ* Hybridisierung im Spermatogenesestadium III - IV und VII - VIII boviner Tubuli Seminiferi . **A.** Ribosonde Porin 1 *antisense*, **B.** Ribosonde Porin 1 *sense* (Negativkontrolle); Spg=Spermatogonien, Spz=Spermatozyten, Spt=Spermatiden, SZ=Sertolizellen.

Porin 1 mRNA konnte also nicht nur in Keimzellen, wie Spermatogonien und frühe Spermatozyten nachgewiesen werden, sondern auch, allerdings abhängig vom Spermatogenesestadium, in Sertolizellen,.

3.4.3 Lokalisation von Porin 2 mRNA in bovinem Hoden

Der mit der Ribosonde Porin 2 *antisense* durchgeführte *in situ* Hybridisierungsversuch (Abb. 18A und 18C) zeigte stadienabhängig ein positives Hybridisierungssignal in Spermatogonien (Spg), primären Spermatozyten (Spz), runden Spermatiden (Spt) und Sertolizellen (SZ). Als Negativkontrolle diente Ribosonde Porin 2 *sense* (Abb. 18B und 18D); hier konnte kein positives Hybridisierungssignal festgestellt werden. Im Stadium VII-VIII wurde Porin 2 mRNA in Spermatogonien und Spermatozyten gefunden, während im Stadium IX-XII zusätzlich zu Spermatogonien und Spermatozyten auch ein Hybridisierungssignal in Spermatiden nachgewiesen wurde. In diesen beiden Stadien konnte kein Hybridisierungsnachweis in Sertolizellen erbracht werden (Abb. 18A). Ein schwaches Hybridisierungssignal sowohl in Sertolizellen als auch in Spermatogonien konnte in Stadium I-IV und V-VI detektiert werden (Abb. 18C).

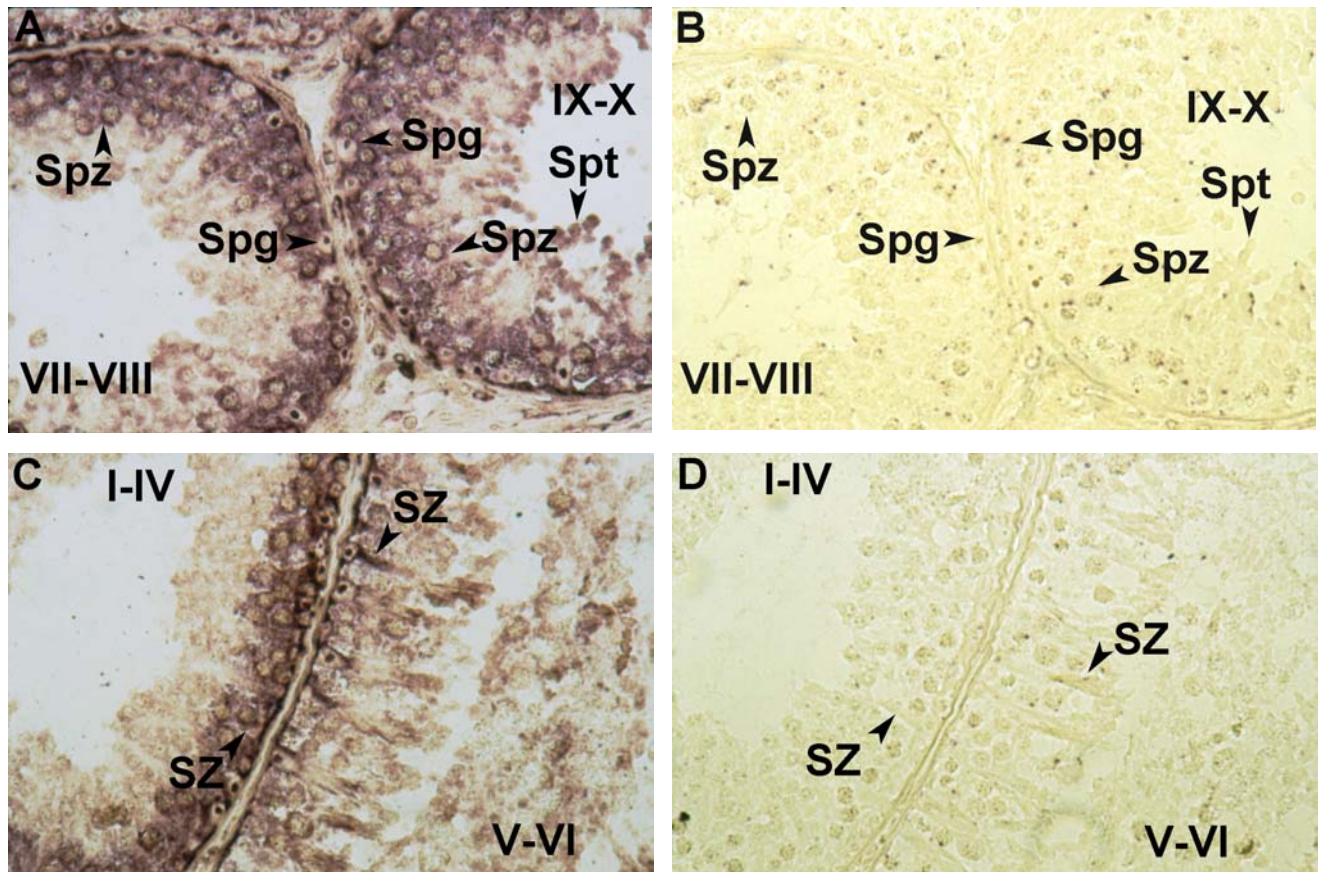


Abbildung 18: Lokalisation von Porin Typ 2 mRNA durch *in situ* Hybridisierung im Spermatogenesestadium VII-VIII, IX-XII, I-IV und V-VI boviner Tubuli Seminiferi. **A:** Ribosonde Porin 2 *antisense*, Stadium VII-VIII, IX-XII; **B** Ribosonde Porin 2 *sense* (Negativkontrolle), Stadium VII-VIII, IX-XII; **C** Ribosonde Porin 2 *antisense*, Stadium I-IV und V-VI; **D:** Ribosonde Porin 2 *sense*, Stadium I-IV und V-VI; Spg=Spermatogonien, Spz=Spermatozyten, Spt=runde Spermatiden, SZ=Sertolizellen.

Porin 2 mRNA konnte stadienabhängig in frühen Stadien der Spermatogenese, wie Spermatogonien und Spermatozyten, in späteren Entwicklungsstadien (runden Spermatiden) aber auch in Sertolizellen lokalisiert werden.

3.5 Nachweis von Porin 1 und Porin 2 Protein in bovinem Hodengewebe mit Antiseren

Zum Nachweis von Porin 1 und Porin 2 Protein in bovinem Hodengewebe wurden immunhistochemische Untersuchungen mit anti-Porin-Peptidantikörpern durchgeführt. Das Antiserum AS P6 ist gegen eine Peptidsequenz (P1b) aus hPorin 1 (h=Mensch) gerichtet. Das gegen ein synthetisches Peptid aus hPorin Typ 2 (H 1) gerichtete Antiserum wurde als AS

P45 und ein weiteres Antiserum gegen ein anderes synthetisches Peptid aus der hPorin Typ 2 (hPorin 2) Sequenz (H 2) hergestellte Antiserum wurde als AS P20 bezeichnet.

3.5.1 Bestimmung der Antiserentiter im ELISA

Zunächst wurde der Antikörpergehalt der oben genannten Antiseren orientierend im ELISA bestimmt. Die Bewertung der Antikörperbindung an das adsorbierte Peptid wurde im Vergleich zu den entsprechenden Präimmunseren (PI) als Negativkontrollen durchgeführt. Die Extinktionswerte der Titrationsreihen, gemessen bei einer Wellenlänge von 492 nm in Abhängigkeit von Verdünnungsfaktor, sind in Abb. 19 A, 19 B und 19 C dargestellt. Die unterschiedliche Immunreaktivität der anti-Porin Antiseren gegen die synthetischen Peptide ist deutlich zu erkennen. Die Titrationskurven des AS P6 und des AS P45 nahmen einen annähernd sigmoidalen Verlauf (Abb. 19 A, B) ein, wohingegen der Kurvenverlauf des AS P20 sich eher flach darstellt. Die Antigenerkennung der gewonnenen Antiseren ist in jedem Fall titrationsabhängig. Bei den Negativkontrollen lagen keine Abhängigkeiten der Extinktionswerte von den Verdünnungsstufen vor. Bei den Präimmunseren wurden nur Extinktionswerte gemessen, die unwesentlich über dem Leerwert lagen. Um Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden die anti-Porin Antiseren im ELISA mit nicht relevanten synthetischen Peptiden getestet und die Extinktionswerte ermittelt. Alle zu testenden anti-Porin-Peptid-Antiseren zeigten eine spezifische Bindung an ihr entsprechendes Antigen. Kreuzreaktionen mit anderen synthetischen Peptiden konnten nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

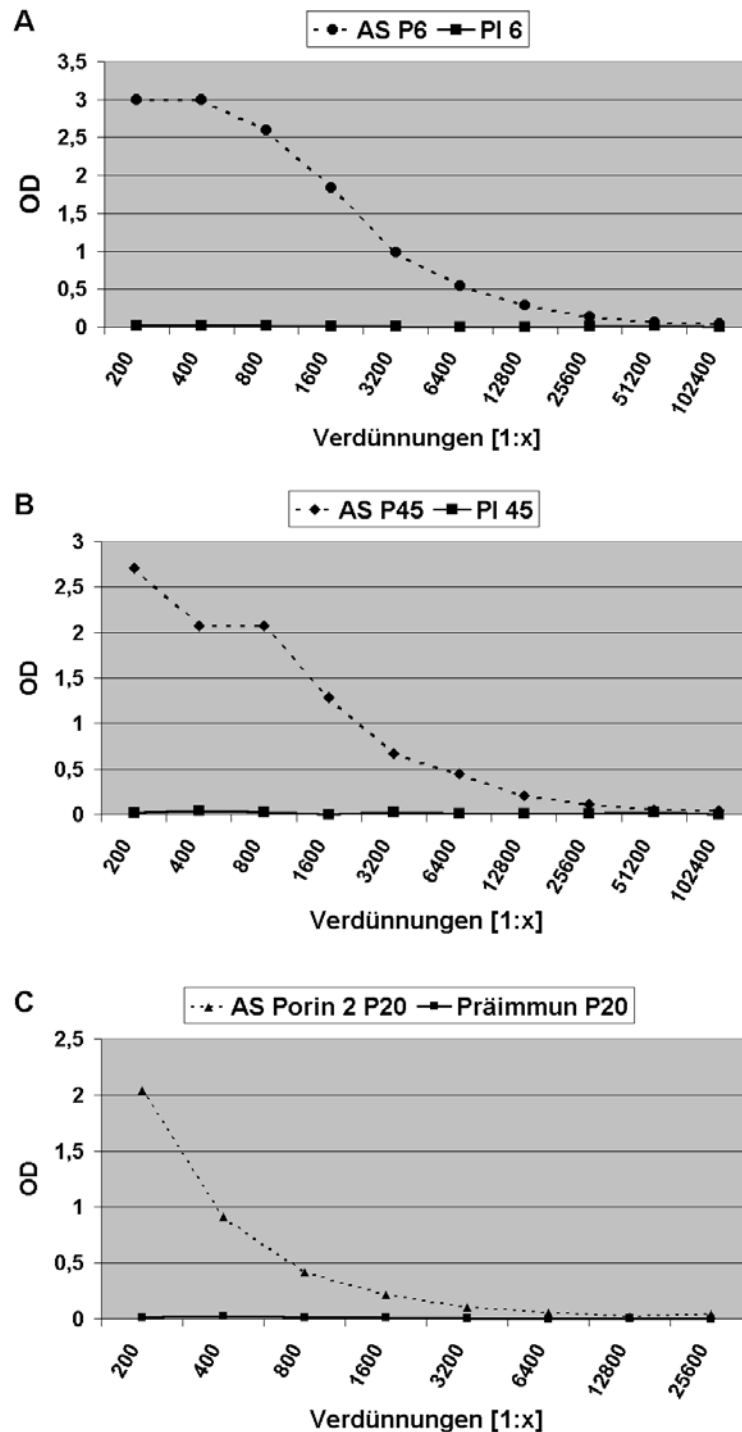


Abbildung 19. Abhängigkeit der Extinktionswerte (OD) bei 492 nm (Ordinate) von den Verdünnungsstufen (Abszisse) der anti-Porin Antiseren **A:** AS P6; **B:** AS P45; **C:** AS P20 und den entsprechenden Präimmunseren PI-6, PI-45 und PI-20. Als Antigen wurden je 1,5 µg Peptid pro Vertiefung in Immuno-Module mit hochaffiner Bindungskapazität eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:3000 und mit DAB als Substrat nachgewiesen.

3.5.2 Immunbiochemische Untersuchungen mit anti-Porin Antikörpern an Proteinextrakten aus bovinen Spermatozoen

Um zu untersuchen, ob die gegen synthetische Peptide gerichteten Antiseren Porin Protein in Spermatozoen erkennen, wurden Immunblots mit einem Zellextrakt aus bovinen Samenzellen und einer biochemisch angereicherten Porinfraktion aus menschlichen Lymphozyten als Positivkontrolle durchgeführt. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden die nach ihren apparenten Molekularmassen aufgetrennten Proteine mit anti-Porin 1 bzw. anti-Porin 2 Antiseren inkubiert. Der Nachweis immunreaktiver Polypeptide erfolgte mit dem ECL System. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale anti-Porin 1 Antikörper Porin 31 HL (Calbiochem) eingesetzt. Der Maus monoklonale Antikörper Porin 31 HL wurde gegen gereinigtes menschliches Lymphozyten 31 kDa Porin hergestellt und soll im wesentlichen mit Porin 1 aber nicht mit Porin 2 reagieren. In Abbildung 22 ist links die entsprechende Immunreaktion mit angereichertem Porin und dem Extrakt aus Bullen Spermatozoen dargestellt. In beiden Fällen konnte eine eindeutige Reaktion im Bereich von 31 kDa nachgewiesen werden. In humanem Lymphozyten Porin (Positivkontrolle) konnte eine intensiv markierte Doppelbande im Bereich von 30/31 kDa beobachtet werden. Hier war die obere 31 kDa Bande wesentlich schwächer ausgeprägt als das untere ca. 30 kDa schweres Polypeptid. Im Spermatozoenextrakt war eine relativ schwache, aber eindeutige Immunreaktion mit einem Polypeptid von etwa 30 kDa zu sehen.

Abbildung 22 zeigt rechts den Einsatz des Antiserums P6, das gegen ein synthetisches Porin 1 Peptid gerichtet ist. Bei angereichertem Porin konnte eine sehr intensive Immunreaktion im Bereich von etwa 28 bis 32 kDa festgestellt werden. Im Gesamtspermatozoenextrakt wurde eine recht schwache aber klare Reaktion mit einem Protein von etwa 31 kDa beobachtet.

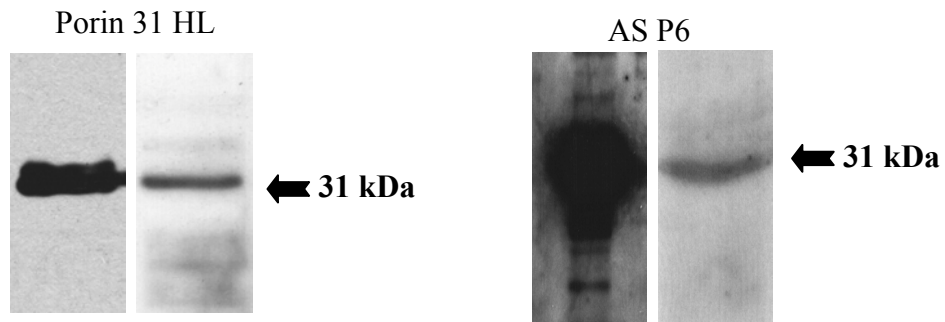


Abbildung 22. Immunblot zum Nachweis von Porin 1 Protein in Porin aus humanen Lymphozyten (linke Spur, ca. 5 μ g Protein) und einem Proteinextrakt aus bovinen Spermatozoen (rechte Spur, $1,5 \times 10^6$ Zellen/Spur). **Links,** Einsatz des monoklonalen anti-Porin 1 Antikörpers, 1:200 verdünnt als Positivkontrolle (Antigen: Porin 31 HL). **Rechts,** Antiserum AS P6, 1:100 verdünnt (Antigen: synthetisches Porin 1 Peptid). Als Zweitantikörper dienten Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG (für Porin 31 HL), 1:3000 verdünnt bzw. anti-Kaninchen IgG (für AS P6), 1:5000 verdünnt. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse mit den Antiseren AS P45 und AS P20, die gegen unterschiedliche, synthetische Porin 2 Peptide gerichtet sind, dargestellt. Auf der linken Seite ist zu erkennen, dass AS P45 menschliches Lymphozyten Porin erkennt. Man sieht eine intensiv markierte Doppelbande bei ca. 30/31 kDa, wobei die untere Bande relativ schwächer markiert erscheint. Porin Antigen wurde von AS P45 auch im bovinen Spermatozoenextrakt detektiert. Hier war allerdings nur eine recht schwache, gut fokussierte linienförmige Bande bei etwa 30 kDa sichtbar. Auf der rechten Seite ist zu sehen, dass auch Antiserum AS P20 in angereichertem Porin sein Antigen als scharfe Bande bei 30 kDa erkennt. Das Antiserum reagierte im Extrakt aus Spermatozoenschwanz allerdings nur mit einer einzigen, kaum sichtbaren, schwachen Bande bei 30 kDa.

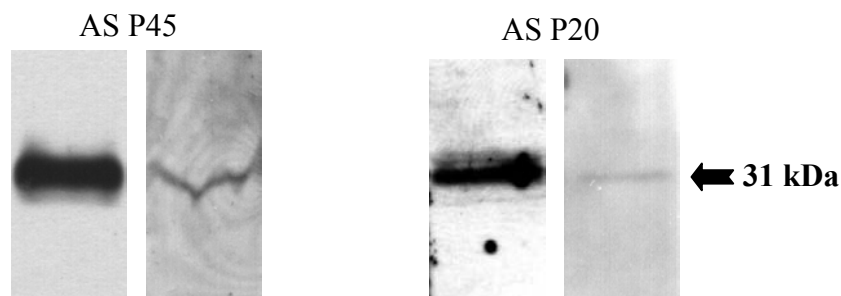


Abbildung 23. Immunblot zum Nachweis von Porin 2 Protein in Porin aus humanen Lymphozyten (linke Spur, ca. 5 μ g Protein) und einem Proteinextrakt aus bovinen Spermatozoen (rechte Spur, $1,5 \times 10^6$ Zellen/Spur). **Links,** Einsatz des Antiserums AS P45, 1: 100 verdünnt (Antigen: synthetisches Porin 2 Peptid). **Rechts,** Antiserum AS P20, 1:100 verdünnt (Antigen: synthetisches Porin 2 Peptid). Als Zweitantikörper dienten Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG, 1:5000 verdünnt. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL System nachgewiesen.

Insgesamt kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Antiseren gegen synthetische Porin Peptide auch Antigen in einer Proteinfraction aus menschlichem Lymphozyten Porin erkennen. Relativ schwach, aber in der Regel eindeutig waren die Immunreaktionen mit einem Polypeptid von etwa 30 kDa, das in Spermatozengesamtextrakt erkannt wurde. Hier handelte es sich aufgrund der apparenten Molekularmasse sehr wahrscheinlich um Spermatozoen Porin 1 bzw. Porin 2 Protein. Von den anti-Porin 1 Antikörpern wurde von den zwei Banden in angereichertem Porin aus menschlichen Lymphozyten präferentiell die untere 30 kDa Bande erkannt; anti-Porin 2 Antiseren hingegen reagierten mit einem Polypeptid, das eine etwas größere apparente Molekularmasse von etwa 31 kDa aufwies.

3.5.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Lokalisation der Proteine Porin 1 und 2 wurden immunhistochemische Untersuchungen mit den Antiseren AS P6, AS P45 und AS P20 auf mit Methacarn-fixierten Hodenschnitten durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Präimmunseren (PI). Die Schnitte wurden am Ende des Versuchs zur besseren Darstellung mit Methylenblau gegengefärbt.

3.5.3.1 Lokalisation des Porin 1 Proteins in bovinem Hoden

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Antiserum AS P6 dargestellt. Eine deutliche Antigen-Antikörper-Reaktion in Form eines braun-schwarzen Farbniederschlags ist in den Sertolizellen zu erkennen (Abb. 20A, SZ). Das Cytosol vereinzelter Spermatogonien war zwar schwächer aber deutlich angefärbt (Abb. 20A, Spg). Das Präimmunserum PI-6 rief keine nennenswerte Farbreaktion hervor (Abb. 20B). Zwischen den Zellen unterschiedlicher Spermatogenesestadien konnte keine Differenz in der Porin 1 Proteinverteilung beobachtet werden.

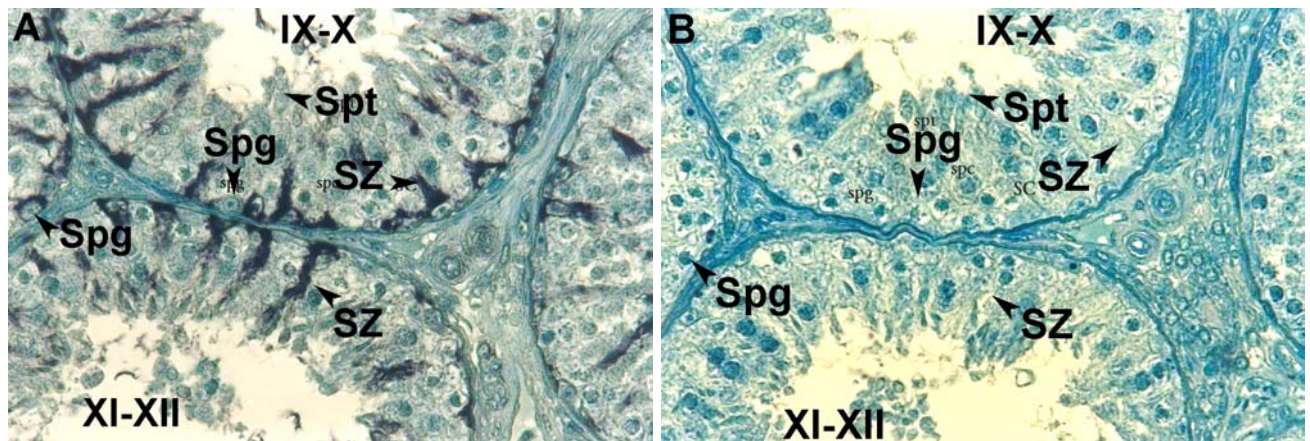


Abbildung 20. Immunhistochemischer Nachweis von Porin 1 Protein im Spermatogenesestadium IX-XII boviner Hoden. Als Erstantikörper wurden **A:** AS P6 (Verdünnung 1:100) und **B:** PI-6 (Verdünnung 1:100) eingesetzt. Alkalische Phosphatasegekoppelte anti-Kaninchen IgG (Bio-Rad) in einer Verdünnung von 1:100 wurden als Zweitantikörper verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit BCIP/NBT als Substrat nachgewiesen. SZ=Sertolizelle, Spg=Spermatogonie

3.5.3.2 Lokalisation des Porin 2 Proteins in bovinem Hoden

Zum Nachweis von Porin 2 wurde das AS P20 in die Experimente eingesetzt. Dabei konnten Immunreaktionen in runden und elongierten Spermatiden später Stadien der Spermatogenese nachgewiesen werden (Abb. 21 A). Als Negativkontrolle diente das Präimmunserum PI 20, das keine spezifische Farbreaktion verursachte (Abb. 21 B). Die unterschiedlichen Spermatogenesestadien wiesen keinen deutlichen Unterschied im Proteinverteilungsmuster auf.

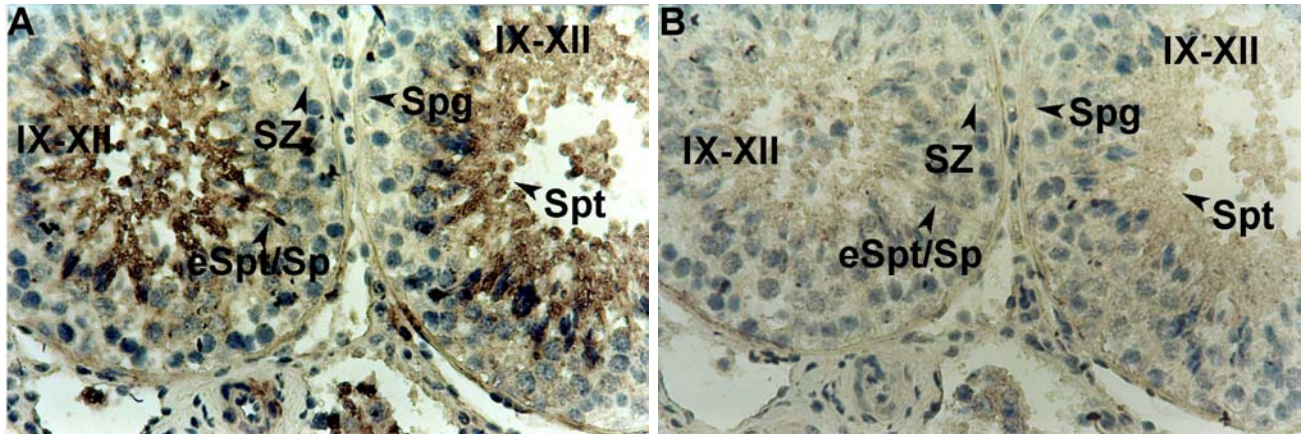


Abbildung 21. Immunhistochemischer Nachweis von Porin 2 Protein in den Spermatogenesestadien IX-XII boviner Hoden. Als Erstantikörper wurden **A:** AS P20 (Verdünnung 1:50) und **B:** PI-20 (Verdünnung 1:50) eingesetzt. Alkalische Phosphatasegekoppelte anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:100 wurden als Zweitantikörper verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit BCIP/NBT als Substrat nachgewiesen Sz=Sertolizelle, Spg=Spermatogonie; Spt=Spermatozoen; eSpt/Sp=elongierte Spermatozoen bzw. Spermatozoen

3.6 Immunzytologische Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenz an bovinen Spermatozoen

Für weitere Untersuchungen zur Lokalisation von Porin 1 und 2 Protein in bovinen Spermatozoen wurde die Immunocytofluoreszenz mit dem monoklonalen anti-Porin 1 Antikörper (Porin 31 HL) und den Antiseren AS P45 und AS P20, die gegen Porin 2 gerichtet, durchgeführt. Der Maus monoklonale Antikörper ist gegen 1 und nicht mit Porin 2 reagieren. Über die Spezifität betreffend Porin 3 ist nichts bekannt. In Abbildung 24 A ist die Immunreaktion mit Spermatozoen Porin nach Verwendung des monoklonalen Antikörpers Porin 31 HL dargestellt. Eine deutliche Markierung war im akrosomalen Bereich des Spermatozoenkopfes sowie eine Reaktion im Bereich des Mittelstücks des Spermatozoons zu erkennen. Porin Typ 2 Protein konnte mit Hilfe der Antiseren AS P45 und AS P20 im Spermatozoenkopf, im Mittelstück und partiell auch im Hauptstück des Flagellums (bei AS P45 sehr schwach ausgeprägt) nachgewiesen werden (Abb. 24B, C). Gegenüber der Lokalisation von Porin 1 durch Porin 31 HL, war die Immunreaktion durch mit AS P45 zusätzlich durch eine schwache Immunfluoreszenz im postakrosomalen Bereich und eine dezente Markierung des Hauptstücks des Schwanzes gekennzeichnet. AS P20 zeigte ein ähnliches Muster, wobei eine stärkere Fluoreszenz des Hauptstücks im Vergleich zu den beiden anderen Antikörpern zu beobachten war.

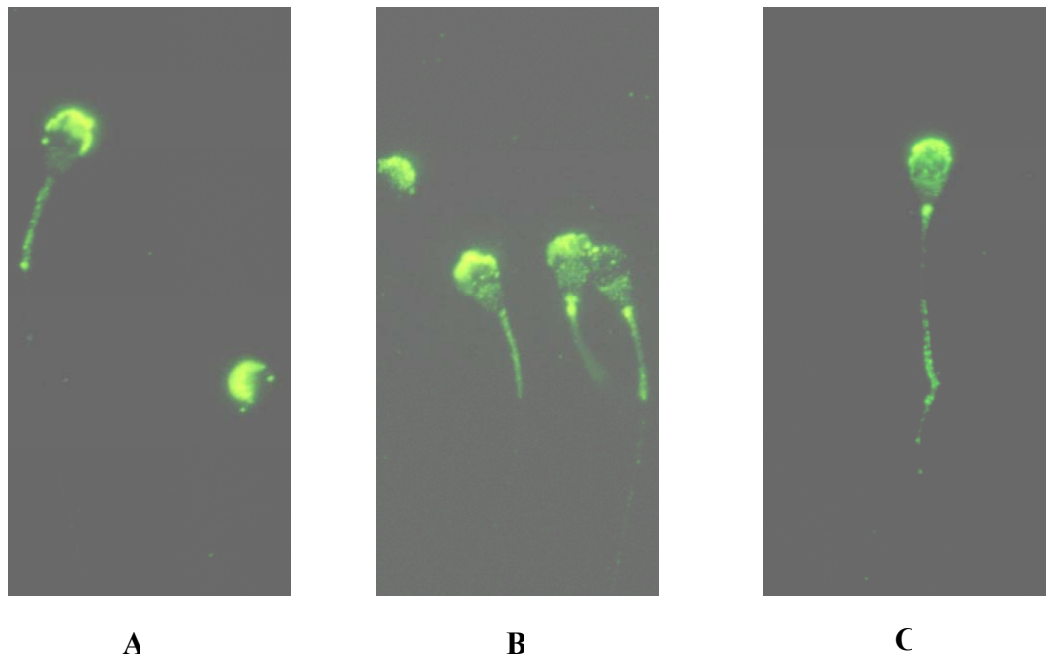


Abbildung 24. Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von Porin 1 und 2 Protein in bovinen Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden mit Methanol fixiert und **A:** mit dem monoklonalen Porin 1 Antikörper (anti-Porin 31 HL) in einer Verdünnung von 1:10; **B:** mit Antiserum AS P45 (Verdünnung von 1:50) und **C:** mit Antiserum AS P 20 (Verdünnung 1:50) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit biotinyliertem anti-Kaninchen IgG und mit FITC-markiertem Avidin immunfluoreszenzoptisch dargestellt.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass mit Hilfe der Immunfluoreszenz Porin 1 und Porin 2 Protein im Kopf und Mittelstück des bovinen Spermatozoons nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz zu dem Nachweis von Porin 1 im Bereich des Spermatozoonkopfes und des Mittelstückes mittels des spezifischen Antikörpers anti-Porin 31 HL wurde durch das Antiserum AS P20 und in deutlich geringem Maße auch durch AS P45 Porin 2 Protein zusätzlich im Hauptstück des Flagellums detektiert.

3.7 Reinigung der anti-Porin Antikörper durch eine Affinitätschromatographische Säule

Die mit dem synthetischen Peptid Porin 1b gekoppelte Affinitätssäule, wurde zur Reinigung des AS P6 verwendet. Zur Gewinnung von monospezifischen Antikörpern aus den Antiseren AS P45 und AS P20 wurden Affinitätssäulen gekoppelt mit Peptid H 1 bzw. mit Peptid H 2 eingesetzt. Die gereinigten Antikörper wurden in 20 Fraktionen von jeweils 500 µl aufgefangen. Zur Bestimmung des Antikörpergehalts wurde ein ELISA durchgeführt und der Proteingehalt mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit bestimmt.

3.7.1 Charakterisierung der affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin Antikörper

Nach der Reinigung der anti-Porin 1 und 2 Antikörper durch die Affinitätssäulen wurden die Fraktionen auf ihren Antikörpergehalt hin im ELISA überprüft. Die Fraktionen mit den höchsten Extinktionswerten im ELISA wurden vereinigt, die Proteinkonzentration photometrisch gemessen und der Antikörpertiter erneut im ELISA bestimmt.

3.7.2 Proteinkonzentration der affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin 1 und anti Porin 2 Antikörper

In den vereinigten Antikörperfraktionen wurden folgende Proteinkonzentration bestimmt (Tab. 4):

Protein	Antiserum	affinitätsgereinigte Antikörper	Proteingehalt
Porin 1	AS P6	affi P6	225 µg/ml
Porin 2	AS P45	affi P45	150 µg/ml
Porin 2	AS P20	affi P20	37,5 µg/ml

Tabelle 4. Proteingehalt der vereinigten affinitätsgereinigten Antikörperfraktionen

3.7.3 Bestimmung des Antikörpertiters der affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin 1 und anti-Porin 2 Antikörper im ELISA

Die Bewertung der Antikörperbindung an die Säulenmatrix gebundene Peptid, das für die entsprechenden Antiseren als Antigen eingesetzt wurde, wurde im Vergleich zu gereinigten Kaninchen IgG (Sigma) mit entsprechender Proteinkonzentration als Negativkontrolle durchgeführt. Wie in Abbildung 25 gezeigt, ist die Antigenerkennung durch die affinitätsgereinigten Antikörper titrationsabhängig. Bei den Negativkontrollen wurden abhängig von den Verdünnungsstufen keine nennenswerten Extinktionswerte gemessen. Der Kurvenverlauf ist bei den affinitätsgereinigten P6 und P45 Antikörpern annähernd sigmoidal, wobei bei P20 Antikörpern ein relativ schneller und steiler Abfall der Immunreaktion zu verzeichnen war. Der Antikörpertiter wurde für P6 bei einer Verdünnung von 1: 320, bei P45 von 1:160 und bei P20 von 1:40 festgelegt.

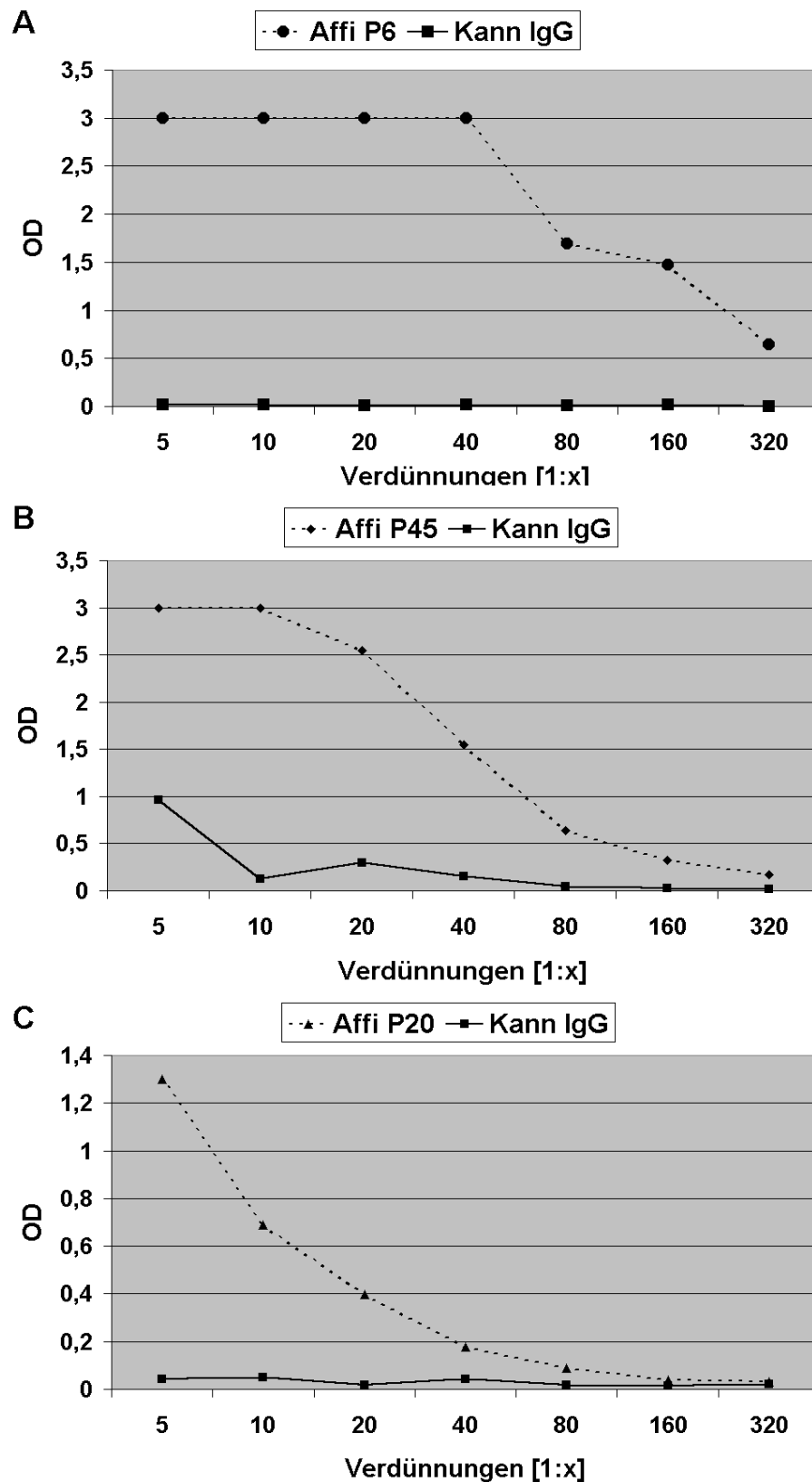


Abbildung 25. Abhängigkeit der Extinktionswerte (OD) bei 492 nm (Ordinate) von den Verdünnungsstufen (Abszisse) der anti-Porin affinitätsgereinigten Antikörper **A:** P6; **B:** P45; **C:** P20 und Kanninchen IgG in entsprechender Konzentration. Als Antigen wurden je 1,5 µg Peptid pro Vertiefung in Immuno-Module mit hochaffiner Bindungskapazität eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:3000 und mit DAB als Substrat nachgewiesen.

3.8 Einfluss der anti-Porin 2 Antikörper auf die Funktion boviner Spermatozoen

Um die Bedeutung von Porin 2 Protein für die Funktion boviner Spermatozoen zu untersuchen, wurden funktionelle Studien mit den affinitätsgereinigten anti-Porin 2 Antikörpern durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluss der Antikörper auf die Motilität sowie auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen.

3.8.1 Einfluss der anti- Porin 2 Antikörper auf die Motilität boviner Spermatozoen

Nach der „Swim-up Methode“ gewonnene Spermatozoen wurden mit 37,5 µg/ml affinitätsgereinigte P45 bzw. P20 Antikörper, sowie mit Kaninchen IgG Antikörpern und Tris Puffer (TEB) alleine als Negativkontrollen, versetzt. Die Motilität der Spermatozoen wurde mit einem CASA System direkt nach Zugabe (0h), nach 30 min, 1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden und nach 4 Stunden gemessen.

In Abbildung 26 ist der Prozentsatz motiler Spermatozoen (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse) dargestellt. Bei allen Versuchsansätzen, inklusive der Kontrollen, war eine Abnahme der Gesamtmotilität mit zunehmender Versuchszeit zu verzeichnen. Bei Einsatz der P45 Antikörper konnte kein Unterschied in der Beweglichkeit von Spermatozoen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Tendenziell zeigte sich nach 4h Inkubation bei den Spermatozoen, die mit den affinitätsgereinigten P20 Antikörpern inkubiert worden waren, eine Abnahme der Gesamtmotilität von ca. 10 %, im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Abweichung wurde in der statistische Auswertung allerdings als nicht statistisch signifikant berechnet.

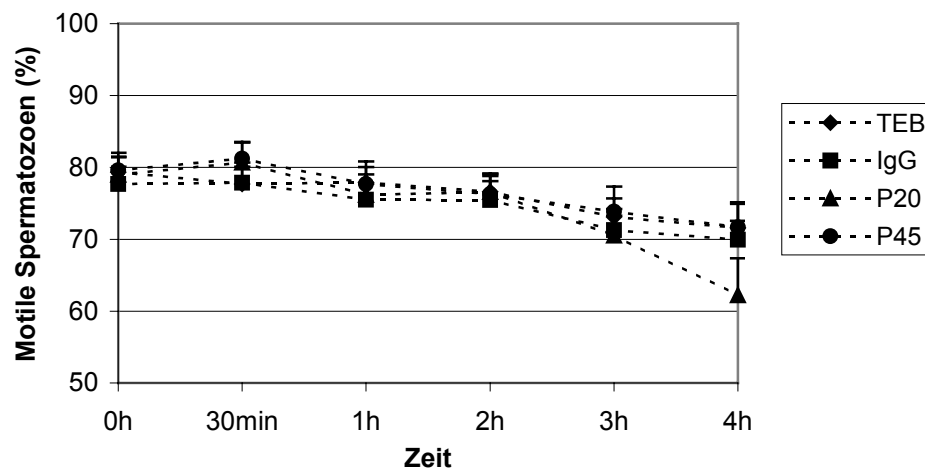


Abbildung 26. Einfluss von affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin 2 Antikörpern auf die Gesamtmotilität (Ordinate) boviner Spermatozoen in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse) nach Inkubation mit 37,5 µg/ml affinitätschromatographisch gereinigten P20 (-▲-), P45 (-●-) Antikörpern, Kaninchen IgG Antikörpern (-■-) und Tris Puffer (TEB) (-◆-). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=3.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in den funktionellen Studien kein signifikanter Einfluss von den anti Porin 2 Antikörpern P45 und P20 auf die Beweglichkeit boviner Spermatozoen nachgewiesen werden konnte. Inwieweit P20 Antikörper tatsächlich einen Einfluss auf die Motilität boviner Spermatozoen haben, kann aufgrund der relativ geringen Anzahl der Versuche zur Zeit noch nicht abschließend beurteilt werden. Die hier gezeigten präliminären Ergebnisse sind Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

3.8.2 Einfluss der anti-Porin 2 Antikörper auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen

Abschließend wurde ein möglicher Einfluss von anti-Porin Antikörpern auf den akrosomalen Status von Samenzellen des Bullen untersucht. Um falsch positive oder falsch negative Resultate aufgrund von Serumbestandteilen zu vermeiden, wurden für diese Experimente affinitätschromatographisch aufgereinigte Antikörper eingesetzt. Abbildung 27 demonstriert den Einfluss von anti-Porin 2 Antikörpern auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen. Aufgeführt ist der Prozentsatz lebend akrosomreagerter Spermatozoen nach einer Inkubationszeit von 0 Stunden, 2 Stunden und 4 Stunden. Zu den Spermatozoen wurden 37,5 µg/ml P45, P20 und Kaninchen IgG Antikörper sowie Tris-Puffer (TEB) zugegeben. Mit

zunehmender Zeit stieg die Anzahl lebend akrosomreagerter Spermatozoen in allen Versuchsansätzen an (spontane Akrosomreaktion). Nach 4 Stunden Inkubation konnte ein Anstieg der lebend akrosomreagierten Spermatozoen mit P45 Antikörpern von 10% (TEB) bzw. 11% IgG) in der Kontrolle auf 17% festgestellt werden. Trotz des tendenziellen Anstiegs akrosomreagerter Spermatozoen nach Zugabe von P45 Antikörpern konnte hier aber kein statistisch signifikanter Unterschied errechnet werden ($P>0,05$). Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund der relativ geringen Versuchszahl ($n=3$) und der bekannt hohen Standardabweichungen beim Messen der Akrosomreaktion als nicht endgültig zu bewerten. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch Zugabe von P20 Antikörpern. Auch hier konnte bei 0h ein Anstieg der lebend akrosomreagierten Spermatozoen auf 12% (IgG im Vergleich dazu 7%) beobachtet werden; aber auch dieses Ergebnis musste aufgrund der relativ geringen Anzahl von Experimenten als tendentiell interessant aber statistisch nicht signifikant bewertet werden ($P>0,05$), zumal nach 4 stündiger Inkubation nur 14% der lebenden Spermatozoen akrosomreagiert waren (IgG 11 %).

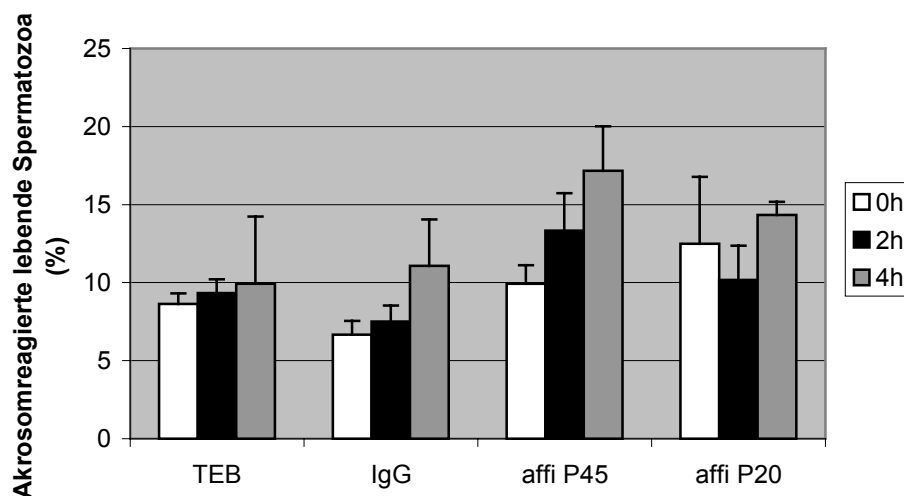


Abbildung 27. Einfluss von affinitätschromatographisch gereinigten anti-Porin 2 Antikörpern auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen. Die durch *Swim-up* gewonnenen Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA nach Zugabe von 37,5 µg/ml affinitätschromatographisch gereinigten P45, P20 Antikörpern, Kaninchen IgG, oder TEB Puffer bei den Zeitpunkten 0h (□), 2h (■) bis zu 4h (▒) inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die H₂₅₈/PSA-FITC-Doppelfärbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. $n = 3$.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aus den funktionellen Untersuchungen zum Einfluss von anti-Porin Antikörper auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen wegen der geringen Anzahl der Experimente vorerst kein definitiver Schluss gezogen werden konnte. Tendenziell war eine Induktion der Akrosomreaktion durch den P45 Antikörper nach einer Inkubationszeit von 4h zu beobachten. Diese Ergebnisse können aber nur Ausgangspunkt für eingehendere Untersuchungen sein.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Porin Subtypen mittels immunologischer Methoden wie Immunbio-, Immunhisto- und Immuncytochemie im bovinen Hoden nachzuweisen. Mit molekularbiologischen Techniken, wie RT-PCR und *in situ* Hybridisierung sowie immunhistochemischem, sollten die Expression und die Lokalisation von Porin Subtypen mRNA und Protein im Hodengewebe und in reifen Spermatozoen überprüft werden. Ein zweites Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von anti-Porin Antikörpern auf die Motilität und auf den akrosomalen Status von Spermatozoen zu untersuchen. Mit diesen Experimenten sollte die funktionelle Bedeutung von Porin Subtypen in bovinen Spermatozoen evaluiert werden.

4.1 Porin

Porin, auch VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) genannt, ist ein porenbildendes Protein. Ursprünglich wurde das transmembranäre Kanalprotein mit apparenten Molekularmassen von 30-50 kDa in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien identifiziert. Die Quartärstruktur bakterieller Porine wird aus einem Heterotrimär formiert, wobei jede Untereinheit Kanalaktivität aufweist (Nikaido, 1993). Die Sekundär- und Tertiärstruktur des Kanals wird durch 16 oder 18 antiparallele β -Faltblätter gebildet, die die Membran durchspannen und eine Pore bilden (Benz und Bauer, 1988; Buchanan, 1999).

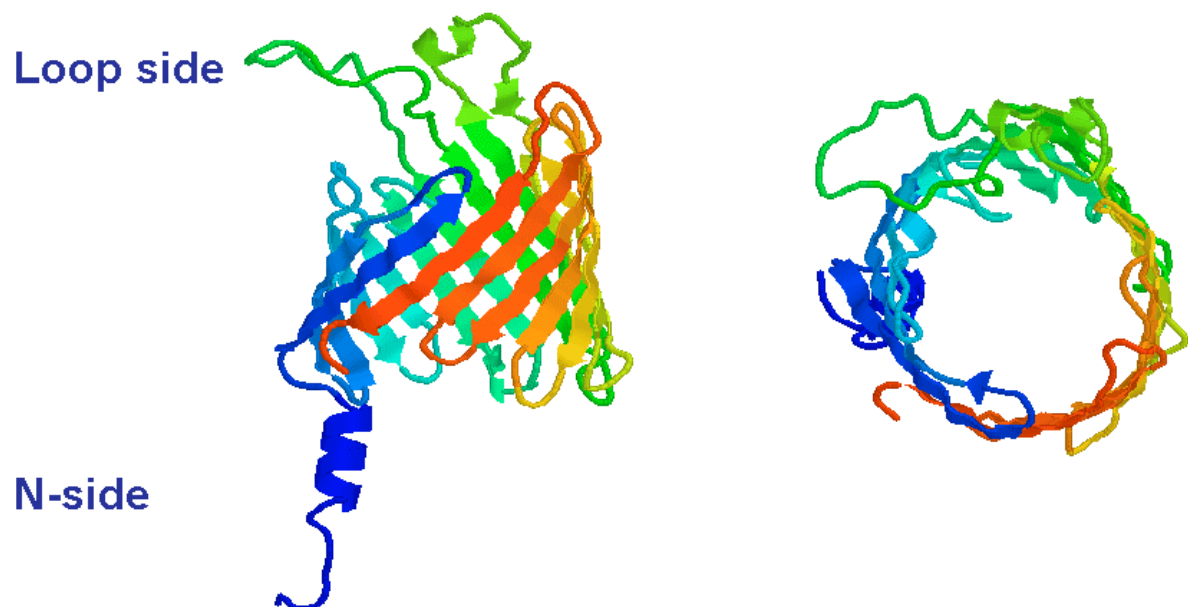


Abbildung 28. Berechnete 3D Struktur des *N. crassa* VDAC (Casadio et al., 2002; Vriend, 1990)

In Eukaryoten wurde Porin erstmals in einem Mitochondrienextrakt von *Paramecium aurelia* gefunden und als eines der ersten kanalbildenden Proteine erfolgreich mit Hilfe der „planar phospholipid bilayer“ Methode elektrochemisch untersucht (Schein et al., 1976).

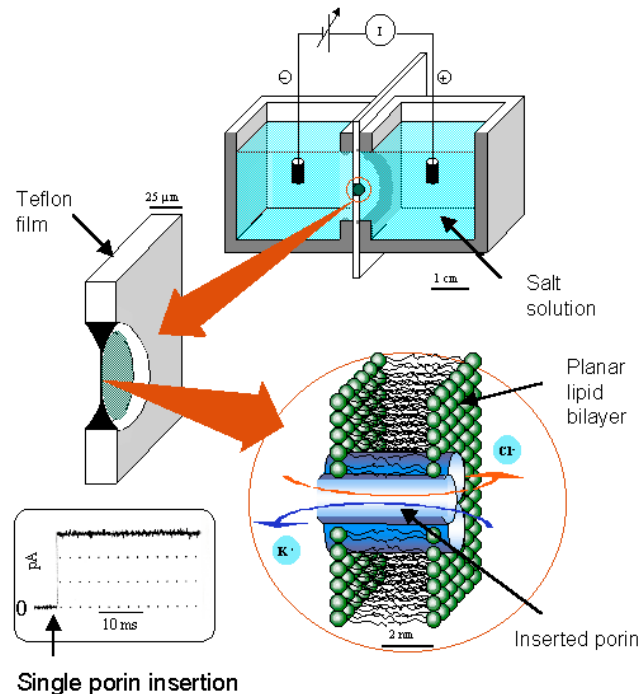


Abbildung 29. Versuchsaufbau des "Planar Bilayer" Systems (modifiziert von de Pinto nach Schein et al., 1976)

Es folgten weitere Publikationen, in denen Porin-homologe 30 kDa Proteine in Mitochondrien verschiedener Gewebe und unterschiedlicher Spezies lokalisiert wurden (Sorgato und Moran, 1993). Porin wurde in Mitochondrien von Paramecien (Ludwig et al., 1989), *Neurospora crassa* (Freitag et al., 1982), Rattenleber (Roos et al., 1982), Rattenhirn (Ludwig et al., 1986), in der äußeren Mitochondrienmembran der Rattenleber (Linden et al., 1982) und in subzellulären Zellfraktionen, die mitochondriale Markerproteine enthalten (Yu et al., 1995), gefunden.

Bei Mensch, Ratte und Maus werden drei verschiedene Porin-Gene exprimiert, sowie drei Protein-Isoformen beschrieben, die eine hohe Homologie zueinander aufweisen (Blachly-Dyson et al., 1993; Rahmani et al., 1998; Sampson et al., 1997). Das humane Porin 1 Gen (hVDAC1 Gen) besteht aus 849 Nukleotiden, die für 283 Aminosäuren kodieren, während das humane Porin 2 Gen aus 882 Nukleotiden besteht, die für 294 Aminosäuren kodieren. Die Aminosäuresequenz von hVDAC2 ist am Aminoterminal-Ende um 11 Aminosäuren länger als die hVDAC1 Aminosäuresequenz. Die Aminosäuresequenzen von humanem Porin 1

(hVDAC1) und Porin 2 (hVDAC2) sind zu 75% identisch (Blachly-Dyson et al., 1993; Rahmani et al., 1998). Das hVDAC1 Gen ist auf 5q31 lokalisiert, während das hVDAC2 Gen in der Position 10q22 nachgewiesen wurde (Messina et al., 1999). Die Aminosäuresequenz des humanen Porin 3 (hVDAC3), bestehend aus 283 Aminosäuren, ist zu 63% identisch mit hVDAC1 und zu 73 % mit hVDAC2. Das hVDAC3 Gen ist in der Position 8p11.2 zu finden (Rahmani et al., 1998).

Gentechnologische Methoden wurde angewandt, um die Wirkung von Porin-Genen auf lebende Zellen zu überprüfen. Durch die Entfernung des POR1-Gens in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), das für das Yeast-VDAC1 Protein kodiert, wird ein langsames Wachstum der Hefe verursacht, und die Zellen sind Stoffwechsel-inaktiv (Blachly-Dyson et al., 1997). In Mitochondrien aus VDAC1(-/-) Hefezellen wurde eine reduzierte Durchlässigkeit für NADH gezeigt (Lee et al., 1998). Auch beim Menschen wird Porin eine Beteiligung an der Regulation wichtiger physiologischer Funktionen zugeschrieben. So wurde von einem Patienten mit einer VDAC1-Gen Defizienz berichtet. Dieser Patient litt unter einer psychomotorischen Verzögerung, ausgeprägter Muskelschwäche und leichtgradigen Fehlbildungen (Huizing et al., 1996).

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

Obwohl sich die Primärstrukturen von Porinen in verschiedenen Spezies unterscheiden, sind in Mitochondrien eukaryotischer Zellen die wesentlichen biophysikalischen Eigenschaften dieser Poren hoch konserviert. Die Kanäle zeichnen sich alle durch eine deutliche Spannungsabhängigkeit aus, die einen Wechsel der Ionenselektivität von Anionen nach Kationen bedingt. Aus diesem Grunde wird das bakterielle Porin-Analog in Eukaryoten auch VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) genannt.

Der individuelle VDAC Kanal wird von einem einzigen VDAC Protein gebildet, das aus ca. 285 Aminosäuren (30-32 kDa) besteht. Der Durchmesser des Kanals in offener Position beträgt ca. 2,5-3,0 nm, wohingegen im geschlossenem Zustand ein Durchmesser von ca. 1,9 nm ermittelt wurde (Blachly-Dyson und Forte, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass

das mitochondriale VDAC mit ATP und Hexo-, Glycerol- und Kreatin-kinasen assoziiert ist und somit an dem Metabolithaushalt der Zelle beteiligt ist (Adams et al., 1991; Beutner et al., 1998; Crompton et al., 2002; Kottke et al., 1988; Ludwig et al., 1986; Rostovtseva und Colombini, 1997). Erst kürzlich wurde darüber berichtet, dass VDAC1 auch eine Funktion bei der Regulation des programmierten Zelltodes, der Apoptose, hat. VDAC1 scheint ein Teil eines mitochondrialen Proteinkomplexes zu sein, der als „Permeability Transition Pore“ (PTP) an der Regulation des Efflux von Cytochrom C in das Cytosol beteiligt ist. PTP ist für die Auslösung der apoptotischen Caspase-Kaskade von Bedeutung und wird direkt durch pro- und antiapoptotische Proteine aus der bcl-2 Familie in seiner Funktion gesteuert (Crompton, 1999; Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Tsujimoto und Shimizu, 2002). Bei der Spermatogenese ist die Apoptose ein wesentlicher physiologischer Faktor, der für die Entwicklung von gesunden, funktionstüchtigen Samenzellen von Bedeutung ist. Porine sind insbesondere in Geweben mit hoher Zellteilungsrate an Vorgängen, die zur Apoptose von Zellen führen, beteiligt. Hier soll das anti-Apoptose Protein bcl-2 Porin-Kanäle verschließen und dadurch den programmierten Zelltod verhindern. Ebenfalls scheint Porin mit dem transmembranären Protein Cyclophilin D zu interagieren (Zamzami und Kroemer, 2001). Der Adeninnukleotid Translokase (ANT)/Porin Komplex ist in der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert und dient als „Kontaktkomplex“ zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Gemeinsam mit Cyclophilin D soll dieser an der Regulation der Apoptose beteiligt sein (Crompton et al., 2002).

Der erste Hinweis auf die Existenz eines extramitochondrialen Porins erfolgte aufgrund von Publikationen von der Arbeitsgruppe von F. P. Thinnes (Thinnes et al., 1983; Thinnes et al., 1984). In diesen Arbeiten wurde das dahin gültige Dogma in Frage gestellt, dass VDAC ausschließlich in mitochondrialen Membranen exprimiert wird. Nach Isolierung einer 31 kDa-Proteinbande aus einer Rohmembranfraktion menschlicher B-Lymphozyten und anschließender Sequenzierung stellte sich aufgrund der hohen Homologie zu bekannten VDAC Sequenzen heraus, dass dieses Protein in die Gruppe der Porine einzuordnen war. Später konnte in menschlichen Muskelmembranen (Sarcolem) eine identische Aminosäuresequenz zur Porinsequenz gefunden werden (Jurgens et al., 1991). Die Expression des Proteins wurde von Blachly-Dyson und Forte (Blachly-Dyson und Forte, 1991) auch auf cDNA-Ebene bestätigt. Des Weiteren wurde durch Mikrosequenzierung von gereinigtem Protein aus Lungen Caveolae der Maus ein Hinweis dafür gefunden, dass VDAC Typ 1 in der Zellmembran dieser Organelle lokalisiert ist (Lisanti et al., 1994; Reymann et al., 1995).

Mittels monoklonaler Antikörper konnte Porin in Plasmamembranen einer Vielzahl von Geweben lokalisiert werden (Babel et al., 1991; Cole et al., 1992; Eben-Brunnen et al., 1998; Jakob et al., 1995). Porin wurde auch in Plasmamembranorganellen, wie z. B. in bovinem Gehirn und Hundelunge (Bathori et al., 1999), in Synaptosomen des Torpedofisches (Shafir et al., 1998), sowie in der „Postsynaptic Density Fraction“ von Ratten-Nervenzellen (Moon et al., 1999) detektiert. Die multitopologische Lokalisation von Porin sowohl in der Plasmamembran als auch in der Mitochondrienmembran konnte mittels molekularbiologischen Untersuchungen von Buettner et al. (Buettner et al., 2000) mit dem Nachweis von zwei alternativen Startcodons des VDAC1 Gens der Maus (plasmalemmal VDAC-1 und mitochondrial VDAC-1) unterstützt werden. Buettner et al., 2000 zeigen mit der GFP (green fluorescence protein)-Technik, dass bei Verwendung des einen Startcodons das Protein in die Membran und bei Verwendung des alternativen Startcodons das Porin-Protein in die Mitochondrienmembran eingebaut wird. Diese Ergebnisse sind aber kritisch zu bewerten, weil in den EST-Datenbanken bisher kein Transkript für dieses Plasmamembran-typische Porin gefunden wurde. EST (expressed sequence tags)-Datenbanken wurden erstellt um aufzuzeigen, wie viele Transkripte für individuelle Proteine in verschiedenen Organismen und Organen vorkommen; somit sollte bei der kompletten Sequenzierung der Genome klargestellt werden, was im Genom überhaupt als Gen definiert werden kann. Allerdings ist die Aussagekraft von EST-Datenbanken mit Vorsicht zu betrachten; die Kritik bezieht sich auf die Technik der Herstellung und der Überlegung, dass extrem seltene Transkripte durchaus fehlen könnten.

Die Untersuchungen zur multitopologischen Lokalisation von Porin geben Anlass zu der Vermutung, dass variable Regulationsmechanismen eine gewebspezifische und Kompartiment-abhängige Funktion von Porin bedingen. Diese Annahme wurde auch dadurch gestützt, dass eine plasmalemmale Assoziation von VDAC mit GABA_A-Rezeptoren in bovinen Gehirnzellen beschrieben wurde. Ein zweiter Hinweis darauf, dass Porin eine funktionelle Rolle bei der Regulation der akrosomalen Exozytose spielen könnte ergab sich aus Untersuchungen zu möglichen Hexokinase/Porin Komplexen im Akrosom der Maus, die von Kalab (Kalab et al., 1994) publiziert wurden (s. unten).

4.2 Nachweis und Lokalisation von Porin in Spermatozoen

Auf der Basis der aus der Literatur ersichtlichen Zusammenhänge zwischen Porin und GABA_A-Rezeptoren bzw. aufgrund einer nachgewiesenen Hoden-spezifische Hexokinase (p95/116) in der akrosomalen Kopfkappe der Maus und der damit verbundenen Bedeutung von Porin in der akrosomalen Plasmamembran entstand die erste Zielsetzung der Dissertationsarbeit: der Nachweis und die Lokalisation von Porin Subtypen in ejakulierten bovinen Spermatozoen.

Methodisch wurde die wissenschaftliche Fragestellung immunzytochemisch angegangen. Es wurden Antikörper gegen synthetische Peptide aus der humanen Porin Aminosäuresequenz eingesetzt. Informationen über Porin Aminosäuresequenzen aus dem in dieser Arbeit eingesetzten bovinen Modellsystem lagen zum Zeitpunkt der Erstellung des wissenschaftlichen Konzeptes der Arbeit nicht vor.

Zur Detektion von Porin Subtypen in bovinen Spermatozoen und im Hodengewebe des Bullen (s. u.) wurden hochspezifische Antikörper als Marker hergestellt. Antiseren gegen Porin Typ 1 und Typ 2 konnten durch Immunisierung von Kaninchen mit an Trägerprotein gekoppelten synthetischen Peptiden gewonnen werden. Nur unter Verwendung dieser Antikörper als Marker war es möglich, Porine in Spermatozoen zu detektieren und zu lokalisieren, denn der Nachweis von mRNA durch *in situ* Hybridisierung, Northern Blot oder PCR gelingen in der Regel nicht in ejakulierten Spermatozoen, weil diese als ausgereifte Gameten keine *de novo* Proteinsynthese mehr durchführen.

Der Einsatz synthetischer Peptide als Antigen hat sich gegenüber gereinigtem Porin HL 31 aus mehreren Gründen als vorteilhaft erwiesen:

1. Im Gegensatz zu Antikörpern gegen gereinigte Proteine sind Antiseren gegen definierte synthetische Peptide meist hochspezifisch für das entsprechende Antigen.
2. Eine Besonderheit von Antiseren gegen synthetische Peptide aus hochkonservierten Porin Aminosäuresequenzen besteht darin, dass diese Antikörper bisher unbekannte Porin Subtypen detektieren, die noch nicht als Protein gereinigt und deren cDNA noch nicht mit gentechnologischen Methoden isoliert worden sind.
3. Antikörper gegen definierte Domänen von Porinen können hinsichtlich ihrer funktionellen Wirkungen auf die Porin Kanalaktivität untersucht werden.
4. Synthetische Peptide können mit einem sehr hohen Reinheitsgrad und in relativ großen Mengen reproduzierbar hergestellt werden. Dieses Verfahren ist im Vergleich zu der

aufwendigen Reinigung oder Expression von Porin-Subtypen mit wesentlich geringerem Arbeitsaufwand verbunden.

Die polyklonalen anti-Porin 1 (AS P6) und anti-Porin 2 (AS P45 und AS P20) Antiseren, die gegen die synthetischen Peptide hergestellt wurden, erkannten in der ELISA Methode spezifisch die als Antigen eingesetzten Peptide. Die Antiseren wurden für den Nachweis und die Lokalisation der Porin 1 und 2 Protein im bovinen Hoden und in Spermatozoen eingesetzt. Des Weiteren konnten erfolgreich affinitätschromatographisch gereinigte anti-Porin Peptid-Antikörper für funktionelle Untersuchungen mit Spermatozoen angereichert werden.

Zur Detektion von Porin Subtypen 1 und 2 Proteinen in bovinen Spermatozoen wurden die anti-Porin Subtypen 1 und 2 Antiseren im Immunblot und in der Immunzytofluoreszenz eingesetzt.

Der Einsatz der Antiseren zeigte, dass die gegen synthetische Porin Peptide gerichteten Antiseren im Immunblot das entsprechende Protein bei ca. 30 kDa erkannten. Hervorzuheben ist, dass das Antiserum gegen Porin Typ 2 (AS P20) hauptsächlich die obere 31-32 kDa Bande erkannte, während das Antiserum gegen Porin Typ 1 (AS P6) präferentiell mit der unteren 30 kDa Bande der im angereicherten humanen Lymphozyten Porin sichtbaren Doppelbande reagierte. Dieser Befund spricht für die Spezifität der Antiseren. Allerdings kann keine Aussage darüber gemacht werden, um genau welchen Porin Subtypen es sich handelt. Es ist z. B. nicht geklärt, ob die Antiseren nicht auch Porin Typ 3 detektieren. Insofern können betreffend der Spezifität der Antikörper definitive Aussagen nur mit biochemisch hoch angereicherten oder rekombinanten Porin Subtypen gemacht werden. Diese standen bisher nicht zur Verfügung. Winkelbach und Mitarbeiter (Winkelbach et al., 1994) haben publiziert, dass von ihnen generierte Antikörper gegen synthetische Porin Typ 1 Peptide deutlich zwischen Typ 1 und Typ 2 Porin unterscheiden können. Sie begründeten ihre Annahme damit, dass die Porin Typ 1 Antikörper im ELISA und im Dot-Blot zwar Typ 1 aber nicht das korrespondierende Typ 2 synthetische Peptid erkennen. Auch in Vorarbeiten zu dieser Dissertationsarbeit konnte im ELISA gezeigt werden, dass die Antiseren nicht mit anderen synthetischen Peptiden kreuzreagierten. Korrespondierende Porin Typ 3 Sequenzen wurden allerdings nicht untersucht. Mit Hilfe des Immunblots konnte gezeigt werden, dass in Proteinextrakten aus Bullen Spermatozoen sowohl der kommerziell erworbene monoklonale Antikörper Porin HL 31 als auch die anti-Porin Antikörper AS P20 und AS P6 eine immunreaktive Polypeptid-Bande mit einer apparenten Molekularmasse von etwa 31 kDa erkannten. Mit diesem Experiment konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Porin Proteine im Spermatozoon zu finden sind. Die Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für die

nachfolgenden Untersuchungen zur Lokalisation und zur möglichen Funktion von Porinen in Samenzellen.

Mittels Immunzytofluoreszenz wurde festgestellt, dass der monoklonale anti-Porin Typ 1 Antikörper (Porin 31 HL) hauptsächlich sein Antigen im Bereich des Akrosoms und des Mittelstücks des Spermatozoons detektiert. Anti-Porin Typ 2 Antikörper hingegen reagierten zusätzlich zu Akrosom und Mittelstück auch mit einem Antigen im Flagellum. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass aufgrund der multitopologischen Lokalisation von Porinen in Samenzellen diese möglicherweise auch unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Kompartimenten des Spermatozoons regulieren (z. B. Akrosomreaktion, Kapazitation im Kopfbereich, Motilität mitochondrial, Motilitätsmuster im Hauptstück). Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass die Fluoreszenzmuster, die Porin Typ 1 und Typ 2 Antikörper im Spermatozoon erzeugen, nicht einheitlich sind. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass, obwohl sich Porin Typ 1, 2 und 3 in ihrer Aminosäuresequenz nur geringgradig unterscheiden, individuelle Porin Subtypen unterschiedliche Funktionen im Spermatozoon innehaben könnten.

4.3 Die Bedeutung von Porin für die Beweglichkeit der Spermatozoen

Die Motilität der Spermatozoen wird während ihrer Reifung im Nebenhoden angelegt; eine gute Beweglichkeit ist im Säugetier von großer Bedeutung für den langen Weg, den die Samenzelle von der Scheide bis zum Eileiter zurücklegen muss. Auch der Erfolg der Penetration durch die Zona pellucida und durch die Keimzellmembran ist abhängig von der Beweglichkeit der Samenzelle (Nagy, 2000). Die morphologische Voraussetzung für die Spermatozoenbeweglichkeit ist der Spermatozoenschwanz mit seinem zentralen Axonem und den damit in Verbindung stehenden äußeren dichten Längsfasern (Outer Dense Fibers). Für die Bewegung sind die Mikrotubuli funktionell und strukturell von Bedeutung. In ihrer Gesamtheit bilden sie das Axonem, das den Schwanz des Spermatozoons in nahezu seiner ganzen Länge durchzieht. Sie weisen im Querschnitt das typische 9 + 2 Muster auf, das ubiquitär in Flagellen und Cilien aller Spezies vorkommt. Dabei werden zwei Zentraltubuli von neun Tubulidoubletten umgeben. Die Doppeltubuli sind untereinander mit Dyneinarmen und mit den Zentraltubuli durch Radialspeichen verbunden (Abb. 30). Eine ATPase im Dynein katalysiert die Hydrolyse von Mg-ATP. Durch Freisetzung von Energie ermöglicht sie das Abscheren und die Freigabe eines Dyneinarmes, das Zurückstellen auf die Ausgangsposition und erneutes Binden an den benachbarten Mikrotubulus. Nach der „*sliding*

filament“ Theorie gleiten so die Tubuli mittels ihrer Dyneinarme aneinander vorbei und bewirken die Krümmung des Flagellums auf seiner ganzen Länge (Boehm, 1998; Kleinig und Sitte, 1989). Durch einen kontinuierlichen Wechsel der Verschiebungsrichtung kommt es auch zu einer Änderung der Krümmungsrichtung und damit zu einem sinusförmigen Schlag, der das Spermatozoon propulsiv bewegt. Der Mechanismus, der zu der koordinierten Gleitbewegung der Mikrotubuli und zu der oszillierenden Bewegung des Flagellums führt, ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Die für die Motilität notwendige Energie wird durch die Mitochondrien im proximalen Teil des Flagellums durch Glykolyseprozesse bereitgestellt (Cooper und Yeung, 2000). Im reifen Spermatozoon wird ATP hauptsächlich zur Aufrechterhaltung der Motilität gebraucht. ATP wird in Mitochondrien über aerobe Glykolyse im Mittelstück des Spermatozoenflagellums synthetisiert, das durch die Dynein-ATPase in Energie umgewandelt und im Axonem verbraucht wird (Bourgeron, 2000)

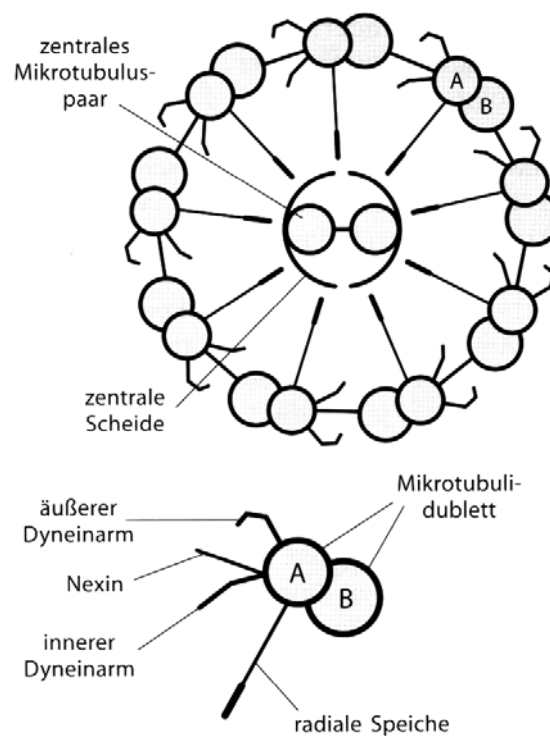


Abbildung 30. Schematische Darstellung der Bestandteile des Axonems (Cooper und Yeung, 2000).

Klinisch können verschiedene Faktoren eine Beeinträchtigung der Spermatozoenmotilität verursachen, die Infertilität bedingen; hier sind z. B. genitale Infektionen, unzureichende Spermatozoenreifung im Nebenhoden und morphologische oder biochemische Defekte im Axonem beschrieben worden. Auch sind das Fehlen von Mitochondrien bzw. funktionell

geschädigte Mitochondrien Ursachen für Asthenozoospermien oder Akinetoospermien beim Menschen (Bourgeron, 2000).

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass anti-Porin Antikörper keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Beweglichkeit boviner Spermatozoen hatten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Antikörper zumindest keine Plasmamembran-ständigen Porinkanäle in ihrer Aktivität beeinflussen. Inwieweit Porin bei der Regulation der Motilität von Spermatozoen eine Rolle spielt, kann aus zwei Gründen aus diesen Ergebnissen noch nicht abschließend festgestellt werden: Erstens, es ist nicht bekannt, ob die eingesetzten anti-Porin Antikörper die Kanalaktivität *in vivo* oder *in vitro* beeinflussen. Zweitens, Porin kann durchaus über Mitochondrien und deren Funktion als Energielieferant einen Einfluss auf die Motilität ausüben. VDAC ist unter anderem verantwortlich für den Fluss von Metaboliten (z.B. ATP) durch die äußere Mitochondrienmembran. Rostovtseva und Colombini (Rostovtseva und Colombini, 1996; Rostovtseva und Colombini, 1997) untersuchten mittels Luciferin/Luciferase Methode den ATP-Durchfluss und berichteten, dass Porine nicht nur den ATP-Ausstrom aus dem Mitochondrium vermitteln, sondern auch den ATP-Fluss kontrollieren können. Die durch Porin gebildeten Poren sind auch für Ca^{2+} -Ionen durchlässig (Gincel et al., 2001), die eine wichtige Rolle bei der Motilität und ihrer verschiedenen Bewegungsmuster (z. B. Hyperaktivierung) spielen. Eine Beteiligung von Porin am mitochondrialen Stoffwechsel in Spermatozoen erscheint somit sehr wahrscheinlich. Es ist allerdings nicht davon auszugehen oder zumindest stark umstritten, ob Antikörper die Plasmamembran der Samenzelle penetrieren können; somit kann unter den angewendeten experimentellen Bedingungen keine definitive Aussage über die Beteiligung von Porin an intrazellulären Regulationsmechanismen gemacht werden.

4.4 Der Einfluss von Porin auf die akrosomale Exozytose des Spermatozoons

Neben der Motilität ist beim Spermatozoon die Akrosomreaktion eine unabdingliche Voraussetzung für den Erfolg der Befruchtung. Nach Erreichen der Oozyte und erfolgter primärer Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida wird über eine G-Protein-abhängige Signaltransduktionskaskade die Zona pellucida 3 (ZP3) Protein-abhängige Akrosomreaktion ausgelöst (Wassarman und Litscher, 2001). Das Akrosom ist im vorderen Teil des Spermatozoonkopfes als Kappe über dem Kern angelegt. Es enthält Enzyme (z. B. Akrosin), die von den Spermatozoen für die Penetration der Granulosa Zellschicht des Kumuluskomplexes bzw. der Zona pellucida der Eizelle gebraucht werden (Eddy und

O'Brien, 1994). Die Akrosomreaktion der Säugetiere ist ein mehrstufiger exozytotischer Prozess (Abb. 31). Hier kommt es zuerst zu einem partiellen Verschmelzen der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran. Es bilden sich aus beiden Membrananteilen Hybridvesikel. Dadurch kommt es zu einer Fenestrierung des Akrosoms durch die akrosomaler Inhalt austreten kann. Im weiteren Verlauf der Akrosomreaktion entwickelt sich so die vollständige Ablösung der äußeren akrosomalen Membran, einschließlich der ihr anliegenden Plasmamembran. Nach Abschluss der Akrosomreaktion liegt die innere akrosomale Membran frei über dem vorderen Anteil des Zellkerns. Nur im Bereich des äquatorialen Bandes können sich noch Reste akrosomalen Inhaltes befinden (Abb. 31).

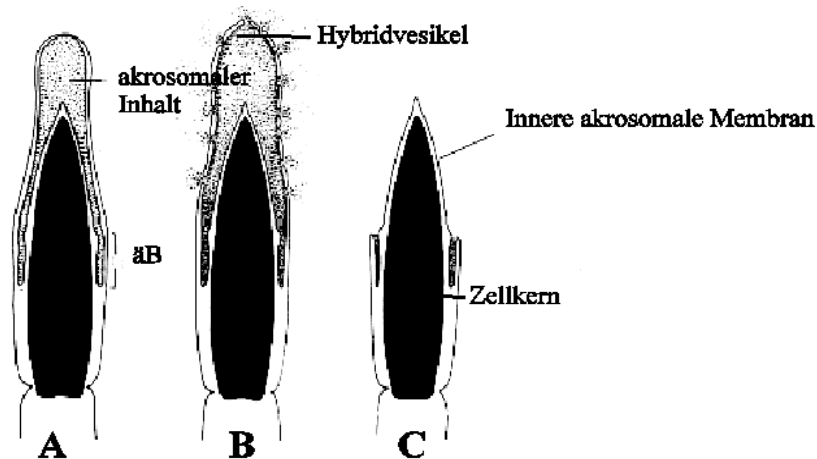


Abbildung 31. Schematischer Ablauf der Akrosomreaktion im Säugetierspermatozoon. **A:** Spermatozoenkopf mit intaktem Akrosom **B:** Partielle Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran, die sogenannte Fenestrierung beginnt. **C:** Vollständige Ablösung der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran mit Resten akrosomalen Inhaltes im Bereich der Umschlagfalte (äB: äquatoriales Band) (Yanagimachi, 1994)

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ, wie sie auch im Skelettmuskel vorkommen, scheinen bei der Agonisten-induzierten Akrosomreaktion eine bedeutende Rolle zu spielen (Blackmore und Eisoldt, 1999). So konnte die mit Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion beim Bullen, sowie die durch Progesteron-induzierte Akrosomreaktion beim Menschen, signifikant durch Ca^{2+} -Kanalantagonisten gehemmt werden (Fraser et al., 1993). Auch konnte gezeigt werden, dass durch diese trivalenten und divalenten Kationen (La^{3+} , Ni^{2+}) nicht die Kapazitation, sondern ausschließlich die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion gehemmt wurde (White und Aitken, 1989). Der Ca^{2+} -Einstrom ist somit als ein wesentlicher Bestandteil der Induktion der Akrosomreaktion zu betrachten (Breitbart, 2002; Visconti et al., 2002). Die

ZP3-induzierte Akrosomreaktion in Säugetieren konnte von Ca^{2+} -Kanalantagonisten, wie Dihydropyridin, Benzothiazepin und Phenyalkylamin blockiert werden (Darszon et al., 1999). Die Spermatozoenplasmamembran enthält eine Vielfalt von Ca^{2+} -Kanälen, z.B. den *Voltage Dependent Calcium Channel* (VDCC), den Ca^{2+} /ATPase Kanal, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger. Mehrere Publikationen deuten an, dass VDCC in der Akrosomreaktion von Säugetieren involviert sind (Flesch und Gadella, 2000). Trotzdem sind der schnelle Ca^{2+} -Einstrom und die Akrosomreaktion nicht direkt miteinander gekoppelt. So ist auch eine hohe extrazelluläre Na^+ -Konzentration für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion wichtig. Ein Na^+ -Einstrom scheint dem Ca^{2+} -Einstrom sogar noch voranzugehen, wobei es durch den Na^+ -Einstrom zu einem Anstieg des intrazellulären pH kommt (Garcia et al., 1991).

Progesteron gilt neben dem Zona pellucida-Protein als physiologischer Induktor der Akrosomreaktion. Es wird in den Zellen des Cumulus Oophorus gebildet und konnte auch in der Follikularflüssigkeit nachgewiesen werden (Osman et al., 1989). Bei dem Progesteron-Rezeptor des Spermatozoons handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor (Cheng et al., 1998), wie in Versuchen mit an BSA gekoppeltem Progesteron gezeigt wurde (Ambhaikar und Puri, 1998; Blackmore und Lattanzio, 1991; Tesarik et al., 1992). Der Progesteron-Rezeptor-Komplex konnte aber nur bei 10 - 30% der humanen kapazitierten Spermatozoen mit Hilfe von FITC-markierten BSA nachgewiesen werden. Durch Einsatz eines gegen den intrazellulären Progesteron-Rezeptor gerichteten monoklonalen Antikörpers konnte die Induktion der Akrosomreaktion gehemmt werden (Baldi et al., 1999). In immunchemischen Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass dieser Antikörper im Western-Blot ein 50kDa Protein erkennen kann. Wie aus anderen Untersuchungen bekannt war, hat die Untereinheit A des neuronalen GABA_A -Rezeptors (Chlorid-Kanal-Komplex) auch ein Molekulargewicht von 50kDa (Beurdeley-Thomas et al., 2000; Sabeur et al., 1996). Dieser Befund wurde dahingehend gedeutet, dass Progesteron an einen Steroid-Rezeptor/Chlorid-Kanal-Komplex bindet. Bei der durch Progesteron induzierten Akrosomreaktion humaner Spermatozoen wird postuliert, dass dieser Komplex durch die Bindung des Progesterons aktiviert wird. Nachfolgend kommt es zu einem Chlorideinstrom und zu einer Aktivierung eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauschmechanismus. Bikarbonat gelangt in die Zelle und der intrazelluläre pH-Wert steigt an. Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass durch DIDS (4,4'-Diisothiocyano-Stilbene-2,2'-Disulfonacid), einem Antagonisten dieses Austauschmechanismus, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion kapazitierter Spermatozoen gehemmt werden kann (Kopf und Gerton, 1991). Ebenso konnte auch durch Chloridkanalantagonisten (Bicuculine) die Progesteron-induzierte Akrosomreaktion gehemmt werden (Wistrom und

Meizel, 1993). So scheint also bei der Maus ein Chlorideinstrom für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion von Bedeutung zu sein. Dazu passend wurde im murinen System ein membranständiges Progesteron-bindendes Protein beschrieben (Kwon und Eddy, 1997), das für die Progesteron-induzierte Akrosomreaktion von Bedeutung sein könnte. An menschlichen Spermatozoen dagegen konnte ein schneller Chlorid-Efflux nach der Progesteron-Induktion gezeigt werden, der durch Picrotoxin gehemmt werden konnte (Turner et al., 1994). Womöglich verursacht dieser Chlorid-Efflux eine Membrandepolarisation und führt damit zu der Aktivierung eines $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus. Dadurch gelangt Bikarbonat in die Zelle und führt dort zu einem pH- Anstieg. Anästhetische Progesteronmetabolite und das synthetische Progesteronderivat Progestin aktivieren in Neuronen proteinchemisch nicht eindeutig identifizierte Cl^- -Kanäle von GABA_A Rezeptor/ Cl^- -Kanal Komplexen. Im Gegensatz zu nonanästhetischen $3\beta\text{-OH}$ Isomeren induzieren synthetische $3\alpha\text{-OH}$ Steroide wie Progestin, wenn auch in geringerem Ausmaß als Progesteron, die Akrosomreaktion (Wistrom und Meizel, 1993). Aufgrund dieser Ergebnisse wird Progesteron als Ligand für einen spezifischen, bisher unbekannten GABA_A -ähnlichen Rezeptor in Spermatozoenmembranen diskutiert. Ein Kandidat für den Cl^- -Kanal in einem postulierten GABA_A Rezeptor/ Cl^- -Kanal Komplex ist das integrale Membranprotein Porin. In somatischen Zellen (neuronale Zellen) sind GABA_A -Rezeptoren und der Cl^- -Kanal Porin copurifiziert worden (Bureau et al., 1992). Porin ist ein spannungsabhängiger Anionen-selektiver Kanal (VDAC), der sowohl in der äußeren Membran von Mitochondrien als auch im Plasmalemm und in anderen Zellkompartimenten von Säugerzellen lokalisiert ist (Reymann et al., 1995). Porin bindet ATP und soll Bestandteil von Cl^- -Kanal Komplexen in der Plasmamembran somatischer Zellen sein. Diese Kanäle haben ähnliche elektrophysiologische Charakteristika wie die Porine der mitochondrialen Außenmembran. Aus diesen Untersuchungen kann folgende Hypothese gestellt werden: Auch in Samenzellen ist ein plasmamembranständiger GABA_A -Rezeptor mit VDAC als Cl^- -Kanal vergesellschaftet und könnte als Teil dieses Komplexes die Spermatozoenfunktionen regulieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit zeigten funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von anti-Porin Antikörpern auf den akrosomalen Status boviner Spermatozoen, dass nach Inkubation mit den Antikörpern zumindest tendenziell eine Induktion der akrosomalem Exozytose zu beobachten war. Der mögliche Signaltransduktionsweg könnte erstens über den oben diskutierten postulierten GABA_A -Rezeptor/ Cl^- -Kanal Komplex reguliert sein, oder zweitens im Zusammenhang mit einem Hexokinase/Porin Proteinkomplex stehen. Die zweite Hypothese basiert auf Ergebnissen, die von Kalab *et al.* (Kalab et al., 1994) publiziert wurden.

In Spermatozoenmembranen, die aus dem Bereich des Akrosoms von Maus-Spermatozoen gewonnen wurden, wurde eine Hoden-spezifische Hexokinase isoliert, die in die Regulation der akrosomalen Exozytose involviert sein könnte. Dieses Protein (p95/116) wird Hoden-spezifisch exprimiert. In Mitochondrien somatischer Zellen (z. B. im Gehirn) ist Porin als Proteinkomplex mit einer Hexokinase, die spezifische Porin-Bindungsstellen aufweist, beschrieben worden (Gottlob et al., 2001; Pastorino et al., 2002). Somit könnte in Analogie zu somatischen Zellen ein solcher Proteinkomplex mit einer funktionelle Rolle bei der Regulation der Akrosomreaktion postuliert werden. Die Stimulation der Akrosomreaktion mittels anti-Porin 2 Antikörpern könnte auch mit der Aktivierung von Porin in der Spermatozoenplasmamembran zusammenhängen, wenn VDAC z. B. aktiv an dem Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol des Spermatozoons beteiligt wäre, der die Akrosomreaktion triggert. Weiterhin könnten eher unspezifische, von der Porinfunktion unabhängige Mechanismen zu einer Antikörper-induzierten akrosomalen Exozytose führen. So wurden z.B. die Induktion oder die Hemmung der Akrosomreaktion durch Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene von Spermatozoen beschrieben, die offensichtlich durch Vernetzung der Antigene über die Antikörper einen Effekt haben. (Nikolaeva et al., 2001).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wegen der unbekannten Signaltransduktionskaskaden, über die Porine an der Regulation der Spermatozoenfunktion beteiligt sein könnten und nicht zuletzt auch wegen der geringen Anzahl an funktionellen Experimenten mit anti-Porin Antikörpern vorerst keine definitiven Aussagen über die Funktion von Porin Subtypen in Spermatozoen gemacht werden können. Die erhobenen Ergebnisse könnten aber als Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen dienen.

4.5 Nachweis und Lokalisation von Porin 1 und 2 mRNA in bovinem Hoden

4.5.1 Genexpression während der Spermatogenese

Die Expression der mRNA und die Translation des Proteins in den Zellen des Hodens korreliert eng mit dem spezifischen Entwicklungsstadium der Hodenzellen, die sich am Spermatogeneseprozess beteiligen (Kleene, 1996). Molekulare und zelluläre Mechanismen, die an der Spermatogenese beteiligt sind, weisen eine Vielzahl spezifischer und faszinierender Entwicklungen auf, die in den Differenzierungsprozessen somatischer Zellen nicht zu beobachten sind. Das Wechselspiel dieser Mechanismen ist außerordentlich komplex und ergibt sich aus der Organisation der für die Spermatogenese verantwortlichen Epithelien. Die

kontinuierliche Produktion von Spermatozoen (beim Bullen z. B. über viele Jahre) erfordert eine lang andauernde und intakte Spermatogenese, die grundsätzlich ein zuverlässiges und kontrollierbares Programm durchlaufen muss (Grootegeed et al., 2000). Der Prozess der Spermatogenese, der bei Säugetieren in der Pubertät mit der Bildung von elongierten Spermatiden aus Typ A Spermatogonien beginnt, wird in drei Hauptphasen eingeteilt: (1) die mitotische Phase, wobei die Stammzellen (Spermatogonien) DNA replizieren und sich teilen; (2) eine meiotische Phase, in der primäre Spermatozyten (46XY, 4n DNA) die genetische Rekombination durchlaufen und sich zu sekundären Spermatozyten (23 XY, 2n DNA) entwickeln; (3) eine Differenzierungsphase, auch Spermiogenese genannt, in der die haploide Zelle, die runde Spermatide (23 XY, 1n DNA), sich zum elongierten Spermatiden mit Akrosom, dem Mittelstück, in dem sich der mitochondriale Apparat befindet und dem Flagellum ausbildet (Abb. 32). Die Spermiogenese kann in Entwicklungsstufen unterteilt werden, die auf der morphologischen Entwicklung der Spermatiden basieren. Die Anzahl der Entwicklungsstufen und die morphologischen Eigenschaften sind unterschiedlich zwischen den Säugetieren (Kleene, 1996); bei Rindern sind 14 Entwicklungsstufen beschrieben. Die Zellen in den Entwicklungsstufen 1-7 sind als runde Spermatiden charakterisiert, während die Zellen in Stufen 8-14 als elongierte Spermatiden bezeichnet werden (Berndson und Desjardins, 1974).

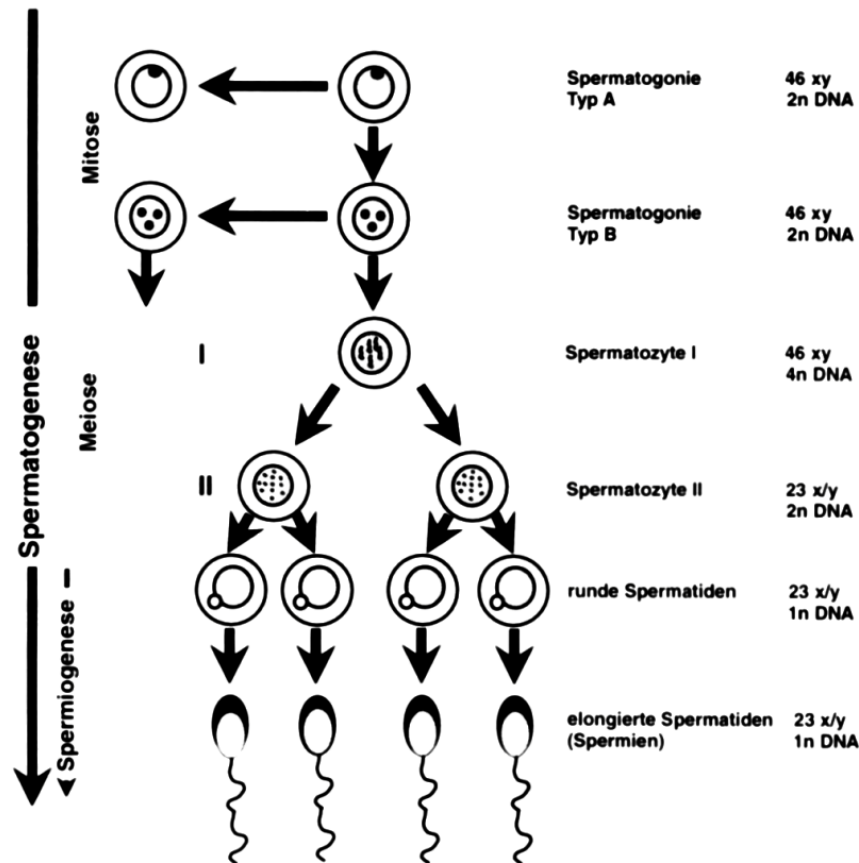


Abbildung 32. Schematische Darstellung der Spermatogenese (Bergmann, 1998)

4.5.2 Aufbau des Detektionssystems für den Nachweis der Expression von Porin Subtypen durch die RT-PCR

Die RT-PCR ist eine kombinierte Technik der reversen Transkriptase (RT) Reaktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Detektion und Analyse der mRNA in der Zelle, die zum ersten Mal von Powell et al. (Powell et al., 1987) beschrieben wurde. Mit dieser Methode kann die mRNA in einer geringen Zahl von Zellen detektiert werden oder eine geringe Menge von mRNA in Zellen quantifiziert werden (Foley et al., 1993; Reue, 1998; Wang et al., 1989). Theoretisch könnten mit der PCR einzelne mRNA Moleküle detektiert werden; praktisch werden aber mehr als 10 Kopien mRNA zur Umformung zu cDNA benötigt. Der Grund hierfür ist die relativ geringe Effizienz der reversen Transkriptase Reaktion (Foley et al., 1993). Die Effizienz der RT-Reaktion hängt von den Unterschieden der Nukleotidsequenz, der Länge des poly(A)-Schwanzes und der Entfernung zwischen den Primern und dem poly(A)-Ende ab. Bei der anschließenden PCR gibt es viele Variationen, welche die Effizienz der Amplifikation beeinflussen, wie z.B. die Konzentration der Matrize, dNTPs, MgCl₂, der

ausgewählte Primer, die verschiedenen Polymerase Enzyme, und das Zyklusprofil der PCR (Newton und Graham, 1994; Wang et al., 1989)

4.5.3 Nachweis von Porin mRNA in Zellisolaten und Zellkulturen sowie in bovinem Hodengewebe

Als Ausgangsmaterial für die RT-Reaktion kann Total-RNA oder mRNA aus isolierten Hoden-Zellen oder immortalisierten Zelllinien verwendet werden. Die in dieser Arbeit gewählte Methode der mRNA-Isolierung zur Gewinnung des Ausgangsmaterials für die RT-PCR erwies sich als zuverlässig. Obwohl keine direkte Quantifizierung und Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese durchgeführt wurde, konnte nach RT-PCR das PCR Produkt (=Amplikon), das gemeinsam mit β -Actin Primern als Positivkontrolle erzeugt wurde (nicht gezeigt), regelmäßig dargestellt werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass im bovinen Hoden die mRNA-Expression der 3 verschiedenen Porin-Subtypen vorhanden ist. Der Unterschied in der Bandenstärke wurde nicht weiter analysiert, da Gegenstand dieser Arbeit lediglich der qualitative Nachweis, nicht aber die Quantifizierung der mRNA-Expression war.

Untersuchungen zur mRNA-Expression der drei Porin-Subtypen wurden in verschiedenen Rattengeweben sowie in Tumorzellen (Shinohara et al., 2000) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Transkripte der drei Porin-Subtypen in den getesteten Geweben, nämlich in Leber, Herz, Niere und Gehirn vorhanden waren. Die drei Porin-Subtypen waren im Herz am stärksten, dagegen in der Leber am niedrigsten exprimiert. In dieser Studie wurde allerdings kein Hodengewebe analysiert. Die Untersuchung zum Nachweis der mRNA-Expression der Porin-Subtypen im Hoden wurde erstmals von Sampson *et al.* (Sampson et al., 1996) in der Maus durchgeführt. Sie konnten berichten, dass mittels Northern-Blot Analyse die mRNA-Expression von Porin 2 sehr ausgeprägt war, während Porin 1 mRNA nicht detektierbar war. Die mRNA Expression von Porin 3 im Maus Hoden wurde mittels Northern-Blot Analyse als ausgesprochen intensiv nachgewiesen (Rahmani et al., 1998). Dagegen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe mittels der RT-PCR Technik nur eine schwache Expression von Porin 3 mRNA gefunden (Sampson et al., 1998).

Wie aus der oben zitierten Literatur ersichtlich, gab es zwar Hinweise auf mRNA-Expression von Porin-Subtypen im Hoden aber die Ergebnisse waren nicht immer einheitlich und wenig zellspezifisch differenziert. Um einen ersten Überblick über die mRNA-Expression im Hoden wie auch in den jeweiligen testikulären Zelltypen zu gewinnen, wurden für diese Untersuchungen vom Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg primäre Zellen und

Zelllinien aus dem unreifen Ratten- bzw. Maushoden zur Verfügung gestellt. Stellvertretend für das epitheliale Kompartiment wurden primäre Sertolizellen und die immortalisierten Zelllinien ASC-17D (Roberts et al., 1995), 93RS2 (Jiang et al., 1997) und SCIT-C8 (Konrad et al., nicht publiziert) verwendet. Des Weiteren wurden primäre Peritubulär-Zellen sowie die immortalisierten RTC-8T12 Zellen (Hoeben et al., 1995) als Repräsentanten der stromalen Komponente des Hodens auf Porin-Expression hin analysiert. Abschließend wurden die Zelllinien GC1 und GC2 untersucht, die entweder frühe Spermatogenese-Stadien (GC1) oder spätere Spermatogenese-Stadien (GC2) darstellen (Hofmann et al., 1994; Hofmann und Millan, 1998; Wolkowicz et al., 1996). Im Unterschied zu den vorher aufgeführten Zellen stammen diese Zelllinien aus dem Maushoden. Leider standen keine Leydig-Zellen zur Verfügung. Die Verwendung von primären Zellen hat zwar den Vorteil, dass die Zellen noch viele ursprüngliche, physiologische Eigenschaften aufweisen, hat aber grundsätzlich den Nachteil einer nicht zu unterschätzenden Verunreinigung (1-5%) mit anderen Zellarten. Aufgrund dieser Überlegung wurden ergänzend dazu immortalisierte Zelllinien zu den Experimenten herangezogen. Diese Linien haben den Vorteil einer hohen Homogenitätsrate (100%), zeigen aber, bedingt durch die biochemisch induzierte Immortalisierung, nicht immer alle physiologischen Eigenschaften von Primärzellkulturen. Trotz Einschränkungen in der Analyse mit permanenten Zellkulturen, waren die permanenten Zelllinien ein gutes zusätzliches Hilfsmittel zum Nachweis von Porin-Expression, insbesondere weil man zum Teil auf den Einsatz von Versuchstieren verzichten konnte.

Porin 1 mRNA konnte in allen Arten der Hodenzellen, in Sertolizellen, in Peritubulärzellen und in verschiedenen Keimzellen (GC1 und GC2) eindeutig nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen nur in einem scheinbaren Widerspruch zu der Publikation von Sampson et al. (Sampson et al., 1996), in der keine Porin 1 mRNA-Expression im Hoden nachgewiesen wurde; diese Arbeitsgruppe setzte die Northern-Blot Analyse an Homogenaten des gesamten Hodens ein, während in der hier vorgelegten Arbeit die wesentlich empfindlichere RT-PCR Methode sowie hoch aufgereinigten Zellfraktionen verwendet wurden. Die Northern-Blot Analyse ermöglicht lediglich die Charakterisierung der Transkriptgröße mit relativ hohen RNA-Mengen (Reue, 1998), während mit RT-PCR mRNA in einer sehr geringen Menge an Material detektiert werden kann (Reue, 1998; Wang et al., 1989).

Die mRNA Expression von Porin 2 wurde deutlich in den Keimzelllinien der frühen Stadien (GC1) wie auch in den späteren Stadien (GC2) gezeigt. In Sertolizellen und in Peritubulär-Zellen konnten keine absolut eindeutigen Porin 2 Amplifikate gezeigt werden; allerdings

wurde hier die PCR Methode nicht weiter optimiert, da die Analysen der Zellen der Spermatogenese in dieser Dissertationsarbeit im Vordergrund standen und nur eine begrenzte Menge an Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung zum Nachweis der mRNA Expression von Porin 3 in den verschiedenen Hodenzelllinien nicht mehr durchgeführt.

Ein weiterer Vorteil der Anwendung der RT-PCR Methode zur Überprüfung oder Nachweis von mRNA Transkription ist, dass das Endprodukt sequenziert werden kann und somit ein Vergleich mit vorhandenen Sequenzdaten möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die komplette Nukleinsäuresequenz der bovinen Porin 2 cDNA (Acc. No. AJ288914), die partielle Nukleinsäuresequenz der testikulären Porin 3 cDNA (Acc. No. AJ299423) und die jeweiligen abgeleiteten Proteinsequenzen (Acc No. CAB94711 für Porin 2 und Acc. No. CAC14092 für Porin 3) vorgelegt. Damit wurde auch eindeutig gezeigt, dass in der RT-PCR die jeweiligen mRNAs amplifiziert wurden und keine Artefakte aus dem Hoden produziert wurden. Des Weiteren wurde für Porin 2 aufgezeigt, dass sowohl das Gen als auch das Protein auch im Rind hochkonserviert vorliegt.

4.5.4 Etablierung der *in situ* Hybridisierungstechnik zum Nachweis der Expression von Porin Subtypen

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) stellt eine Technik dar, die molekularbiologische und histochemische Techniken zur Untersuchung der Genexpression in Gewebeschnitten und cytologischen Präparaten kombiniert (Jin und Lloyd, 1997).

Bei der Bestimmung der Konzentration der Ribosonden mittels der Dot-Blot Methode ergab sich eine Ausbeute für Porin 2 mRNA von 200-300 µg/ml, während von Porin 1 nur ca. 50 - 60 µg/ml synthetisiert wurden. Die Bestimmung der Konzentration und die davon abhängige erfolgreiche Markierung der Ribosonden ist wichtig, um eine optimale Hybridisierung auf den Gewebeschnitten zu gewährleisten. Ein weiterer kritischer Punkt bei der *in situ* Hybridisierung ist die Optimierung der Proteinase K-Konzentrationen; der Verdau durch Proteinase K muss für jedes Gewebe grundsätzlich individuell adaptiert werden. Die Behandlung der Gewebeschnitte mit Proteasen, wie z.B. mit Proteinase K, ist einer von mehreren wichtigen Schritten bei der *in situ* Hybridisierung, weil hier die Erreichbarkeit der Zielsequenz durch die Ribosonden gesichert wird. Die optimalen Konzentrationen der Proteinase K hängen nicht nur von den zu untersuchenden Gewebearten sondern auch von der Fixierungsart und der Dauer der Fixierung ab (Jin und Lloyd, 1997). Die Proteinase K Konzentration von 20 µg/ml war in dem hier eingesetzten Hodengewebe optimal für die

Durchführung der *in situ* Hybridisierung geeignet. Mit dieser Konzentration wurden die in Bouin'scher-Lösung fixierten bovinen Hodenschnitte nicht beschädigt. Die optimale Hybridisierungstemperatur für die Porin 1 Ribosonde lag bei 42°C, während für Porin 2 die Erhitzung auf 48°C nötig war. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung hängt von der Länge der Sonde, der Art des Hybrids (DNA-DNA, DNA-RNA oder RNA-RNA), und der Stringenz ab, die von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration von helixdestabilisierenden Molekülen (z. B. Formamid) abhängig ist (Jin und Lloyd, 1997). Die Stringenz, mit der die *in situ* Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den ungefähren Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz (Leitch et al., 1994).

4.5.5 Lokalisation der Porin Subtypen 1 und 2 mRNA mittels *in situ* Hybridisierung

Nach Optimierung des Testsystems für die jeweiligen Ribosonden wurden diese zum Nachweis und zur Lokalisation von Porin 1 und 2 mRNA eingesetzt. Die *in situ* Hybridisierung mit Porin 1 wies mRNA in Keimzellen der frühen Stadien der Spermatogenese auf. Eine weniger intensive, aber eindeutige Expression von Porin 1 wurde in Sertolizellen beobachtet. Das Vorkommen von Porin 1 mRNA in späteren Stadien der Spermatogenese und auch in den Peritubulärzellen, wie es die RT-PCR Ergebnisse nahe legten, konnte durch die *in situ* Hybridisierung nicht eindeutig bestätigt werden. Diese Diskrepanz ist sehr wahrscheinlich damit zu erklären, dass die *in situ*-Hybridisierung eine vergleichsweise geringere Sensitivität als die RT-PCR aufweist. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Detektion von Proteinen und mRNAs in gewebeständigen Peritubulär-Zellen durch deren Einbettung in eine dichte Extrazellulär-Matrix erschwert wird. Diese Hypothese wird durch *in vitro* Untersuchungen zum Nachweis von TGF- β Subtypen in Peritubulär-Zellen und Sertolizellen unterstützt. Bereits 1989 und 1993 wurde von der Arbeitsgruppe von Skinner (Mullaney und Skinner, 1993; Skinner und Moses, 1989) gezeigt, dass die o.g. Zellen *in vitro* TGF- β mRNA und Protein produzieren; die eindeutige Lokalisation von TGF- β mRNA in den im Gewebsverband befindlichen beiden Zelltypen steht aber noch aus [vgl. z.B. (Olaso et al., 1997)].

Während die Porin 1 mRNA eindeutig aber relativ schwach in den Keimzellen und Sertolizellen aller Spermatogenesestadien vorkommt, ist die Expression des Porin 2 Gens in den bovinen Hodenzellen möglicherweise Stadien-spezifisch. Im Ergebnisteil wurde gezeigt, dass das Porin 2 Gen stark in den Keimzellen der frühen und späteren Stadien (VII-VIII) des

Spermatogenese-Zyklus, aber schwach in den Sertolizellen (Stadien I-V und IX-X) exprimiert wird. Auch wenn kein quantitativer Vergleich durchgeführt wurde, ist es bemerkenswert, dass im Vergleich zum Porin 1 Gen die Expression des Porin 2 Gens im bovinen Hoden insbesondere in den Keimzellen sehr hoch war. Dies könnte hinweisend für die besondere Rolle des Porin 2 Gens bei der Spermatogenese sein; dieser Befund und die daraus gezogenen Rückschlüsse müssen allerdings noch durch eine semiquantitative morphometrische Analyse weiter untermauert werden.

Zusammengefasst weisen die durchgeführten gentechnologischen Untersuchungen übereinstimmend darauf hin, dass Porin Subtypen in verschiedenen Zellen des Säugetier Hodens exprimiert wird. Von außerordentlicher Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass Porin 1 und Porin 2 Subtypen weder ein einheitliches noch ein Entwicklungsstadien-spezifisches Expressionsmuster aufweisen. Dieses Ergebnis deutet auf eine differenzierte Porinfunktionen während der Spermatogenese hin. Über die genauen Funktionen während der Spermatogenese kann nur spekuliert werden. Eventuell könnte Porin in die Regulation der Apoptose involviert sein. Während der Spermiogenese könnten, wie mit Porin „*knock-out*“ Mäusen gezeigt (Sampson et al., 2001), Porine auch am strukturellen Aufbau des Flagellums beteiligt sein. Generell ist zu erwarten, dass Porine über den mitochondrialen Stoffwechsel eine Rolle bei der Motilität der Samenzelle spielen. Genauere Hinweise könnten unter anderem durch die Gewinnung transgener Tiere (Porin 1, 2 und 3 „*knock-out*“ Mäuse) und die zu beobachtenden Auswirkungen auf die Fertilität des entsprechenden Phänotyps gewonnen werden.

4.6 Nachweis von Porin Subtypen 1 und 2 Proteinen im bovinen Hoden

Die Ergebnisse zum Nachweis von Porin Subtypen 1 und 2 Proteinen in bovinem Hoden durch spezifische Antikörper unterstützen die aus den gentechnologischen Untersuchungen gewonnenen Befunde. Durch Antiserum AS P6 konnte immunhistochemisch Porin 1 Protein im bovinem Hoden nachgewiesen werden, während Porin 2 Protein durch Antiserum AS P20 in diesem Gewebe detektiert werden konnte.

Porin 1 Protein war ausgesprochen intensiv in Sertolizellen, aber nicht oder nur ausgesprochen schwach in Keimzellen zu finden. Diese Ergebnisse konnten durch den monoklonalen anti-Porin 1 Antikörper HL 31 Porin bestätigt werden (nicht gezeigt). Das Vorhandensein von Porin 1 Protein in Typ A Spermatogonien war mit

immunhistochemischen Methoden nur schwer zu erheben, weil wegen der morphologischen Ähnlichkeit zwischen Typ A Spermatogonien und Sertolizellen diese Zellen nicht immer eindeutig unterschieden werden konnten. Weitergehende elektronmikroskopische oder immunhistochemische Methoden mit zellspezifischen Markern, z. B. mit dem Nachweis der Cytochrom C_t Isoform für Spermatogonien (Hofmann und Millan, 1998) und Doppelmarkierungen könnten hier in der Zukunft ein definitives Resultat betreffend der Lokalisation von Porin Typ 1 in bovinem Hoden liefern. Die Diskrepanz zwischen den Daten, die durch die *in situ* Hybridisierung und RT-PCR gewonnen wurden, ist offensichtlich. So fand sich eine intensive mRNA Expression in Spermatogonien und in primären Spermatozyten, während der Proteinnachweis in Spermatogonien nur marginal und in Spermatozyten überhaupt nicht gelang. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in der geringeren Sensitivität des immunhistochemischen Testsystems liegen. Außerdem wäre auch eine eventuelle Maskierung von durch die Antikörper detektierte antigene Determinanten zu diskutieren. Auf jeden Fall ist es in diesem Zusammenhang wichtig festzustellen, dass immunhistochemische Ergebnisse allein zwar das Vorkommen von Proteinen nahe legen, aber niemals ausschließen können. Bei negativen immunhistochemischen Resultaten sollten immer andere, unabhängige Untersuchungsmethoden hinzugezogen werden, um die gewonnenen Daten zu sichern.

Porin 2 Protein wurde fast ausschließlich in späteren Stadien der Spermatogenese nachgewiesen; hier fand sich Porin 2 insbesondere in den runden und elongierten Spermatisiden. Auffällig ist, dass Porin Typ 2 in früheren Stadien der Spermatogenese (ab den Spermatogonien) zwar als mRNA exprimiert, aber das Protein erst in einer späteren Phase (runde und elongierte Spermatisiden) translatiert wird. Dieser Befund könnte mit der bekannten Entkoppelung von Transkription und Translation von Proteinen während der Spermatogenese zu erklären sein. Dieses Phänomen ist eng verbunden mit dem Stop der Genexpression während der Spermiogenese. Diese Auffälligkeit wurde unter anderem bei der Expression und *de novo* Synthese von Transitionsproteinen während der Spermiogenese beschrieben (Kleene, 2001; Steger, 1999; Steger, 2001). Zusammenfassend ist festzustellen, dass Porin Subtyp 1 und 2 Protein in Sertolizellen und Spermatogenesenzellen nachzuweisen sind. Auch hier zeigte sich, ähnlich zu den Befunden, die durch *in situ* Hybridisierung erhoben wurden, ein unterschiedliches Muster der Proteinverteilung von Porin 1 und Porin 2. Verglichen mit den Ergebnissen aus RT-PCR und *in situ* Hybridisierung ist jedoch offensichtlich, dass der Nachweis von Protein durch spezifische Antikörper eine wesentlich unempfindlichere Methode ist.

5 Zusammenfassung

Porine sind spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC, *voltage dependent anion channel*), die nicht nur im Mitochondrium sondern auch in der Plasmamembran von Säugetieren nachzuweisen sind. Über das Vorkommen und die Funktion von Porinen in Zellen des Säugetierhodens ist nur wenig bekannt. Aus der Literatur kann aufgrund von Analogien zu somatischen Zellen die Hypothese aufgestellt werden, dass Porine z. B. bei der Motilität, der Induktion der Akrosomreaktion oder bei dem strukturellen Aufbau von Säugetierspermatozoen eine Rolle spielen. Ziel der Dissertationsarbeit war der Nachweis und die Lokalisation von Porin Subtypen während der Spermatogenese sowie die Bedeutung dieser Kanäle für die Regulation von Spermatozoenfunktionen. Porin Subtypen 1 und 2 wurden mittels spezifischer Antikörper im bovinen Hoden dargestellt. Die Expression von Porin Subtypen 1 und 2 mRNA in Zellen des Bullenhodens konnte durch gentechnologische Methoden den Zellen zugeordnet werden. Mittels Immunfluoreszenz mit bovinen Spermatozoen wurde gezeigt, dass Porin Subtypen in unterschiedlichen Regionen (Kopf, Mittelstück, Flagellum) des Spermatozoons zu finden sind. Die Ergebnisse zeigen, dass aufgrund ihrer multitopologischen Lokalisation in Samenzellen Porin Subtypen möglicherweise auch differente Funktionen in den Kompartimenten des Spermatozoons regulieren. Die gentechnologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zeigten übereinstimmend, dass Porin Subtypen in verschiedenen Zellarten des Säugetier Hodens exprimiert werden. Von großer Bedeutung ist, dass Porin 1 und Porin 2 Subtypen sowohl als mRNA wie auch als Protein kein einheitliches und kein Entwicklungsstadien-spezifisches Expressionsmuster aufweisen. Dieses Ergebnis deutet auf eine differenzierte Porin-Funktion während der Spermatogenese hin. Erste Hinweise für die funktionelle Bedeutung von Porin Subtypen für die Akrosomreaktion und für die Motilität der Samenzelle wurden durch den Einsatz von spezifischen anti-Porin Antikörpern gewonnen. Porin Antikörper scheinen die akrosomale Exocytose in Spermatozoen auszulösen, wohingegen die Spermienmotilität im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt. Wegen der unbekannten Signaltransduktionskaskaden, über die Porine an der Regulation der Spermatozoenfunktion beteiligt sein könnten und nicht zuletzt auch wegen der geringen Anzahl an funktionellen Experimenten mit anti-Porin Antikörpern können vorerst aber noch keine definitiven Aussagen über die Funktion von Porin Subtypen in Spermatozoen gemacht werden. Die erhobenen Ergebnisse werden aber als Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen dienen.

6 Summary

Porins are voltage dependent anion channels (VDAC) that are abundant not only in mitochondria but also in mammalian plasma membranes. So far, almost nothing is known about the presence and the function of Porin in the testis. Looking into literature the following hypothesis can be established in analogy to the knowledge that has been gained in somatic cells, Porins could possibly be involved in the regulation of exocytotic events in spermatozoa as well as in the maintenance of the structure of the flagellum and sperm motility. The aim of the study was to evaluate the localisation of Porin subtypes during spermatogenesis and the relevance of this anion channel in the regulation of sperm function. Using specific anti-Porin antibodies, the presence of Porin 1 and 2 could be demonstrated in bovine testis. By the use of RT-PCR and *in situ* hybridisation, the expression of mRNAs of both porin subtypes could be shown in particular bovine testes cells. Using the immune fluorescence method, anti-Porin antibodies produced particular staining patterns for each subtype in the head (acrosome), midpiece (mitochondria) and principal piece of the flagellum. The results demonstrate that, because of their multitopological localisation in sperm cells, Porin subtypes might regulate different functions in particular sperm compartments. *In situ* hybridisation and immune histochemical methods consistently showed that Porin subtypes were present in different cell types of the mammalian testis, e.g., in spermatogenic cells and in Sertoli cells. It is important to note that the staining patterns for Porin 1 and 2 mRNA and protein displayed no uniformity for developmental stages during spermatogenesis. The results obtained lead to the hypothesis that Porin subtypes might have different and individual functions during spermatogenesis. Preliminary evidence for the possible functional impact of Porin upon sperm motility and acrosome reaction has been found by the use of specific anti-Porin antibodies. The results obtained show a tendency towards the assumption that Porin antibodies induce the acrosomal exocytosis in bovine sperm, whereas motility seemed not to be affected. However, because of the yet unknown signal transduction cascades and last but not least because of the low numbers of functional experiments, no conclusive statements about the possible roles of Porin subtypes in sperm physiology can be made. This set of data obtained, however, will be the basis for future scientific investigations.

7 Literaturverzeichnis

- Adams V, Griffin L, Towbin J, Gelb B, Worley K, McCabe E R. Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane. *Biochem Med Metab Biol* 1991; (45): 271-291.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1990.
- Ambhaikar M, Puri C. Cell surface binding sites for progesterone on human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998; (4): 413-421.
- Babel D, Walter G, Gotz H, Thinnies F P, Jurgens L, König U, Hilschmann N. Studies on human porin. VI. Production and characterization of eight monoclonal mouse antibodies against the human VDAC "Porin 31HL" and their application for histotopological studies in human skeletal muscle. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; (372): 1027-1034.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Francavilla S, Gabriele A, Properzi G, Forti G. Nongenomic progesterone receptor on human spermatozoa: biochemical aspects and clinical implications. *Steroids* 1999; (64): 143-148.
- Bathori G, Parolini I, Szabo I, Tombola F, Messina A, Oliva M, Sargiacomo M, De Pinto V, Zoratti M. Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr* 2000; (32): 79-89.
- Bathori G, Parolini I, Tombola F, Szabo I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M. Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* 1999; (274): 29607-29612.
- Benz R. Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1988; (42): 359-393.
- Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1994; (1197): 167-196.
- Benz R, Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. *Eur J Biochem* 1988; (176): 1-19.
- Bergmann M. Spermatogenesis. In: *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. (Eds. Krause W, Weidner W). Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1998; 9-14.
- Berndson W E, Desjardins C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 1974; (140): 167-179.
- Beurdeley-Thomas A, Miccoli L, Oudard S, Dutrillaux B, Poupon M F. The peripheral benzodiazepine receptors: a review. *J Neurooncol* 2000; (46): 45-56.
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; (1368): 7-18.

- Blachly-Dyson E, Forte M. Cloning of a human VDAC cDNA. *Biophys.J.* 59, 216a. 1991.
- Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC channels. *IUBMB Life* 2001; (52): 113-118.
- Blachly-Dyson E, Song J, Wolfgang W J, 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.
- Blachly-Dyson E, Zambronicz E B, Yu W H, Adams V, McCabe E R, Adelman J, Colombini M, Forte M. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 1993; (268): 1835-1841.
- Blackmore P F, Eisoldt S. The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1999; (5): 498-506.
- Blackmore P F, Lattanzio F A. Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; (181): 331-336.
- Boehm JG. Untersuchungen zur Regulation der Spermatozoenmotilität durch Rho-regulierte Proteine. 1-118. 1998. Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bourgeron T. Mitochondrial function and male infertility. *Results Probl Cell Differ* 2000; (28): 187-210.
- Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 2002; (187): 139-144.
- Buchanan S K. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 1999; (9): 455-461.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray D C, Dermietzel R. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; (97): 3201-3206.
- Bureau M H, Khrestchatisky M, Heeren M A, Zambrowicz E B, Kim H, Grisar T M, Colombini M, Tobin A J, Olsen R W. Isolation and cloning of a voltage-dependent anion channel-like Mr 36,000 polypeptide from mammalian brain. *J Biol Chem* 1992; (267): 8679-8684.
- Casadio R, Jacoboni I, Messina A, De P, V. A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett* 2002; (520): 1-7.
- Cheng F P, Gadella B M, Voorhout W F, Fazeli A, Bevers M M, Colenbrander B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* 1998; (59): 733-742.
- Cole T, Awni L A, Nyakatura E, Gotz H, Walter G, Thinnies F P, Hilschmann N. Studies on human porin. VIII. Expression of "Porin 31HL" channels in the plasmalemma of the acute-

- lymphoblastic-leukemia cell line KM3 as revealed by light- and electron-microscopy. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; (373): 891-896.
- Cooper T G, Yeung C H. Physiologie der Spermienreifung und Fertilisation. In: *Andrologie*. (Eds.Nieschlag E, Behre HM). Berlin: Springer, 2000; 2: 69-90.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; (341 (Pt 2)): 233-249.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 2002; (84): 143-152.
- Cross N L, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 1989; (41): 635-641.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 1999; (79): 481-510.
- Eben-Brunnen J, Reymann S, Awni L A, Cole T, Hellmann T, Hellmann K P, Paetzold G, Kleineke J, Thinnies F P, Gotz H, Hilschmann N. Lentil lectin enriched microsomes from the plasma membrane of the human B-lymphocyte cell line H2LCL carry a heavy load of type-1 porin. *Biol Chem* 1998; (379): 1419-1426.
- Eddy E M, O'Brien D A. The Spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction*. (Eds.Knobel E, Neil JD). New York: Raven Press, Ltd, 1994; 29-77.
- Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, Grube D, Christ M, Weigel M, Buddhikot M, Meizel S, Wehling M. Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca^{2+} -fluxes in sperm. *Endocrinology* 1999; (140): 5999-6002.
- Fisch J D, 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.
- Flesch F M, Gadella B M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; (1469): 197-235.
- Foley K P, Leonard M W, Engel J D. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1993; (9): 380-385.
- Fraser L R, Umar G, Sayed S. Na^{+} -requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; (97): 539-549.
- Freitag H, Neupert W, Benz R. Purification and characterisation of a pore protein of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* 1982; (123): 629-636.
- Gadkar S, Shah C A, Sachdeva G, Samant U, Puri C P. Progesterone receptor as an indicator of sperm function. *Biol Reprod* 2002; (67): 1327-1336.
- Garcia R, Martinez R, Rabago M, Hernandez-Perez O, Reyes A, Rosado A. Subcellular distribution of phospholipase A2 and ATPases during capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Arch Androl* 1991; (26): 93-105.

- Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 2001; (358): 147-155.
- Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey R B, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 2001; (15): 1406-1418.
- Grootegoed J A, Siep M, Baarends W M. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; (14): 331-343.
- Hinsch E, et.al. Identification of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibers fractions. *Reprod.Dom.Anim.* 2003.
- Hinsch K D, Asmarinah, Hinsch E, Konrad L. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta* 2001; (1518): 329-333.
- Hoeben E, Briers T, Vanderstichele H, De Smet W, Heyns W, Deboel L, Vanderhoydonck F, Verhoeven G. Characterization of newly established testicular peritubular and prostatic stromal cell lines: potential use in the study of mesenchymal-epithelial interactions. *Endocrinology* 1995; (136): 2862-2873.
- Hofmann M C, Hess R A, Goldberg E, Millan J L. Immortalized germ cells undergo meiosis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; (91): 5533-5537.
- Hofmann M C, Millan J L. Establishment of mammalian testicular cell lines. *Methods Cell Biol* 1998; (57): 93-110.
- Huizing M, Ruitenbeek W, Thinnes F P, DePinto V, Wendel U, Trijbels F J, Smit L M, ter Laak H J, van den Heuvel L P. Deficiency of the voltage-dependent anion channel: a novel cause of mitochondriopathy. *Pediatr Res* 1996; (39): 760-765.
- Jakob C, Gotz H, Hellmann T, Hellmann K P, Reymann S, Florke H, Thinnes F P, Hilschmann N. Studies on human porin: XIII. The type-1 VDAC 'porin 31HL' biotinylated at the plasmalemma of trypan blue excluding human B lymphocytes. *FEBS Lett* 1995; (368): 5-9.
- Jiang C, Hall S J, Boekelheide K. Development and characterization of a prepubertal rat Sertoli cell line, 93RS2. *J Androl* 1997; (18): 393-399.
- Jin L, Lloyd R V. In situ hybridization: methods and applications. *J Clin Lab Anal* 1997; (11): 2-9.
- Jurgens L, Ilseemann P, Kratzin H D, Hesse D, Eckart K, Thinnes F P, Hilschmann N. Studies on human porin. IV. The primary structures of "Porin 31HM" purified from human skeletal muscle membranes and of "Porin 31HL" derived from human B lymphocyte membranes are identical. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; (372): 455-463.
- Kalab P, Visconti P, Leclerc P, Kopf G S. p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J Biol Chem* 1994; (269): 3810-3817.

- Kleene K C. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* 1996; (43): 268-281.
- Kleene K C. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* 2001; (106): 3-23.
- Kleinig H, Sitte P. *Zellbiologie*. Fischer Verlag, Stuttgart 1989.
- Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Aumuller G. Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology* 2000; (141): 3679-3686.
- Kopf G S. Identification in Sperm of a Guanine Nucleotide-binding Regulatory Protein (G-Protein) and the Demonstration of its Intermediary Role in the Murine Zona Pellucidainduced Acrosome Reaktion. *Reproductive Biology* 1987.
- Kopf G S, Gerton G L. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: *Elements of mammalian Fertilization*. (Ed. Wassarman PM). Boca Raton: CRC Press, Inc., 1991; 153-203.
- Kottke M, Adam V, Riesinger I, Bremm G, Bosch W, Brdiczka D, Sandri G, Panfili E. 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.
- Kwon S, Eddy EM. The expression of a membrane associated progesteron receptor (MAPR) in the male mouse reproduction system. *Cell Biology Meeting* . 1997.
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; (227): 680-685.
- Lee A C, Xu X, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M. The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J Membr Biol* 1998; (161): 173-181.
- 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.
- Leitch A R, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch I J. *In situ Hybridisierung*. Spektrum, Berlin 1994.
- Linden M, Gellerfors P, Nelson B D. Purification of a protein having pore forming activity from the rat liver mitochondrial outer membrane. *Biochem J* 1982; (208): 77-82.
- Lisanti M P, Scherer P E, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu Y H, Cook R F, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 1994; (126): 111-126.
- Ludwig O, Benz R, Schultz J E. Porin of Paramecium mitochondria isolation, characterization and ion selectivity of the closed state. *Biochim Biophys Acta* 1989; (978): 319-327.
- 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.

- Meizel S. Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1997; (56): 569-574.
- Messina A, Oliva M, Rosato C, Huizing M, Ruitenbeek W, van den Heuvel L P, Forte M, Rocchi M, De P, V. Mapping of the human Voltage-Dependent Anion Channel isoforms 1 and 2 reconsidered. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; (255): 707-710.
- Moon J I, Jung Y W, Ko B H, De P, V, Jin I, Moon I S. Presence of a voltage-dependent anion channel 1 in the rat postsynaptic density fraction. *Neuroreport* 1999; (10): 443-447.
- Mullaney B P, Skinner M K. Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 1993; (7): 67-76.
- Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; (155): 335-350.
- Myles D G, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 1997; (56): 320-327.
- Nagy Z P. Sperm centriole dysfunction and sperm immotility. *Mol Cell Endocrinol* 2000; (166): 59-62.
- Newton C R, Graham A. PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1994.
- Nikaido H. Transport across the bacterial outer membrane. *J Bioenerg Biomembr* 1993; (25): 581-589.
- Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* 1994; (269): 3905-3908.
- Nikolaeva M A, Krutskikh A Y, Korotkova I V, Golubeva E L, Kulakov V I, Sukhikh G T. Antisperm antibodies and sterility: insoluble problem or perspective trend of research? *Bull Exp Biol Med* 2001; (131): 24-28.
- Olaso R, Gautier C, Levacher C, Durand P, Saez J, Habert R. The immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 2 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1997; (126): 165-172.
- Osman R A, Andria M L, Jones A D, Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; (160): 828-833.
- Pastorino J G, Shulga N, Hoek J B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2002; (277): 7610-7618.
- Powell L M, Wallis S C, Pease R J, Edwards Y H, Knott T J, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987; (50): 831-840.
- Primakoff P, Myles D G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 2002; (296): 2183-2185.

- Print C G, Loveland K L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; (22): 423-430.
- Rahmani Z, Maunoury C, Siddiqui A. Isolation of a novel human voltage-dependent anion channel gene. *Eur J Hum Genet* 1998; (6): 337-340.
- Rathi R, Colenbrander B, Stout T A, Bevers M M, Gadella B M. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 2003; (64): 120-128.
- Reue K. mRNA quantitation techniques: considerations for experimental design and application. *J Nutr* 1998; (128): 2038-2044.
- Reymann S, Florke H, Heiden M, Jakob C, Stadtmüller U, Steinacker P, Lalk V E, Pardowitz I, Thinnies F P. Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem Mol Med* 1995; (54): 75-87.
- Roberts K P, Banerjee P P, Tindall J W, Zirkin B R. immortalization and characterization of a Sertoli cell line from the adult rat. *Biol Reprod* 1995; (53): 1446-1453.
- Roos N, Benz R, Brdiczka D. Identification and characterization of the pore-forming protein in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1982; (686): 204-214.
- 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.
- Sabeur K, Edwards D P, Meizel S. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1996; (54): 993-1001.
- Saling P M, Storey B T. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 1979; (83): 544-555.
- Sampson M J, Decker W K, Beaudet A L, Ruitenbeek W, Armstrong D, Hicks M J, Craigen W J. Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem* 2001; (276): 39206-39212.
- Sampson M J, Lovell R S, Craigen W J. Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics* 1996; (33): 283-288.
- Sampson M J, Lovell R S, Craigen W J. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J Biol Chem* 1997; (272): 18966-18973.
- Sampson M J, Ross L, Decker W K, Craigen W J. A novel isoform of the mitochondrial outer membrane protein VDAC3 via alternative splicing of a 3-base exon. Functional characteristics and subcellular localization. *J Biol Chem* 1998; (273): 30482-30486.

- Schein S J, Colombini M, Finkelstein A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 1976; (30): 99-120.
- Schuffner A A, Bastiaan H S, Duran H E, Lin Z Y, Morshedi M, Franken D R, Oehninger S. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod* 2002; (8): 722-727.
- Shafir I, Feng W, Shoshan-Barmataz V. Voltage-dependent anion channel proteins in synaptosomes of the torpedo electric organ: immunolocalization, purification, and characterization. *J Bioenerg Biomembr* 1998; (30): 499-510.
- Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; (97): 3100-3105.
- Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 2001; (152): 237-250.
- Shinohara Y, Ishida T, Hino M, Yamazaki N, Baba Y, Terada H. Characterization of porin isoforms expressed in tumor cells. *Eur J Biochem* 2000; (267): 6067-6073.
- Skinner M K, Moses H L. Transforming growth factor beta gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol Endocrinol* 1989; (3): 625-634.
- Sorgato M C, Moran O. Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and prospects for the future. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; (28): 127-171.
- Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)* 1999; (199): 471-487.
- Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol (Berl)* 2001; (203): 323-334.
- Tesarik J, Carreras A, Mendoza C. Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol Reprod Dev* 1993; (34): 183-189.
- Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Carreras A. Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril* 1992; (58): 784-792.
- Thinnes F P. Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eucaryotic cells. *J Bioenerg Biomembr* 1992; (24): 71-75.
- Thinnes F P, Egert G, Gotz H, Pauly E, Altevogt P, Kolbel S, Wernet P, Kratzin H, Yang C, Hilschmann N. [Primary structure of human class II histocompatibility antigens (HLA-D). I. Isolation, purification and characterization of the HLA-D alpha/beta chain complex from a homozygous lymphoblastoid B cell line, H2LCL (HLA-A3, 3; B7, 7; Dw2, 2; DR2, 2; MT1, 1; DC1, 1; MB1, 1]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1984; (365): 1277-1289.

- Thinnes F P, 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.
- Thomas P, Meizel S. An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res* 1988; (20): 397-411.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; (76): 4350-4354.
- Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 2002; (84): 187-193.
- Turner K O, Garcia M A, Meizel S. Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement. *Mol Cell Endocrinol* 1994; (101): 221-225.
- Visconti P E, Olds-Clarke P, Moss S B, Kalab P, Travis A J, de las H M, Kopf G S. Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1996; (43): 82-93.
- Visconti P E, Westbrook V A, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman A B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; (53): 133-150.
- Vriend G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 1990; (8): 52-6, 29.
- Wang A M, Doyle M V, Mark D F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; (86): 9717-9721.
- Wassarman P M, Litscher E S. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 2001; (168): 36-45.
- White D R, Aitken R J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 1989; (22): 163-177.
- Winkelbach H, Walter G, Morys-Wortmann C, Paetzold G, Hesse D, Zimmermann B, Florke H, Reymann S, Stadtmuller U, Thinnes F P, . Studies on human porin. XII. Eight monoclonal mouse anti-"porin 31HL" antibodies discriminate type 1 and type 2 mammalian porin channels/VDACs in western blotting and enzyme-linked immunosorbent assays. *Biochem Med Metab Biol* 1994; (52): 120-127.
- Wistrom C A, Meizel S. Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* 1993; (159): 679-690.
- Wolkowicz M J, Coonrod S A, Reddi P P, Millan J L, Hofmann M C, Herr J C, Coonrod S M. Refinement of the differentiated phenotype of the spermatogenic cell line GC-2spd(ts). *Biol Reprod* 1996; (55): 923-932.

-
- Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: The Physiology of Reproduction. (Eds. Knobil E, Neill JD). New York: Raven Press, Ltd., 1994; Second: 189-317.
- Yoo B C, 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.
- Yu W H, Wolfgang W, Forte M. Subcellular localization of human voltage-dependent anion channel isoforms. *J Biol Chem* 1995; (270): 13998-14006.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; (2): 67-71.

A. Danksagung

Viele Menschen sind dafür verantwortlich, dass ich meine Doktorarbeit in Deutschland begonnen und erfolgreich beendet habe. Hiermit möchte ich mich bei allen herzlich bedanken:

Herr Prof. Dr. O. Soeradi und Prof. Dr. N. Moeloek, mein ehemaliger und jetziger Chef aus der Fachabteilung Biomedizin, Fachbereich Medizin Universität Indonesien, Jakarta, Indonesien, gaben mir die Genehmigung, in Deutschland weiter zu studieren.

Herr Prof. Dr. H.-J. Freisleben, ehemaliger pädagogischer Berater des Fachbereichs Medizin der Universität Indonesien, knüpfte die Kontakte zu Wissenschaftlern in Gießen und gab mir das Selbstvertrauen, um mich für ein DAAD-Stipendium zu bewerben.

Herr Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill akzeptierte meine Bewerbung und gab mir die Möglichkeit bei Herrn Prof. Dr. Hinsch und Frau PD Dr. Hinsch zu arbeiten.

Herr Prof. Dr. K-D. Hinsch und Frau PD. Dr. E. Hinsch gaben mir das Thema dieser Arbeit und hervorragende engagierte Betreuung. Sie haben mich mit großem Verständnis für meine Probleme, nicht nur im Labor, sondern auch im meinen privaten Leben unterstützt.

Herrn Prof. Dr. W. Clauß vom Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Unterstützung in Form von Diskussionen und Begutachtungen der Promotionsarbeit für das DAAD-Stipendium.

Herrn PD Dr. L. Konrad für die engagierte Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. M. Bergmann und Herrn PD Dr. Steger aus dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Diskussion der Ergebnisse.

Frau Dr. V. A. Aires danke ich für die große Hilfe beim Erstellen des Layouts der Arbeit und die Zusammenarbeit im Labor.

Ehemalige Mitarbeiter des Labors Hinsch, Sabine Gröger, Anika Brummer und die Mitarbeiter im molekularbiologischen Labor im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg, besonders Frau E. Völck-Badouin für die nette und geduldige Hilfe.

Mein Dank gilt auch Stefan, Katja, Xenia, Carolina für die nette Arbeitsatmosphäre und Diskussion im Labor; und den Kollegiaten des Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ der Universitäten Gießen und Marburg für viele motivierende Gespräche.

Des Weiteren bedanke ich mich auch bei meinen Geschwistern in Indonesien, sowie Tante Hilde und Onkel Hans für die Unterstützung und auch bei meinen indonesischen Freunden in Jakarta und in Deutschland für die Motivation.

Ich bedanke mich auch sehr beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), Bonn, für die finanzielle Unterstützung meines Aufenthalts in Deutschland ohne die, ich meine Dissertation nicht hätte durchführen können.

Letztendlich bedanke ich mich ganz besonders bei meinem Ehemann, Abdul Rahman und meinen Töchtern Muthia und Aisyah ohne deren Erlaubnis, Unterstützung und Verständnis, ich diese Arbeit nicht erfolgreich beendet hätte.

B. Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit

B.1 Originalarbeiten

Hinsch KD, **Asmarinah**, Hinsch E, Konrad L. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. Biochim Biophys Acta 2001 Apr 16;1518(3):329-33

Asmarinah, Konrad L., Hinsch E., Schill W.B., Hinsch K-D. Identification of porin subtypes mRNA in bovine testis. Andrologia 2001; 33: 235-237.

Konrad L., **Asmarinah**, Hinsch E., Hinsch K-D. Bos taurus mRNA for voltage-dependent anion channel 2 (Vdac2 gene). The EMBL data bank for nucleotide, Acc. No. AJ288914.

Konrad L., **Asmarinah**, Hinsch E., Hinsch K-D. Bos taurus partial mRNA for voltage-dependent anion channel 3 (Vdac3 gene). The EMBL data bank for nucleotide, Acc. No. AJ299423.

Asmarinah, Konrad, L., Hinsch, E., Schill, W.-B. and Hinsch, K.-D. Voltage-dependent anion channel 3 [Bos taurus]. The EMBL data bank for protein, Acc. No. CAC14092

Hinsch, K.D., **Asmarinah**, Hinsch, E. and Konrad, L. Voltage-dependent anion channel 2 [Bos taurus]. The EMBL data bank for protein, Acc. No. CAB94711

B.2 Publiizierte Abstrakts

Asmarinah, Hinsch E, Steger K, Bergmann M, Brummer A, Schill WB, Hinsch KD. Localization of porin type I and II mRNA in the bovine testis. Reproduction in Domestic Animals 35 (1): 13.

Asmarinah, Konrad L, Hinsch E, Schill WB, Hinsch KD. Identification and localization of type I and type II porin in the bovine testis. DVG-Proceedings der 34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Gießen, 22.-23 Februar 2001, 2.

Asmarinah, KD Hinsch, V Aires, E Hinsch. Functional studies with anti-porin type 2 antibodies in bovine spermatozoa. DVG-Proceedings der 35. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Leipzig, 14.-15. Februar 2002: 17

C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Asmarinah.
Geburtsdatum: 21.11.1965.
Geburtsort: Jakarta, Indonesien.
Staatsangehörigkeit: indonesisch.
Religion: Moslem
Familienstand: verheiratet.
Ehemann: Abdul Rahman.
Kinder: Muthiarani Rahman.
Aisyah Rifani Rahman.
Hafiz Abdul Rahman.

Ausbildung

1972 - 1977: Grundschule „Persit KCK“, Cijantung, Jakarta.
1978 - 1981: Mittelschule SMPN 102, Cijantung, Jakarta.
1981 - 1984: Oberschule SMAN 14, Cililitan, Jakarta.
1984 – 1989: Studium der Biologie am Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften, Universität Indonesien, Jakarta.
Abschlusstitel: Sarjana
1993 - 1996: Studium der Biomedizin am biomedizinischen Graduiertenprogramm, Universität Indonesien, Jakarta
Abschlusstitel : Master
1998 - 2003: Promotion am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen mit der Unterstützung des DAAD Stipendiums.
Seit 2000: Kollegiatin im Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ der Universitäten Gießen und Marburg.

Tätigkeit

Seit 1990: Dozentin an der Fachabteilung Biomedizin, Fachbereich Medizin der Universität Indonesien, in Jakarta, Indonesien