

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes Homburg/Saar

## **Verteilung und funktionelle Untersuchungen des ABCG2-Transporters in murinen Spermatozoen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von Philip Reppes  
geb. am 03.12.1980 in Willich

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität des Saarlandes am

---

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael Menger

Referent: Univ.-Prof. Dr. Gunther Wennemuth

1. Korreferent: n.n

**In Liebe meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>                                    | <b>4</b>  |
| <b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                     | <b>6</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>                                               | <b>8</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                 | <b>10</b> |
| <b>2 EINLEITUNG .....</b>                                          | <b>11</b> |
| 2.1 SPERMATOGENESE UND AUFBAU DES SPERMATOZOONS .....              | 11        |
| 2.2 KAPAZITATION UND AKROSOMALE REAKTION .....                     | 14        |
| 2.3 ABC-TRANSPORTER .....                                          | 18        |
| 2.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....                 | 25        |
| <b>3 MATERIAL UND METHODIK .....</b>                               | <b>26</b> |
| 3.1 MATERIAL .....                                                 | 26        |
| 3.1.1 <i>Allgemeine Geräte</i> .....                               | 26        |
| 3.1.2 <i>PC-Software</i> .....                                     | 26        |
| 3.1.3 <i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....                      | 27        |
| 3.1.4 <i>Verwendete Puffer</i> .....                               | 29        |
| 3.1.5 <i>Verwendete Antikörper</i> .....                           | 32        |
| 3.1.6 <i>ABCG2-Inhibitor</i> .....                                 | 32        |
| 3.1.7 <i>Versuchsmaterial</i> .....                                | 33        |
| 3.2 METHODIK .....                                                 | 34        |
| 3.2.1 <i>Übersicht</i> .....                                       | 34        |
| 3.2.2 <i>Zellkultur</i> .....                                      | 35        |
| 3.2.3 <i>Nebenhodenpräparation und Spermatozoengewinnung</i> ..... | 35        |
| 3.2.4 <i>Proteinaufbereitung</i> .....                             | 37        |
| 3.2.5 <i>SDS-PAGE und Western Blot</i> .....                       | 38        |
| 3.2.6 <i>Immunzytochemie</i> .....                                 | 39        |
| 3.2.7 <i>Transportversuche an bovinen Spermatozoen</i> .....       | 41        |
| 3.2.8 <i>Chlortetrazyklinmethode</i> .....                         | 42        |
| 3.2.9 <i>PSA-Färbung</i> .....                                     | 43        |

|          |                                                                                                                  |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.10   | Statistik.....                                                                                                   | 44         |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>                                                                                          | <b>45</b>  |
| 4.1      | IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS DES ABCG2-PROTEINS IN SPERMATOZOEN<br>VERSCHIEDENER SPEZIES.....                        | 45         |
| 4.1.1    | <i>Western Blot</i> .....                                                                                        | 45         |
| 4.1.2    | <i>Immunzytochemie</i> .....                                                                                     | 46         |
| 4.2      | TRANSPORTVERSUCHE AN HEK-293-ZELLEN UND BOVINEN SPERMATOZOEN ...                                                 | 48         |
| 4.3      | EINFLUSS VON ABCG2 AUF DIE KAPAZITATIONSASSOZIIERTE<br>PROTEINTYROSINPHOSPHORYLIERUNG MURINER SPERMATOZOEN ..... | 53         |
| 4.4      | CTC-FÄRBUNG AN MURINEN SPERMATOZOEN .....                                                                        | 56         |
| 4.5      | PSA-LEKTINFÄRBUNG DES MURINEN AKROSOMS.....                                                                      | 64         |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION .....</b>                                                                                          | <b>70</b>  |
| <b>6</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                                                                | <b>89</b>  |
| <b>7</b> | <b>PUBLIKATIONEN/DANKSAGUNG .....</b>                                                                            | <b>102</b> |
| <b>8</b> | <b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF .....</b>                                                                           | <b>103</b> |

# 1 Zusammenfassung

## Verteilung und funktionelle Untersuchungen des ABCG2-Transporters in murinen Spermatozoen

**Autor: Philip Regges**

Die Aufgabe von Spermatozoen ist es das Erbmateriale zur weiblichen Oozyte zu transportieren. Voraussetzung für eine physiologische Befruchtung sind physiologische und biochemische Veränderungen der Spermatozoen im weiblichen Reproduktionstrakt, die in ihrer Gesamtheit als Kapazitation bezeichnet werden. Die Abnahme des Cholesterolgehaltes in den Plasmamembranen von Spermatozoen ist ein entscheidender Schritt in der Kapazitation dieser Zellen. Wie es zu der Abnahme des Cholesterolgehaltes kommt ist bislang unklar. Ein Transporter, dessen Beteiligung im Transport von Cholesterole in somatischen Zellen derzeit diskutiert wird, ist ABCG2.

Das ABCG2-Protein (Adenosin-Triphosphate-Binding-Cassette 2) ist ein aus sechs Transmembrandomänen bestehender, phylogenetisch hoch konservierter Transporter der ATP-Binding-Cassette-Familie, der in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen ist. Dort minimiert er die Akkumulation zytotoxischer Substanzen. Dies ist in entarteten Geweben die Grundlage der klinisch bedeutsamen Resistenz gegenüber einer großen Anzahl von Chemotherapeutika. In dieser Arbeit sollte die Lokalisation des ABCG2-Transporters in Spermatozoen verschiedener Spezies nachgewiesen und überprüft werden, inwieweit ABCG2 in Spermatozoen funktionell aktiv und an der Fertilisation beteiligt ist.

Das 72 kDa schwere Protein konnte in dieser Arbeit mittels Western-Blot in Spermatozoen von Mensch, Bulle, Ratte und Maus nachgewiesen werden. In immunzytochemischen Untersuchungen zeigte sich eine Lokalisation des Proteins in der akrosomalen Region in Spermatozoen von Bulle und Maus. Es konnte mittels Transportversuchen gezeigt werden, dass ABCG2 in

Spermatozoon funktionell aktiv ist und dass der spezifische-Inhibitor Fumitremorgin C die intrazelluläre Akkumulation der Substrate Hoechst 33342 und Ethidiumbromid in Spermatozoen erhöhte. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der ABCG2 Transport-Inhibitor Fumitremorgin C keinen Einfluss auf die Kapazitation nimmt. So wurde die Ausprägung der kapazitationsassoziierten Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Western-Blot durch Fumitremorgin C nicht verändert. Im Weiteren zeigte sich in der Chlortetrazyklin- und der *Pisum sativum Agglutinin*-Färbung, dass der spezifische Inhibitor die Anzahl akrosomal reagierter Zellen nach Auslösung der akrosomalen Reaktion mit dem Kalzium-Ionophor A23187 nicht signifikant verminderte. Der Nachweis von ABCG2 in Spermatozoen verschiedener Spezies und die gezeigte funktionelle Aktivität von ABCG2 sprechen für eine wichtige Rolle des Transporters in Spermatozoen.

## Summary

### **Distribution and functional analysis of ABCG2 in murine spermatozoa**

The role of mature spermatozoa is the transportation of the genetic material to the site of fertilization in the female oviduct. The biochemical and physiological changes of the spermatozoa which are responsible for the ability to fuse with the plasma membrane of the female oocyte are termed capacitation. Especially the removal of cholesterol from the plasma membrane is a crucial early step in the process of capacitation that prepares sperm for fertilization. The mechanism underlying the decrease of cholesterol during capacitation are largely unknown. A protein whose participation in the transport of cholesterol in somatic cells is currently being discussed is ABCG2.

The ABCG2 transporter is a 6 transmembrane domain protein that is highly conserved and is expressed in a wide variety of tissues, where it is involved in limiting the intracellular accumulation of cytotoxic compounds. Its clinical relevance includes roles in multi-drug-resistance in malignant tissues.

Here we show that the ABCG2 transporter also may be present in spermatozoa. Specifically, we show for the first time that a 72 kDa immunoreactive band is recognized on western blots of extracts of sperm from man, bull, rat, and mouse and that ABCG2 is localized in the acrosomal region of bovine and murine spermatozoa. We also show that the specific ABCG2 transport inhibitor Fumitremorgin C slows the removal of the cytotoxic agents Hoechst 33342 and ethidium bromide from sperm. However we found that the ABCG2 transport inhibitor Fumitremorgin C did not alter the progress of capacitation for sperm. Specifically, the time course of appearance of protein tyrosine phosphorylation was not slowed. In addition the inhibitor did not significantly decrease the proportion of sperm that achieved a recognized end-point of capacitation (ionophore-triggered acrosomal exocytosis) assessed by staining with *Pisum sativum agglutinin* or with chlortetracycline.

The detection of ABCG2 in spermatozoa of various species and shown functional activity of ABCG2 suggest a specific role for the ABCG2 transporter in mature spermatozoa.

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |                                                     |
|-----------------|-----------------------------------------------------|
| ABC-Transporter | ATP-Binding-Cassette-Transporter                    |
| ADP             | Adenosindiphosphat                                  |
| ATP             | Adenosintriphosphat                                 |
| BSA             | Bovines Serum Albumin                               |
| cAMP            | Cyclisches Adenosinmonophosphat                     |
| CF              | Cystische Fibrose                                   |
| CFTR            | Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| CTC             | Chlortetracycline                                   |
| CY3             | Carbocyanin 3                                       |
| DAPI            | 4', 6-Diamidino-2-phenylindol                       |
| DIC             | Differential Interference Contrast                  |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle Medium                    |
| ECL             | Enhanced Chemiluminescence                          |
| EDTA            | Etylendiamintetraessigsäure                         |
| FITC            | fluorescein-5-isothiocyanate-protein conjugate      |
| HEK             | Human Embryonic Kidney                              |
| HRP             | horseradish-peroxidase                              |
| MDR             | multidrug-resistance                                |
| MOPS            | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure                  |
| MRP             | multidrug-resistance related protein                |
| NBS             | Nukleotidbindungsstellen                            |
| NIH             | National Institutes of Health                       |
| NMRI            | Naval Medical Research Institute                    |
| PBS             | phosphate buffered saline                           |
| PKA             | Proteinkinase A                                     |
| PLC             | Phospholipase C                                     |
| PSA             | Pisum sativum agglutinin                            |
| SAC             | soluble adenylat cyclase                            |
| TMD             | Transmembrandomänen                                 |
| ZP3             | Zona-Pellucida-Protein-3                            |

## 2 Einleitung

### 2.1 Spermatogenese und Aufbau des Spermatozoons

Der als Spermatogenese bezeichnete Reifungsprozess männlicher Gameten lässt sich bei Säugern in zwei verschiedene Phasen einteilen, die Spermatozytogenese und die Spermio-genese. Während der Spermatozytogenese kommt es zu einer klonalen Vermehrung und Differenzierung der Spermatogonien. Dieser Abschnitt ist von mitotischen Teilungen der Spermatogonien A gekennzeichnet, die an der Basallamina der Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) lokalisiert sind. Hierbei wird eine Tochterzelle in die Spermatogenese eingeschleust. Nach einer mitotischen Teilung entstehen aus diesen Spermatogonien B die Spermatozyten I. Die Spermatozyten I verdoppeln ihren DNA-Gehalt und gehen in die 1. Reifeteilung (Reduktionsteilung) der Meiose über. Nach deren Ende beträgt ihr DNA-Gehalt  $2n$  und sie werden als Spermatozyten II bezeichnet. In der Prophase der Reduktionsteilung kommt es zur Rekombination des mütterlichen und väterlichen Erbmateri-als. Sie dauert beim Menschen ca. 20 Tage. Auf diese in 5 Stadien einteilbare Prophase folgen schnell Meta-, Ana- und Telophase. In histologischen Schnitten sind die als Spermatozyten II bezeichneten Zellen nur selten zu erkennen, da es weder zu einer Reduplikation noch zu einer Rekombination des Erbgutes kommt und der Prozess der nun einsetzenden 2. Reduktionsteilung nur wenige Stunden in Anspruch nimmt. Aus der 2. Reifeteilung gehen die haploiden Spermatiden hervor. Diese Spermatiden durchlaufen im Folgenden zytologische Reifungen, welche zum Teil zeitgleich ablaufen und im Gesamten als Spermio-genese bezeichnet werden. Sie haben zum Ziel, das Spermatozoon in die Lage zu versetzen, die weibliche Oozyte zu befruchten.

Vereinfacht lässt sich dieser hochkomplexe Prozess folgendermaßen in vier Phasen beschreiben:

1. Kernkondensation

Während dieser Phase kommt zu einer Verdichtung des Chromatins auf ca. 10% seines ursprünglichen Volumens und zu einer exzentrischen Verlagerung des Kerns, der sich zu einer speziecharakteristischen Form umwandelt.

2. Akrosomenphase

Das zur Penetration der weiblichen *Zona Pellucida* essentielle Akrosom entwickelt sich aus dem Golgi-Apparat. Kleine granuläre Vakuolen aus dem Golgi-Apparat konfluieren und bewegen sich auf die Kernmembran zu. Dort flacht das akrosomale Vesikel ab und legt sich kappenartig um den Kern.

3. Spermatozoenschwanzentwicklung

Das zur Fortbewegung im weiblichen Genitaltrakt benötigte Schwanzstück entsteht aus den Zentriolen der Spermatide. Sie bestehen aus einer Mikrotubulstruktur mit der Anordnung  $9 \times 2 + 2$ .

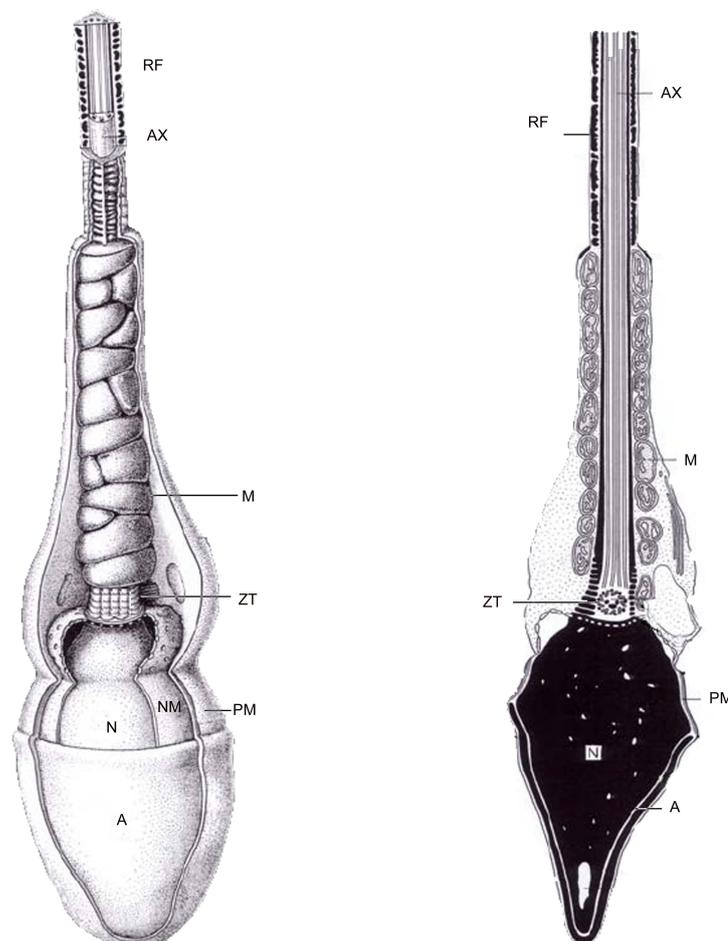
4. Zytoplasmareduktion

Das überflüssige Zytoplasma wird von den umgebenden Sertoli-Zellen phagozytiert. Die sich anschließende Freisetzung der Spermatozoen in das Lumen der Hodenkanälchen wird als Spermiation bezeichnet. Der passive Transport Richtung *Rete testis* und Nebenhoden dauert beim Menschen 8-17 Tage und ist mit einer weiteren Reifung der Spermatozoen verbunden. Im Nebenhoden werden die morphologisch ausdifferenzierten, aber unkapazitierten Spermatozoen nun bis zur Ejakulation gespeichert.

Die aus der Spermatogenese entstandenen Spermatozoen sind beim Menschen ca. 60  $\mu\text{m}$  lang und gliedern sich in einen Kopf- und in einen Schwanzteil, wobei der Schwanz weiter in Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt werden kann. Im Kopfbereich befindet sich der Kern mit dem kondensierten Chromatin, dem das Akrosom kappenartig aufliegt. Der sich anschließende Schwanz des Spermatozoons umfasst neben einem zentralen

Achsenfaden, dem sogenannten *Axonema*, im Mittelstück zirkulär angeordnete Mitochondrien, die für die nötige Energie während der Aszension im weiblichen Reproduktionstrakt sorgen. Das Halsstück des Spermatozoons ist gekennzeichnet durch Zentriol und Basalkörper. Im Mittelstück wird es zu den Mitochondrien hin durch spiralig angeordnete Längsfasern abgegrenzt, die im Bereich des Hauptstückes in Ringfasern übergehen und ca. 5 µm vor dem Ende des Spermatozoenschwanzes im Endstück enden (Holstein, 2003).

Abbildung 1 zeigt die Darstellung eines humanen Spermatozoons:



**Abbildung 1** *Humanes Spermatozoon in einer grafischen Darstellung (linke Seite), sowie die Zeichnung einer elektronenmikroskopischen Abbildung (rechte Seite), A= Akrosom, AX= Axonema, M= Mitochondrium, N= Nukleus, NM= Nukleäre Membran, PM= Plasmamembran, RF= Ringfaser, ZT= Zentriol, das Schwanzstück ist nur partiell dargestellt (modifiziert nach Roosen-Runge, Atlas of Human Spermatogenesis, 1981).*

## 2.2 Kapazitation und akrosomale Reaktion

Unmittelbar nach der Ejakulation sind Spermatozoen zwar morphologisch vollständig entwickelt, aber funktionell noch nicht in der Lage, die weibliche Gamete zu befruchten. Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation ist eine Reifung im weiblichen Genitaltrakt.

Während dieses Reifungsprozesses kommt es sowohl zu weitreichenden intrazellulären Veränderungen als auch zu Modifikationen der Plasmamembran. Diese biochemischen und physiologischen Veränderungen wurden Anfang der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts unabhängig von Chang und Austin postuliert und als Kapazitation bezeichnet (*Chang, 1951; Austin, 1952*). Der Prozess der Kapazitation ist eine essentielle Voraussetzung für Spermatozoen um mit der Plasmamembran der weiblichen Eizelle zu fusionieren.

Um in Spermatozoen die kapazitationsspezifischen Veränderungen *in vitro* nachweisen zu können, sind neben Substraten für den Energiestoffwechsel speziesübergreifend bei den meisten Säugern drei Komponenten von essentieller Bedeutung: Bikarbonat, Kalzium und Albumin, in aller Regel BSA (Bovines Serum Albumin). Die Wirkung dieser drei Komponenten resultiert letztlich via einer cAMP-abhängigen Signaltransduktion in der Phosphorylierung von Tyrosinresten von Zielproteinen und daraus resultierenden Aktivitätsänderungen der Proteine. Diese Aktivitätsveränderungen spielen hinsichtlich der transkriptionalen und translationalen Inaktivität der Spermatozoen eine besondere Rolle, da die Phosphorylierung von Proteinen in Spermatozoen eine entscheidende Möglichkeit der Steuerung darstellt. Reguliert werden diese Phosphorylierungen durch cAMP. Bei steigenden Konzentrationen führt cAMP zu einer Aktivierung von Proteinkinasen, vor allem Proteinkinase A (PKA). Inkubiert man Spermatozoen mit cAMP-Agonisten, so kommt es auch unter Abwesenheit von Bikarbonat, BSA und Kalzium zu einer Proteintyrosinphosphorylierung. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Proteinkinase A-Hemmer H-89 die Kapazitation und die damit verbundene Proteintyrosin-

phosphorylierung verhindert. Deshalb wird eine Involvierung dieses cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges in der Kapazitation angenommen (*Visconti, 1995a, b; Visconti, 1999b*).

Ein wichtiger Faktor für die Auslösung der Kapazitation ist Bikarbonat, unter dessen Abwesenheit es zu keiner Proteintyrosinphosphorylierung *in vivo* und *in vitro* kommt (*Visconti, 1995a*). Da die Konzentration an Bikarbonat in der *Epididymis* im Gegensatz zum Seminalplasma und der Zervixflüssigkeit gering ist, kommt es erst nach erfolgter Ejakulation zu bikarbonatspezifischen Veränderungen der Spermatozoen (*Brooks, 1983*). Der Einstrom von Bikarbonat in unkapazitierte Spermatozoen resultiert in einer Hyperaktivierung, einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes und in Veränderungen der Membranarchitektur (*Vredenburg-Wilberg, 1995; Flesch 2001; Suarez, 2003*). Sowohl die Hyperaktivierung als auch die weitreichenden Veränderungen der Plasmamembran während der Kapazitation durch Bikarbonat sind von der spezifisch in Spermatozoen lokalisierten löslichen Adenylatzyklase (sAC) abhängig, deren Fehlen in einer Infertilität resultiert (*Litvin, 2003; Esposito, 2004; Carlson, 2007*). Die Wirkung dieser nicht membranständigen Adenylatzyklase wird über cAMP vermittelt (*Xie, 2006*). Die dadurch ausgelöste Proteinphosphorylierung an Serin- und Threoninresten durch PKA beginnt bereits nach 90 Sekunden, eine kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung ist hingegen erst nach 60 Minuten zu beobachten (*Harrison, 2000; Harrison, 2004*). Ein weiterer wichtiger Effekt von Bikarbonat auf Spermatozoen von Säugern ist die Auslösung des sogenannten „Phospholipid-Scrambling“, einem Kollaps der Asymmetrie der Membranlipide. Die Änderungen der Membranunordnung umfassen eine Auswärtsbewegung von Phosphatidyl-Serin und Ethanolamin und wird ebenfalls durch PKA vermittelt (*Gadella, 2000; Harrison, 2000*). Nach Studien von Flesch *et al.* liegt die Bedeutung des „Phospholipid-Scrambling“ darin, zelluläres Cholesterin hauptsächlich aus der akrosomalen Region bikarbonatstimulierter Spermatozoen zu entfernen (*Flesch, 2001*).

Die Lipidzusammensetzung der äußeren und der inneren Schicht der Doppelmembran unterscheidet sich in somatischen Zellen und in Spermatozoen am Gehalt der vier am häufigsten vorkommenden Phospholipide Phosphatidyl-Cholin, Ethanolamin, Serin und Sphingomyelin. Für die Fluidität der Membran ist neben der Menge an ungesättigten Fettsäuren Cholesterol von entscheidender Bedeutung. Eine Abnahme des Cholesterolgehaltes in Spermatozoenmembranen gilt als ein Initiator der Kapazitation (Travis, 2002). Um mit der weiblichen Eizelle verschmelzen zu können, ist ein metastabiler Zustand der Membran der Spermatozoen erforderlich. Dieser ist im hohen Maße von dem Sterolgehalt der Membran abhängig. Die Interaktion mit Epithelien vom *Vas deferens* bis zum Ort der Fertilisation im Ovidukt führen in Spermatozoen zu einer Veränderung des Membransterolgehaltes. So haben die Epithelzellen der *Epididymis* und *Vasa deferentia* eine hohe Kapazität zur Bildung von Sterolen, während im weiblichen Genitaltrakt die Follikelflüssigkeit die Fähigkeit zur Sterolaufnahme besitzt (Hamilton, 1969). Humanes Albumin, das in der folliculären Flüssigkeit sowie im Ovidukt vorkommt, ist ein potenter Cholesterolakzeptor (Langlais, 1988). Die Entfernung von Cholesterol aus der Spermatozoenmembran während der Kapazitation führt über bisher nicht geklärte Mechanismen neben einer Erhöhung der Membranfluidität zu einer cAMP-PKA-abhängigen Phosphorylierung von Tyrosinresten an Zielproteinen (Visconti, 1999a, b; Travis 2002).

Neben BSA als Cholesterolakzeptor und Bikarbonat ist Kalzium eine weitere essentielle Komponente für die *in-vitro*-Kapazitation von Spermatozoen (Breitbart, 2002b; Wennemuth, 2003; Ho, 2003). Kalzium ist ein *second messenger* und reguliert verschiedene Signaltransduktionswege. Während der Kapazitation spielt Kalzium über bisher nicht exakt geklärte Mechanismen in Spermatozoen eine essentielle Rolle (Visconti, 1995a). Bekannt ist, dass auch Kalzium über cAMP und PKA zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten führt (Breitbart; 2002b)

Ein funktioneller Endpunkt der Kapazitation ist die akrosomale Reaktion. Sie ist eine Voraussetzung dafür, dass ein Spermatozoon mit der Plasmamembran der Oozyte fusionieren kann. Bevor diese Fusion möglich ist, muss das Spermatozoon zwei Schichten durchdringen. Zum einen den sogenannten *Cumulus oophorus*, eine Schicht von Granulosa-Zellen des Follikels, zum anderen die extrazelluläre Matrix der Oozyte, die *Zona Pellucida*. Während die Passage durch die Granulosa-Zell-Schicht durch die Hyaluronidase PH-20 erreicht wird, ist die Durchdringung der *Zona Pellucida* ein kompliziert regulierter Prozess (Evans & Florman, 2002). Tritt ein Spermatozoon in Kontakt mit der *Zona Pellucida*, binden oberflächliche Glykoproteine der *Zona Pellucida* an spezifische Rezeptoren in der Plasmamembran des Spermatozoons (Tulsiani, 1997). Während der membranäre Rezeptor des Spermatozoons bis heute nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte, ist das Glykoprotein der *Zona Pellucida* das sogenannte ZP3 (Zona-Pellucida-Protein-3). Kurz nach der Bindung kommt es im Spermatozoon zu einem kurzzeitigen Anstieg des intrazellulären Kalziums und nachfolgend zu einer Aktivierung von G-Proteinen (Ward, 1994). Dies resultiert in einer Steigerung der Phospholipase C-Aktivität. Diese Aktivitätssteigerung führt über nicht genau geklärte Signaltransduktionswege zu einer dauerhaften Elevation des intrazellulären Kalziumspiegels. Die Mechanismen, die nachfolgend zu einer Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran der Spermatozoen führen, sind bislang weitestgehend unklar. Die Verschmelzung führt zu einer exozytotischen Ausschüttung der im Akrosom gespeicherten Enzyme, die mit der weiblichen *Zona Pellucida* reagieren und dem Spermatozoon die Passage durch diese Schicht und letztlich die Fusion mit der Oozyte ermöglichen (Evans & Florman, 2002; Breitbart, 2002a).

### 2.3 ABC-Transporter

Die größte Familie der Transmembrantransporter ist die Familie der ATP-Binding-Cassette-Transporter (ABC-Transporter). Sie besteht im menschlichen Genom aus 49 Genen. ABC-Proteine sind für den ATP-abhängigen Transport diverser Substrate wie Kohlenhydrate, Proteine, Lipide und hydrophober Verbindungen verantwortlich. Lokalisiert sind die ABC-Proteine sowohl in der Plasmamembran eukaryotischer und prokaryotischer Zellen als auch in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, der Peroxisomen und der Mitochondrien (Dean, 2001). Die genetische Organisation ist phylogenetisch stark konserviert, da sich ABC-Proteine sowohl in Prokaryoten, Nematoden, als auch in höheren Organismen wie Säugern nachweisen lassen. Strukturell besitzen die ABC-Transporter zwei Nukleotidbindungsstellen (NBS) und zwei Transmembrandomänen (TMD) (Saraste, 1982; Higgins, 1986). Die NBS ist der Ort der Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat. Die dabei freiwerdende Energie wird für den transmembranären Transport der Substrate verwendet. Die Substratspezifität der Transporter ist durch die TMD gewährleistet, die in der Regel aus sechs  $\alpha$ -helikalen Bereichen bestehen, die die Membran durchspannen und für die Porenbildung verantwortlich sind. In prokaryotischen Zellen übernehmen ABC-Transporter sowohl den Export hydrophober Verbindungen und Toxinen als auch den Import von lebenswichtigen Substanzen. In Eukaryoten sind die ABC-Proteine hingegen lediglich im Export von Substanzen involviert, ohne am Stoffimport beteiligt zu sein. Die ABC-Transporter werden aufgrund der Organisation ihrer Proteindomänen und der Sequenzhomologie ihrer TMD und NBS bei Säugern in sieben Unterfamilien unterteilt. Diese Unterfamilien enthalten Gene, die entweder für sogenannte Volltransporter oder Halbtransporter kodieren. Volltransporter enthalten 2 NBS und 2 TMD, während Halbtransporter zur Erlangung ihrer Funktionalität homo- bzw. heterodimerisieren müssen (Dean, 2001).

Nachfolgend sind Vertreter der ABC-Familie unter besonderer Berücksichtigung ihrer Relevanz für den Reproduktionstrakt und das Verständnis der Fragestellung dargestellt:

ABCA-Proteine spielen eine wichtige Rolle in physiologischen sowie pathologischen Prozessen. ABCA1 ist für die Übertragung membranständigen Cholesterols auf spezielle plasmatische Akzeptoren, die Apolipoproteine, verantwortlich (Tall, 2000). Weiteren Studien zufolge spielt ABCA1 eine Rolle im testikulären Lipid-Metabolismus. So konnte an genetisch veränderten Mäusen, die das ABCA-Gen nicht mehr exprimieren gezeigt werden, dass kein Cholesterol-Transport von kultivierten Sertoli-Zellen auf apoA1 stattfindet (Selva, 2004). ABCA1 ist ebenfalls in Spermatiden und in Spermatozoen nachgewiesen. Dort ist das Protein im Mittelstück und in der akrosomalen Region lokalisiert. In der Studie konnte gezeigt werden, dass ABCA1 in Spermatozoen am Cholesteroltransport beteiligt ist. In der gleichen Studie, in der Oozyten mit ABCA1-inhibierten Spermatozoen inkubiert wurden, zeigte sich, dass es unter inhibierten Bedingungen zu einer Reduktion der befruchteten Oozyten um bis zu 70 Prozent kam (Morales, 2008).

Das in medikamentenresistenten Tumorzelllinien überexprimierte ABCB1 vermittelt unidirektional den Transport diverser Chemotherapeutika und erhielt daher den Namen MDR (multidrug-resistance-protein). Es wird auch als *P-Glykoprotein* bezeichnet. Dieses Protein ist der erste im menschlichen Organismus charakterisierte ABC-Transporter. Er schleust zytotoxische Verbindungen aus den Zellen und ist unter anderem in der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert (Juliano, 1976; Riordan, 1985; Kartner, 1985). In maligne entarteten Geweben kommt ihm eine wichtige Bedeutung in der sogenannten multidrug-resistance zu. Durch die Expression dieses Transporters erreichen Tumorzellen eine Resistenz gegen eine Vielzahl von chemotherapeutischen Substanzen. Eine wichtige Aufgabe übernimmt dieser Transporter im Schutz hämatopoetischer Stammzellen vor toxischen Substanzen (Chaudhary, 1991; Sarkadi, 2006). MDR konnte von Melaine *et al.* ebenfalls in testikulären Zellen und Zellen der

Spermatogenese aus Ratte, Maus und Mensch beschrieben werden und spielt dort laut Autoren möglicherweise einer Rolle in der Reduktion von zytotoxischen Substanzen (*Melaine, 2002*).

Mutationen des CFTR-Gens (ABCC7) resultieren in der Cystischen Fibrose (CF), die durch einen gestörten Transport von Bikarbonat- und Chloridionen gekennzeichnet ist. Auffallend hoch ist die im Vergleich zu gesunden Individuen gesteigerte Infertilität bei den betroffenen Patienten (*Riordan, 1989; Kerem, 1989*). So zeigen Endometriumzellen mit defektem CFTR eine verminderte Bikarbonatsekretion und eine damit verbundene reduzierte Fertilisierungskapazität für kokultivierte Spermatozoen (*Wang 2003; Chan, 2006*). Sowohl CFTR-mRNA als auch das CFTR-Protein wurde in humanen und murinen Spermatozoen nachgewiesen. Ein Einfluss auf die kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung konnte durch eine Blockierung von CFTR allerdings nicht nachgewiesen werden (*Hernández-González, 2007*). *Xu et al.* wiesen darüber hinaus eine reduzierte Aufnahme von Bikarbonat in genetisch veränderten Mäusen mit heterozygoten CFTR und damit verbunden eine Reduzierung des Bikarbonat-abhängigen cAMP-Anstiegs nach (*Xu W, 2007*).

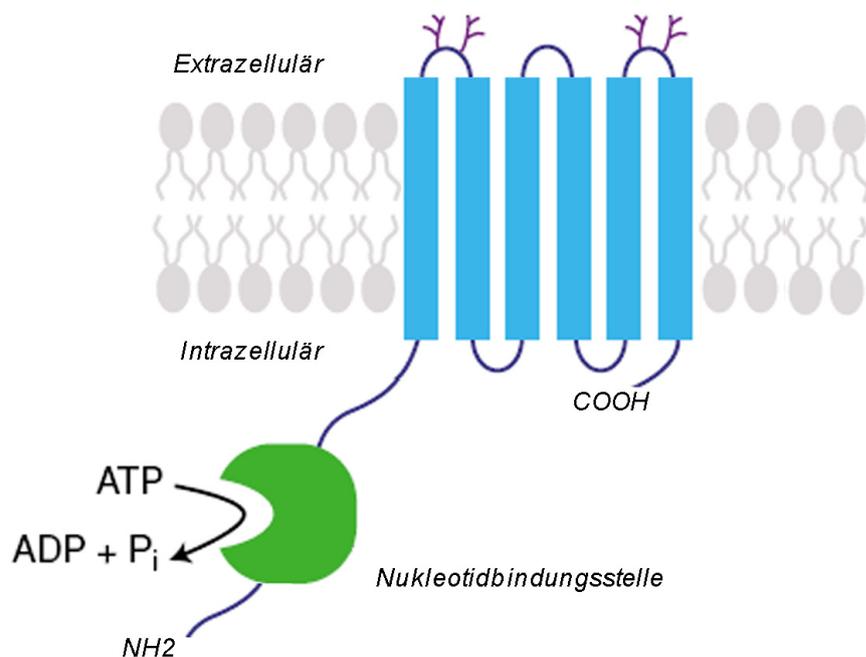
Der humane ABCG1-Transporter wird in Makrophagen stark exprimiert und ist dort am Auswärtstransport zellulären Cholesterols beteiligt (*Klucken, 2000*). Im Gegensatz zu ABCA1 benötigt ABCG1 aber keine Lipoproteine als Akzeptoren für den Transport (*Wang, 2004*). Beide Transportproteine können allerdings synergistisch am Auswärtstransport von Lipiden auf apoL1 wirken (*Gelissen, 2006*). In ABCG1<sup>-/-</sup>-Tieren kommt es zu einer massiven Ansammlung von Neutrallipiden in Makrophagen und Hepatozyten (*Cserapes, 2004; Kennedy, 2005*). Studien, die die Verteilung des ABCG1-Transporters in Zellen der Spermatogenese und Spermatozoen untersuchten, wiesen eine Lokalisation des Transporters im Hauptstück von Spermatiden und Spermatozoen nach. Eine Inhibition von ABCG1 führte in dieser Studie zu einem verminderten Cholesteroltransport aus Spermatozoen und zu einer Halbierung befruchteter kokultivierter Oozyten *in vitro* (*Morales, 2008*).

**ABCG2 (BCRP, ABCP, MXR)**

Die Identifikation des humanen ABCG2-Transporters gelang unabhängig drei verschiedenen Arbeitsgruppen. Doyle *et al.* klonen den Transporter aus einer mit Verapamil inhibierten Brustkrebs-Zelllinie, die weder ABCB1 (MDR) noch ABCC1 (MRP) überexprimierte und trotzdem das Phänomen der MDR aufwies. Der Transporter wurde deshalb von den Autoren als BCRP (breast cancer resistance protein) bezeichnet (Doyle, 1998). Etwa zeitgleich konnten Alikmets *et al.* mit Hilfe genetischer Analysen aus der humanen Plazenta die cDNA von ABCG2 isolieren (ABCP) (Alikmets, 1998). Miyake *et al.* gelang die Isolation aus Kolon-Karzinom-Zelllinien, die resistent gegen das Anthrachinon Mitoxantron waren (Miyake, 1999). Die unabhängige Isolation zeigte, dass am Phänomen der MDR nicht ausschließlich MRP (Multidrug Resistance Related Protein) und *P-Glykoprotein* beteiligt sind, sondern auch ABCG2 am Auswärtstransport von Chemotherapeutika und hydrophober Substanzen von Bedeutung ist (Sarkadi, 2004). Diese MDR ist von größter klinischer Relevanz, da die dafür verantwortlichen Transporter in der Lage sind, Chemotherapeutika aus den entarteten Zellen zu transportieren und somit die therapeutische Wirkung dieser Substanzen zu limitieren (Robey, 2007). Eine wichtige Bedeutung kommt dem Transporter deshalb in maligne entarteten Geweben im Auswärtstransport zytotoxischer Substanzen wie Mitoxantron, Doxorubicin, Daunorubicin, Topotecan und Flavopiridol zu, die in der onkologischen Therapie von Bedeutung sind (Krishnamurthy, 2006). Darüber hinaus hat der Transporter nicht nur eine Bedeutung in der Krebstherapie, sondern spielt auch eine Rolle im Auswärtstransport von Antibiotika aus Geweben. So weisen Studien dem Transporter eine Rolle im Auswärtstransport von Makroliden, Fluorochinolonen und Tetrazyklinen zu (Suzuki, 2003; Janvilisri, 2005; Ando, 2007). Der ABCG2-Transporter besitzt ein breites Substratspektrum und ist in der Lage, unter ATP-Hydrolyse sowohl positiv als auch negativ geladene Substanzen durch die Membran in den Extrazellularraum zu befördern (Nakagawa, 2002; Sarkadi, 2004).

Die folgende Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des ABCG2-Transporters.

#### Struktur von ABCG2



**Abbildung 2** Schematische Abbildung des ABCG2-Transporters mit 6 Transmembrandomänen und der Nukleotidbindungsstelle am N-Terminus. Extrazellulär dargestellt ist die Glykolyse des Transporters

Im humanen Genom findet sich das Gen für das ABCG2-Protein auf Chromosom 4q22. Es umfasst 66 Kilobasenpaare und besteht aus 16 Exons und 15 Introns (Bailey-Dell, 2001). Das Produkt dieses Gens ist 655 Aminosäuren lang und hat eine Masse von 72 kDa. ABCG2 benötigt einen Homodimerisationspartner um funktionell aktiv werden zu können (Krishnamurthy, 2006). Versuche, in denen eine inaktive Variante mit einer aktiven ko-exprimiert wurde, zeigten einen Verlust der Funktion. Neuere Studien zeigen eine mögliche Bildung eines Homo-Oligomers mit bis zu zwölf Untereinheiten (Xu J, 2007). In ABCG2-transfizierten Zelllinien ist das Protein in der Plasmamembran lokali-

siert. und besitzt drei Glykolyisationsstellen. Eine Besonderheit der ABCG-Familie, im Gegensatz zu den anderen ABC-Familien, ist die gegenläufige Orientierung der Polypeptidketten, die NBS befindet sich am N-Terminus, die TMD am C-Terminus (Scheffer, 2000; Maliepaard, 2001; Xia, 2005; Diop 2005; Pal, 2007).

Das Protein ist in vielen Geweben des Körpers nachgewiesen. Es ist in exkretorisch tätigen Geweben, in Geweben die an der Stoffaufnahme beteiligt sind und in solchen Geweben lokalisiert, die natürliche Schranken im Körper bilden. Dort ist es an der Limitierung der Aufnahme von Substanzen bzw. deren Elimination beteiligt. Deskriptive Untersuchungen wiesen Lokalisationen des Proteins in den apikalen Membranen plazentären Synzytiotrophoblastzellen, den kanalikulären Membranen der Leber, sowie im Dünndarm nach (Maliepaard, 2001; Suzuki, 2003). In Endothelzellen des Gehirns ist das Protein an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Die Expression des ABCG2-Proteins im Gehirn von ABCB1-defizienten Mäusen ist dreimal höher als in Wildtyp-Tieren, was für einen kompensatorischen Mechanismus spricht (Cisternino, 2004). Eine weitere Lokalisation findet sich in der Blut-Hoden-Schranke und im Nebenhoden (Bart, 2004; Fetsch, 2006; Enokizono, 2007; Enokizono, 2008). Im männlichen Reproduktionstrakt spielt ABCG2 aber nicht nur eine Rolle in der Blut-Hoden-Schranke und im Nebenhoden. Studien von Lassalle *et al.* wiesen ABCG2 in Zellen der Spermatogenese nach. Die Expression von ABCG2 war in den verschiedenen Differenzierungsstufen der spermatogonischen Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt. In den Zellen der späten Spermatogenese, den Spermatischen, war die Expression am höchsten. Eine Lokalisation in Spermatozoen wurde in der genannten Studie nicht untersucht (Lassalle, 2004).

ABCG2 wird ebenfalls in Stammzellen exprimiert. Für hämatopoetische Stammzellen ist bekannt, dass in einer Teilpopulation, der sogenannten sidepopulation, der Farbstoff Hoechst 33342 durch ABCG2 verstärkt aus den Zellen transportiert wird. Mittels durchflusszytometrischer Analysen ist es mög-

lich, diese Zellen aus der Gesamtpopulation zu isolieren und näher zu charakterisieren. Die Zellen dieser Teilpopulation weisen wesentliche Stammzellmarker auf (*Goodell, 1996; Goodell, 1997; Zhou, 2001; Scharenberg, 2002*).

Die Generierung von ABCG2-defizienten-Mäusen war ein wichtiger Schritt in der Untersuchung der physiologischen Funktion des Proteins (*Jonker, 2002; Zhou, 2002*). ABCG2-defiziente-Tiere sind lebensfähig und fertil, zeigen aber unter einer Chlorophyll-reichen Diät eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber phototoxischen Hautreaktionen. Diese phototoxischen Läsionen sind Resultat einer erhöhten Ansammlung von Pheophorbid, einen Abbauprodukt von Chlorophyll (*Jonker, 2002*). Unter hypoxischen Bedingungen steigt in genetisch unveränderten Tieren die Expression des Proteins und die das ABCG2-Protein exprimierenden Zellen zeigen eine erhöhte Überlebensrate durch einen verbesserten Clearance-Wert toxischer Häm-Metabolite (*Krishnamurthy, 2004*).

Neuere Untersuchungen vermuten eine Beteiligung des Proteins im Transport von Cholesterol. Es konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von ABCG2 in einer ABCG2-transfizierten Insektenzelllinie durch eine Erhöhung des membranären Cholesterolgehaltes ansteigt. Ob dieser stimulative Effekt bedeutet, dass ABCG2 Cholesterol transportiert ist bislang nicht geklärt (*Pal, 2007; Telbisz, 2007*). Da aber wie beschrieben, auch andere ABC-Transporter am Transport von Cholesterol beteiligt sind, ist auch eine Beteiligung von ABCG2 in diesem Prozess denkbar.

Der ABCG2-Transporter spielt somit eine wichtige Rolle in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen und ist sowohl in maligne entarteten als auch in normalen Geweben lokalisiert. Die genaue Rolle dieses Transporters in diesen Prozessen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In dieser Arbeit soll die Rolle von ABCG2 in reifen Spermatozoen untersucht werden, da es Hinweise auf eine Beteiligung des ABCG2-Transporters im Transport von Cholesterol gibt und Cholesterol eine essentielle Rolle in der Kapazitation von Spermatozoen zukommt.

## **2.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit soll ABCG2 in Spermatozoen nachgewiesen und überprüft werden, wo der Transporter in Spermatozoen lokalisiert ist. Desweiteren soll untersucht werden, ob der ABCG2 in Spermatozoen aktiv ist und einen Einfluss auf spezifische Spermatozoenfunktionen hat. Im Konkreten ergeben sich hieraus folgende Fragestellungen:

- 1. Kann ABCG2 in murinen Spermatozoen nachgewiesen werden?**
- 2. Inwieweit ist ABCG2 konserviert und kann auch in Spermatozoen anderer Spezies nachgewiesen werden?**
- 3. Wie ist die subzelluläre Verteilung von ABCG2 in murinen Spermatozoen?**
- 4. Ist ABCG2 in Spermatozoen funktionell aktiv?**
- 5. Ist ABCG2 an der Kapazitation muriner Spermatozoen beteiligt?**
- 6. Ist ABCG2 an der akrosomalen Reaktion muriner Spermatozoen beteiligt?**

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Allgemeine Geräte**

|                      |                                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Entwicklermaschine   | Curix 60, Agfa-Gevaert, Leverkusen                                    |
| Gellaufkammer        | XCell SureLock, Invitrogen, Karlsruhe                                 |
| Invertoskop          | Nikon TE-2000U Eclipse, Nikon GmbH, Düsseldorf                        |
| Kamera               | Nikon D1, Nikon GmbH, Düsseldorf                                      |
| Monochromator-System | Deltascan Illumination System, Photon Technology International, Wedel |
| pH-Meter             | Inolab, WTW, Weilheim                                                 |
| Photomultiplier      | PTI D104 Photon Technology International, London, Wedel               |
| Scanner              | Vilber Lourmat, Eberhardzell                                          |
| Zentrifuge           | IEC Micromax RF 3593F, Thermo Scientific, Bonn                        |

##### **3.1.2 PC-Software**

|                          |                                          |
|--------------------------|------------------------------------------|
| Fotobearbeitungsprogramm | Adobe Photoshop CS2, Adobe Systems       |
| PTI-Programm             | PTI, Felix                               |
| Statistik                | SPSS, Version 15.0                       |
| Tabellenkalkulation      | Microsoft Excel, Microsoft, Version 2007 |
| Textverarbeitung         | Microsoft Word, Microsoft, Version 2007  |

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Die von den Standard-Labormaterialien abweichenden Materialien und Puffer sind in Tabelle 1 dargestellt: SIGMA, Taufkirchen, MERCK, Darmstadt, GIBCO, Karlsruhe, ROTH, Karlsruhe, AMERSHAM, Piscataway, NJ, USA, GE HEALTHCARE, München, PAA LABORATORIES, Cölbe, SANTA CRUZ, Santa Cruz, CA, USA, ACRIS ANTIBODIES, Hiddenhausen, SERVA, Heidelberg, INVITROGEN, Karlsruhe, UPSTATE, Lake Placid, NY, USA, E. CHRISTIANSEN, Planegg, VECTOR LABS, Burlingame, CA, USA

**Tabelle 1** *Verwendete Materialien mit Herstellerfirmen*

| <b>Materialien</b>                     | <b>Herstellerfirmen</b> | <b>Bestellnummern</b> |
|----------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| (4-Bromo-) Calcium Ionophore A23187    | SIGMA                   | B-7272                |
| Albumin fraction V                     | MERCK                   | 11201802              |
| Antibiotic/Antimycotic                 | GIBCO                   | 15240-062             |
| Brilliant Blue G                       | SIGMA                   | B-8772                |
| Chlortetracycline                      | FLUKA                   | 26430                 |
| DAPI                                   | ROTH                    | 6335.1                |
| Dimethylsulfoxid                       | SIGMA                   | D-2650                |
| DMEM-Zellkulturmedium                  | GIBCO                   | 41966                 |
| Donkey anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert | AMERSHAM                | NA934VS               |
| ECL-Reagenz                            | GE HEALTHCARE           | RPN2109               |
| Ethidium bromide solution              | SIGMA                   | E-1510                |
| Foetales Rinder Serum                  | PAA LABORATORIES        | A14-151               |

|                                      |                  |           |
|--------------------------------------|------------------|-----------|
| Goat anti-mouse IgG, HRP-konjugiert  | SANTA CRUZ       | SC-2005   |
| Goat anti-rabbit IgG, Cy3-konjugiert | ACRIS ANTIBODIES | R1458C3   |
| HEPES                                | SERVA            | 25245     |
| Hoechst 33342                        | SIGMA            | B-2261    |
| L-Cystein                            | ROTH             | 3467.1    |
| Mouse anti-Phosphotyrosine IgG, 4G10 | UPSTATE          | 05-321    |
| Natriumazid                          | SIGMA            | S-8032    |
| Nitrocellulose Membrane 0.45µm Pore  | INVITROGEN       | LC2001    |
| NuPAGE Antioxidant                   | INVITROGEN       | NP0005    |
| NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 12 wells   | INVITROGEN       | NP0322    |
| NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)        | INVITROGEN       | NP0007    |
| NuPAGE MOPS Running Buffer           | INVITROGEN       | NP0001    |
| NuPAGE Sample reducing Agent (10X)   | INVITROGEN       | NP0004    |
| Paraformaldehyd                      | MERCK            | 4005      |
| Ponceau S                            | SIGMA            | P-7170    |
| PSA FITC-konjugiert                  | SIGMA            | L0770-2MG |
| Röntgen-Entwickler                   | E. CHRISTIANSEN  | ADE38     |
| Röntgen-Fixier                       | E. CHRISTIANSEN  | ADF38     |
| Roti-Block (10x)                     | ROTH             | A151.2    |
| SeeBlue Plus2 Prestained Standard    | INVITROGEN       | LC5925    |
| SIGMAFAST Protease Inhibitor         | SIGMA            | S-8820    |
| Vectashield Antifade                 | VECTOR LABS      | H-1400    |

### 3.1.4 Verwendete Puffer

In der Arbeit entspricht der HS-Puffer Bedingungen, in denen Spermatozoen nicht kapazitieren und der HSB-Puffer Bedingungen, die eine Kapazitation und eine akrosomale Reaktion begünstigen (HS-Puffer + 15 mM Natriumbicarbonat und 5 mg/ml BSA).

PBS Stammlösung (10x):

|        |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------|
| 80 g   | NaCl (58,44 g/mol)                              |
| 2 g    | KCl (74,55 g/mol)                               |
| 14,4 g | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (137,99 g/mol) |
| 2,4 g  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,09 g/mol)  |

auf 1L auffüllen mit Aqua bidest. und  
mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen

HS-Puffer Lösung (2x) A:

|         |                                     |
|---------|-------------------------------------|
| 15,77 g | NaCl (58,44 g/mol)                  |
| 0,74 g  | KCl (74,55 g/mol)                   |
| 1 ml    | 2M MgSO <sub>4</sub> (120,37 g/mol) |
| 2 ml    | 2M CaCl <sub>2</sub> (147,02 g/mol) |

auf 1L auffüllen mit Aqua bidest.

HS-Puffer Gebrauchslösung:

|         |                        |
|---------|------------------------|
| 100 ml  | Stammlösung A          |
| 0,312 g | Glukose (180,16 g/mol) |
| 4 ml    | 1M Hepes (238,3 g/mol) |
| 0,5 ml  | Laktat (90,1 g/mol)    |
| 0,022 g | Pyruvat (110 g/mol)    |

auf 200 ml auffüllen mit Aqua bidest.  
und mit 1 M NaOH auf pH 7.4 einstellen

HSB-Puffer:

5 ml HS-Puffer Gebrauchslösung  
0,0063 g NaHCO<sub>3</sub> (84,01 g/mol)  
0,025 g Bovines Serum Albumin

Homogenisierungspuffer:

85,57 g Saccharose (342,30 g/mol)  
4,76 g MgCl (95,21 g/mol)  
29,22 g EDTA (292,25 g/mol)  
10,47 g MOPS (209,3 g/mol)  
mit 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen und  
mit Proteaseinhibitor Sigma Fast  
versetzen (1 Tablette pro 50 ml Puffer)

Laufpuffer für die

35 ml NuPAGE Lauf-Puffer

Gelelektrophorese:

665 ml Aqua bidest. Daraus 200 ml  
mit 500 µl NuPAGE Antioxidant für die  
innere Gelkammer

Blotting-Puffer:

20 ml NuPAGE Transfer-Puffer  
40 ml Methanol  
340 ml Aqua bidest.  
500 µl NuPAGE Antioxidant

---

|                           |                                          |                         |
|---------------------------|------------------------------------------|-------------------------|
| <u>Blocking-Puffer A:</u> | 250 ml                                   | Aqua bidest.            |
|                           | 12,5 g                                   | Bovines Serum Albumin   |
|                           | 250 µl                                   | Tween20                 |
|                           | 50 µg                                    | NaN <sub>3</sub>        |
| <br>                      |                                          |                         |
| <u>Blocking-Puffer B:</u> | 10 %                                     | Roti-Block in PBS       |
| <br>                      |                                          |                         |
| <u>Waschpuffer:</u>       | 1 l                                      | Aqua bidest.            |
|                           | 1 ml                                     | Tween 20 (122,72 g/mol) |
| <br>                      |                                          |                         |
| <u>CTC-Puffer:</u>        | 0,24 g                                   | Tris (121,14 g/mol)     |
|                           | 0,76 g                                   | NaCl (58,44 g/mol)      |
|                           | in 100 ml Aqua bidest.                   |                         |
| <br>                      |                                          |                         |
| <u>CTC-Färbelösung:</u>   | 0.002 g                                  | CTC (478,8 g/mol)       |
|                           | 0.0044 g                                 | Cystein (121,16 g/mol)  |
|                           | in 5 ml CTC-Puffer, mit HCl oder         |                         |
|                           | auf pH 7,8 einstellen und lichtgeschützt |                         |
|                           | aufbewahren                              |                         |
| <br>                      |                                          |                         |
| <u>CTC-Fixativ:</u>       | 12,5% Paraformaldehyd in 0,5 mM Tris     |                         |
|                           | mit HCl oder NaOH auf pH 7,4 einstellen  |                         |

### 3.1.5 Verwendete Antikörper

#### Primäre Antikörper:

- Anti-Abcg2-87405, Kaninchen, polyklonal, National Institutes of Health in Bethesda, MD, USA
- Anti-Phosphotyrosin, Klon 4G10, Maus, monoklonal, Upstate, Lake Placid, USA

Der benutzte polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen, Anti-ABCG2-87405 (14. Blutung), ist gegen ein intrazelluläres Epitop nahe des N-Terminus des Proteins gerichtet und wurde von der Arbeitsgruppe Bates von den NIH zur Verfügung gestellt.

#### Sekundäre Antikörper:

- Anti-Kaninchen, HRP-konjugierter Antikörper, Esel, Amersham Biosciences, Freiburg
- Anti-Maus, HRP-konjugierter Antikörper, Ziege, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- Anti-Kaninchen, Cy3-konjugierter Antikörper, Ziege, Acris Antibodies, Hiddenhausen

### 3.1.6 ABCG2-Inhibitor

Der in dieser Arbeit verwendete spezifische ABCG2-Inhibitor Fumitremorgin C (FTC) wurde von der Arbeitsgruppe Bates der National Institutes of Health in Bethesda, USA zur Verfügung gestellt (Thomas McCloud, Developmental Therapeutics Program, Natural Products Extraction Laboratory, National Institutes of Health (Bethesda, MD)). Dieses Mykotoxin wird aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus* gewonnen und inhibiert selektiv das ABCG2-Protein (Rabindran, 1998; Robey 2007). Fumitremorgin C wurde in DMSO gelöst und in den Versuchen in einer Konzentration von 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M eingesetzt.

### **3.1.7 Versuchsmaterial**

NMRI-Mäuse (retired breeders) wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Frische Rattenhoden wurden von der Arbeitsgruppe Steiniger, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg zur Verfügung gestellt.

Hoden und Nebenhoden von Bullen wurden frisch entnommen (Schlachthof Marburg GmbH, Marburg) und bis zur Präparation der Spermatozoen auf Eis gelagert.

Menschliche Spermatozoen wurden von gesunden Spendern, nach mindestens zweitägiger Karenz, mittels Masturbation gewonnen.

Die transfizierten HEK-293-Zellen wurden von den National Institutes of Health in Bethesda, USA zur Verfügung gestellt.

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Übersicht

**Tabelle 2 Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Methoden**

| <b>Ziel</b>                                                              | <b>Durchgeführte Methode</b>                                  |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1. Nachweis von ABCG2 in murinen Spermatozoen                            | <b>Western-Blot mit Anti-ABCG2</b>                            |
| 2. Nachweis von ABCG2 in Spermatozoen von Ratte, Bulle und Mensch        | <b>Western-Blot mit Anti-ABCG2</b>                            |
| 3. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von ABCG2 in Spermatozoen | <b>Immunzytochemie mit Anti-ABCG2</b>                         |
| 4. Untersuchung der Aktivität von ABCG2 in Spermatozoen                  | <b>Transportversuche mit Hoechst 33342 und Ethidiumbromid</b> |
| 5. Untersuchung des Einflusses von ABCG2 auf die Kapazitation            | <b>Western-Blot mit Anti Phosphotyrosin<br/>CTC-Färbung</b>   |
| 6. Untersuchung des Einflusses von ABCG2 auf die akrosomale Reaktion     | <b>CTC-Färbung<br/>PSA-Färbung</b>                            |

### 3.2.2 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden HEK-293-Zellen als Positiv- bzw. Negativkontrollzellen für den Nachweis und die funktionellen Untersuchungen von ABCG2 kultiviert. Hierzu wurden HEK-Zellen im NIH, Bethesda, MD, USA mit dem Vektor ABCG2-482R bzw. mit einem Leervektor transfiziert. Positivtransfizierte Zellen werden in dieser Arbeit als 293-R5, negativtransfizierte HEK-Zellen mit 293-PC bezeichnet. HEK-Zellen wurden erstmals aus humanen embryonalen Nieren isoliert und wachsen adhärent (*Schein, 1962*). Die HEK-Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Die Kultivierung der HEK-Zellen erfolgte in DMEM-Medium mit Glukose, nicht essentiellen Aminosäuren und Pyruvat, 10% fetalem Kälberserum, 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B. Um die Zellen zu Passagieren wurde das Medium verworfen und die Zellen mit PBS gespült. Im Weiteren wurden die Zellen mit Trypsin überschichtet und auf einer Wärmeplatte für 2 min bei 37°C inkubiert. Nach der vollständigen Ablösung der Zellen wurden 10 ml Medium hinzugefügt und die Zellsuspension wurde in 50 ml Gefäße überführt und bei 500 x g 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 auf Zellkulturflaschen verteilt.

### 3.2.3 Nebenhodenpräparation und Spermatozoengewinnung

Die nachgewiesenen fertilen NMRI-Mäuse-Böcke (*retired breeders*) wurden durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Die Euthanasierung der Tiere wurde entsprechend der Tierschutzbestimmungen der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die Nebenhoden wurden freipräpariert und der *Ductus deferens* möglichst proximal abgesetzt. Nach drei manuellen Waschschritten in HS-Puffer wurden die Nebenhoden in 1 ml bikarbonathaltigem HSB-Puffer transferiert und der *Ductus deferens* zur Gewinnung der Spermatozoen der Länge nach mit einer Pinzette ausgestrichen.

Mittels drei bis fünf kleiner Inzisionen wurde der Schwanz des Nebenhodens eröffnet und den Spermatozoen die Möglichkeit gegeben aus dem Nebenhodengang auszuschwimmen. Der „swim-out“ wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 15 min vollzogen. Nach dreimaligem Waschen in HS-Puffer, bei 300 x g für 5 min, zur Entfernung des Bikarbonates und dem „Poolen“ der Zellen wurden diese für die verschiedenen Versuchsansätze weiterverwendet. Die Gewinnung der Rattenspermatozoen erfolgte durch das gleiche Protokoll, mit der Ausnahme, dass 10 ml Puffer verwendet wurden.

Zur Gewinnung boviner Spermatozoen wurde der Nebenhoden vom Hoden getrennt, der Schwanz des Nebenhodens durch mehrere Inzisionen eröffnet und die Spermatozoen in HS-Puffer ausgeschwenkt. Nach Aufnahme in 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min im Pellet gesammelt und für die weiteren Versuche verwendet.

Zur Gewinnung humaner Spermatozoen wurde frisches Ejakulat in 50 ml Röhrchen gesammelt. Zur Separation der motilen und immotilen Spermatozoenpopulationen wurde die „swim-up-Methode“ verwendet (*Mahadevan, 1984*). Dazu wurde das verflüssigte Ejakulat mit 4 ml HS-Puffer verdünnt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet vorsichtig mit 1 ml des HSB-Puffers überschichtet und in einem 15 ml Gefäß, bei einer Neigung von 45° eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Bei dieser Methode schwimmen die motilen und morphologisch gesunden Spermatozoen in das bikarbonathaltige Medium, während die immotilen Spermatozoen und Leukozyten am Boden des Gefäßes verbleiben. Der nun spermatozoenhaltige Puffer wurde vorsichtig abpipettiert, 3 x für 5 min bei 300 x g in HS-Puffer gewaschen und zur Proteingewinnung weiterverwendet.

### 3.2.4 Proteinaufbereitung

Die als Positiv- und Negativkontrolle verwendeten Zellen wurden zur Proteingewinnung, nach dem unter 3.2.2 beschriebenen Protokoll, enzymatisch mit Trypsin von ihrer Unterlage gelöst und nach Aufnahme in 2 ml PBS für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Homogenisationspuffer mit Proteinaseinhibitor aufgenommen, mit einem Potter mechanisch aufgeschlossen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Proben-Puffer im Verhältnis 1:4 wurde die Suspension 5 min bei 100°C gekocht, für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren. Vor der Beladung der Gele wurden die Extrakte im Verhältnis 1:10 mit Reducing-Agent versetzt und 5 min bei 100°C gekocht. Zur Proteingewinnung der Spermatozoen wurden die Zellen nach jeweiliger Inkubation in verschiedenen Medien 3 x 5 min bei 300 x g gewaschen und für 5 min bei 1000 x g in einem Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Nach zehninütiger Inkubation auf Eis und gelegentlichem Mischen wurde der Probe eine entsprechende Menge Probenpuffer im Verhältnis 1:4 zugesetzt und 5 min bei 100°C gekocht. Zur Sedimentation der nukleären Anteile wurde die Probe anschließend für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Zur Reduzierung der Proben wurde der Überstand 1:10 mit Reducing-Agent versetzt und vor der Beladung des Gels 5 min bei 100°C erhitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das NuPage-System der Fa. Invitrogen verwendet. Sowohl die Gelelektrophorese als auch der sich anschließende Western-Blot wurden nach Herstellerangaben in einer modifizierten Version nach Laemmli durchgeführt (*Laemmli, 1970*).

### 3.2.5 SDS-PAGE und Western Blot

Zum Nachweis von ABCG2 diente in dieser Arbeit die Western-Blot Methode, da mit dieser das Protein mittels eines spezifischen, gegen ein Epitop gerichteten, Antikörpers detektiert werden kann (*Laemmli, 1970*). Die Darstellung der Protein-Tyrosinphosphorylierung in murinen Spermatozoen erfolgte ebenfalls durch die Western-Blot Methode. Der verwendete Antikörper bindet spezifisch an phosphorylierte Tyrosinresten in den Proteinen der Spermatozoen. Eine Markierung von Phosphorylierungen in Höhe zwischen 40 kDa und 120 kDa gilt als Nachweis der Kapazitation (*Visconti, 1995a; Litman, 2002*).

Beim Western Blot werden Proteine, die zuvor in Abhängigkeit von ihren Molekulargewichten gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, mittels spezifischer Antikörper dargestellt. Um die Ladungen der Proteine im Gemisch zu relativieren, wird der Probe während der Auftrennung das anionische Detergenz SDS (*sodium dodecylsulfate*) hinzugefügt, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und sie eine konstante Ladungsverteilung innerhalb des Moleküls aufweisen. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Proteine sich ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld verteilen. Die Konservierung der aufgetrennten Proteine erfolgt daran anschließend durch einen Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen, auf denen die Proteine mittels Antikörpern markiert und so anschließend detektiert werden können (*Laemmli, 1970; Towbin, 1979*).

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in der vorliegenden Untersuchung auf 4–12% Bis-Tris-Gelen in einem entsprechend der Herstellerangaben bereiteten MOPS-Lauf-Puffer im X-Cell Sure-Lock-System der Fa. Invitrogen. Die Laufzeit der Gele betrug 50 min bei 200 V und 120 mA. Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte auf Nitrozellulosemembranen in einem methanolhaltigen Blotting-Puffer mit zugesetztem Antioxidans bei 25 V und 160 mA für 60 min. Zur Überprüfung des Transfers wurden das Gel mit Brilliant-Blue (Coomassie-Blau) und die Membran mit Ponceau-Rot angefärbt. Die Membran wurde für 30 min getrocknet und zur Blockierung

unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Für den Nachweis von ABCG2 wurde die Membran 1 Stunde in Blocking-Puffer, im Falle der Bestimmung der Proteintyrosinphosphorylierung mit Roti-Block 10% in PBS inkubiert. Die Inkubation des Erstantikörpers für 1 Stunde wurde im Falle des Nachweises von ABCG2 in Spermatozoen mit dem Anti-ABCG2-Antikörper in einer Verdünnung von 1: 2000, im Falle der Determination der Proteintyrosinphosphorylierung in einer Verdünnung von 1: 1000 unter leichtem Schütteln durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde inkubiert. Anti-Kaninchen wurde in einer Verdünnung von 1: 10000, Anti-Maus in einer Verdünnung von 1: 2000 in Tween-haltigem Waschpuffer verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen in Waschpuffer für jeweils 5 min wurden 2 ml ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*) auf die Membran gegeben. Das ECL-Reagenz reagiert in diesem Verfahren mit dem an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzym HRP. Bei dieser Reaktion werden Lichtquanten frei, die den Film belichten. Nach 1 min Inkubation mit dem ECL-Reagenz wurde der Röntgenfilm 10 Sek. belichtet und automatisch in einer Entwicklermaschine der Firma Agfa-Gevaert entwickelt.

### 3.2.6 Immunzytochemie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation des ABCG2-Transporters wurde in dieser Arbeit eine Immunfluoreszenzuntersuchung an Spermatozoenausstrichen verwendet. Desweiteren wurde überprüft, ob die Immunfluoreszenz nach Auslösung der akrosomalen Reaktion durch das Kalzium-Ionophor A23187 verschwindet.

Die akrosomale Reaktion kann *in vitro* durch das Kalzium-Ionophor A23187 ausgelöst werden. Es wurde in der vorliegenden Untersuchung in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für 15 min eingesetzt.

Das Kalzium-Ionophor induziert in Spermatozoen einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Porenbildung in der Membran. Dieser Anstieg des intrazellulären Kalziums führt in kapazitierten Spermatozoen zur Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran und schließlich zur exozytotischen Ausschüttung des akrosomalen Inhaltes (*Shams-Borhan, 1981; Fraser, 1995*).

Im Versuchsaufbau wurden 20  $\mu\text{l}$  Spermatozoensuspension auf gereinigte Objektträger pipettiert und bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Ausstriche bei 4°C für 1 min in Aceton fixiert. Alle weiteren Schritte wurden in einer dunklen, feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach jeder Inkubation wurden die Proben 3 x 5 min in PBS gewaschen. Die Proben wurden in Schweineserum in PBS in einer Konzentration von 1:500 für 1 Stunde geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-ABCG2 erfolgte in einer Konzentration von 1:1000 für 1 Stunde. Darauf folgte eine Inkubation mit einem Cy3-konjugierten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:50 für 1 Stunde. Die Kernfärbung mit dem Farbstoff DAPI wurde darauf folgend für zehn min in einer Konzentration von 1:1000 durchgeführt. Die Anregung von DAPI erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda_A = 358 \text{ nm}$ , die Emission wurde bei  $\lambda_E = 461 \text{ nm}$  erfasst. Die Anregung von Cy3 erfolgte bei  $\lambda_A = 550 \text{ nm}$ , die Emission wurde zwischen  $\lambda_E = 610\text{-}675 \text{ nm}$  detektiert. Die Untersuchung der Proben wurde mit einem Nikon TE-2000U Eclipse Invertoskop durchgeführt und mit einer Nikon D1 Kamera aufgezeichnet.

### 3.2.7 Transportversuche an bovinen Spermatozoen

Zur Überprüfung der Aktivität von ABCG2 in reifen Spermatozoen wurde anhand von Transportversuchen überprüft ob ABCG2 in Spermatozoen in der Lage ist, die bekannten ABCG2-Substrate Hoechst 33342 und Ethidiumbromid aus den Spermatozoen zu transportieren (*Janvilisri, 2003*).

Hierzu wurden die Spermatozoen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$ /ml in HSB-Puffer ohne BSA verdünnt. Die folgenden Schritte wurden bei  $37^\circ\text{C}$  ausgeführt. Die Beladung der Zellen erfolgte in 2 ml Spermatozoensuspension, im Falle von Hoechst 33342 in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$ , im Falle von Ethidiumbromid in einer Konzentration von  $2 \mu\text{M}$ . Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen in HS-Puffer gewaschen, 3 x bei  $300 \times g$  für 3 min zentrifugiert und in 2 ml HSB-Puffer ohne BSA resuspendiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in Küvetten mit einem Photometrie-Setup. Hierbei wird der Farbstoff durch monochromatisches Licht angeregt. Die Emissionsspektren des angeregten Farbstoffs werden anschließend mit einem Photomultiplier aufgenommen und quantifiziert. Damit lassen sich Aussagen über die Menge der intrazellulären Farbstoffe und damit über die aus den Zellen transportierten Farbstoffmengen in den Spermatozoen treffen. Die Messung der Fluoreszenz wurde bei Ethidiumbromid nach Hintergrundkorrektur bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von  $\lambda_A=500 \text{ nm}$  und  $\lambda_E=580 \text{ nm}$  aufgezeichnet. Hoechst 33342 wurde bei  $\lambda_A=360 \text{ nm}$ , bzw.  $\lambda_E=450 \text{ nm}$  erfasst. Der spezifische ABCG2-Inhibitor Fumitremorgin C wurde den Proben 1 min vor der Messung in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  hinzugegeben und die intrazelluläre Fluoreszenz der zugesetzten Farbstoffe zu verschiedenen Zeitpunkten bis 15 min gemessen und aufgezeichnet.

### 3.2.8 Chlortetrazyklinmethode

Um den Einfluss des ABCG2-Transporters auf die Fertilisation zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Färbemethoden angewandt (Chlortetrazyklin-Färbung, PSA-Färbung). Zur Differenzierung des Zustandes der Spermatozoen (unkapazitiert, kapazitiert und akrosomal reagiert) wurde nach Inkubation in verschiedenen Medien die Chlortetrazyklin-Färbung (CTC-Färbung) verwendet.

Grundlage dieser Methode ist das fluoreszierende Chlortetrazyklin (CTC), das als Chelator bivalente Kationen und damit auch Kalzium bindet. Wenn CTC freies Kalzium in Membranen bindet, steigt die Emission der Fluoreszenz. Daraus ergibt sich in Spermatozoen ein charakteristisches Fluoreszenzmuster in Abhängigkeit von dem Status der Kapazitation bzw. der akrosomalen Reaktion (*Sailing, 1979; DasGupta, 1993*). So zeigen unkapazitierte Spermatozoen in Anwesenheit von CTC und Kalzium eine Fluoreszenz des gesamten Kopfes sowie des Mittelstückes. Kapazitierte Spermatozoen weisen eine Fluoreszenz des vorderen Spermatozonenkopfes und des Mittelstückes auf, während die postakrosomale Region ungefärbt bleibt. Akrosomal reagierte Spermatozoen zeigen als Folge des Verlustes des akrosomalen Inhaltes lediglich eine Fluoreszenz des Mittelstückes. In dieser Färbung entspricht das Färbemuster „F“ unkapazitierten, „B“ kapazitierten und „AR“ akrosomal reagierten Spermatozoen (Abbildung 10).

Im Versuchsaufbau wurden die murinen Spermatozoen aus dem Nebenhodenschwanz präpariert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation in verschiedenen Medien gefärbt. Hierzu wurden 80 µl der Spermatozoensuspension nach entsprechender Inkubationszeit mit 8 µl des CTC-Fixatives gemischt und 80 µl der Färbelösung hinzugefügt. Die Färbelösung wurde kühl und dunkel aufbewahrt. Nach kurzer Inkubation wurden 10 µl der Suspension auf gereinigte Objektträger gegeben und mit einem Tropfen Vectashield der Fa. Vector Labs gemischt. Dieses Reagenz bewirkt ein langsames Ausbleichen der gefärbten Proben. Zur besseren Auszählung der

Spermatozoen wurden die Objektträger nach Applikation eines Deckgläschens mehrmals zwischen zwei Fingern ausgepresst. Das Kalzium-Ionophor wurde den Proben jeweils 15 min vor der Auswertung in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zugesetzt und unter leichtem Schütteln vermischt. Den Proben, die kein Kalzium-Ionophor erhielten, wurde eine entsprechende Menge DMSO hinzugefügt. Die Auszählung erfolgte unmittelbar nach der Färbung unter einem Invertoskop unter Anregung mit violetterem Licht ( $\lambda_A=405$  nm Bandpass) bei einer Emission von  $\lambda_E=455$  nm und einer Vergrößerung von 10 x 60 (Öl-immersion). Von jeder Probe wurden 100 Zellen ausgezählt und von einer zweiten Person überprüft. Zur Verblindung wurden die Objektträger von einer dritten Person chiffriert beschriftet.

#### **3.2.9 PSA-Färbung**

Das verwendete Lektin (*Pisum sativum*) bindet spezifisch an den Inhalt des Säugersakrosoms (Cross, 1986). Dieses Lektin kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (fluorescein-5-isothiocyanate-protein conjugate) konjugiert werden und lässt so an permeabilisierten und fixierten Spermatozoen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Aussage über den Status des Akrosoms zu. Ist das Akrosom intakt, zeigen die Spermatozoen eine deutliche Fluoreszenz im Kopfbereich und im Mittelstück, während akrosomal reagierte Spermatozoen lediglich eine Fluoreszenz des Mittelstücks aufweisen. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte bei  $\lambda_A=495$  nm, die Emission bei  $\lambda_E=520$  nm. In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll nach Cummins verwendet, das lediglich zwischen diesen beiden beschriebenen Formen differenziert (Cummins, 1991). Das PSA wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml als Stammlösung in Aqua bidest. hergestellt und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Nach verschiedenen Inkubationszeiten und Bedingungen wurden die Zellen nach 3 Waschschritten mit HS-Puffer für 5 min bei 300 x g im Pellet gesammelt, mit 100 µl -18°C kaltem Ethanol resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden 20 µl der Suspension auf gereinigte Objektträger pipettiert und bei Raumtemperatur bis zur völligen Verdunstung des Ethanols inkubiert. Im Anschluss daran wurden 20 µl der PSA-Lösung auf die eingetrockneten Zellen gegeben und für 10 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert, das überschüssige PSA mit Aqua bidest. abgewaschen und die Zellen unmittelbar ausgezählt. Zur Auslösung der akrosomalen Reaktion wurde ebenfalls das Kalzium-Ionophor A23187 in einer Konzentration von 5 µM verwendet und den Proben 15 min vor der Auswertung hinzugefügt. Von jeder Probe wurden 100 Zellen ausgezählt und von einer zweiten Person überprüft. Zur Verblindung wurden die Objektträger von einer dritten Person chiffriert beschriftet.

### **3.2.10 Statistik**

Zur statistischen Analyse der Signifikanz des Unterschiedes bei inhibierten und nicht-inhibierten Bedingungen diente ein t-Test für unabhängige Stichproben. Beim t-Test wird die Differenz der Mittelwerte auf den Standardfehler normiert. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,01$  gewählt.

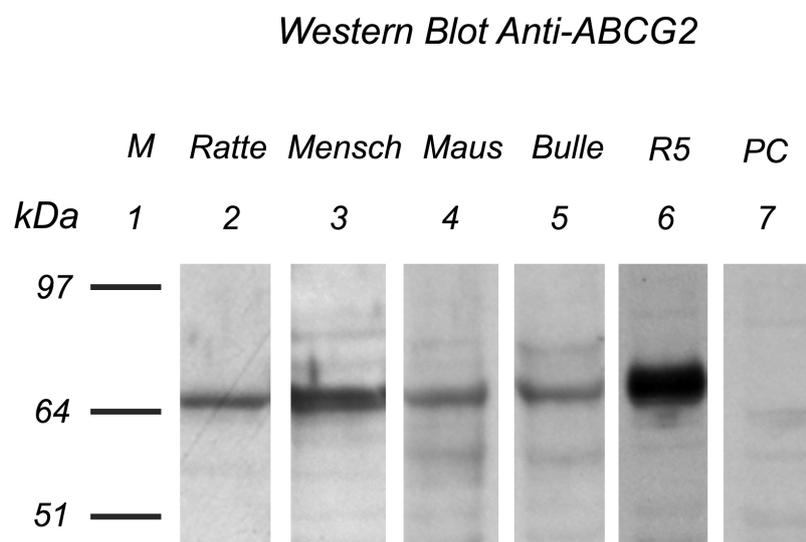
Der t-Test für unabhängige Stichproben testet, ob zwei Gruppen sich im Mittel anhand von einer Variablen statistisch unterscheiden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunologischer Nachweis des ABCG2-Proteins in Spermatozoen verschiedener Spezies

#### 4.1.1 Western Blot

Mit dem in Abbildung 3 dargestellten Western Blot konnte der Nachweis des ABCG2-Proteins in Spermatozoen verschiedener Spezies erbracht werden.

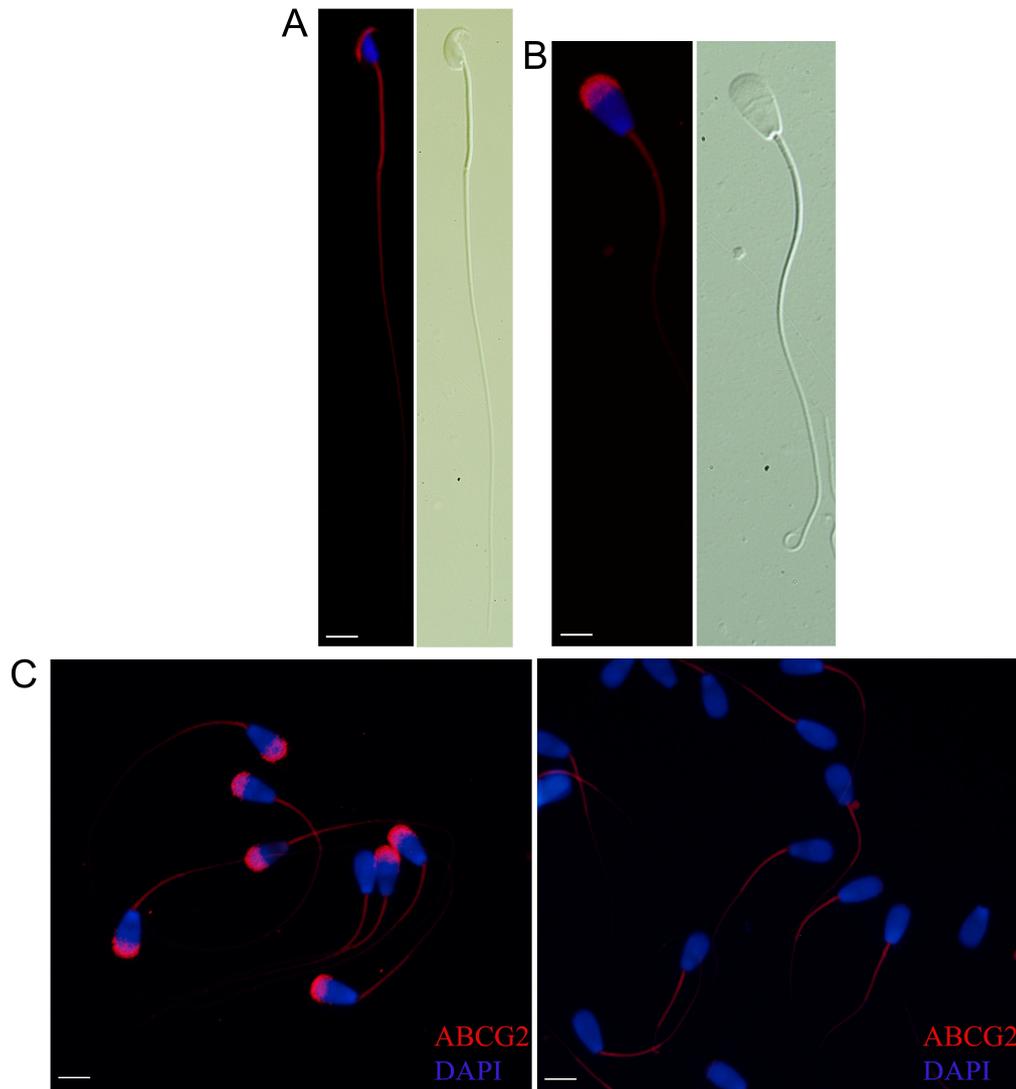


**Abbildung 3** *Western-Blot zum Nachweis von ABCG2 in Spermatozoen verschiedener Spezies.* Verwendet wurden Anti-ABCG2 unter reduzierenden Bedingungen in einer Verdünnung von 1:2000 als Erstantikörper und ein ECL-konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 als Sekundärantikörper. Es ist in den Spuren 2-6, eine deutliche Immunreaktion in Höhe des dem ABCG2-Transporter entsprechenden Molekulargewichtes von 72 kDa zu erkennen. Spur 2-5 entspricht Spermatozoen von Ratte, Mensch, Maus und Bulle. Spur 6 zeigt die Positivkontrolle (293-ABCG2). In Spur 7 hingegen bleibt die Immunreaktion in der Negativkontrolle (293-PC) aus. Spur 1 zeigt den Molekulargewichtsmarker. ABCG2 ist in Spermatozoen verschiedener Spezies nachweisbar.

Der polyklonale Antikörper Anti-ABCG2 markierte in den Zellextrakten der als 293-R5 bezeichneten, das ABCG2-Protein überexprimierenden Positivkontrolle eine Bande in der Höhe von 72 kDa. Dies entspricht dem Molekulargewicht des ABCG2-Proteins. Im Gegensatz dazu kam es in der mit dem Leervektor transfizierten Negativkontrolle (293-PC) entsprechenden Spur zu keiner spezifischen Immunreaktion. In den Extrakten der Spermatozoen der gezeigten Spezies war eine deutliche Immunreaktion in Höhe von 72 kDa zu erkennen. In Vorversuchen stellte sich eine Verdünnung des Primärantikörperantikörpers von 1: 2000 bei einer Inkubationszeit von 60 min als optimal dar, während der HRP-konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1: 10000 für 60 min verwendet wurde. Die Laufzeit der Gele betrug 50 min.

#### **4.1.2 Immunzytochemie**

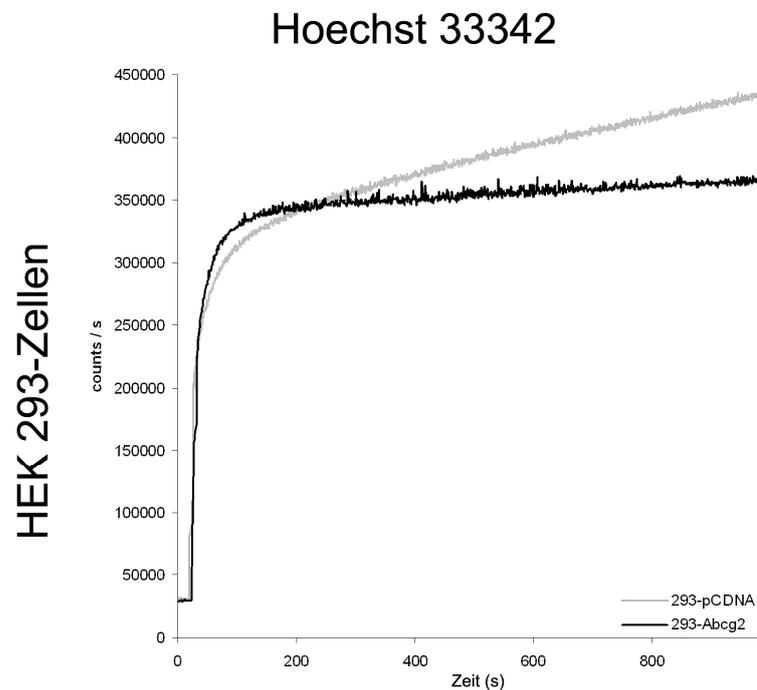
Zur Bestimmung der subzellulären Verteilung von ABCG2 in Spermatozoen wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenzuntersuchungen mit dem spezifischen ABCG2-Antikörper und dem Kernfarbstoff DAPI an murinen und bovinen Spermatozoen verwendet. Abbildung 4 zeigt die subzelluläre Lokalisation des ABCG2-Transporters in unkapazitierten Spermatozoen von Maus und Bulle, sowie das Verschwinden der Immunreaktion nach der Auslösung der akrosomalen Reaktion. Die spezifische Immunreaktion von ABCG2 ist in rot, die Kernfärbung in blau zu beobachten. Die benachbarten DIC-Bilder zeigen die entsprechenden Spermatozoen. Es ist in unkapazitierten Spermatozoen vorwiegend in der akrosomalen Region eine Immunreaktion zu beobachten, während im Schwanzstück eine schwächere Färbung zu erkennen ist. Nach Auslösung der akrosomalen Reaktion mit dem Kalzium-Ionophor A23187 verschwindet die Immunreaktion im Bereich der akrosomalen Kappe, während die Fluoreszenz im Schwanzstück erhalten bleibt.



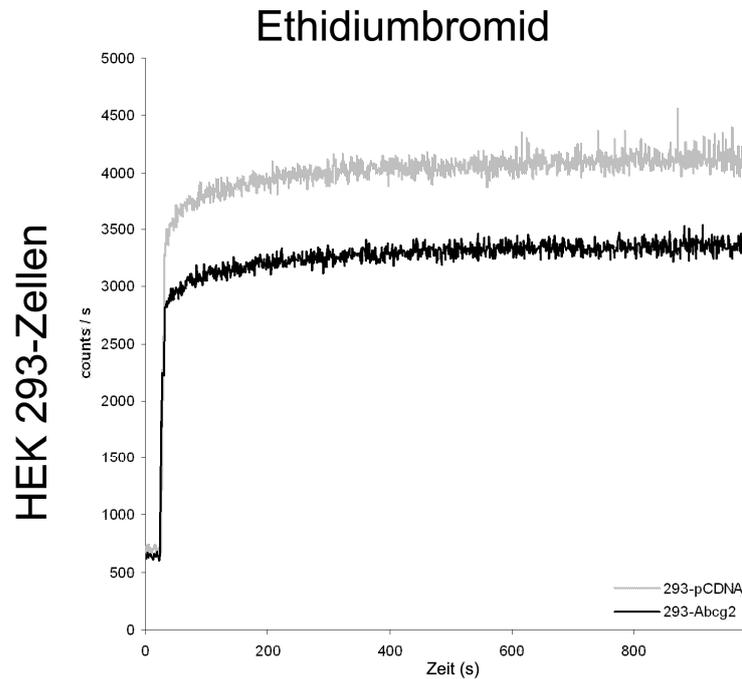
**Abbildung 4 Lokalisation von ABCG2 in Spermatozoen von Maus und Bulle.** Unkapazitierte Spermatozoen wurden mit Anti-ABCG2 (rot) und dem Kernfarbstoff DAPI (blau) gefärbt. **(A)** In epididymalen Spermatozoen der Maus ist ABCG2 in der akrosomalen Region und im Schwanzstück lokalisiert. **(B)** Die gleiche Lokalisation findet sich in bovinen Spermatozoen. Die DIC-Bilder zeigen die entsprechenden Spermatozoen. **(C-links)** Kapazitierte bovine Spermatozoen wurden wie in A und B mit Cy3-konjugiertem Anti-ABCG2 (rot) und DAPI (blau) gefärbt. **(C-rechts)** Nach Auslösung der akrosomalen Reaktion mit dem Kalzium-Ionophor A23187 (5µM) verschwindet die Immunreaktion in der akrosomalen Region, während die Fluoreszenz im Schwanzstück erhalten bleibt (Maßstabsbalken = 10 µm).

## 4.2 Transportversuche an HEK-293-Zellen und bovinen Spermatozoen

In den vorliegenden Abbildungen 5 und 6 ist der Effekt von ABCG2 auf den Transport von Hoechst 33342 und Ethidiumbromid aus HEK-293-Zellen dargestellt.



**Abbildung 5** *Transport von Hoechst 33342 aus positiv- und negativ-transfizierten HEK-Zellen. 293-pcDNA entspricht den mit einem Leervektor transfizierten HEK-293 Zellen und ist mit der hellen Linie gekennzeichnet, 293-ABCG2 entspricht mit dem ABCG2-Vektor transfizierten HEK-293-Zellen, erkennbar an der dunklen Linie. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus 9 unabhängigen Experimenten. Die positivtransfizierten 293-Zellen sind in der Lage, die Akkumulation der Farbstoffe in den Zellen zu limitieren, während es in den negativtransfizierten Zellen über den Untersuchungszeitraum zu einer erhöhten Akkumulation des Farbstoffs kommt.*

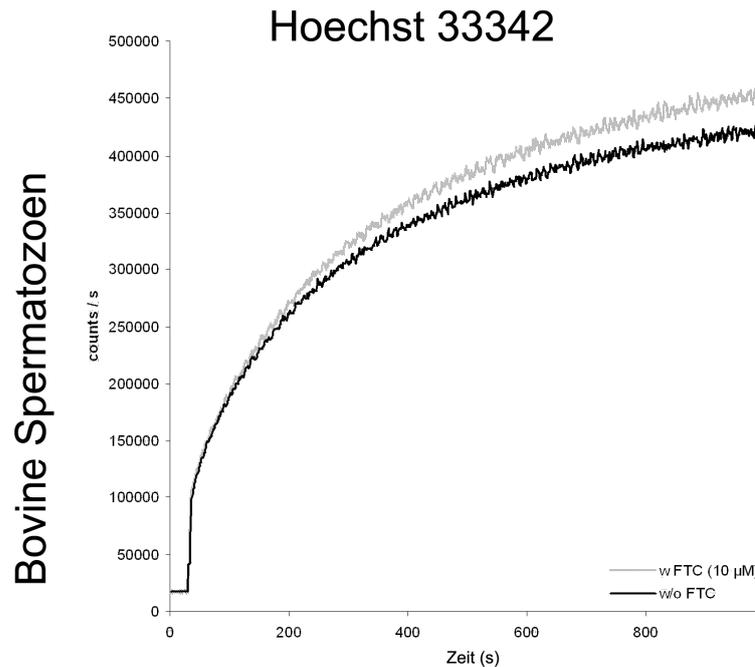


**Abbildung 6** *Transport von Ethidiumbromid aus positiv- und negativ-transfizierten HEK-Zellen.* 293-pCDNA entspricht den mit einem Leervektor transfizierten HEK-293 Zellen und ist mit der hellen Linie gekennzeichnet, 293-ABCG2 entspricht mit dem ABCG2-Vektor transfizierten HEK-293-Zellen, erkennbar an der dunklen Linie. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus 9 unabhängigen Experimenten. Die positivtransfizierten 293-Zellen sind in der Lage, die Akkumulation der Farbstoffe in den Zellen zu limitieren, während es in den negativtransfizierten Zellen über den Untersuchungszeitraum zu einer erhöhten Akkumulation des Farbstoffs kommt.

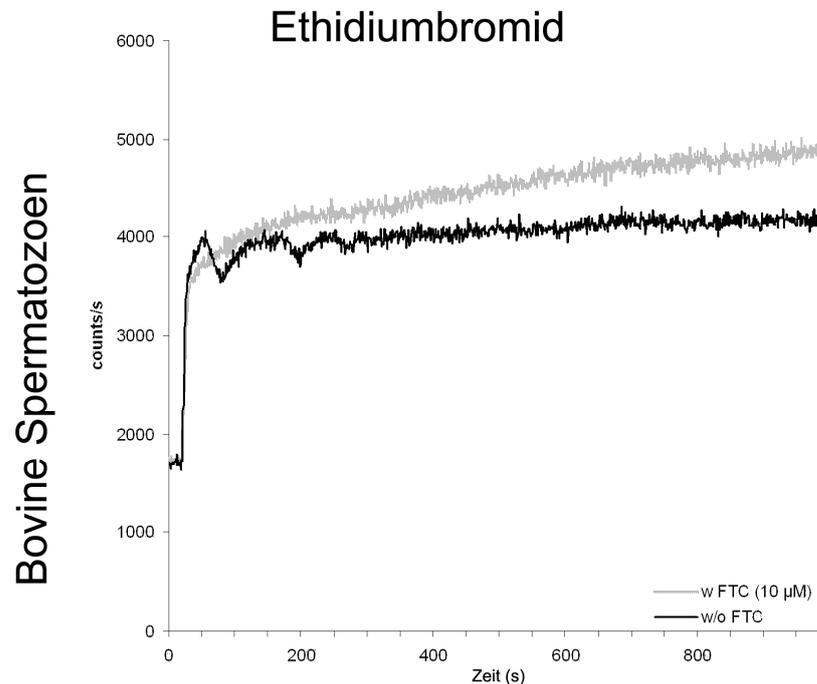
Zur Untersuchung der Aktivität von ABCG2 wurde der Transport von Hoechst 33342 und Ethidiumbromid in transfizierten HEK-293-Zelllinien untersucht. Die Experimente wurden nach identischem Versuchsaufbau neun Mal wiederholt. Gezeigt ist der Mittelwert der Versuche. Die beiden gewählten Substanzen Hoechst 33342 und Ethidiumbromid sind bekannte Substrate des Transporters (Janvilisri, 2003). Als Positivkontrolle wurde in den Experimenten eine mit ABCG2-cDNA transfizierte HEK-293-Zelllinie verwendet, die das Protein überexprimiert. Die Negativkontrolle entspricht einer mit dem entsprechenden Leervektor transfizierten HEK-293-Zelllinie.

In der Negativkontrolle kam es über den Untersuchungszeitraum zu einer erhöhten Akkumulation der Substanzen in den Zellen und damit zu einer erhöhten intrazellulären Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu waren die positiv-transfizierten Zellen in der Lage, die Substanzen nach extrazellulär zu transportieren und somit die Fluoreszenz in den Zellen zu reduzieren. ABCG2 bewirkt einen Transport der Substanzen Hoechst 33342 und Ethidiumbromid aus ABCG2-transfizierten HEK-293-Zellen.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen den Effekt des ABCG2-Inhibitors Fumitremorgin C auf den Transport der Substanzen Hoechst 33342 und Ethidiumbromid aus bovinen Spermatozoen.



**Abbildung 7** *Transport von Hoechst 33342 aus bovinen Spermatozoen.* w/FTC entspricht bovinen Spermatozoen in HSB-Puffer unter Zugabe von 10 µM Fumitremorgin C, gekennzeichnet durch die helle Linie, w/o FTC entspricht Versuchsbedingungen in HSB-Puffer ohne die Zugabe des Inhibitors, dargestellt in der dunklen Linie. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus 9 unabhängigen Experimenten. Der ABCG2-Inhibitor führt in inhibierten Spermatozoon im Vergleich zu nicht-inhibierten Bedingungen zu einer erhöhten Akkumulation der untersuchten Substanz.



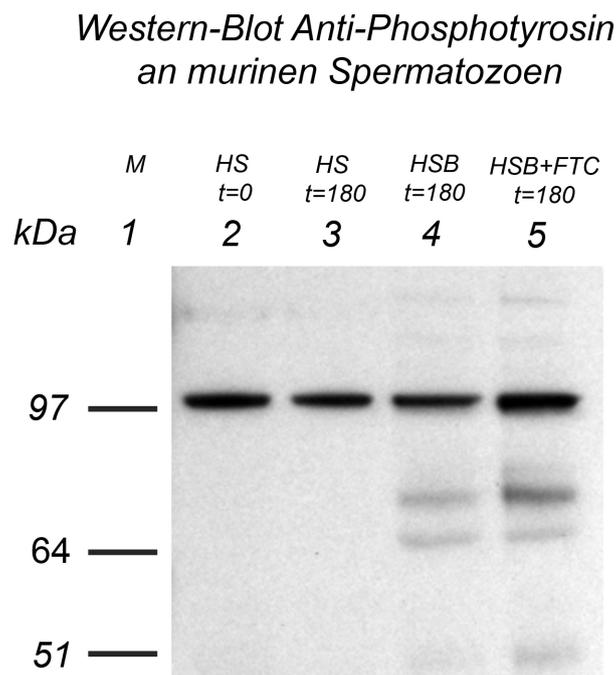
**Abbildung 8** *Transport von Ethidiumbromid aus bovinen Spermatozoen.* *wFTC* entspricht bovinen Spermatozoen in HSB-Puffer unter Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Fumitremorgin C, gekennzeichnet durch die helle Linie, *w/o FTC* entspricht Versuchsbedingungen in HSB-Puffer ohne die Zugabe des Inhibitors, dargestellt in der dunklen Linie. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus 9 unabhängigen Experimenten. Der ABCG2-Inhibitor führt in inhibierten Spermatozoon im Vergleich zu nicht-inhibierten Bedingungen zu einer erhöhten Akkumulation der untersuchten Substanz.

Zur Untersuchung der Aktivität des ABCG2-Inhibitors in Spermatozoen wurde im vorliegenden Experiment überprüft, ob eine Inhibition des Proteins mit FTC einen Einfluss auf den Transport der Substanzen Hoechst 33342 und Ethidiumbromid in bovinen Spermatozoen hat.

Im Vergleich zu nicht-inhibierten Bedingungen führte eine Inhibition des ABCG2-Transporters in bovinen Spermatozoen sowohl im Falle von Hoechst 33342, als auch im Falle von Ethidiumbromid zu einer Reduktion des Transports und damit einer erhöhten Akkumulation der Substanzen im Untersuchungszeitraum. ABCG2 ist in bovinen Spermatozoen funktionell aktiv.

### 4.3 Einfluss von ABCG2 auf die kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung muriner Spermatozoen

In Abbildung 9 ist der Einfluss des ABCG2-Inhibitors Fumitremorgin C (FTC) auf die kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung muriner Spermatozoen dargestellt.



**Abbildung 9** Phosphotyrosin-Immunoblot zum Nachweis des Effektes des ABCG2-Inhibitors Fumitremorgin C auf die kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung muriner Spermatozoen. Verwendet wurde der monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 (Upstate, Lake Placid, USA) in einer Verdünnung von 1: 1000. Zur Visualisierung der Banden diente ein ECL-konjugierter Anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1: 2000. Gezeigt sind in Spur 2-5 verschiedene Inkubationsmedien. HS entspricht Inkubationsbedingungen, in denen murine Spermatozoen nicht kapazitieren, HSB solchen, die die Kapazitation begünstigen. HSB+FTC entsprechen den Bedingungen, in denen der ABCG2-Transporter durch Fumitremorgin C gehemmt wurde (5  $\mu$ M). Spur 3 entspricht der Positivkontrolle, in der es zu einer Ausprägung eines spezifischen, mit der Kapazitation assoziierten Bandenmusters kommt. Eine vergleichbare Ausprägung zeigt sich auch in den inhibierten Bedingungen (Spur 2). Spur 1 zeigt den Molekulargewichtsmarker. FTC hat keine Auswirkung auf die Ausprägung des Bandenmusters.

Eine wichtige Voraussetzung der Kapazitation ist die Abnahme des Cholesterolgehaltes aus Spermatozoenmembranen. Diese Abnahme des Cholesterolgehaltes resultiert in einer Phosphorylierung an Tyrosinresten von Zielproteinen, die mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert werden können. Dies führt zu einer charakteristischen Ausprägung eines Bandenmusters im Western-Blot. Diese spezifische Ausprägung gilt als Nachweis einer erfolgten Kapazitation. Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz des ABCG2-Transporters in Spermatozoen während der Kapazitation wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des ABCG2-Inhibitors FTC auf die Proteintyrosinphosphorylierung der Spermatozoen analysiert. Dazu wurden murine Spermatozoen in verschiedenen Inkubationsmedien inkubiert und die Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen überführt. Anschließend wurden die Membranen mittels des spezifischen Antikörpers 4G10 gegen phosphorylierte Tyrosinreste inkubiert und ausgewertet. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden 4-12% Bis/Tris-Gele verwendet. Nach der Übertragung auf Nitrozellulosemembranen wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1: 1000, der Sekundärantikörper 1: 2000 bei einer jeweils einstündigen Inkubation eingesetzt und die Banden mit ECL-Reagenz visualisiert. Dieses Experiment wurde nach identischem Versuchsaufbau viermal wiederholt, in Abbildung 9 ist ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

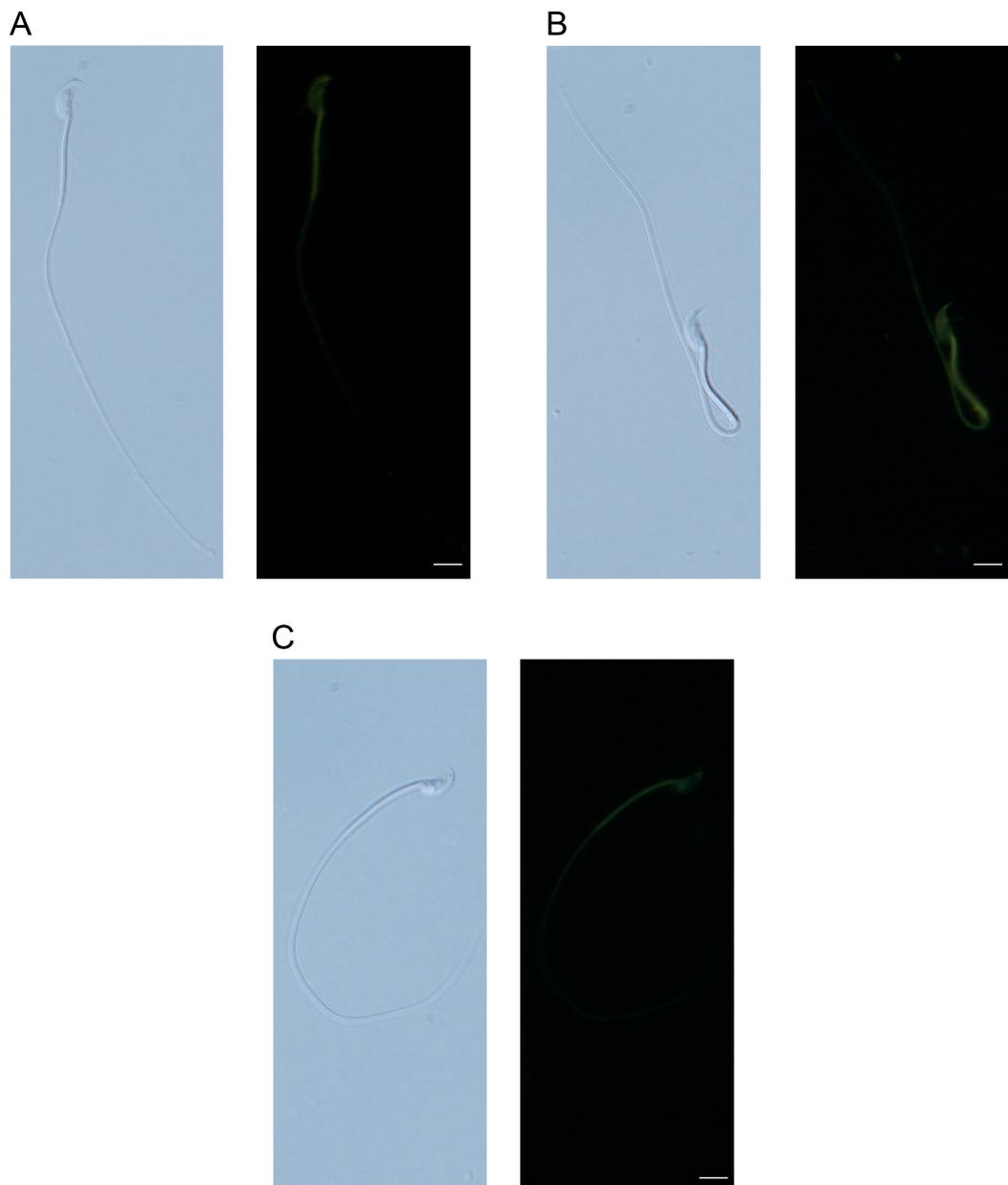
Das HS-Medium entspricht Bedingungen, in denen murine Spermatozoen nicht kapazitieren. HSB entspricht solchen, die eine Kapazitation der Spermatozoen begünstigen (Positivkontrolle) und HSB+FTC entsprechenden Bedingungen unter Zusatz von 5  $\mu$ M des ABCG2-Inhibitors FTC. Als Negativkontrolle diente die Inkubation in HS-Medium zum Zeitpunkt 0. Unter den die Kapazitation begünstigenden Bedingungen (HSB) zeigten sich nach 180-minütiger Inkubation neben einer Immunreaktion in Höhe der konstitutiv exprimierten Hexokinase (97 kDa) weitere Banden in Höhe von 51, 70, 85 und

110 kDa entsprechend einer erfolgten Kapazitation (*Kalab, 1994; Visconti 1995a*). Das gleiche Bandenmuster fand sich auch unter den das ABCG2-Protein inhibierenden (5  $\mu$ M) Inkubationsbedingungen (HSB+FTC). In der Negativkontrolle sind weder nach 0 min noch nach 180 min neben der konstitutiv exprimierten Hexokinase Banden in Höhe von 51, 70, 85 und 110 kDa zu erkennen. Eine Inhibition von ABCG2 durch Fumitremorgin C hatte keinen detektierbaren Einfluss auf die Ausprägung des Bandenmusters in der immunologischen Darstellung der kapazitationsassoziierten Phosphorylierung von Tyrosinresten an Proteinen in murinen Spermatozoen.

#### **4.4 CTC-Färbung an murinen Spermatozoen**

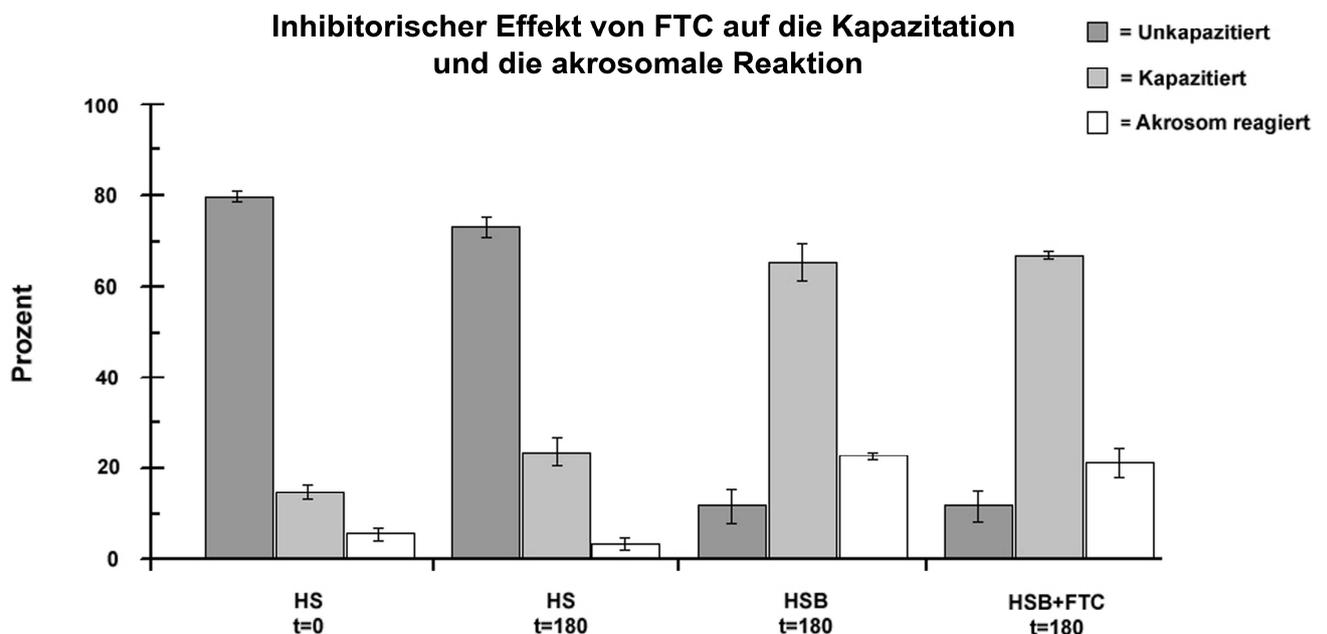
Zur weiteren Überprüfung des Einflusses von ABCG2 auf die Kapazitation und die akrosomale Reaktion wurde in der vorliegenden Arbeit die Chlortetrazyklin-Methode angewandt. Sie erlaubt eine Unterscheidung zwischen unkapazitierten, kapazitierten und akrosomal reagierten Spermatozoen.

Abbildung 10 zeigt die unterschiedliche Ausprägung der Färbemuster, „F“ entsprechend unkapazitierten Spermatozoen, „B“ entsprechend kapazitierten Spermatozoen und „AR“ entsprechend akrosomal reagierten Spermatozoen. Die benachbarten DIC-Bilder zeigen die entsprechenden Spermatozoen.



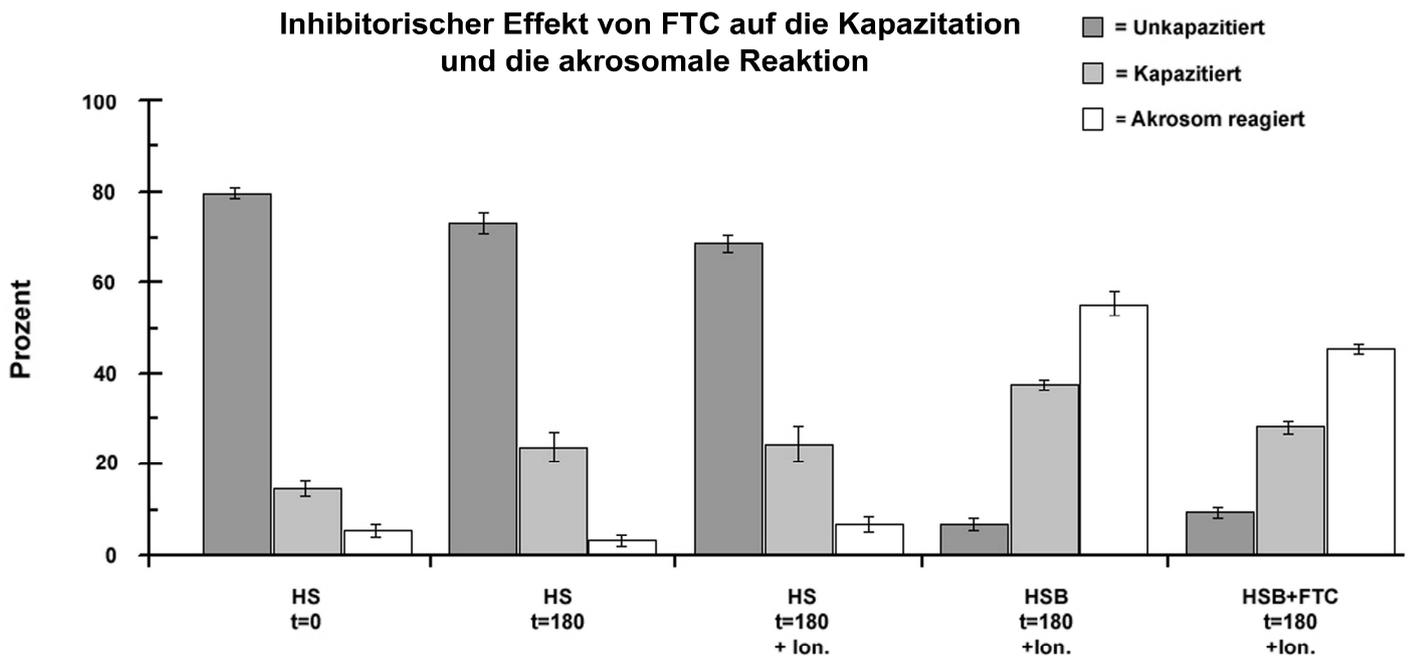
**Abbildung 10 Murine Spermatozoen in der CTC-Färbung:** (A) Färbemuster entsprechend Muster „F“. Markiert ist sowohl das Akrosom, der postakrosomale Bereich als auch die Halsregion. (B) Färbemuster entsprechend Muster „B“. Markiert sind das Akrosom und das Mittelstück, während im postakrosomalen Bereich keine Fluoreszenz zu beobachten ist. (C) Färbemuster entsprechend Muster „AR“. Markiert ist lediglich das Mittelstück, während das Kopfstück keine Fluoreszenz zeigt. Die DIC-Bilder in (A)-(C) zeigen die entsprechenden Spermatozoen (Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m).

Die folgende Abbildung 11 zeigt die prozentuale Verteilung der Mittelwerte der beschriebenen Färbemuster in der CTC-Färbung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu den Zeitpunkten t=0 und t=180 min:



**Abbildung 11** Prozentuale Verteilung der Mittelwerte der verschiedenen Färbemuster murinen Spermatozoen in der CTC-Färbung: Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Färbemuster „F“, „B“ und „AR“ in unterschiedlichen, die Kapazitation beeinflussenden Inkubationsmedien zu verschiedenen Zeitpunkten. HS entspricht Inkubationsbedingungen, in denen Spermatozoen nicht kapazitieren, HSB solchen, in denen Spermatozoen kapazitieren und HSB+FTC entsprechenden Bedingungen, in denen der ABCG2 durch Fumitremorgin C gehemmt wurde (5  $\mu$ M). Angegeben ist der Standardfehler aus n=3. Eine Inhibition des ABCG2-Transporters hat keinen signifikanten Einfluss auf die Kapazitation und die akrosomale Reaktion.

Die folgende Abbildung 12 zeigt die prozentuale Verteilung der beschriebenen Färbemuster in der CTC-Färbung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu den Zeitpunkten  $t=0$  und  $t=180$  min unter Zugabe des Kalzium-Ionophors A23187 in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  für 15 min. Tabelle 3 zeigt



**Abbildung 12 Prozentuale Verteilung der Mittelwerte von den Färbemustern murinen Spermatozoen in der CTC-Färbung:** Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Färbemuster „F“, „B“ und „AR“ in unterschiedlichen, die Kapazitation beeinflussenden Inkubationsmedien zu verschiedenen Zeitpunkten. HS entspricht Inkubationsbedingungen, in denen Spermatozoen nicht kapazitieren, HSB solchen, die die Kapazitation begünstigen und HSB+FTC entsprechenden Bedingungen, in denen der ABCG2 durch Fumitremorgin C gehemmt wurde ( $5 \mu\text{M}$ ). „+ lon.“ entspricht einer zusätzlichen Inkubation mit dem Kalzium-Ionophor A23187 ( $5 \mu\text{M}$ ). Angegeben ist der Standardfehler aus  $n=3$ . Eine Inhibition des ABCG2-Transporters hat keinen signifikanten Einfluss auf die Kapazitation und die akrosomale Reaktion unter Koinkubation mit Kalzium-Ionophor A23187 ( $5 \mu\text{M}$ )

Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Prozentwerte der CTC-Versuche.

**Tabelle 3** Mittelwerte der prozentualen Verteilung muriner Spermatozoen in der CTC-Färbung mit und ohne Inhibition von ABCG2 durch FTC (5 $\mu$ M). Angegeben ist der Standardfehler aus n=3.

| CTC                                      | HSB<br>t=180 min | HSB+FTC<br>t=180 min | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------|----------------------|--------|
| <i>Muster F</i><br>„unkapazitiert“       | 11,7 $\pm$ 4,41  | 11,7 $\pm$ 4,06      | 1,00   |
| <i>Muster B</i><br>„kapazitiert“         | 65,3 $\pm$ 5,21  | 67,0 $\pm$ 1,00      | 0,77   |
| <i>Muster AR</i><br>„Akrosomal reagiert“ | 23,0 $\pm$ 1,00  | 21,3 $\pm$ 4,10      | 0,71   |

**Tabelle 4** Mittelwerte der prozentualen Verteilung muriner Spermatozoen in der CTC-Färbung mit und ohne Inhibition von ABCG2 durch FTC (5 $\mu$ M) und Inkubation mit Kalziumionophor A23287 für 15 min (5 $\mu$ M). Angegeben ist der Standardfehler aus n=3.

| CTC + A23187<br>5 $\mu$ M                | HSB<br>t=180 min | HSB+FTC<br>t=180 min | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------|----------------------|--------|
| <i>Muster F</i><br>„unkapazitiert“       | 7,0 $\pm$ 1,73   | 9,7 $\pm$ 1,45       | 0,304  |
| <i>Muster B</i><br>„kapazitiert“         | 37,7 $\pm$ 1,45  | 28,0 $\pm$ 1,73      | 0,013  |
| <i>Muster AR</i><br>„Akrosomal reagiert“ | 55,3 $\pm$ 3,18  | 62,3 $\pm$ 1,45      | 0,116  |

Untersucht wurde der Einfluss verschiedener Inkubationsbedingungen auf den Status der Kapazitation sowie die Auslösung der akrosomalen Reaktion. Färbemuster „F“ entspricht unkapazitierten, „F“ kapazitierten und „AR“ akrosomal reagierten Spermatozoen. Hierzu wurden murine Spermatozoen zum Einen in einem Medium inkubiert, welches die Kapazitation begünstigt (HSB), zum Anderen in einem vergleichbaren Medium inkubiert, das mit dem spezifischen ABCG2-Inhibitor Fumitremorgin C in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  versetzt war (HSB+FTC). Als Negativkontrolle wurden die Spermatozoen einem Medium ausgesetzt, welches die Kapazitation verhindert (HS). Nach 180 min wurde anhand der CTC-Färbung überprüft, ob dieser Inhibitor einen Einfluss auf das Kapazitationsverhalten der Spermatozoen hat. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Kalzium-Ionophor (5 $\mu\text{M}$ ) überprüft, inwieweit FTC die Auslösung der akrosomalen Reaktion beeinflusst. Verglichen wurden jeweils inhibierte und nicht-inhibierte Bedingungen, HSB+FTC vs. HSB.

### **Verhältnis der Färbemuster in der CTC-Färbung ohne Zugabe von Kalzium-Ionophor**

#### *Färbemuster „F“:*

Ohne die Zugabe von Kalzium-Ionophor sind die Mittelwerte der Messungen im Färbemuster „F“, entsprechend kapazitierten Spermatozoen mit 11,7% gleich, wie in Abbildung 11 und Tabelle 3 zu erkennen ist.

#### *Färbemuster „B“:*

Ein signifikanter Unterschied zwischen den ABCG2-inhibierten und nicht-inhibierten Bedingungen ist ohne die Zugabe von Kalzium-Ionophor nach 180 min Inkubation im Anteil der dem Muster „B“ (kapazitiert) entsprechenden Zellen mit 65,3% in HSB zu 67,0% in HSB+FTC nicht zu erkennen (p-Wert = 0,77), wie in Abbildung 11 und Tabelle 3 dargestellt ist.

***Färbemuster „AR“:***

Ohne die Zugabe von Kalzium-Ionophor ist der Unterschied zwischen inhi-  
bierten und nicht-inhierten Bedingungen im Anteil der akrosomal reagierten  
Zellen (Muster AR) mit 21,3% zu 23,0% ebenfalls nicht signifikant (p-Wert =  
0,71) (Abbildung 11, Tabelle 3).

**Verhältnis der Färbemuster in der CTC-Färbung nach Zugabe von Kal-  
zium-Ionophor (5µM)*****Färbemuster „F“:***

Nach der Zugabe von Kalzium-Ionophor A23187 ist der Unterschied zwi-  
schen nicht-inhierten und inhierten Spermatozoen mit 7,0% zu 9,3% im  
Färbemuster „F“ nicht signifikant (p-Wert = 0,30)

***Färbemuster „B“:***

Ein signifikanter Unterschied ist im Muster „B“ nach der Inkubation mit dem  
Kalzium-Ionophor nicht zu erkennen. (p-Wert = 0,013), wie in Abbildung 12  
und Tabelle 4 dargestellt ist. Hierbei kommt es unter nicht-inhierten Bedin-  
gungen zu einer Zunahme der kapazitierten Zellen zu vergleichbaren Bedin-  
gungen, in denen Spermatozoen nicht kapazitieren von 24,3% zu 37,7%. Im  
Gegensatz dazu steigt der Anteil des entsprechenden Färbemusters „B“ un-  
ter inhierten Bedingungen lediglich auf 28,0% an.

***Färbemuster „AR“:***

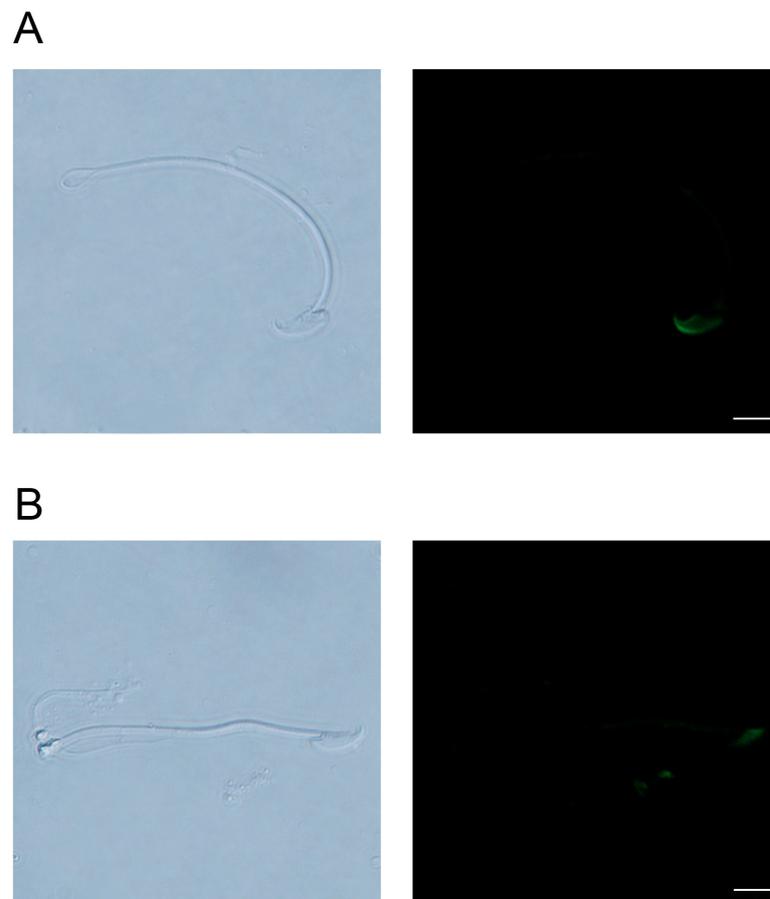
Dagegen stellt sich nach 180 min das Verhältnis der akrosomal reagierten  
Zellen unter nicht-inhierten und inhierten Bedingungen nach der Zugabe  
von Kalzium-Ionophor in einer Konzentration von 5 µM dar. Hierbei kommt es  
im Vergleich zum Zeitpunkt 0 unter nicht-inhibierenden Bedingungen zu einer  
Zunahme der akrosomal reagierten Zellen von 5,7% auf 55,3%. Im Kontrast  
dazu steht eine Erhöhung der akrosomal reagierten Spermatozoen zwischen  
den beiden Zeitpunkten unter Zugabe des ABCG2-Inhibitors von 5,7% auf

63,0%. Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant (p-Wert = 0,116) (Abbildung 12, Tabelle 4).

Die Inhibition des ABCG2-Inhibitors FTC hat in der Untersuchung in der CTC-Färbung keinen signifikanten Einfluss auf die akrosomale Reaktion in Spermatozoen von Mäusen. Bezogen auf die Kapazitation kommt es zwischen inhibierten und nicht-inhibierten Bedingungen zu keinem signifikanten Unterschied.

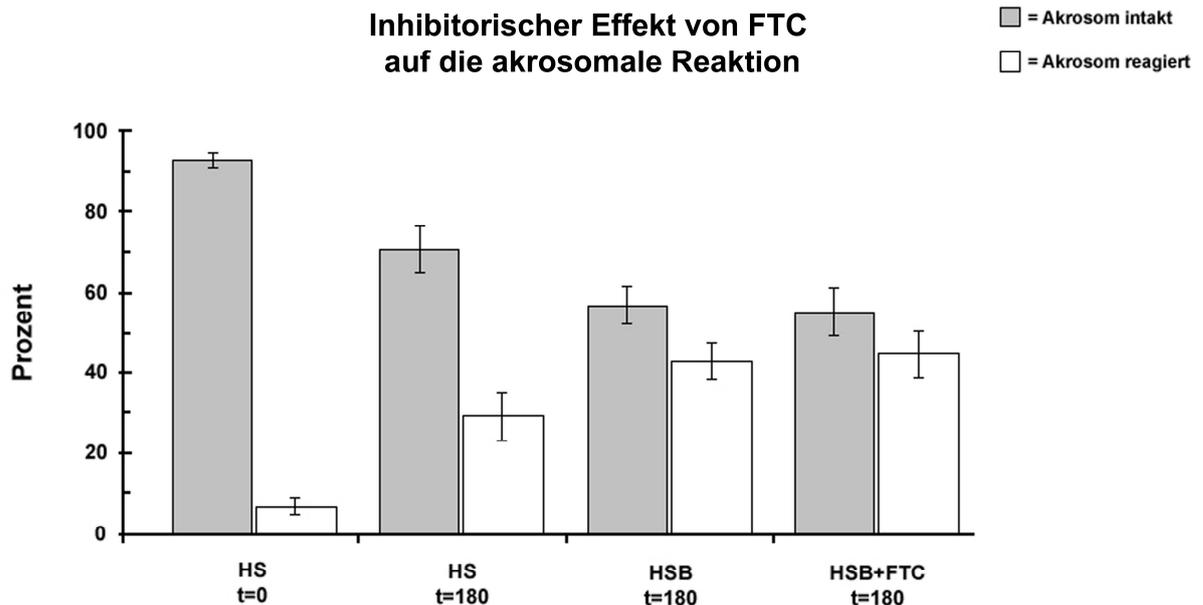
#### 4.5 PSA-Lektinfärbung des murinen Akrosoms

Zur Untersuchung der Wirkung des ABCG2-Inhibitors Fumitremorgin C auf die akrosomale Reaktion wurden murinen Spermatozoen in verschiedenen Inkubationsmedien inkubiert, mit PSA gefärbt und zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet. In Abbildung 13 sind die verschiedenen Färbemuster (akrosomal intakt und akrosomal reagiert) in der PSA-Färbung dargestellt:



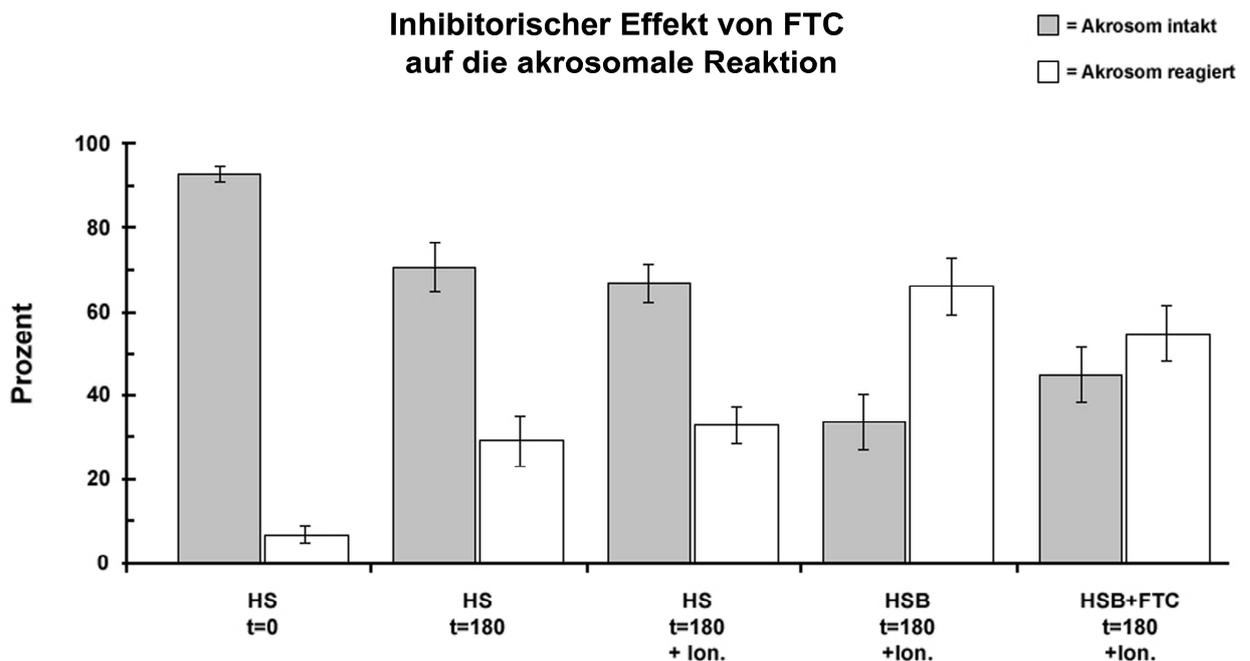
**Abbildung 13** *Fluoreszenzmuster PSA-gefärbter murinen Spermatozoen (A) zeigt ein akrosomal intaktes Spermatozoon mit einer deutlichen Fluoreszenz im Bereich des Akrosoms. Der postakrosomale Teil des Kopfes ist schwach gefärbt. (B) zeigt ein akrosomal reagiertes Spermatozoon mit fehlender Fluoreszenz im Bereich des Akrosoms. Zu sehen ist lediglich eine schwache Färbung im postakrosomalen Bereich. Die DIC-Bilder in (A) und (B) zeigen die entsprechenden Spermatozoen (Maßstabsbalken = 10 µm)*

Die folgende Abbildung 14 zeigt die prozentuale Verteilung der beschriebenen Färbemuster in der PSA-Färbung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu den Zeitpunkten t=0 und t=180 min.



**Abbildung 14** *Prozentuale Verteilung der Mittelwerte akrosomenintakter und akrosomenreagierter Spermatozoen zu verschiedenen Zeitpunkten in der PSA-Färbung.* HS entspricht Inkubationsbedingungen in denen Spermatozoen nicht kapazitieren (Negativkontrolle), HSB solchen, die die Kapazitation begünstigen und HSB+FTC entsprechenden Bedingungen, in denen der ABCG2-Transporter durch Fumitremorgin C gehemmt wurde (5  $\mu$ M). Angegeben ist der Standardfehler aus n=6. Eine Inhibition des ABCG2-Transporters hat keinen signifikanten Einfluss auf die akrosomale Reaktion muriner Spermatozoen.

Die folgende Abbildung 15 zeigt die prozentuale Verteilung der beschriebenen Färbemuster in der PSA-Färbung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu den Zeitpunkten  $t=0$  und  $t=180$  min unter Zugabe des Kalziumionophors A23187 in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 15** Prozentuale Verteilung der Mittelwerte akrosomenintakter und akrosomenreagierte Spermatozoen zu verschiedenen Zeitpunkten in der PSA-Färbung. HS entspricht Inkubationsbedingungen in denen Spermatozoen nicht kapazitieren (Negativkontrolle), HSB solchen, die die Kapazitation begünstigen und HSB+FTC entsprechenden Bedingungen, in denen der ABCG2-Transporter durch Fumitremorgin C gehemmt wurde ( $5 \mu\text{M}$ ). „+ Ion“ entspricht einer zusätzlichen Inkubation mit dem Kalziumionophor A23187 ( $5 \mu\text{M}$ ). Angegeben ist der Standardfehler aus  $n=6$ . Eine Inhibition des ABCG2-Transporters hat keinen signifikanten Einfluss auf die akrosomale Reaktion muriner Spermatozoen unter Koinkubation mit dem Kalzium-Ionophor A23187 ( $5 \mu\text{M}$ ).

Tabelle 5 und 6 zeigen die Prozentwerte der PSA-Versuche:

**Tabelle 5** *Mittelwerte der prozentualen Verteilung muriner Spermatozoen in der PSA-Färbung mit und ohne Inhibition von ABCG2 durch FTC (5 $\mu$ M). Angegeben ist der Standardfehler aus n=6.*

| <b>PSA</b>                | <b>HSB<br/>t=180 min</b>          | <b>HSB+FTC<br/>t=180 min</b>      | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <b>Akrosomal intakt</b>   | <b>56,8 <math>\pm</math> 5,80</b> | <b>55,2 <math>\pm</math> 6,76</b> | <b>0,855</b>  |
| <b>Akrosomal reagiert</b> | <b>43,2 <math>\pm</math> 5,80</b> | <b>44,8 <math>\pm</math> 6,76</b> | <b>0,855</b>  |

**Tabelle 6** *Mittelwerte der prozentualen Verteilung muriner Spermatozoen in der PSA-Färbung mit und ohne Inhibition von ABCG2 durch FTC (5 $\mu$ M) und Inkubation mit Kalzium-Ionophor A23187 für 15 min (5 $\mu$ M). Angegeben ist der Standardfehler aus n=6.*

| <b>PSA+ A23187<br/>5<math>\mu</math>M</b> | <b>HSB<br/>t=180 min</b>          | <b>HSB+FTC<br/>t=180 min</b>      | <b>p-Wert</b> |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <b>Akrosomal intakt</b>                   | <b>33,9 <math>\pm</math> 4,55</b> | <b>45,2 <math>\pm</math> 6,47</b> | <b>0,189</b>  |
| <b>Akrosomal reagiert</b>                 | <b>66,0 <math>\pm</math> 4,55</b> | <b>54,8 <math>\pm</math> 6,47</b> | <b>0,189</b>  |

Zur Überprüfung des Einflusses von ABCG2 auf die akrosomalen Reaktion wurden der Anteil nicht-akrosomal reagierter Spermatozoen zum Zeitpunkt t=180 min unter inhibierten und nicht-inhibierten Bedingungen, jeweils mit oder ohne Zugabe von Kalzium-Ionophor miteinander verglichen.

Zur Auslösung der akrosomalen Reaktion wurde in der Untersuchung das Kalzium-Ionophor A23187 verwendet. Als Negativkontrolle dienten Inkubationsbedingungen, in denen Spermatozoen nicht kapazitieren (HS-Puffer).

**Verhältnis der Färbemuster in der PSA-Färbung**

Die Spermatozoen, die unter kapazitationsfördernden Bedingungen inkubiert wurden weisen nach 180 min einen Anteil von  $43,2 \pm 5,80$  % nicht-reagierter Zellen auf. Die entsprechenden inhibierten Spermatozoen zeigen einen Anteil von  $44,8 \pm 6,76$  nicht-akrosomal reagierter Zellen. Der Unterschied ist nicht signifikant (p-Wert = 0,855) (Abbildung 14, Tabelle 5).

**Verhältnis der Färbemuster in der PSA-Färbung nach Zugabe von Kalzium-Ionophor**

Der Vergleich im HSB-Puffer in Abbildung 15 und Tabelle 6 zeigt, dass der Unterschied zwischen den akrosomenintakten Zellen zwischen nicht-inhibierten  $66,0 \pm 4,55$  %, und inhibierten Spermatozoen  $54,8 \pm 6,47$  % nicht signifikant ist (p-Wert = 0,189).

Der spezifische ABCG2-Inhibitor Fumitremorgin C hat in der PSA-Färbung keinen signifikanten Einfluss auf die akrosomale Reaktion.

**Tabelle 7 Übersicht der Fragestellung und der erzielten Ergebnisse**

| <b>Fragestellung</b>                                                                                  | <b>Ergebnisse</b>                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Kann ABCG2 in murinen Spermatozoen nachgewiesen werden?                                            | ABCG2 ist im Western-Blot in murinen Spermatozoen nachweisbar                                                                                                                                                                                              |
| 2. Inwieweit ist ABCG2 konserviert und kann auch in Spermatozoen anderen Spezies nachgewiesen werden? | ABCG2 ist im Western-Blot in Spermatozoen von Ratte, Bulle und Mensch nachweisbar                                                                                                                                                                          |
| 3. Wie ist die subzelluläre Verteilung von ABCG2 in murinen Spermatozoen?                             | Immunzytochemische Untersuchung zeigen eine Lokalisation von ABCG2 in der akrosomalen Region und im Mittelstück von bovinen und murinen Spermatozoen                                                                                                       |
| 4. Ist ABCG2 in Spermatozoen funktionell aktiv?                                                       | ABCG2 ist in Spermatozoen funktionell aktiv und kann Substrate transportieren                                                                                                                                                                              |
| 5. Ist ABCG2 an der Kapazitation muriner Spermatozoen beteiligt?                                      | Durch eine Inhibition von ABCG2 durch den spezifischen Inhibitor Fumitremorgin C kommt es zu keiner nachweisbaren Veränderung der kapazitationsassoziierten Proteintyrosinphosphorylierung in murinen Spermatozoen und der Kapazitation in der CTC-Färbung |
| 6. Ist ABCG2 an der akrosomalen Reaktion muriner Spermatozoen beteiligt?                              | Der ABCG2-Inhibitor FTC hat keinen signifikanten Einfluss auf die Auslösung der akrosomalen Reaktion in murinen Spermatozoen in der PSA- und der CTC-Färbung                                                                                               |

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es zu überprüfen, ob der ABCG2-Transporter in Spermatozoen verschiedener Spezies nachgewiesen werden kann. Zudem sollte überprüft werden wo in Spermatozoen das Protein lokalisiert ist. Im Weiteren stellte sich die Frage, ob der Transporter in Spermatozoen funktionell aktiv ist und inwieweit er die Fertilisation beeinflusst.

### **ABCG2 ist in Spermatozoen verschiedener Spezies nachweisbar**

Der Nachweis des Transporters im Hoden konnte von Doyle *et al.* bereits kurz nach der Identifizierung des Proteins auf mRNA-Niveau erbracht werden. Das Protein ist nach Fetsch *et al.* hauptsächlich in Sertoli-Zellen und den steroidproduzierenden Leydigischen Zwischenzellen lokalisiert. Widersprüchlich dazu kommt es laut einer Untersuchung von Bart *et al.* zu keiner Expression von ABCG2 in den Leydigischen Zwischenzellen (Doyle, 1998; Bart, 2004; Fetsch, 2006). ABCG2 ist in der Blut-Hoden-Schranke konzentriert und ist an der Limitierung der Aufnahme von Xenobiotika, also körperfremden Stoffen beteiligt (Bart, 2004; Enokizono, 2008). Immunhistochemische Untersuchungen bewiesen zudem eine Lokalisation des Proteins im Nebenhoden des Menschen, wo es an der Limitierung der Aufnahme von Phytoöstrogenen, also pflanzlichen, sexualhormonähnlichen Stoffen beteiligt ist (Enokizono, 2007). Ein wichtiger Beitrag zur Rolle von ABCG2 im männlichen Reproduktionstrakt konnte 2004 von Lassalle *et al.* erbracht werden, die ABCG2 in Zellen der Spermatogenese nachwiesen. In dieser Untersuchung war der ABCG2-Transporter in den verschiedenen Differenzierungsstufen der Spermatogenese unterschiedlich stark exprimiert. In der Studie fand sich die mRNA von ABCG2 in Spermatogonien, in Spermatozyten und in Spermatischen. ABCG2-mRNA konnte zwar ebenfalls in den haploiden Spermatischen nachgewiesen werden, Lassalle *et al.* interpretierten dies aber als eine Art von RNA-Speicherprozess ohne funktionelle Relevanz für Spermatischen und reife

Spermatozoen. Eine Lokalisation von ABCG2 in reifen Spermatozoen hingegen wurde in der Studie von Lassalle *et al.* nicht untersucht (Lassalle, 2004). Auf dieser Grundlage ergab sich als erste Fragestellung dieser Arbeit ob der ABCG2-Transporter in reifen Spermatozoen lokalisiert ist und mittels immunologischer Methoden nachgewiesen werden kann.

Als Modell zum Nachweis des ABCG2-Transporters in Spermatozoen diente in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der Reproduzierbarkeit und der leichten Verfügbarkeit von Probenmaterial das Mausmodell. Als Nachweismethode wurde der Western Blot und die Immunzytochemie gewählt. Der Western-Blot ist die Standard-Nachweismethode von Proteinen und eignet sich besonders wegen seiner Reproduzierbarkeit und seiner Spezifität. Zum Nachweis von ABCG2 in murinen, epididymalen Spermatozoen wurde ein spezifischer ABCG2-Antikörper (Anti-ABCG2-87405, NIH, Bethesda, USA) verwendet, der gegen ein intrazelluläres Epitop gerichtet ist. Der verwendete Antikörper ist bereits etabliert und wurde zum Nachweis von ABCG2 in verschiedenen Geweben verwendet. Litman *et al.* konnten in einer Studie unter reduzierenden Bedingungen mit dem gleichen Antikörper zeigen, dass eine Bande von ca. 72 kDa dem ABCG2-Protein entspricht (Litman, 2002; Fetsch, 2006). Der polyklonale Antikörper Anti-Abcg2 markierte unter den hier verwendeten reduzierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese und dem anschließenden Western-Blot die in Abbildung 3 gezeigte Bande in Höhe von ca. 70 kDa. Die Masse von 72 kDa entspricht dem Molekulargewicht von ABCG2. Als Positivkontrolle ist in Abbildung 3, die einer mit ABCG2-cDNA transfizierten HEK-293-Zelllinie entsprechende Bande gezeigt.

Da ABCG2 in murinen Spermatozoen nachgewiesen werden konnte, interessierte im Weiteren die Frage, ob ABCG2 auch in Spermatozoen anderer Spezies nachgewiesen werden kann. Dazu wurden Zellextrakte der Spermatozoen von Ratte (epididymal), Bulle (epididymal) und Mensch (ejakuliert) gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels des spezifischen Antikörpers markiert. Wie in Abbildung 3 gezeigt ist, konnte eine starke Immunreaktion in

einer Höhe von ca. 70 kDa in allen beschriebenen Spezies beobachtet werden. Dies spricht für eine Lokalisation des ABCG2-Transporters in Spermatozoen aller untersuchten Spezies.

Nach dem gängigen Modell der Literatur muss ABCG2 homodimerisieren um funktionell aktiv werden zu können (Litman, 2002; Krishnamurthy, 2006). Neuere Studien in somatischen Zellen weisen auf eine Organisation des Transporters als Homo-Oligomer mit bis zu 12 ABCG2-Untereinheiten hin (Xu J, 2007). Ob der ABCG2-Transporter in Spermatozoen als Homodimer oder Homo-Oligomer vorliegt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit nicht beurteilt werden, da die suprastrukturbildenden Disulfidbrücken mittels Reduzierung durch den zugesetzten Reducing-Agent und die Erhitzung der Proben auf 100°C zerstört wurden. Der Nachweis des Proteins in Spermatozoen zeigt eine Lokalisation des Transporters im männlichen Reproduktionstrakt, die bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte und erweitert damit die Beobachtungen von Lassalle *et al.*, die ABCG2 nur in den Zellen der Spermatogenese nachwies (Lassalle, 2004).

Während in der eigenen Untersuchung das Protein mittels Western-Blot in Spermatozoen nachgewiesen wurde, konnte in der Studie von Lassalle *et al.* ABCG2-mRNA in Zellen der Spermatogenese gezeigt werden. Der alleinige Nachweis von RNA aber beweist noch nicht die Transkription ins funktionell aktive Protein. Einen aktiven, auf dem Vorhandensein des ABCG2-Proteins basierenden Transport des Farbstoffs Hoechst 33342, konnte in der Studie von Lassalle *et al.* in Spermatischen nicht nachgewiesen werden. Darauf beruhte die Vermutung der Autoren, dass die ABCG2-mRNA eine Art der Speicherung darstellte, die ohne funktionelle Relevanz für Spermatischen und Spermatozoen sei. Da Spermatozoen selber nicht mehr zur Proteinbiosynthese fähig sind, muss das in den eigenen Untersuchungen nachgewiesene Protein deshalb bereits in unreiferen Differenzierungsstufen der Keimzellen synthetisiert worden sein.

Wann in der komplizierten Entwicklung der Spermatiden zu den reifen Spermatozoen die Transkription des Proteins von statten geht, kann allerdings anhand der in der eigenen Studie erbrachten Ergebnisse nicht bestimmt werden.

### **ABCG2 ist in der akrosomalen Region lokalisiert**

Durch den Nachweis des Proteins im Western-Blot ergab sich im Weiteren die Fragestellung in welchem subzellulären Kompartiment ABCG2 in Spermatozoen lokalisiert ist. Als Nachweismethode wurde dazu die Immunzytochemie gewählt, mit der es möglich ist die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Zellen zu markieren und zu visualisieren. Zur Untersuchung dieser subzellulären Lokalisation von ABCG2 wurden Spermatozoenausstriche unkapazitierter Spermatozoen mit dem spezifischen Antikörper 87405 inkubiert. Um die Bindung des Erstantikörpers sichtbar zu machen wurde ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die in Abbildung 4 (A und B) gezeigte subzelluläre Lokalisation des Transporters in Spermatozoen beschränkt sich auf die akrosomale Region sowie in schwächerem Maße auf das Mittelstück. Die Lokalisation konnte, wie in Abbildung 4 gezeigt, sowohl in murinen (5A) als auch in bovinen (5B) Spermatozoen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Lokalisation in der akrosomalen Region von Spermatozoen wurde in einer weiteren Untersuchung überprüft, ob die Fluoreszenz in kapazitierten Spermatozoen nach der Auslösung der akrosomalen Reaktion nachweisbar ist. Dazu wurden zuvor kapazitierte Spermatozoen für 15 min mit dem Kalzium-Ionophor A23187 inkubiert und anschließend nach beschriebenenem Protokoll gefärbt und ausgewertet. In der Beurteilung zeigte sich, dass nach erfolgter Auslösung der akrosomalen Reaktion keine Immunfluoreszenz im Bereich des Kopfes mehr zu detektieren war, während die Immunreaktion im Mittelstück weiterhin vorhanden war (Abbildung 5C).

---

ABCG2 ist nicht der Einzige ABC-Transporter der in Spermatozoen im Akrosom nachgewiesen werden konnte. Morales *et al.* untersuchten die Rolle von weiteren ABC-Proteinen in Spermatozoen von Mäusen; ABCA1, ABCA7, ABCG1 und ABCG4. In dieser Studie konnten ABCA1, ABCA7 und ABCG1 mittels Western-Blot und Immunzytochemie in murinen Spermatozoen nachgewiesen werden. Diese Transporter sind am Cholesteroltransport über Membranen in somatischen Zellen beteiligt. Die subzelluläre Lokalisation der Transporter ABCA1 und ABCA7 ist der in Abbildung 4 gezeigten Lokalisation von ABCG2 sehr ähnlich. Sowohl in der Studie von Morales *et al.*, als auch in den eigenen Untersuchungen beschränkt sich die Immunreaktion in der Immunzytochemie auf die akrosomale Region und das Mittelstück von epididymalen Spermatozoen von Mäusen. Die Studie von Morales *et al.* beschrieb eine Beteiligung der untersuchten Transporter im kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport. Dort konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der beschriebenen Transporter Auswirkungen auf den Cholesteroltransport aus Spermatozoenmembranen hat (Klucken, 2000; Selva, 2004; Morales, 2008).

### **ABCG2 ist in Spermatozoen funktionell aktiv**

Da der ABCG2-Transporter in der vorliegenden Untersuchung in Spermatozoen von verschiedenen Spezies nachgewiesen werden konnte stellte sich für weitere Untersuchungen die Frage, ob ABCG2 in reifen Spermatozoen funktionell aktiv ist.

Eine Aktivität von ABCG2 kann nachgewiesen werden, indem man die Konzentration eines ABCG2-Substrates in Zellen misst und inhibierte mit nicht-inhibierten Bedingungen vergleicht. Bekannte Substrate von ABCG2 sind die fluoreszierenden Farbstoffe Hoechst 33342 und Ethidiumbromid (Janvilisri, 2003; Robey, 2007). Der Auswärtstransport von Hoechst wird bei der durchflusszytometrischen Isolation von Stammzellen genutzt. Durch den aktiven Auswärtstransport kommt es in der sogenannten „Side-Population“ zu einer

---

geringeren Ansammlung des Farbstoffes im Vergleich zu anderen Zellen. Die Zellen der „side-population“ weisen wesentliche Stammzellmarker auf. Scharenberg *et al.* konnte zeigen, dass dieser Auswärtstransport von Hoechst 33342 auf dem Vorhandensein von ABCG2 und MDR in diesen Zellen beruht. Inhibiert man ABCG2 und MDR lassen sich keine „side-population“-Zellen isolieren (Zhou, 2001; Zhou, 2002; Scharenberg, 2002).

Mit den in Abbildungen 5 und 6 dargestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Auswärtstransport von Hoechst 33342 und Ethidiumbromid auch in HEK-293-Zellen auf dem Vorhandensein von ABCG2 beruht. Dafür wurde jedoch keine durchflusszytometrische Untersuchung gewählt, sondern es wurde die intrazelluläre Fluoreszenz von Hoechst 33342 und Ethidiumbromid in Küvetten quantifiziert. Negativtransfizierte HEK-293-Zellen zeigten einen geringeren Auswärtstransport von Hoechst 33342 und Ethidiumbromid, als mit ABCG2-cDNA-transfizierte HEK-293-Zellen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit beschriebenen Untersuchungen, dass ABCG2 Hoechst 33342 transportiert. Ebenfalls übereinstimmend mit früheren Studien von Janvilisri *et al.* sind die Ergebnisse, dass Ethidiumbromid ein Substrat von ABCG2 ist. In diesen Untersuchungen konnte ein Transport von Ethidiumbromid durch ABCG2 in *Lactococcus lactis* beobachtet werden (Zhou, 2001; Zhou, 2002; Scharenberg, 2002; Janvilisri, 2003).

Um zu untersuchen ob ABCG2 in Spermatozoen aktiv ist wurde in der vorliegenden Arbeit der Auswärtstransport von Hoechst und Ethidiumbromid mit und ohne Inhibition von ABCG2 gemessen. Dazu wurde die intrazelluläre Fluoreszenz in Spermatozoen gemessen. Da bovine Spermatozoen größer sind als die Spermatozoen der anderen in dieser Studie verwendeten Spezies, eigneten sich diese besonders für diese Versuche. Wie in den Abbildungen 7 und 8 gezeigt ist, kam es in bovinen Spermatozoen, unter Inhibition von ABCG2 durch den spezifischen Inhibitor Fumitremorgin C (10 µM), zu einer deutlichen Reduktion der intrazellulären Fluoreszenz, verglichen mit nicht-inhibierten Spermatozoen. Diese Beobachtung konnte sowohl für Hoechst

33342 als auch für Ethidiumbromid getroffen werden. Dies spricht für eine funktionelle Aktivität von ABCG2 in bovinen Spermatozoen. Da ABCG2 auch in Spermatozoen von Maus, Ratte und Mensch nachgewiesen werden konnte, ist eine Aktivität auch in Spermatozoen der genannten Spezies zu vermuten.

Lassalle *et al.* konnten anhand des Hoechst 33342-Transportes „side-population“-Zellen aus dem Hoden isolieren und zeigen, dass diese „side-population“ einen hohen Anteil an Stammzellen enthält. Der Auswärtstransport von Hoechst 33342 konnte, wie in den eigenen Untersuchungen durch Fumitremorgin C gehemmt werden (Lassalle, 2004).

Zusammen mit dem Nachweis von ABCG2-mRNA, der ebenfalls von Lassalle *et al.* gezeigt werden konnte sprechen diese Ergebnisse für eine Lokalisation von ABCG2 in Zellen der Spermatogenese. Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen konnten Lassalle *et al.* aber keinen aktiven Transport von Hoechst 33342 aus haploiden Zellen der Spermatogenese beobachten. Dass in den haploiden Zellen jedoch wie in den unreiferen Vorstufen auch mRNA von ABCG2 nachgewiesen werden konnte, interpretierten die Autoren als mRNA-Speichermechanismus, der ohne funktionelle Bedeutung für Spermatischen und Spermatozoen sei. Daher widerspricht der in dieser Studie erbrachte Nachweis von ABCG2 auf Proteinniveau (Abbildungen 3 und 4) und der Nachweis der funktionellen Aktivität der Interpretation von Lassalle *et al.*, dass die mRNA ohne funktionelle Relevanz für die Spermatozoen sei.

Da ABCG2 in der vorliegenden Untersuchung nicht nur in Spermatozoen verschiedenen Spezies nachgewiesen werden konnte sondern in bovinen Spermatozoen funktionell aktiv war, weist auf eine spezifische Aufgabe von ABCG2 in Spermatozoen hin. Für eine spezifische Aufgabe spricht zudem die Beobachtung, dass es nach einer relativ geringeren Expression von ABCG2-mRNA in tetraploiden Zellen der Spermatogenese, zu einer Erhöhung der Expression in haploiden Zellen kommt (Lassalle, 2004). Aus diesem Ansatz ergab sich im Weiteren die Fragestellung welche Aufgaben ABCG2 in Spermatozoen übernimmt.

### **ABCG2 in der Kapazitation**

Die Hauptaufgabe der Spermatozoen ist es die weibliche Eizelle zu befruchten. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen Spermatozoen einer Reihe biochemischer und biophysikalischer Änderungen durchlaufen, die zusammen als Kapazitation bezeichnet werden und letztendlich in der akrosomalen Reaktion resultieren (*Chang, 1951; Austin, 1952; Evans & Florman, 2002*). Die Abnahme des Cholesterolgehaltes aus Spermatozoenmembranen gilt als ein Initiator der Kapazitation. Die Entfernung von Cholesterol aus Spermatozoenmembranen resultiert in einer cAMP-PKA-abhängigen Signaltransduktion und in der Phosphorylierung von Tyrosinresten an Zielproteinen (*Visconti, 1995a, b; Cross, 1998; Visconti, 1999a, b; Travis, 2002*). Bislang ist es unklar über welche Mechanismen Cholesterol die Membranen in Spermatozoen verlässt. In anderen Zellsystemen ist bekannt, dass ABC-Transporter am Cholesteroltransport beteiligt sind (*Tall, 2000; Travis, 2001; Wang, 2004*). Neuere Studien weisen auch auf eine Beteiligung von ABCG2 am Transport von Cholesterol in somatischen hin. Der Gehalt an Cholesterol in Membranen von *Lactococcus lactis*, Insektenzellen und in den Zellen von Säugern hatte in diesen Studien einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von ABCG2. Je höher der Gehalt an Cholesterol in den Membranen war, desto höher war auch die ATPase-Aktivität von ABCG2. Die Aktivität der ATPase ist ein Indikator für die Transportaktivität des Transporters. (*Janvilisri, 2003; Pal, 2007; Storch, 2007; Telbisz, 2007*). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ABCG2 in der Lage ist sulfatierte Konjugate von Steroiden, Sterole und Cholat, eine aus Cholesterol synthetisierte Gallensäure zu transportieren (*Janvilisri, 2003; Suzuki, 2003; Janvilisri, 2005*). Dies führte zu der Vermutung, dass Cholesterol ein Substrat des ABCG2-Transporters ist. Aus dieser Hypothese ergab sich für die vorliegende Arbeit die Fragestellung, ob ABCG2, wie andere ABC-Transporter am kapazitationssassoziierten Cholesteroltransport in Spermatozoen beteiligt ist.

Um einen mögliche Beteiligung von ABCG2 in der Kapazitation nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit überprüft inwieweit eine Inhibition des Proteins die Kapazitation muriner Spermatozoen moduliert. Dazu wurden murine Spermatozoen in einem Medium inkubiert das die Kapazitation fördert und das mit dem ABCG2-Transport-Inhibitor Fumitremorgin C versetzt war. Als Kontrolle wurden Spermatozoen aus der gleichen Präparation unter nicht-inhibierten Bedingungen inkubiert. Die diesem Versuchsansatz zu Grunde liegende Hypothese war, dass ABCG2 beim Cholesteroltransport aus Spermatozoenmembranen beteiligt ist. Eine Inhibition des Proteins durch den ABCG2-Transport-Inhibitor Fumitremorgin C sollte so zu einer detektierbaren Beeinflussung der Kapazitation führen

Die Auswertung erfolgte in dieser Arbeit durch zwei verschiedene Methoden; den immunologischen Nachweis der Proteintyrosinphosphorylierung und die CTC-Färbung.

Der immunologische Nachweis der Proteintyrosinphosphorylierungen gilt als Referenz-Methode um die Kapazitation in Spermatozoen nachzuweisen (*Visconti, 1995a, b*). Dazu werden die Spermatozoenproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einem gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichteten Antikörper markiert. Anhand der Menge der phosphorylierten Proteine werden Rückschlüsse auf die Progression der Kapazitation gezogen, je mehr Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert sind, desto mehr ist die Kapazitation fortgeschritten (*Visconti, 1995a, b; Cross, 1998; Visconti, 1999a, b; Travis, 2002*).

Die CTC-Färbung ist eine etablierte Methode um zwischen den Ausprägungen „unkapazitiert“, „kapazitiert“ und „akrosomal reagiert“ in Spermatozoen verschiedenen Spezies zu unterscheiden (*Sailing, 1979; DasGupta, 1993; Fraser, 1995*). Diese Methode ist im hohen Maße von der Erfahrung des Untersuchers abhängig, da es oftmals schwierig ist die Ausprägung der Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop zu differenzieren. Die Auszählung der Proben wurde deshalb von einer zweiten Person überprüft. Um einen „Untersucher-Effekt“ in den Experimenten auszuschließen, wurden die Objektträger von

einer dritten Person chiffriert beschriftet. Damit wurde verhindert, dass der Untersucher wusste, aus welchen Inkubationsmedien die vorgelegten Spermatozoen stammten.

Durch Inhibition des ABCG2-Transporters mit FTC konnte in der vorliegenden Untersuchung kein Einfluss des Transporters auf die kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Trotz einer Inhibition durch den spezifischen ABCG2-Inhibitor Fumitremorgin C kam es zu keiner Veränderung in der Ausprägung des Bandenmusters im Vergleich zu den nicht-inhibierten Bedingungen, wie in Abbildung 9 zu erkennen ist. Auch in der CTC-Färbung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen inhibierten und nicht inhibierten Bedingungen in Bezug auf die Kapazitation beobachtet werden.

Eine denkbare Erklärung dafür, dass es trotz einer Inhibition nicht zu einer Veränderung der Bandenausprägung im Western-Blot kam, liefert die Hypothese das andere Transporter für Cholesterol aus der ABC-Familie in Spermatozoen aktiv sind. Morales *et al.* untersuchten in einer Studie ABC-Transporter in Spermatozoen. Dabei konnten die ABC-Transporter A1, A7 oder G1 in Spermatozoen nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, funktionelle Untersuchungen angeschlossen. Während in der eigenen Untersuchung der Fokus auf der Untersuchung der Kapazitation und der akrosomalen Reaktion lag, wurde in der Studie von Morales *et al.* zum Einen der Einfluss auf den Cholesteroltransport direkt und auf eine erfolgreiche Fertilisation gelegt. Zur Inhibition wurde nicht, wie in den eigenen Untersuchungen, ein spezifischer Inhibitor benutzt, sondern die Spermatozoen wurden mit entsprechenden Antikörpern koinkubiert. Es wurde anhand eines Cholesterol-Assays überprüft, wie viel Cholesterol aus der Membran entfernt wurde. Zudem erfolgte die Überprüfung, ob eine Inhibition der Transporter einen Effekt auf die Befruchtungsrate von kokultivierten Oozyten hat. Sowohl mit BSA als auch mit apoA-1 als Cholesterolakzeptoren führte eine Inhibition der Transporter zu einer signifikanten Reduktion des

Cholesteroltransportes in Spermatozoen aus Cauda, Corpus und Caput der *Epididymis*. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen führte die Inhibition jedes einzelnen der beteiligten Transporter bereits zu einer Reduktion des Cholesteroltransportes um bis zu ca. 40% (ABCG1). Spermatozoen, in denen die Transporter ABCA1, ABCA7 und ABCG1 inhibiert wurden, zeigten zudem eine geringere Befruchtungskapazität von kokultivierten Oozyten um bis zu 70%, im Gegensatz zu nicht inhibierten Bedingungen (Morales, 2008). Daraus lässt sich folgern, dass diese ABC-Transporter an der Fertilisation beteiligt sind. In den eigenen Untersuchungen hingegen führte eine Inhibition von ABCG2 lediglich zu einer nicht-signifikanten Reduktion des Anteils des den kapazitierten Spermatozoen entsprechenden Färbemusters. Unter nicht inhibierten Bedingungen entsprach der Anteil der kapazitierten Spermatozoen  $65,3 \pm 5,21\%$ . Unter Koinkubation mit dem ABCG2-Transport-Inhibitor Fumitremorgin C in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  hingegen entsprach der Anteil kapazitierter Spermatozoen  $67,0 \pm 1,00$  (Abbildung 11, Tabelle 3). Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,77 nicht signifikant. Zusammen mit den Ergebnissen, dass der Inhibitor auch keinen Einfluss auf die Ausprägung des Bandenmusters in den Versuchen der Proteintyrosinphosphorylierungen hatte, konnte gefolgert werden, dass ABCG2 keinen direkten Einfluss auf die Kapazitation muriner Spermatozoen hat. Eine Beteiligung von ABCG2 am kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport kann aber trotz des fehlenden Nachweises in den eigenen Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Untersuchungen von Morales *et al.* und den eigenen dargestellten Untersuchungen konnte erstmals der Nachweis von ABC-Transportern in reifen Spermatozoen erbracht werden, denen eine Rolle im Cholesteroltransport zugesprochen wird. Durch welchen Mechanismus genau Cholesterol während der Kapazitation die Membran von Spermatozoen verlässt ist größtenteils unklar (Travis, 2001). In somatischen Zellen ist beschrieben, dass ABCG1 und ABCA1 zusammen am Transport von Cholesterol auf *aopA-1*

wirken (*Gelissen, 2006*). Daher ist auch ein synergistischer Transport von Cholesterol durch ABC-Transporter in Spermatozoen denkbar. Geht man von einem Cholesteroltransport durch ABC-Transporter in Spermatozoen aus, so ist eine Hypothese, dass diese ABC-Transporter den Ausfall eines anderen ABC-Transporters kompensieren können. In einer Studie, die die Verteilung der ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 in Gehirnen von Mäusen untersuchte, führte der Ausfall von ABCB1 zu einer dreifach erhöhten Expression von ABCG2 (*Cisternino, 2004*). Ob der Ausfall eines ABC-Transporters in Spermatozoen zu einer vermehrten Expression der anderen am Cholesteroltransport beteiligten Transporter führt, bleibt zu überprüfen. Der Cholesteroltransport aus Spermatozoenmembranen ist ein sehr wichtiger Vorgang in der Fertilisation, da der Transport als Initiator der Kapazitation gilt und unkapazitierte Spermatozoen nicht in der Lage sind die weibliche Eizelle zu befruchten. Daher ist es wahrscheinlich, dass es im Organismus Kompensationsmechanismen für den Ausfall eines in diesem Prozess beteiligten Proteins gibt. Deshalb ist es möglich, dass die Inhibition von ABCG2 durch eine vermehrte Aktivität anderer Cholesterol-Transporter kompensiert wird und dass dies eine Beteiligung von ABCG2 in der Kapazitation kaschiert. Für diese Theorie würde auch die Tatsache sprechen, dass ABCG2-defiziente Mäuse in Untersuchungen von *Zhou et al.* keine Defizite in der Fertilisation zeigten. Dies wäre ein Ansatz für weitere Untersuchungen an ABC-Transportern in Spermatozoen. Um den Cholesteroltransport durch ABCG2 in Spermatozoen direkt zu untersuchen, wäre aus Vergleichszwecken ebenfalls eine Untersuchung der Cholesterolmengen mit und ohne Inhibition notwendig, wie sie beispielsweise in der Untersuchung von *Morales et al.* durchgeführt wurde (*Zhou, 2002; Morales, 2008*).

### **ABCG2 in der akrosomalen Reaktion**

Neben der Kapazitation ist auch die akrosomale Reaktion ein essentieller Bestandteil der erfolgreichen Fertilisation. Die Oozyte ist im weiblichen Genitaltrakt von der *Zona pellucida* umgeben. Diese Schicht aus Glykoproteinen ist für Spermatozoen *per se* nicht passierbar. Erst durch die exozytotische Ausschüttung von hydrolytischen Enzymen aus dem Akrosom können Spermatozoen diese Schicht durchdringen. Diese exozytotische Ausschüttung ist der funktionelle Endpunkt der Kapazitation und wird als akrosomale Reaktion bezeichnet (Evans & Florman, 2002). In der in Abbildung 4 gezeigten Lokalisation von ABCG2 kommt es hauptsächlich in der Region des Akrosoms zu einer Immunreaktion mit dem ABCG2-Antikörper. Diese spezifische Immunreaktion war nach einer Auslösung der akrosomalen Reaktion nicht mehr zu beobachten. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass ABCG2 die akrosomalen Reaktion beeinflusst.

Um zu ermitteln, ob ABCG2 einen Einfluss auf die akrosomale Reaktion hat, wurde wie bei der Überprüfung der Rolle von ABCG2 in der Kapazitation, Spermatozoen in einem Medium inkubiert, in denen Spermatozoen kapazitieren und in dem ABCG2 durch (5µM) FTC gehemmt wurde. Als Kontrollmedium diente ein entsprechendes Medium ohne FTC. Anhand zweier Färbungen wurde verglichen, ob die Inhibition von ABCG2 einen Effekt auf die Anzahl akrosomal reagierter Zellen hat.

Das Kalzium-Ionophor A23187 für die Auslösung der akrosomalen Reaktion zu benutzen ist umstritten, da es die physiologische Signaltransduktion die zur Auslösung der akrosomalen Reaktion führt umgeht). Trotz der Umgehung physiologischer Regulationsmechanismen ist das Kalzium-Ionophor A23187 ein oft genutzter und sicherer Auslöser der akrosomalen Reaktion *in vitro* (Das Gupta, 1993; Fraser, 1995; Witte, 2007).

Die Verwendung von Lektinen zur Bestimmung des akrosomalen Status (reagiert vs. intakt) ist eine etablierte Methode (Cross, 1986). Die *Pisum-sativum*-Färbung stellt eine klinische Routinemethode in der Diagnostik von Fertilitätsstörungen dar und eignet sich besonders wegen ihrer schnellen Verfügbarkeit, Reproduzierbarkeit und Einfachheit (Cummins, 1991). Permeabilisierte und mit PSA-FITC gefärbte, Spermatozoen können unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand der Fluoreszenz im Bereich des Kopfes in akrosomenintakte und akrosomen-reagierte Spermatozoen unterteilt und ausgezählt werden (Abbildung 13). Die ebenfalls verwendete CTC-Methode wurde bereits beschrieben.

In der Auswertung zeigte sich, dass weder mit der PSA- noch mit der CTC-Färbung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen inhibierten und nicht-inhibierten Bedingungen bezüglich der akrosomalen Reaktion nachgewiesen werden konnte. In den Färbungen zeigte sich, dass der Unterschied in den akrosomal reagierten Spermatozoen ohne Kalzium-Ionophor A23187 zwischen inhibierten und nicht-inhibierten Spermatozoen nicht signifikant war ( $44,8 \pm 6,76$  zu  $43,2 \pm 5,80$ , p-Wert = 0,855 in der PSA-Färbung,  $21,3 \pm 4,10$  zu  $23,0 \pm 1,00$ , p-Wert = 0,71 in der CTC-Färbung).

Mit einem prozentualen Anteil von  $54,8 \pm 6,47$  unter inhibierten und einem Anteil von  $66,0 \pm 4,55$  unter nicht-inhibierenden Bedingungen (p-Wert = 0,189) in der PSA-Färbung und einem Anteil von  $62,3 \pm 1,45$  zu  $55,3 \pm 3,18$  (p-Wert = 0,12) in der CTC-Färbung bewirkte ebenfalls die Koinkubation mit dem Kalzium-Ionophor A23187 ( $5\mu\text{M}$ ) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen

Auffallend war die unterschiedliche Detektion des Effektes von ABCG2 auf die die Anzahl akrosomal reagierter Zellen durch die beiden Färbemethoden nach Auslösung der akrosomalen Reaktion durch das Kalzium-Ionophor A23187. So wurden durch die PSA-Färbung nach Inhibition von ABCG2 mehr Zellen als akrosomal reagiert detektiert, in der CTC-Färbung jedoch weniger als unter nicht-inhibierten Bedingungen. Die Unterschiede zwischen

inhibierten und nicht-inhibierten Bedingungen waren jedoch in beiden Fällen nicht signifikant ( $p \geq 0,01$ )

Dagegen kam es ohne Zugabe des Kalzium-Ionophors A2318 zu einer großen Differenz zwischen den beiden Methoden in der Detektion der akrosomalen Reaktion. Hierbei wurde der relative Effekt des Inhibitors in beiden Färbungen ähnlich detektiert. So wurden unter gleichen Inkubationsbedingungen in der PSA-Färbung ca. doppelt so viele Zellen als akrosomal reagiert detektiert wie in der CTC-Färbung (Tabelle 4, Tabelle 6). Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die CTC-Färbung für die Detektion der akrosomalen Reaktion relevanter Änderungen nicht so schnell detektieren kann wie die PSA-Färbung. Während in der PSA-Färbung der akrosomale Inhalt direkt nachgewiesen wird, ist in der CTC-Färbung das Färbemuster von der Verteilung von Kalziumionen abhängig. Durch den massiven Einstrom von Kalzium-Ionen, zu dem es nach Inkubation mit Ionophor kommt, könnte es zu einer Beschleunigung der Prozesse kommen, die das Färbemuster in der CTC-Färbung Richtung Färbemuster „AR“ modifizieren. Dafür spricht, dass sich die Differenzen in der Detektion der akrosomalen Reaktion in den beiden Färbemethoden in Folge des massiven Überangebots an Kalziumionen nach Inkubation mit dem Ionophor relativieren. Hingegen konnte in Spermatozoen von Bullen und Menschen kein signifikanter Unterschied in der Detektion der akrosomalen Reaktion durch PSA und CTC festgestellt werden (*Das Gupta, 1993; Kaul, 2001*). In den eigenen Messungen wurden die Wirkung von Fumitremorgin C jedoch nicht zwischen den Färbungen verglichen, sondern es wurde innerhalb einer Färbung verglichen, ob der Inhibitor die Anzahl der Spermatozoen die akrosomal reagiert waren miteinander verglichen. Die Differenz des Effektes, den der ABCG2-Inhibitor Fumitremorgin C ohne Ionophor-Behandlung auf die akrosomalen Reaktion in der PSA und der CTC-Färbung hatte, ist fast identisch PSA  $\Delta 1,6$  %, CTC  $\Delta 1,7$  % (Tabelle 3 und Tabelle 5).

---

Zusammenfassen sprechen die Ergebnisse der CTC- und der PSA-Färbung dafür, dass ABCG2 keinen Einfluss auf die akrosomale Reaktion hat. Wie bereits in der Diskussion über die Rolle von ABCG2 in der Kapazitation beschrieben, ist es möglich, dass andere ABC-Transporter den Ausfall von ABCG2 kompensieren. Für die Aktivität von anderen für die Fertilisierung wichtigen Transportern in Spermatozoen spricht die Tatsache, dass auch eine kombinierte Inhibition der ABC-Transporter in der Studie von Morales nicht zu einer kompletten Verhinderung der Befruchtung von Oozyten führte (Morales, 2008). Um nachzuweisen, ob eine Kompensation durch andere ABC-Transporter den Ausfall von ABCG2 in der Wirkung auf die Fertilisation verdeckt, wäre eine kombinierte Untersuchung mit Inhibition der bereits bekannten ABC-Transportern in Spermatozoen notwendig.

### **Mögliche Aufgaben von ABCG2 in Spermatozoen**

Da ABCG2 in dieser Arbeit in Spermatozoen verschiedener Spezies nachgewiesen und eine funktionelle Aktivität gezeigt werden konnte, ist eine Funktion von ABCG2 in Spermatozoen wahrscheinlich. Da jedoch weder in der Kapazitation noch in der akrosomalen Reaktion eine Beteiligung des Proteins nachgewiesen werden konnte, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine spezifische Aufgabe des Proteins in Spermatozoen aufgezeigt werden. Zwar ist es durchaus möglich, dass auch andere ABC-Transporter in Spermatozoen in der Kapazitation und in der akrosomalen Reaktion synergistisch mit ABCG2 zusammenwirken, jedoch konnte diese Hypothese in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Abgesehen von der in dieser Arbeit untersuchten Rolle von ABCG2 in der Kapazitation und der akrosomalen Reaktion bietet die Literatur einen weiteren Ansatz für eine mögliche Rolle von ABCG2 in Spermatozoen; eine Rolle im Schutz vor schädlichen Substanzen:

Eine Hauptaufgabe des ABCG2-Transporters in vielen Geweben liegt nach Robey *et al.* in der Protektion dieser Gewebe vor xenobiotischen Substan-

---

zen. Zum Einen können dies Medikamente, wie Doxorubicin, Mitoxantron, Toxine und verschiedene Antibiotika sein, zum Anderen transportiert ABCG2 auch natürliche Produkte wie Phytoöstrogene (Janvilisri, 2005; Robey, 2007; Enokizono, 2008). Diese körperfremden Stoffe sind oftmals in der Lage Zellen in ihrem Stoffwechsel zu stören oder das genetische Material zu verändern. ABCG2 ist in Geweben daran beteiligt, die Konzentration dieser Substanzen niedrig zu halten, indem der Transporter diese Stoffe unter ATP-Hydrolyse aus den Zellen befördert (Robey, 2007). Gerade in exponierten Geweben, die häufig mit körperfremden Stoffen in Kontakt kommen wie dem Darm, oder Geweben die besonders sensibel auf Störungen des Zellstoffwechsel oder der genetischen Integrität reagieren (Gehirn, Plazenta) ist die Expression von ABCG2 besonders hoch. Sowohl im Gehirn als auch in der Plazenta ist der ABCG2-Transporter an Schranken zum Blutgefäßsystem beteiligt, die es den Geweben ermöglichen eine Barriere gegen schädliche Substanzen zu bilden. (Allikmets, 1998; Maliepaard, 2001; Robey, 2007; Enokizono, 2007; Mao, 2008).

Neben ABCG2 sind weitere Transporter daran beteiligt die Akkumulation von xenobiotischen Substanzen und eine damit einhergehende Toxizität in verschiedenen Geweben zu limitieren. In diesem Zusammenhang sind vor allem die *Multidrug-resistance-Transporter* MDR (ABCB1) und MRP1 (ABCC1) zu nennen (Sarkadi, 2006). Ein gut funktionierender Schutz gegen Medikamente und andere xenobiotische Substanzen sind auch im Reproduktionstrakt wichtig. Kommt es zu einer erhöhten Akkumulation dieser Substanzen in Zellen der Spermatogenese oder in Spermatozoen, besteht die Gefahr einer Veränderung des Genoms der Gameten. Spermatozoen transportieren das väterliche Erbgut zur Eizelle. Nach der Fusion des Spermatozoons mit der Eizelle kommt es zu einer Vereinigung des mütterlichen und des väterlichen Erbmaterials. Daher ist die genetische Integrität der Spermatozoen von entscheidender Bedeutung, da eine Übertragung von gesunder Erbsubstanz eine Voraussetzung für die Gesundheit der Nachkommen ist. Obwohl auch Spermatozoen mit geschädigter DNA in der Lage sind die weibliche Eizelle zu

befruchten, kann die Schädigung der DNA zu erheblichen Beeinträchtigungen der Folgegenerationen führen. Die Folgen reichen von Fehlgeburten bis zu malignen Erkrankungen im Kindesalter der Nachkommen (Olsen, 2005; Lewis, 2005). Daher ist eine Lokalisation von Transportern, die Zellen der Spermatogenese und Spermatozoen vor potentiell schädlichen Substanzen schützen, sinnvoll. Sowohl MDR, als auch MRP1 und ABCG2 sind in somatischen Zellen im Hoden nachgewiesen worden und dort an der Blut-Hoden-Schranke beteiligt. Diese Blut-Hoden-Schranke ist wichtig um das Stammzellkompartiment des Hodens gegen die Umgebung abzuschirmen und so eine Penetration von schädlichen Substanzen zu limitieren. Während in Studien von Bart *et al.* MRP hauptsächlich in den Sertoli-Zellen exprimiert wurde, fanden sich ABCG2 und MDR vornehmlich in den Endothelzellen und den myoiden Zellen der *Tubuli seminiferi*. Aus dieser Lokalisation schlossen die Autoren, dass die Transporter ihre Substrate aus den *Tubuli seminiferi* heraus schleusen (Wijnholds, 1998; Melaine, 2002; Bart, 2004; Enokizono, 2008). Die Spermatozoen aber müssen bevor sie die weibliche Eizelle erreichen eine weitere Reifung im Nebenhoden durchlaufen und sind dort nicht mehr durch die Blut-Hoden-Schranke geschützt. Enokizono *et al.* konnten zeigen, dass ABCG2 ebenfalls im Nebenhoden exprimiert wird und dort funktionell aktiv ist. So konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Phytoöstrogenen in den Nebenhoden von ABCG2-defizienten Mäusen im Gegensatz zu genetisch unveränderten Tieren erhöht war (Enokizono, 2007). Neben einer Lokalisation in somatischen Zellen des Hodens und des Nebenhodens konnte MDR ebenfalls in Zellen der Spermatogenese nachgewiesen werden. So kommt es nach Melaine *et al.* im Gegensatz zu den unreiferen Vorstufen in der Spermatogenese vor allem zu einem gehäuften Vorkommen in den späten Spermatischen und damit wahrscheinlich auch in den Spermatozoen. Dass MDR in den früheren Zellen der Spermatogenese eine geringere Expression aufwies, sahen die Autoren als Grundlage für eine erhöhte Anfälligkeit dieser Zellen für toxische Effekte durch Xenobiotika (Melaine, 2002).

Ebenso konnten Lassalle *et al.* zeigen, dass auch ABCG2-mRNA in Zellen der Spermatogenese nachgewiesen werden kann. Die Autoren interpretierten diese Expression ebenfalls als eine mögliche Rolle des Proteins im Schutz der Zellen vor toxischen Einflüssen (Lassalle, 2004). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, dass die zytotoxischen Substanzen Hoechst 33342 und Ethidiumbromid durch ABCG2 aus Spermatozoen befördert werden.

Somit könnten die Zellen der Spermatogenese nicht nur im Hoden durch die beschriebenen Transporter MDR, MRP und ABCG2 vor der Akkumulation von xenobiotischen Substanzen geschützt werden, sondern die Zellen der Spermatogenese selbst könnten durch ABC-Transporter vor Schädigungen durch xenobiotische Substanzen geschützt sein. In diesen Zusammenhang fallen die eigenen erhobenen Ergebnisse. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ABCG2 nicht nur in Spermatozoen verschiedener Spezies lokalisiert ist, sondern funktionelle aktiv ist. Zusammen mit der von Melaine *et al.* vermuteten Lokalisation von MDR in reifen Spermatozoen, weist dieses Ergebnisse auf eine mögliche Rolle von ABC-Transportern im Schutz von Spermatozoen vor schädigenden Substanzen hin. So besteht die Hypothese darin, dass auch reife Spermatozoen funktionell aktive ABC-Transporter besitzen, die es ihnen ermöglichen auch in der posttestikulären Reifungsphase gegen xenobiotische Substanzen geschützt zu sein.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58: 5337–5339
2. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama, Y (2007) Involvement of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in the Biliary Excretion Mechanism of Fluoroquinolones. *Drug Metab. Dispos.* 35: 1873-1879
3. Austin CR (1952) The ‘capacitation’ of the mammalian sperm. *Nature* 170: 326
4. Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD (2001) Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1520: 234–241
5. Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT (2004) The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood–testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 40: 2064–2070
6. Breitbart H (2002) Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J. Reprod. Immun.* 53: 151–159
7. Breitbart H (2002) Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187: 139–144
8. Brooks DE (1983) Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 36: 205-221

9. Carlson AE, Hille B, Babcock DF (2007) External Ca<sup>2+</sup> acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol.* 312(1): 183-192
10. Chan HC, Shi QX, Zhou CX, Wang XF, Xu WM, Chen WY, Chen AJ, Ni Y, Yuan YY. (2006) Critical role of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Mol Cell Endocrinol.* 250(1-2): 106-113
11. Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 997–998
12. Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell.* 66: 85-94
13. Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein ABCG2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* 64: 3296–3301
14. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15: 213–226
15. Cross, NL (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7-11
16. Cserepes J, Szentpetery Z, Seres L, Ozvegy-Laczka C, Langmann T, Schmitz G, Glavinas H, Klein I, Homolya L, Varadi A, Sarkadi B, Elkind NB (2004) Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun.* 320(3): 860-867

17. Cummins JM, Pember SM, Jequier, AM (1991) A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge – relationship to fertility and other seminal parameters. *J. Androl.* 12: 98–103
18. DasGupta S, Mills CL, Fraser LR (1993) Ca<sup>2+</sup>-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* 99: 135–143
19. Dean M, Allikmets R (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev.* 5: 779-785
20. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Res.* 11: 1156–1166.
21. Diop NK, Hrycyna CA (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* 44: 5420–5429
22. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15665–15670
23. Enokizono J, Kusuhara H, Ose A, Schinkel AH, Sugiyama Y (2008) Quantitative Investigation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Limiting Brain and Testis Penetration of Xenobiotic Compounds. *Drug Metab Dispos.* 36: 995-1002
24. Enokizono J, Kusuhara, H, Sugiyama (2007) Effect of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) on the Disposition of Phytoestrogens *Mol Pharmacol* 72: 967-975
25. Evans JP, Florman, HM (2002) The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat. Cell Biol.* 4: 57–63

26. Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, Bates SE (2006) Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett.* 235: 84-92
27. Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM (2001) Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114: 3543–3555
28. Fraser LR, McDermott CA (1992)  $Ca^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J Reprod Fertil* 96: 363–377.
29. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K, (1995)  $Ca^{2+}$  regulating mechanisms that modulate bull spermatozoa capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40: 233–241
30. Gadella BM, Harrison RA (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane *Development* 127: 2407-2420
31. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183: 1797–1806
32. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M (1997) Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med.* 3: 1337–1345
33. Hamilton DW, Jones AL, Fawcett DW (1969) Cholesterol biosynthesis in the mouse epididymis and ductus deferens: a biochemical and morphological study. *Biol. Reprod.* 1: 167-184

34. Harrison RAP (2004) Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev.* 67: 337–352
35. Harrison RAP, Miller NGA. (2000) cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55: 220–228
36. Hernandez-Gonzalez EO, Trevino CL, Castellano LE, de la Vega-Beltran JL, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A (2007) Involvement of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Mouse Sperm Capacitation. *J Biol Chem.* 282: 24397-24406
37. Higgins CF, Hiles ID, Salmond, GPC, Gill DR, Downie JA (1986) A family of related ATP binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-450
38. Holstein AF, Roosen-Runge EC (1981) Atlas of Human Spermatogenesis: *Grosse, Berlin*
39. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 107
40. Janvilisri T, Venter H, Shahi S, Reuter G, Balakrishnan L, van Veen H (2003) Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 278: 20645–20651
41. Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW (2005) Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem. J.* 385: 419–426

42. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk MA, Scheffer GL (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15649–15654
43. Juliano RL, Ling VA (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 152-162
44. Kalab P, Visconti P, Leclerc P and Kopf GS (1994) p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J. Biol. Chem.* 269: 3810-3817
45. Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V (1985) Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature.* 316: 820-823
46. Kaul G, Sharma, GS, Singh BK, Gandhi K (2001) Capacitation and acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and Pisum sativum agglutinin fluorescence assay *Theriogenology* 55;1457–1468
47. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.*1: 121–131
48. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 245: 1073-1080
49. Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 817-822

50. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* 279: 24218–24225
51. Krishnamurthy P, Schuetz, JD (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 381–410
52. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685
53. Langlais J (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* 20: 185-201
54. Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Testart J, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I (2004) 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* 131: 479-487
55. Lewis SE, Aitken RJ. (2005) DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322: 33-41
56. Litman T, Jensen U, Hansen A, Covitz KM, Zhan, Z, Fetsch P, Abati A, Hansen PR, Horn T, Skovsgaard T, Bates SE (2002) Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1565: 6-16
57. Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR (2003) Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem.* 278: 15922–15926.
58. Mahadevan M, Baker G (1984) Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: Wood C, Trounson A. editor. *Clinical In Vitro Fertilization.* Springer-Verlag, Berlin

- 
59. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61: 3458–3464
  60. Mao Q (2008) BCRP/ABCG2 in the Placenta: Expression, Function and Regulation. *Pharm Res.* 6:1244-1255
  61. Melaine N, Liénard MO, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H, Jégou B (2002) Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human *Biol Reprod.* 67: 1699-1707
  62. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes *Cancer Res.* 59: 8–13
  63. Morales CR Marat AL, Ni X, Yu Y, Oko R, Smith BT, Argraves WS (2008) ATP-binding cassette transporters ABCA1, ABCA7, and ABCG1 in mouse spermatozoa *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 472-477
  64. Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G (2005) How do male germ cells handle DNA damage?, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: 521–531.
  65. Pal A, Mehn D, Molnar E, Gedey S, Meszaros P, Nagy T, Glavinas H, Janaky T, von Richter O, Bathori G, Szente L, Krajcsi P (2007) Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther.* 321: 1085-1094
  66. Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, Greenberger LM (1998) Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.* 58: 5850-5858

67. Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*. 316: 817-819
68. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073
69. Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 39–57
70. Sailing PM, Storey BT (1979) Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Bio* 83: 544-555
71. Saraste M, Walker JE (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 144: 250–254
72. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A (2004) ABCG2 – a transporter for all seasons. *FEBS Lett* 567: 116–120
73. Sarkadi B, Laszlo H, Gergely S, Varadi A (2006) Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinmunity Defense System *Physiol Rev* 86: 1179–1236
74. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507–12

75. Scheffer GL, Maliepaard M, Pijnenborg AC, van Gastelen MA, de Jong MC (2000) Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res.* 60: 2589–2593
76. Schein HM (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. Morphology and growth characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 1164-1172
77. Selva DM, Hirsch-Reinshagen V, Burgess B, Zhou S, Chan J, Mclsaac S, Hayden M, Hammond GL, Vogl AW, Wellington CL (2004) The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J. Lipid Res.* 45: 1040-1050
78. Shams-Borhan G, Harrison RAP (1981) Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gamete Res* 4: 407–432
79. Storch CH, Ehehalt R, Haefeli WE, Weiss J (2007) Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 257–264
80. Suarez SS, Ho HC (2003) Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol.* 49: 351–356
81. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* 278: 22644–22649
82. Tall AR, Wang N (2000) Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest* 106: 1205–1207

- 
83. Telbisz A, Muller M, Ozvegy-Laczka C, Homolya L, Szente L, Varadi A, Sarkadi B (2007) Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768 (11): 2698-2713
  84. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350–4354.
  85. Travis AJ, Kopf GS (2002) The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.* 110: 731–736
  86. Travis, AJ (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev. Biol.* 240: 599-610
  87. Tulsiani DRP, Yoshida-Komiya H, Araki Y (1997) Mammalian fertilization: A carbohydrate mediated event. *Biol.Reprod.* 57: 487–494
  88. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129–1137
  89. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139–1150
  90. Visconti PE (1999a) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm.  $\beta$ -Cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* 274: 3235-3242

91. Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. (1999b). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214(2):429-443.
92. Vredenburg-Wilberg WL, Parrish JJ (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation *Mol Reprod Dev* 40: 490-502.
93. Wang XF, Zhou CX, Shi QX, Yuan YY, Yu MK, Ajonuma LC, Ho LS, Lo PS, Tsang LL, Liu Y, Lam SY, Chan LN, Zhao WC, Chung YW, Chan HC (2003) Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat Cell Biol.* 5: 902-906
94. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9774–9779
95. Ward CR, Storey BT, Kopf GS (1994) Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 269: 13254–13258
96. Wennemuth, G, Carlson, AE, Harper, AJ, Babcock DF (2003) Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup>-channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130: 1317–1326
97. Wijnholds, J Scheffer, GL, van der Valk, M, van der Valk, P, Beijnen, J, Scheper, RJ, Borst, P (1998) Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *J. Exp. Med.* 188, 797– 808
98. Witte S, Schäfer-Somi S (2007) Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 181–193

99. Xia CQ, Liu N, Yang D, Miwa G, Gan LS (2005) Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 33: 637–643
100. Xie F, Garcia M, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal B, Gossen J, Esposito G, van Duin M, Conti M (2006) Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization *Developmental Biology* 296: 353–362
101. Xu J, Peng H, Chen Q, Liu Y, Dong Z, Zhang JT (2007) Oligomerization Domain of the Multidrug Resistance-Associated Transporter ABCG2 and Its Dominant Inhibitory Activity *Cancer Res* 67: 4373-4381
102. Xu WM, Shi QX, Chen WY, Zhou CX, Ni Y, Rowlands DK (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 9816-9821
103. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7: 1028–1034
104. Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12339–12344

## 7 Publikationen/Danksagung

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

*Biochemical and Biophysical Research Communications* 378: 302-307, 9  
Januar 2009

### **ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and associated with the outer acrosomal membrane**

*Christian Scharenberg, Nadja Mannowetz, Robert W. Robey, Cornelia Brendel, Philip Repges, Tim Sahrhage, Thomas Jähn, Gunther Wennemuth*

Vielen Menschen, die mir den Abschluss der Dissertation ermöglichten, bin ich zu Dank verpflichtet:

An allererster Stelle meinem Doktorvater und Freund Prof. Dr. Gunther Wennemuth, der mich weit über das normale Maß hinaus bei der Anfertigung der Dissertation mit Geduld, Hinweisen und Freundschaft unterstützt hat.

Meiner Familie, die mich immer finanziell und vor allem emotional unterstützt hat und mir die nötige Ruhe schenkte.

Den Mitarbeitern der Anatomischen Institute in Marburg und Homburg, die mich mit offenen Armen empfangen haben und mir bei allen anfallenden Problemen des Laboralltags zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Nadja Mannowetz, Frau Ingrid Lang und natürlich Herrn Christian Scharenberg (Wo ist das Gas?).

## 8 Tabellarischer Lebenslauf

|                             |                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Name:</b>                | Reppes                                                                                                                                                                                          |
| <b>Vorname:</b>             | Philip                                                                                                                                                                                          |
| <b>Geburtsdatum:</b>        | 03. 12. 1980                                                                                                                                                                                    |
| <b>Geburtsort:</b>          | Willich                                                                                                                                                                                         |
| <b>Eltern:</b>              | Peter Reppes<br>Agnes Reppes geb. Flören                                                                                                                                                        |
| <b>Geschwister:</b>         | Hendrik Reppes<br>Laura Reppes<br>Pia Reppes                                                                                                                                                    |
| <b>Schulbildung:</b>        |                                                                                                                                                                                                 |
| 1986 bis 1990:              | Grundschule „Sollbrüggen“, Krefeld                                                                                                                                                              |
| 1990 bis 2000:              | Gymnasium „Fabritianum“, Krefeld                                                                                                                                                                |
| 06/2000:                    | Erlangung der allgemeinen Hochschulreife                                                                                                                                                        |
| <b>Hochschulausbildung:</b> |                                                                                                                                                                                                 |
| ab 04/2002:                 | Studium der Zahnmedizin an der Philipps-Universität Marburg                                                                                                                                     |
| bis 06/2007:                | Staatsexamen und Erlangung der Approbation als Zahnarzt                                                                                                                                         |
| seit 10/2007:               | Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg                                                                                                                                    |
| <b>Promotion:</b>           |                                                                                                                                                                                                 |
| seit 03/2005:               | Beginn der Arbeiten am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg und der Universität des Saarlandes zur Erlangung des doctor medicinae dentariae                           |
| Herbst 2005:                | Stipendiat der „Medizinstiftung Marburg“: Aufenthalt am Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle, USA bei Prof. Dr. Donner Babcock und Prof. Dr. Bertil Hille |
| 07/2007-10/2007:            | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie und Zellbiologie/Universität des Saarlandes                                                                                             |
| <b>Beruf:</b>               | seit 01/2008 Assistenz Zahnarzt in niedergelassener Praxis in Marburg                                                                                                                           |