

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

**Verteilung der
ATP-binding-cassette Transporter
ABCG1, ABCG2, ABCB9 und ABCE1
in murinem Hodengewebe**

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

2011

vorgelegt von Tim Oliver Sahrhage
geb. am 23.05.1979
in Bielefeld

Für meine Eltern

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität des Saarlandes am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Referent: Univ.-Prof. Dr. Gunther Wennemuth

1. Korreferent n.n.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
2. EINLEITUNG	11
2.1. Spermato-genese.....	11
2.2. Morphologie des Spermatozoons	14
2.3. Kapazitation	17
2.4. ATP-binding-cassette (ABC) Transporter.....	20
2.4.1. Unterfamilie G.....	21
2.4.1.1. ABCG1	22
2.4.1.2. ABCG2 (BCRP/MRP).....	23
2.4.2. Unterfamilie B	25
2.4.2.1. ABCB9 (TAP-like).....	26
2.4.3. Unterfamilie E	27
2.4.3.1. ABCE1 (RLI).....	27
2.5. Zielsetzung der Arbeit.....	28
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1. Materialien.....	30
3.1.1. Verwendete Geräte.....	30
3.1.2. Programme zur Ergebnisauswertung	31
3.1.3. Verwendete Puffer und Lösungen	31
3.1.4. Verwendete Antikörper	34
3.1.5. Versuchstiere.....	35
3.2. Methoden.....	36
3.2.1. Immunhistochemie.....	36
3.2.1.1. Verwendetes Gewebe	36

3.2.1.2.	Einfachmarkierungen an Paraffinschnitten mittels Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)	36
3.2.1.3.	Gewinnung muriner Spermatozoen	37
3.2.1.4.	Anfertigung der Spermatozoenausstriche.....	38
3.2.1.5.	Immunfluoreszenz	38
3.2.2.	Lipidanalyse	39
3.2.2.1.	Lipidextraktion aus Spermatozoen.....	39
3.2.2.2.	Dünnschichtchromatographie der Membranlipide	40
3.2.3.	Western Blot-Analyse	41
3.2.3.1.	Herstellung der Gewebeextrakte und Proteinbestimmung	41
3.2.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.2.3.3.	Proteinfärbung mit Ponceau-Rot.....	42
3.2.3.4.	Immunlogischer Nachweis der Proteine.....	43
4.	ERGEBNISSE.....	44
4.1.	<i>Immunologischer Nachweis von ABCG2 innerhalb der Spermato-genese.....</i>	44
4.1.1.	Immunhistochemische Ergebnisse.....	44
4.1.2.	Fluoreszenznachweis	46
4.2.	<i>Nachweis von ABCG2 in reifen Spermatozoen.....</i>	47
4.3.	<i>ABCB9 innerhalb der Spermato-genese.....</i>	48
4.4.	<i>Lokalisation von ABCB9 in verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens.....</i>	49
4.4.1.	Immunhistochemische Ergebnisse.....	49
4.4.2.	Fluoreszenznachweis	51
4.5.	<i>Nachweis einer regional spezifischen Expression von ABCB9 im Ductus epididymidis.....</i>	52
4.6.	<i>Nachweis von ABCB9 in reifen Spermatozoen.....</i>	53
4.7.	<i>ABCE1 innerhalb der Spermato-genese.....</i>	54
4.8.	<i>Nachweis von ABCE1 in reifen Spermatozoen.....</i>	55

4.9. Nachweis von ABCG1 im Ductus epididymidis	56
4.9.1. Ergebnisse der Western-Blot-Analyse.....	56
4.10. Einfluss des ABCG2-spezifischen Inhibitors Fumitremorgin C auf den kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport muriner Spermatozoen	57
4.10.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis	57
5. DISKUSSION.....	61
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	70
7. PUBLIKATIONEN / DANK	81
7.1. Publikationen.....	81
7.2. Danksagung.....	82

1. ZUSAMMENFASSUNG

Eine wesentliche und essentielle Aufgabe von Zellen aller Organismen ist der Transport von Stoffen und Molekülen durch ihre Lipidmembranen. Eine der wichtigsten Membran-Transporter Familien, die diese Funktion erfüllt und reguliert ist die der ATP-binding-cassette (ABC) Transporter Familie. Sie ermöglicht es den Zellen verschiedene Metabolite, wie Zucker, Aminosäuren, Lipide sowie Arzneimittel, durch ihre Lipidmembranen zu transportieren. Diese Transporter sind Bestandteile sowohl aller normalen als auch maligne entarteter Gewebe.

Neben ihrer Rolle im Ablauf vieler entscheidender Stoffwechselwege in den Zellen können Mutationen innerhalb der Gene dieser Proteine bekannte Krankheiten wie Mukoviszidose, Anämien oder Arzneimittelunverträglichkeiten verursachen. Basierend auf bekannten hohen Expressionen wurde in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen der ABC-Transporter ABCB9, ABCE1, ABCG1 und ABCG2 in murinem Hodengewebe auf Proteinebene nachgewiesen. Es wurden immunologische Nachweisverfahren wie Western Blot und die Immunhistochemie verwendet.

Während der Entwicklung im Hoden und der weiteren Reifung im Nebenhoden erfahren die Spermatozoen, Träger der Erbanlagen des Mannes, Veränderungen in der Lipidzusammensetzung ihrer Membranen. Die Gesamtheit dieser Veränderungen, der Erwerb ihrer Motilität im männlichen Nebenhoden und die weitere Reifung der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt, werden als Kapazitation bezeichnet. So war ein zusätzlicher systematischer Ansatzpunkt dieser Arbeit eine mögliche Mitbeteiligung der ABC-Transporter während der Kapazitation.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition von ABCG2 durch Fumitremorgin C den kapazitationsassoziierten Cholesterolefflux aus Membranen muriner Spermatozoen moduliert. Daneben beschreibt diese Arbeit die Verteilung der ABC-Transporter ABCB9, ABCE1, ABCG1 und ABCG2 im männlichen Genitaltrakt der Maus.

SUMMARY

A substantial and essential function of cells of all organisms is the transport of substrates and molecules across their lipid membranes. One of the most important membrane transporters families which fulfills and regulates this function is the ATP-binding-cassette (ABC) transporter family. It enables the cells to transport different metabolites like sugar, amino acids, lipids, as well as drugs across their lipid membranes. These transporters are components of all normal as well as malignantly degenerated tissues.

Besides their role in the process of many important metabolic pathways in the cells mutations within the genes of these proteins can cause known diseases like cystic fibrosis, anaemias or drug intolerance. Based on known high expression patterns the appearance of the ABC-transporter ABCB9, ABCE1, ABCG1 and ABCG2 was detected in the present work at protein level in murine testis. Methods like immunoblotting and immunohistochemistry were used.

The spermatozoa, which are responsible for the hereditary disposition of the man, undergo modification in the constitution of lipids of membranes during the development in the testis and the other maturation in the epididymis. The totality of these changes, i.e. the acquisition of the spermatozoa's motility in the male epididymis and their maturation in the female genital tract, are called capacitation. An additional starting point of this work was the possibility of a coparticipation of the ABC-transporters during the capacitation.

It could be shown for the first time that the inhibition of ABCG2 by using Fumitremorgin C modulates the capacitation mediated cholesterol efflux of membranes from spermatozoa. Additionally the ABC-transporter ABCB9, ABCE1, ABCG1 and ABCG2 were detected in murine testis in this work.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding-cassette
A. dest.	Aqua destillata
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BCRP	Breast cancer resistant protein
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cy3	Carbocyanin 3
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
DAB	Diaminobenzidin-terahydroxychlorid
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FTC	Fumitremogin C
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
MDR	Multi drug resistance
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSD	Membrane spanning domain
NBD	Nucleotide binding domain
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phosphatidylethanolamin
P-gp	P-glycoprotein
PL	Phospholipid
PM	Plasmamembran

PS	Phosphatidylserin
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonucleic acid
SM	Sphingomyelin
TAP	Antigen Peptid Transporter
TBS	Trishydroxymethyl-aminomethan-buffered saline

2. EINLEITUNG

2.1. *Spermatogenese*

Der Prozess der Spermatogenese beschreibt die Entwicklung und Reifung der männlichen Gamete im Hoden. Die Bildung der Spermatozoen erfolgt in den *Tubuli seminiferi contorti* des Hodens, den Hodenkanälchen. Während der Spermatogenese durchlaufen die männlichen Keimzellen einen schrittweisen Prozess der in drei Entwicklungsphasen eingeteilt werden kann: die Phase der Multiplikation der Spermatogonien, die Phase der Meiose und die Phase der Differenzierung zu Spermatozoen, die Spermiogenese. Die Spermatozoenentwicklung nimmt bei der Maus etwa 35 Tage in Anspruch. Die des Menschen dauert etwa 64 Tage. Die Spermatogenese beginnt mit den Spermatogonien Typ A, die der Basalmembran der Tubuli seminiferi aufliegen und eine mitotische Proliferation durchlaufen. Durch diese mitotischen Teilungen kommt es zur Aufrechterhaltung der Spermatogonien (homonyme Teilung) und zum Einschleusen von Tochterzellen in den Zyklus der Spermatogenese (heteronyme Teilung). Spermatogonien Typ A differenzieren sich fortlaufend zu Spermatogonien Typ B, aus deren mitotischer Teilung die primären Spermatozyten (Spermatozyte I.Ordnung) hervorgehen. Es folgt die erste Reifeteilung (Meiose I). In diesem auch als Präleptotän-Stadium bezeichneten Schritt erfolgt die letzte DNA-Replikation der Spermatogenese. Die primären Spermatozyten treten in die Prophase der Meiose ein, in der es zur Chromosomenpaarung und Neukombination des genetischen Materials kommt. Aus einer primären Spermatozyte entstehen zwei sekundäre Spermatozyten (Spermatozyte II.Ordnung). Diese treten direkt in die sich anschließende zweite Reifeteilung ein (Meiose II). Aus ihr entstehen aus zwei diploiden Spermatozyten II.Ordnung vier haploide Spermatisden. Die haploiden Spermatisden reifen weiter zu Spermatozoen. Der Prozess der Spermiogenese vollzieht sich in vier verschiedenen Phasen:

1. Kondensation des Chromatingerüsts
2. Akrosomenbildung
3. Bildung des Spermatozoenschwanzes
4. Zytoplasmareduktion

Das Chromatin des Kerns verdichtet sich und es kommt zu einer exzentrischen Verlagerung des Kerns. Durch Abschnürung kleiner Vakuolen aus dem Golgi-Apparat bildet sich das akrosomale Vesikel (Kierszenbaum and Tres 2004). Es enthält für die Fertilisation wichtige hydrolysierende Enzyme. Mit fortschreitender Reifung legt sich das membranumschlossene Akrosom kappenartig um den Kern des reifen Spermatozoons. Die dem Zellkern zugewandte Seite wird als innere Akrosomenmembran, die an die Plasmamembran angrenzende Seite als äußere Akrosomenmembran bezeichnet (Asano et al. 2009). Das Schwanzstück des Spermatozoons entsteht aus dem Zentriol und besitzt eine 9 x 2 Mikrotubulianordnung (Inaba 2007). Der überschüssige Zytoplasmarest wird von den Sertolizellen phagozytiert, wodurch die Spermatozoen in die Phase der Spermiation eintreten und in das Lumen der Hodenkanälchen transportiert werden. Dort sind die Spermatozoen morphologisch ausgereift, jedoch besitzen sie noch nicht die Fähigkeit zur Fertilisation. Sie werden anschließend im Nebenhoden gespeichert, zu dem sie durch einen gerichteten Flüssigkeitsstrom gelangen und eine weitere Reifung durchlaufen (Holstein et al. 2003; Gadella et al. 2008).

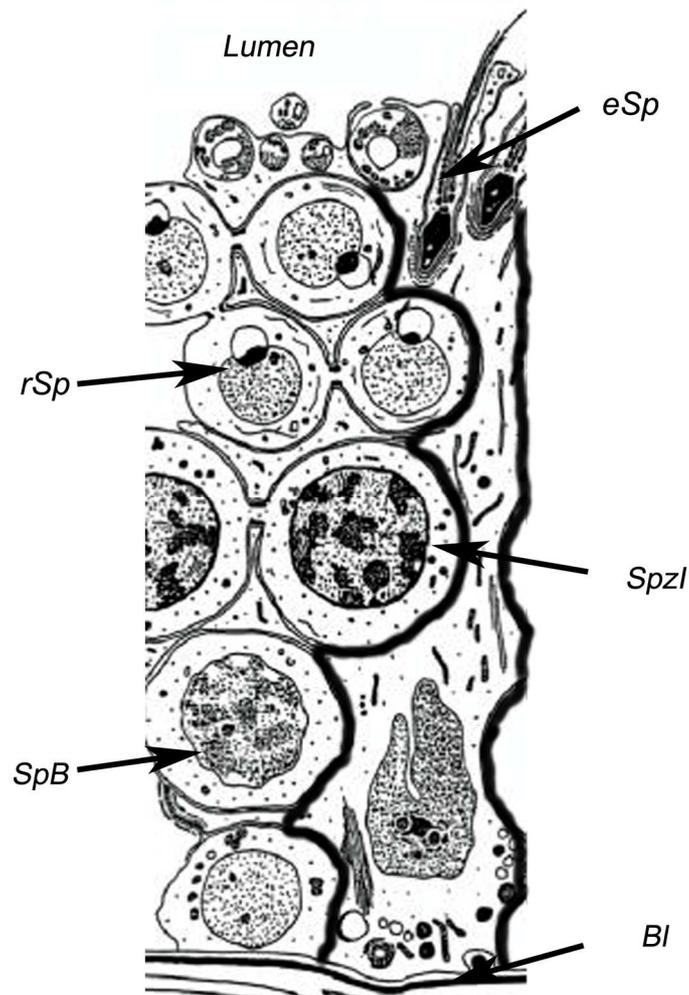


Abbildung 1 **Spermatogenese mit ihren Phasen und Zelltypen in einem Tubulus seminiferus (Ausschnitt).** Die Sertolizellen (schwarz hervorgehoben) erstrecken sich vom basalen bis hin zum luminalen Kompartiment, in dem die elongierten, noch nicht befruchtungsfähigen Spermatozoen (eSp) zu erkennen sind. Die Pfeile zeigen Basallamina (Bl), Spermatogonie Typ B (SpB), Spermatozyt I. Ordnung (SpzI) sowie runde Spermatisden (rSp) (modifiziert nach Holstein et al. 2003).

2.2. *Morphologie des Spermatozoons*

Reife Spermatozoen sind hochpolarisierte 50 – 70 µm lange, bewegliche Zellen und weisen eine mehrgliedrige, hoch spezifische Struktur auf. Sie bestehen aus einem Kopf, einem Hals und einem Schwanz, der sich in ein Mittel-, Haupt-, und ein Endstück unterteilen lässt. Dieser Grundaufbau ist bei allen Säugetieren identisch, jedoch gibt es Abweichungen bezüglich ihrer Struktur (Holstein et al. 2003; Morrow 2004). Der Kopf des Spermatozoons enthält die Erbanlagen der männlichen Keimzelle. Im Mittelstück liegen zirkulär angeordnet, parallel zum zentral gelegenen Achsenfaden, dem Axonema, die Mitochondrien. Sie liefern dem Spermatozoon die Energie in Form von ATP, die es zur Fortbewegung benötigt. Das Axonema ist der bewegliche Schwanzteil des Spermatozoons. Es hat eine geißelförmige Struktur und besitzt einen typischen, geordneten Bündelaufbau durch ein 9 x 2 Mikrotubulisystem. Die vordere Hälfte des Spermatozoenkopfes wird von dem Akrosom umgeben (Holstein et al. 2003). Interaktionen mit der weiblichen Eizelle finden nur im vorderen Teil des Kopfes statt. Er enthält den Kern mit dem haploiden Chromosomensatz und das Akrosom, ein spezialisiertes Sekretvesikel mit hydrolisierenden Enzymen, die zur Penetration der weiblichen Eizelle (*Zona Pellucida*) benötigt werden. Das Spermatozoon bindet an die *Zona Pellucida*, wodurch die Akrosomenreaktion eingeleitet wird und die Plasmamembran mit der äußeren Akrosomenmembran fusioniert. Es kommt zur anschließenden Verschmelzung von Spermatozoon und Eizelle (Breitbart 2002). Die Plasmamembran schützt das Spermatozoon gegen äußere Einflüsse, wie die sich wechselnden Milieus, verhindert eine spontane Akrosomenreaktion und ist für die Entwicklung und Reifung des Spermatozoons im Nebenhoden mit verantwortlich. Während der Reifung und der Wanderung des Spermatozoons im Epididymis, der Ejakulation und während seiner Wanderung im weiblichen Genitaltrakt finden zahlreiche Umbauvorgänge in der Plasmamembran des Spermatozoons statt (Jones 1989). Wie durch *Singer* und *Nicholson* beschrieben, besteht die Membran aus einer Phospholipiddoppelschicht („*Fluid-Mosaic*“) (Singer and Nicolson 1972).

Zu den wichtigsten in Membranen eingebauten Phospholipiden gehören Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SM) und Phosphatidylserin (PS). Bei vielen Zelltypen unterscheiden sich die beiden Schichten der Plasmamembranen in ihrer Zusammensetzung. Die Aminophospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin sind auf der inneren Seite der Membran konzentriert, die neutralen Phospholipide Sphingomyelin und Phosphatidylcholin auf der äußeren Seite (Verkleij et al. 1973). Spezialisierte Strukturen wie „*lipid-rafts*“ befinden sich in der Plasmamembran (Simons and Toomre 2000). Die „*lipid-rafts*“ – Hypothese besagt, dass Cholesterol-Sphingomyelin-Mikrodomänen in sämtliche zelluläre Funktionen wie Membrantransporte, Zellverbindungen und Signaltransduktionen integriert sind (Simons and Ikonen 1997). Eine der wichtigsten Eigenschaften dieser „*lipid-rafts*“ ist das Ein- und Ausschleusen verschiedener Proteine. Die Mikrodomänen setzen sich aus bisher noch ungeklärten Mechanismen aus Cholesterol, Sphingomyelin, Gangliosiden, Phospholipiden und Lipiden mit langen Fettsäureketten zusammen (Pike 2006). *Gadella* und Mitarbeiter zeigten, dass in Lipidmembranen von Spermatozoen die Phospholipide ungleichmäßig verteilt sind, sie in der Membran einer ständigen Umverteilung unterzogen sind und somit eine Eigenbewegung verursachen (*Gadella et al.* 1999). Die Plasmamembran des Spermatozoonkopfes besitzt einen hohen Anteil des Lipides Cholesterol. Von Cholesterol ist bekannt, dass es die Fluidität von Zellmembranen gewährleistet. Gemeinsam mit anderen Lipiden erhöht Cholesterol die Stabilität der Lipidmembran und spielt eine wichtige Rolle bei dem Prozess der Kapazitation. Gemeinsam mit anderen Membranbestandteilen ist es am Membrantransport beteiligt. Während der Passage des Spermatozoons durch den weiblichen Genitaltrakt wird Cholesterol aus der Membran durch bisher noch unbekannte Mechanismen herausgelöst und von Albumin und High density Lipoproteinen aufgenommen (Langlais et al. 1988; Oram and Vaughan 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass es Transportmechanismen geben muss, die an diesem Herauslösen und dem Efflux von Cholesterol aus der Membran mitbeteiligt sind.

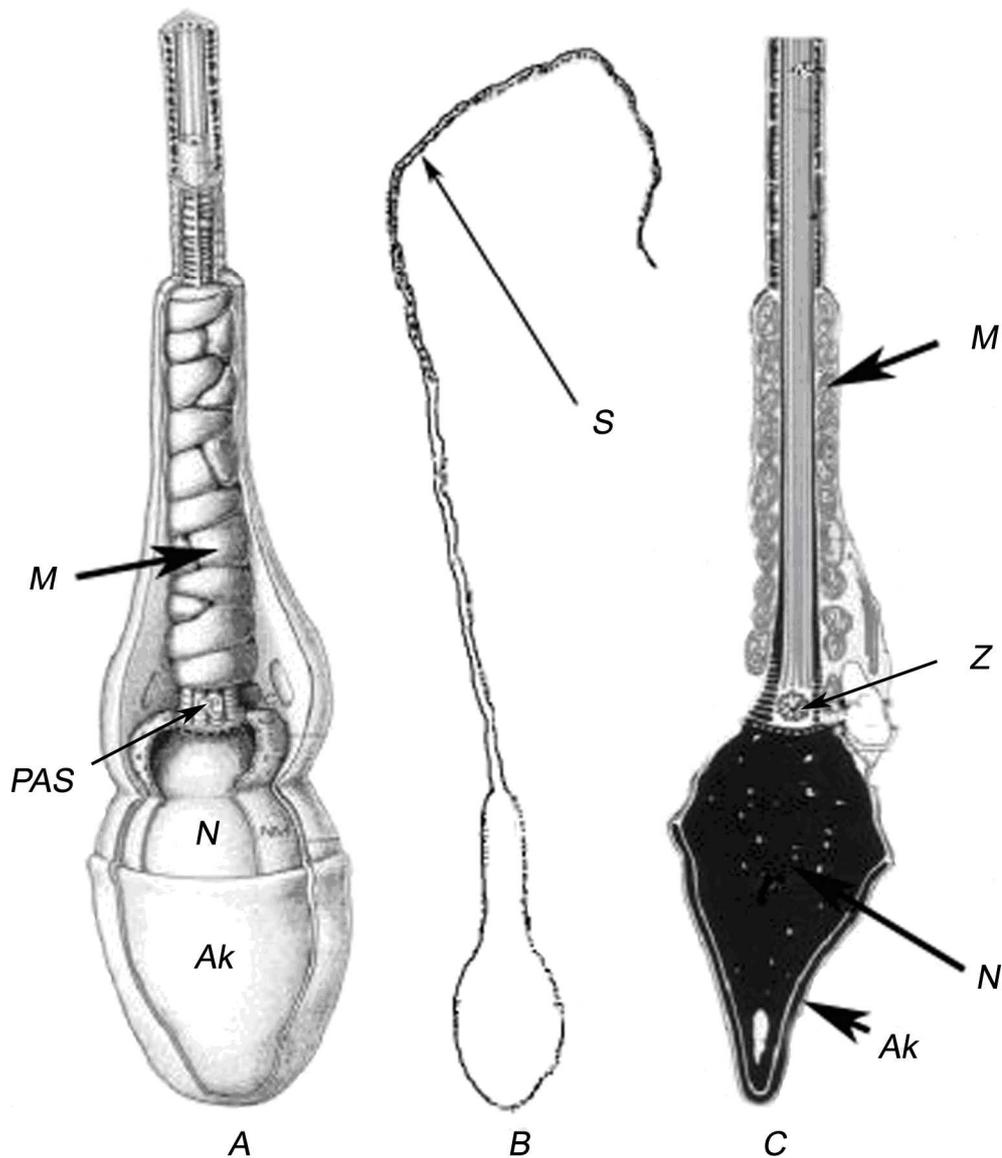


Abbildung 2 Darstellung eines reifen humanen Spermatozoons (A-C). Der Spermatozoenkopf mit seinem im Kern dicht kondensierten, genetischen Material (N), dem lang gezogenen, schlanken Schwanz (S) und den im Mittelstück aneinander gereihten Mitochondrien (M). Im vorderen Teil befindet sich das Akrosom (Ak), das zur Befruchtung der Oozyte dient. Zusätzlich sind noch die postakrosomale Scheide (PAS) und das Zentriol (Z) dargestellt. Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung (A), eine Skizze (B) und eine elektronenmikroskopische Abbildung (C) eines humanen Spermatozoons (modifiziert nach Holstein et al. 2003).

2.3. Kapazitation

Frisch ejakulierte Spermatozoen sind nicht unmittelbar nach der Ejakulation in der Lage die weibliche Eizelle zu befruchten. Sie müssen zuerst eine gewisse Zeit im weiblichen Genitaltrakt verbringen. Dieser Reifungsprozess, bei dem die Spermatozoen weitere Reifungsvorgänge durchlaufen und die Fähigkeit der Hyperaktivität erlangen um sich zielgerichtet fortzubewegen, wurde von *Austin* und *Chang* Anfang der 50er Jahre unabhängig voneinander als Kapazitation identifiziert (Chang 1951; Austin 1952). Durch diese Prozesse, bei denen es zu einer Signalkaskade kommt, erlangt das Spermatozoon die Fähigkeit die Hülle der Eizelle, die Zona pellucida, zu erkennen, an sie zu binden und die Akrosomenreaktion einzuleiten und erfolgreich durchzuführen.

Visconti et al. zeigten 1995, dass die Kapazitation *in vitro* durch verschiedene Induktoren, die auch im weiblichen Genitaltrakt vorkommen, eingeleitet werden kann (*Visconti et al.* 1995a; *Visconti et al.* 1995b). Zu diesen gehören Bikarbonat, Calcium und Serumalbumin welche die Induktion einer cAMP-Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung von Tyrosinresten an Zielproteinen bewirken (*Gadella and Harrison* 2000; *Harrison and Miller* 2000; *Harrison* 2004). In einer *in-vitro*-Untersuchung von *Brandt* und *Hoskins* ließ sich die Motilitätssteigerung an mit cAMP-inkubierten Spermatozoen zeigen. Spermatozoen ohne Zugabe von cAMP zeigten keine Motilität. Es wird angenommen dass cAMP hinsichtlich der Regulation der Spermatozoenmotilität ein wichtiger Faktor ist (*Brandt and Hoskins* 1980).

Neben der Erlangung der Motilität unterliegen Spermatozoen auch anderen Reifungsvorgängen. So ist die Spermatozoenmembran, um eine erfolgreiche Kapazitation zu gewährleisten, auf Bikarbonat als Initiator angewiesen. Es induziert die Aktivierung einer löslichen Adenylatzyklase. Die Konzentration von Bikarbonat ist dabei im Bereich des Epididymis niedriger als im weiblichen Genitaltrakt (*Rodriguez-Martinez et al.* 1990). Das bei der Aktivierung der löslichen Adenylatzyklase gebildete cAMP kann über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) eine Proteinphosphorylierung verschiedener Signalproteine stimulieren.

Neben der Phosphorylierung von Signalproteinen löst Bikarbonat das ebenfalls Adenylatzyklase-abhängige „*Phospholipid-Scrambling*“ aus (Gadella and Harrison 2000). Es wird als eine Umverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran beschrieben. *In vitro* konnte gezeigt werden dass es zu einer ebenfalls PKA-vermittelten Umverteilung der vier, neben Cholesterol, wichtigsten Membranlipide Phosphatidylserin, Ethanolamin, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin innerhalb der Spermatozoenmembran kommt. Dabei ist zu beobachten, dass unter Zugabe von Bikarbonat zunächst die Membranfluidität zunimmt und zelluläres Cholesterol anschließend aus der akrosomalen Region entfernt wird (Flesch *et al.* 2001).

Es wird angenommen, dass der Anstieg der Membranfluidität eine Voraussetzung für den genauen Ablauf der Kapazitation ist. Zudem findet eine Neuverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran statt. Neben Bikarbonat als Effektor gilt auch der Efflux von Cholesterol als Auslöser der Kapazitation. Mit der Entfernung des Cholesterols aus der Plasmamembran ändert sich die Membranfluidität, was zu einer Instabilität führt (Cross 1998; Visconti *et al.* 1999; Travis and Kopf 2002).

Sterolbindende Proteine, wie das High-density-lipoprotein (HDL) und Albumin im weiblichen Genitaltrakt, bewirken eine Entfernung des Cholesterols aus der Plasmamembran. Humanes Albumin, welches in der folliculären Flüssigkeit vorkommt, dient hierbei als möglicher Cholesterolakzeptor (Langlais *et al.* 1988). Es wird als Promotor des Cholesterol-Efflux in Spermatozoen während der Kapazitation in Betracht gezogen.

Neben Bikarbonat gilt auch Calcium als ein essentieller Bestandteil des *in-vitro*-Kapazitationsmediums von Spermatozoen (Breitbart 2002; Wennemuth *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass auch Calcium zu einer cAMP- und PKA-vermittelten Phosphorylierung von Tyrosinresten funktioneller Proteine führt (Breitbart 2002). Daher wird ein Zusammenhang zwischen Calcium und den Membranlipidveränderungen in Spermatozoen während der Kapazitation vermutet. Daneben wurde in *in-vitro*-Studien gezeigt, dass Calcium essentiell für die sich anschließende akrosomale Reaktion ist (De Jonge 1996).

Auf welchen Wegen Cholesterol während der Kapazitation die Spermatozoenmembran verlässt ist weiterhin unklar. Kürzlich konnte eine Beteiligung von sogenannten ABC-Transportern im Prozess der Kapazitation und der sich anschließenden Fertilisation gezeigt werden (Morales et al. 2008).

2.4. ATP-binding-cassette (ABC) Transporter

Die ATP-binding-cassette (ABC) Transporter gehören zu den wichtigsten Membranprotein-Familien und sind in allen lebenden Organismen zu finden. Die sowohl in Eukaryoten als auch Prokaryoten vorkommenden ABC-Proteine ermöglichen den Transport zahlreicher Substrate wie z.B. Kohlenhydrate, Aminosäuren oder auch Arzneimittel durch Zellmembranen. Sie sind an sämtlichen zellulären Stoffwechselprozessen beteiligt (Higgins 2001; Schmitt and Tampe 2002). Neben ihrer physiologischen Funktionen haben die ABC-Transporter unterschiedliche klinische Bedeutungen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Arzneimittelresistenz bei der Chemotherapie und bei der häufigsten autosomal-rezessiven Erbkrankheit Mukoviszidose (Borst and Elferink 2002). Neben ihrem Vorkommen in der Plasmamembran sind sie auch in anderen Zellorganellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder in Mitochondrien lokalisiert. Sie werden in allen Geweben und Zelltypen exprimiert, was die Vermutung nahe legt, dass sie eine Schlüsselrolle im Metabolismus von Zellen und beim Transport durch Zellmembranen spielen. Gegen einen Konzentrationsgradienten schleusen die Transporter Substanzen durch die Zellmembran, wodurch die Akkumulation dieser Stoffe in der Zielzelle verhindert werden kann.

Bisher sind 48 verschiedene ABC-Gene identifiziert worden, die für ABC-Proteine kodieren und sie wurden in sieben Unterfamilien eingeteilt (ABCA–ABCG) (Dean *et al.* 2001). Ihre genauen Funktionsweisen sind größtenteils noch ungeklärt. ABC-Transporter setzen sich aus zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD) zusammen, die in der Literatur auch als ATP-bindende Domänen bezeichnet werden (Tusnady *et al.* 2006). Die ATP-bindende Domäne ist das Charakteristikum aller ABC-Unterfamilien. Sie ermöglicht den aktiven Transport von Substanzen durch die Membran der Zelle. Die hierfür notwendige Energie liefert die Hydrolyse von ATP. Man unterscheidet innerhalb der ABC-Familie zwischen sogenannten Voll- und Halbtransportern. Während zwei Halbtransporter ein funktionelles

Dimer bilden müssen um einen Transport zu gewährleisten, stellt ein Volltransporter ein bereits vollständiges funktionsfähiges Protein dar (Dean et al. 2001; Krishnamurthy and Schuetz 2006).

In der Literatur wurde bisher eine große Anzahl an Vertretern dieser Membran-Transporter beschrieben, die für eine Arzneimittelresistenz verantwortlich gemacht werden (Cordon-Cardo et al. 1990; Gottesman and Pastan 1993; Ambudkar et al. 1999). Drei von ihnen bewirken eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika: ABCB1 (P-Glycoprotein, P-gp, MDR1), ABCG1 (MRP1) und ABCG2 (BCRP). Der Bekannteste ist das P-Glycoprotein. In der Arbeit von Chen *et al.* wurde es erstmals in maligne entarteten Zellen des Menschen entdeckt und für die Arzneimittelresistenz verantwortlich gemacht (Chen et al. 1986). Das 170-kDa große Protein wird durch das *mdr*-Gen kodiert (Ueda et al. 1986). P-gp erzeugt durch seine Überexpression in Tumorzellen eine Resistenz gegen Zytostatika, indem es die intrazelluläre Konzentration der Medikamente durch Export herabsetzt (Endicott and Ling 1989; Gottesman and Pastan 1993).

2.4.1. Unterfamilie G

Die Unterfamilie G der ABC-Transporter besteht aus fünf Mitgliedern (ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 und ABCG8) und gehört zu der Gruppe der Halbtransporter. Um funktionell aktiv zu werden, liegen die Transporter entweder als Homodimere (ABCG1, ABCG2 und ABCG4) oder als Heterodimere (ABCG5 und ABCG8) vor.

Ausgenommen von ABCG2 sind die restlichen Mitglieder der G-Unterfamilie an dem Transport von Cholesterol aus Zellen beteiligt. ABCG1 und ABCG4 erleichtern die Abgabe von überschüssigem Cholesterol aus der Zelle an HDL und regulieren die Sterolakkumulation im Gehirn (Wang et al. 2004; Vaughan and Oram 2005; Gelissen et al. 2006). Daneben wird ABCG4 eine Funktion im Cholesteroltransport in Neuronen und Astrozyten zugeschrieben. Aufgrund seiner Expression in murinem Hodengewebe wird er mit einer möglichen Beteiligung bei

dem Transport von Sexualhormonen in Zusammenhang gebracht (Koshihara et al. 2008). Die verbleibenden zwei ABCG-Halbtransporter ABCG5 und ABCG8 werden im Dünndarm und der Leber exprimiert, wo sie die Cholesterolausscheidung vermitteln (Repa et al. 2002).

2.4.1.1. ABCG1

ABCG1 ist am zellulären Phospholipidstoffwechsel von Makrophagen beteiligt und reguliert dort ebenfalls den Cholesteroltransport (Klucken et al. 2000). Der Transporter fördert den Efflux von Cholesterol und Phospholipiden aus den Zellen (Basso et al. 2006). Er besitzt eine Membrandomäne, die aus sechs Untereinheiten aufgebaut ist, und eine Nukleotid-bindende Sequenz, die am Aminoende lokalisiert ist. Es wird angenommen das ABCG1 vorwiegend als Homodimer oder Homotrimer in der Plasmamembran als Effluxtransporter fungiert (Vaughan and Oram 2005). Er wird in hohem Maße in Makrophagen, in Endothelzellen, in der Niere und im Gehirn exprimiert. In geringerer Konzentration liegt er in der Leber vor.

Gemeinsam mit ABCA1 und ABCG4 vermittelt ABCG1 den Cholesterol-Efflux auf HDL und Apolipoprotein A1 (Wang and Tall 2003; Wang et al. 2004; Wang and Rader 2007). Der Transporter konnte in murinem Hodengewebe mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine Immunreaktionen für ABCG1 in Spermatogonien, Spermatozyten und in runden Spermatiden, jedoch in elongierten Spermatiden. Dagegen konnte das Protein ebenfalls im Übergang vom Mittelstück zum Kopf und in dem Flagellum reifer Spermatozoen aus dem Nebenhoden detektiert werden (Morales et al. 2008). Neben der Lokalisation wurde in der Arbeit von *Morales* eine mögliche Mitbeteiligung am Cholesterolefflux während der Kapazitation von ABCG1 gezeigt.

2.4.1.2. ABCG2 (BCRP/MRP)

Aufgrund seiner Identifikation in Doxorubicin-resistenten menschlichen MCF-7 Tumorzelllinien wurde dieser ABC-Transporter als „*Breast cancer resistant protein* (BCRP)“ bezeichnet und im Jahre 1998 als ein neuer Transporter der ABC-Transporterfamilie benannt (Doyle et al. 1998). BCRP, auch plazenta-spezifischer ABC-Transporter (ABCP) genannt, ist ein aus 655 Aminosäuren bestehendes 72 kDa-schweres Polypeptid, welches auch als ABCG2 bezeichnet wird (Allikmets et al. 1998). Das Gen erstreckt sich über 66 Kilobasenpaare, bestehend aus 16 Exons und 15 Introns (Bailey-Dell et al. 2001). ABCG2 setzt sich aus sechs Transmembrandomänen zusammen. Durch Bindung von ATP und der sich anschließenden Hydrolyse ist ABCG2 in der Lage sowohl positiv als auch negativ geladene Ionen durch Membranen zu transportieren (Robey et al. 2007; Enokizono et al. 2008).

Der Transporter spielt eine wichtige Rolle in der Pharmakokinetik der Arzneimittel und deren Gewebe- und Membranpassagen. Des Weiteren existiert ein genetischer Polymorphismus von ABCG2, der für die individuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik der Arzneimittel verantwortlich ist (Kusuhara and Sugiyama 2007). Neben seinem Vorkommen in Tumorzellen wird ABCG2 in der Plasmamembran plazentärer Synzytiotrophoblasten, im Dünndarmepithel, in den Gallenkapillaren und in den, dem Lumen zugewandten Oberflächen von Endothelzellen menschlicher Gehirnkapillaren exprimiert. Dieses Vorkommen in den unterschiedlichen Geweben unterstreicht, dass ABCG2 eine wichtige Rolle in der Absorption, Verteilung und Elimination von Substanzen durch Zellmembranen spielt (Maliepaard et al. 2001; Mao and Unadkat 2005).

Immunhistologische Untersuchungen zeigen, dass ABCG2 vornehmlich in Plasmamembranen exprimiert wird (Rocchi et al. 2000; Maliepaard et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von ABCG2 in Mitoxantronresistenten Kolon-Karzinom-Zelllinien und in mit Verapamil inhibierten Brustkrebs-Zelllinien vorkommt (Doyle et al. 1998; Miyake et al. 1999). Zudem wurde beobachtet, dass ABCG2 auch in der Skelettmuskulatur

und in Geweben wie der menschlichen Leber, im menschlichen Pankreas und im embryonalen Herzen exprimiert wird (Martin et al. 2004). Doyle *et al.* detektierten ABCG2 in der menschlichen Plazenta, Prostata, Dünndarm, Gehirn, Colon, Leber und dem Ovar (Doyle and Ross 2003). Enokizono wies den ABC-Transporter mittels Westernblot in den Abschnitten des murinen Intestinums nach, wo er eine limitierende Rolle bei Gewebepassagen von Substanzen darstellt und eine mögliche Entgiftungsfunktion besitzt (Enokizono et al. 2007b). In der 2004 veröffentlichten Expressionsstudie von Lassalle ließ sich der ABCG2-Transporter in den Zellen der Spermatogenese nachweisen. Die Expression von ABCG2 war in den späten Differenzierungsstufen, den Spermatozyten, am höchsten (Lassalle et al. 2004).

Das ABCG2-Protein wird in hämatopoetischen Stammzellen stark exprimiert und ist ein Transporter für den Stammzellmarker Hoechst 33342. Hoechst wird in einer Teilpopulation der Stammzellen, der sogenannten „side-population“, vermehrt aus der Zelle transportiert (Kim et al. 2002; Scharenberg et al. 2002). Ebenfalls konnte durch Inhibition des Hoechst 33342-Effluxes mittels Ko143, einem ABCG2-spezifischen Inhibitor, die Aktivität des ABCG2-Transporters in dieser Teilpopulation gezeigt werden (Lassalle et al. 2004).

Untersuchungen lassen vermuten, dass Cholesterin schon bei einer geringen Abnahme aus der Plasmamembran den Efflux von Arzneimitteln durch ABCG2 hemmt, während sich die Lokalisation des ABC-Transporters innerhalb der Membran nicht verändert (Telbisz et al. 2007). Zeitgleich wiesen Pal *et al.* 2007 nach, dass Cholesterin in Membranen eine essentielle und bedeutende Rolle für die Aktivität von ABCG2 spielt. Nach Zugabe von bekannten Substraten wie Topotecan wurde die ATPase Aktivität des Transporters stimuliert. In den Membranen mit reduziertem Cholesterinanteil zeigte sich keine Aktivität der ATPase. Es ließ sich der Einfluss von Cholesterin in Membranen auf die ATPase-Aktivität des Transporters nachweisen (Pal et al. 2007). Die Ergebnisse lassen eine mögliche Beteiligung des ABC-Transporters auf den Cholesterintransport vermuten.

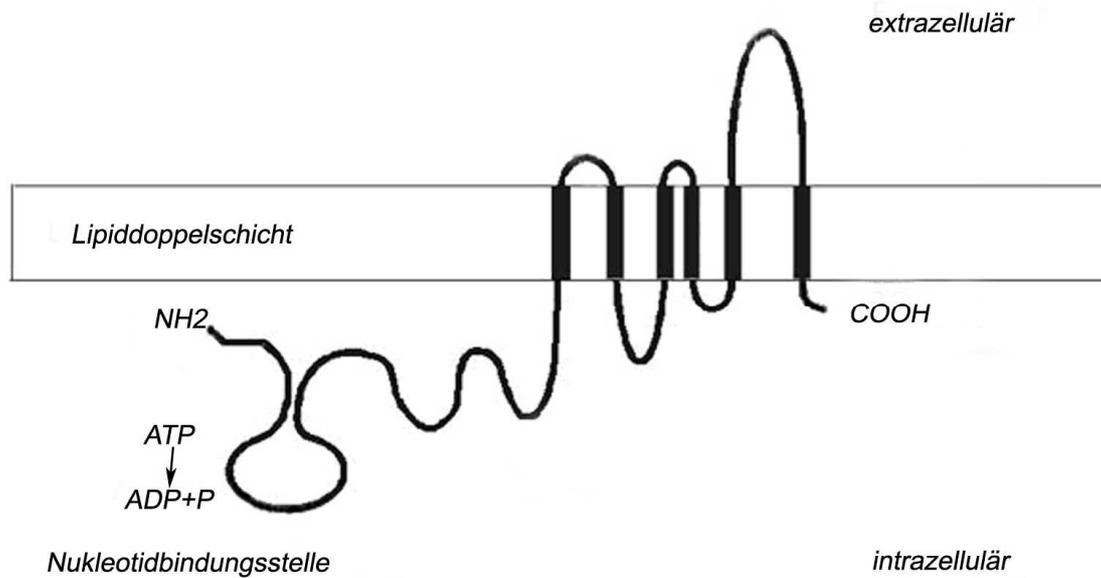


Abbildung 3 Lipiddoppelschicht mit schematischer Struktur-Darstellung des **ABCG2/BCRP-Transporters**. Man erkennt die Nukleotidbindungsstelle und die membranständige Domäne mit ihren sechs in die Membran eingelagerten α -Helices (modifiziert nach Mao and Unadkat 2005).

2.4.2. Unterfamilie B

Der Unterfamilie B gehören sowohl Halbtransporter als auch Volltransporter an (Dean and Annilo 2005). Der wichtigste Vertreter der Unterfamilie B ist das als erstes als humaner ABC-Transporter entdeckte p-Glycoprotein. Es gehört zu der Gruppe der Volltransporter und tritt in allen Organismen auf. Es besitzt multisubstratspezifische Eigenschaften. Basierend auf dieser p-Glycoprotein-vermittelten Resistenz von Zellen gegenüber toxischer Substanzen wurde das Phänomen der „*multidrug resistance*“ (MDR) beschrieben (Endicott and Ling 1989). Im Urogenitaltrakt konnte das Protein in Leydigzellen, in testikulären Makrophagen, in peritubulären Zellen wie auch in Sertolizellen nachgewiesen werden. Da ihm eine Funktion im Transport toxischer Verbindungen aus Zellen

zugeschrieben wird, interpretieren die Autoren daraus eine mögliche protektive Rolle von P-gp im männlichen Genitaltrakt (Ambudkar et al. 1999). Ebenso wird P-gp in exkretorischen Geweben wie Leber und Dünndarm exprimiert (Tanigawara 2000).

Ein Weiterer zu den Volltransportern zählender ABC-Transporter ist ABCB4. Er vermittelt den Transport von Phosphatidylcholin von der inneren zur äußeren kanalikulären Hepatozytenmembran (Oude Elferink and Paulusma 2007). Daneben fungieren einige Mitglieder der Unterfamilie B als Peptidtransporter. Den beiden ABC-Halbtransportern ABCB2 und ABCB3 (TAP1 und TAP2) wird eine Rolle bei der Antigenpräsentation zugeschrieben. Als Heterodimere an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, transportieren sie Antigene vom Zytoplasma ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums zur anschließenden Antigenpräsentation. Sie sind somit Teil der zellulären Immunabwehr (Meyer et al. 1994; Abele and Tampe 1999). Weitere Vertreter der ABC-Halbtransporter sind ABCB6, ABCB7, ABCB8 und ABCB10. Sie bilden homodimerische Komplexe und sind an der Eisenhomöostase in Mitochondrien beteiligt (Hofacker et al. 2007).

2.4.2.1. ABCB9 (TAP-like)

Das zu der Unterfamilie B gehörende ABCB9-Gen kodiert für ein 286 Aminosäuren langes und 30 kDa schweres Membranprotein. Es gehört zu den Halbtransportern. Northernblot Analysen zeigten, dass es in hohem Maße im Hodengewebe und ebenfalls im Gehirn und im Rückenmark vorkommt (Zhang et al. 2000; Zhao et al. 2008). ABCB9 wird sowohl in Sertolizellen als auch in den Tubuli seminiferi in Mäuse- und Rattenhoden exprimiert. Ebenso ist der Transporter eng mit den beiden Halbtransportern TAP1 und TAP2 assoziiert (Wolters et al. 2005). TAP1 und TAP2 sind zwei Transporter, die am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. ABCB9 wurde sowohl in der ER-Membran als auch in Lysosomen nachgewiesen (Zhang et al. 2000)

Die ABCB9-Expression konnte im Hodengewebe von Mäusen und von Ratten nachgewiesen werden. Mittels ABCB9-spezifischen Antiseren konnte ABCB9 in zytoplasmatischen Kompartimenten von Sertolizellen lokalisiert werden (Zhang et al. 2000). Seine Lokalisation in murinen Spermatozoen und im Epididymis soll mit dieser Arbeit untersucht werden.

2.4.3. Unterfamilie E

Die Proteine der Unterfamilie E treten in allen eukaryotischen Zellen auf. Aufgrund ihrer fehlenden Membrandomäne besitzen sie keine Transporterfunktion. Ihnen wird eine Bedeutung in der Regulation, Translation und Transkription während der Proteinbiosynthese zugesprochen (Dong et al. 2004; Zhao et al. 2004).

2.4.3.1. ABCE1 (RLI)

ABCE1 wird den ABC-Transportern zugeordnet und wurde früher als „*Rnase L inhibitor*“ (RLI1) bezeichnet. Es kommt außer in Bakterien, in allen lebenden Organismen vor. Sein Funktionsmechanismus auf molekularer Ebene ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch enthält ABCE1 eine N-terminale Bindungsstelle, die durch Cystein charakterisiert ist und an Eisen-Schwefel-Gruppen bindet (Barthelme et al. 2007). Es wird beschrieben dass ABCE1 eine katalytische und regulatorische Funktion in der Synthese von Ribosomen und in der Translation übernimmt (Kispal et al. 2005). *In-vivo*-Untersuchungen zeigen eine Assoziation von ABCE1 mit spezifischen Translationsfaktoren an der ribosomalen 40 S-Untereinheit (Dong et al. 2004). Da ABCE1 keine Transmembrandomänen besitzt, ist er nicht in den Transport durch Membranen involviert (Heimerl et al. 2007).

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Es sind in der Vergangenheit viele Vertreter der ABC-Familie unter Berücksichtigung ihrer Relevanz für den männlichen Reproduktionstrakt beschrieben worden (Lassalle et al. 2004; Enokizono et al. 2007b; Morales et al. 2008). Bisher wurde keine umfassende Untersuchung zur Verteilung der vier hier beschriebenen Transporter innerhalb der männlichen Reproduktionsorgane durchgeführt.

Ein Verteilungsmuster der vier ABC-Transporter ABCG1, ABCG2, ABCB9 und ABCE1 im murinen Hodengewebe wurde in einer Genexpressionsdatenbank beschrieben (Shima et al. 2004). Aus der Datenbank geht hervor, dass die vier Transporter in den verschiedenen Differenzierungsphasen der Spermatogenese unterschiedlich stark exprimiert werden. Anhand dieser Expressionsdaten konnte ein Übersichtsdiagramm erstellt werden (Abb. 4).

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der Arbeit die genaue Lokalisation und das Vorkommen der vier Transporter im murinen Genitaltrakt, speziell im Testis und Epididymis, zu beschreiben.

Angewandt wurden folgende Methoden:

1. *Immunhistochemische Untersuchungen:*

An Paraffinschnitten von Mäuse-Testis und –Epididymis wurde versucht, die vier ABC-Transporter ABCG1, ABCG2, ABCB9 und ABCE1 nachzuweisen. Außerdem wurden im Anschluss daran immunzytochemische Färbungen am Hoden- und Nebenhodengewebe durchgeführt.

2. *Immunfluoreszenz:*

Isolierte, reife Spermatozoen aus dem Nebenhodengang wurden einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen.

3. *Immunoblot:*

Gesamtprotein aus Epididymishomogenat wurde elektrophoretisch aufgetrennt und einem immunologischen Nachweisverfahren zur Detektion der Proteine unterworfen.

Ein zusätzlicher Punkt dieser Arbeit war die Prüfung des Zusammenhanges zwischen dem Cholesteroltransport aus der Spermatozoenmembran und der mit ihm assoziierten Kapazitation. Ein möglicher Effekt des ABCG2-spezifischen Inhibitors Fumitremorgin C war von besonderem Interesse. Dieses Experiment wurde an kapazitierten Spermatozoenmembranen durchgeführt. Als Nachweisverfahren wurde die Lipiddünnschichtchromatographie herangezogen.

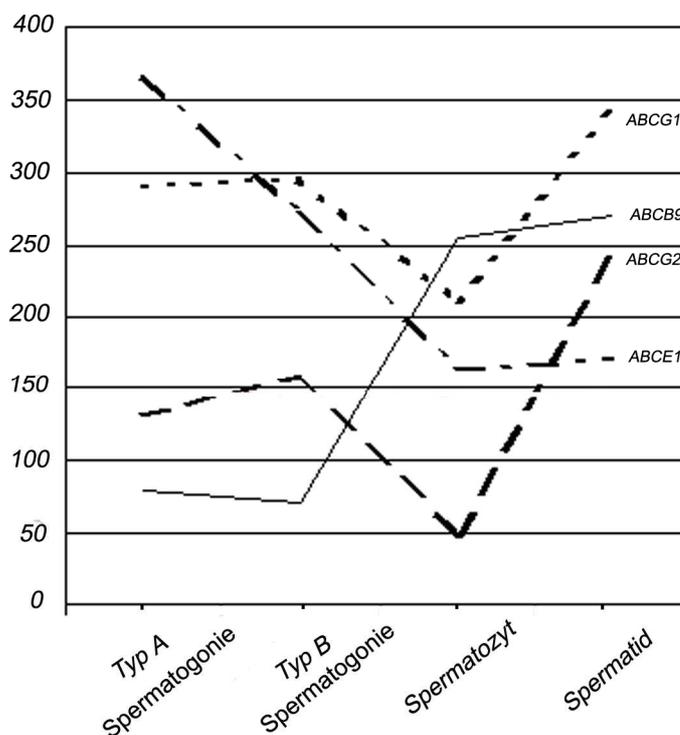


Abbildung 4 *Expressionsmuster der ABC-Transporter ABCG1, ABCG2, ABCB9 und ABCE1 im murinen Hodengewebe.* Gezeigt sind die Expressionsmuster bei Typ A-Spermatogonien (Typ A), Typ B-Spermatogonien (Typ B), pachytänen Spermatozyten und an runden Spermatischen (Daten aus Genexpressionsdatenbank Shima *et al.* 2004).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. *Materialien*

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: E. Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Roth (Karlsruhe), Sigma (München).

3.1.1. **Verwendete Geräte**

Laufkammer für Western Blot	Xcell SureLock, Invitrogen, Karlsruhe
Entwickler	Kodak, Stuttgart
Heizgerät	KTMR-133, Heap Labor Consult, Bovenden
Wärmebad	SWB 20, Preiss-Daimler, Medingen
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse™, TE 2000-U, Düsseldorf
Lichtmikroskop	Axiophot, Zeiss, Jena
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Messwaage	Explorer Pro, Ohaus, Giessen
Mikrotom	Historange, Reichert-Jung, Heidelberg
Zentrifuge	Mikromax RF, Thermo Scientific, Bonn
Flachbett-Scanner	Vilber Lourmat, Eberhardzell

3.1.2. Programme zur Ergebnisauswertung

Für die schriftliche Ausarbeitung der Arbeit kam Microsoft Word 2007 zur Anwendung. Für die Darstellung von Bildern und Graphiken wurden Microsoft Powerpoint und Adobe Photoshop CS2 herangezogen. Tabellen wurden mit Microsoft Excel für Windows XP erstellt.

3.1.3. Verwendete Puffer und Lösungen

PBS-Puffer Stammlösung (10x):

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g

Ad 1 l H₂O, pH 7.2.

PBS (1x):

PBS (10 x)	100 ml
H ₂ O	900 ml

HS-Puffer (Stammlösung):

NaCl	15,77 g
KCl	0,74 g
2M MgSO ₄	1 ml
2M CaCl ₂	2 ml

Ad 1 l H₂O.

HS-Puffer (Gebrauchslösung):

HS Stammlösung	10 ml
Glucose	0,312 g
HEPES (1 M / pH 7,4)	4 ml
Lactat	0,5 ml
Pyruvat	0,022 g

Ad 200 ml H₂O, pH 7.4.

HSB-Puffer (Gebrauchslösung):

HS-Puffer (Gebrauchslösung)	50 ml
NaHCO ₃	0,063 g

HSB-Puffer (zur *in-vitro*-Kapazitation):

HSB-Puffer (Gebrauchslösung)	5 ml
Bovines Serum Albumin	0,025 g

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie:**Laufmittel 1:**

Methylacetat	266 ml
1-Propanol	266 ml
Chloroform	266 ml
Methanol	106 ml
KCl-Lösung 0,25%	96 ml

Laufmittel 2:

n-Hexan	750 ml
Diethylether	230 ml
C ₂ H ₄ O ₂	20 ml

Laufmittel 3:

n-Hexan	1000 ml
---------	---------

Kupfersulfat-Phosphorsäure-Reagenz (Färbelösung):

H ₃ PO ₄ (85%)	100 ml
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	75 g
H ₂ O	900 ml

Homogenisierungspuffer:

Saccharose	85,57 g
MgCl ₂	4,76 g
EDTA	29,22 g
MOPS	10,47 g

Es wurde mit 1M NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Proteaseinhibitor Sigma Fast versetzt (1 Tablette pro 50 ml Puffer).

Laufpuffer für die Gelelektrophorese:

Invitrogen Lauf-Puffer	35 ml
Aqua bidest.	665 ml

Blotting-Puffer:

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

Eosin-Färbelösung:

Eosin	0,2 g
A.dest	100 ml
Essigsäure	1 – 2 Tropfen

HCl-Alkohol:

Isopropanol 70 %	995 ml
HCl 25%	5 ml

Avidin (Stammlösung):

Avidin	1 mg
PBS	1 ml
Natriumazid 0,1 %	1 mg

Biotin (Stammlösung):

Biotin	10 mg
Natriumazid 0,1 %	10 mg
PBS	10 ml

DAB:

Die Lösung der 10 mg-Tablette erfolgte in 20 ml TBS (pH 7.6). Zum Gebrauch wurden Aliquots à 1 ml verwendet.

3.1.4. Verwendete Antikörper**Primäre Antikörper:**

- Der polyklonale ABCG2-87405-Antikörper wurde aus der Spezies Kaninchen gewonnen (14. Blutung). Er wurde von der Arbeitsgruppe Bates vom National Institute of Health in Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

- Die polyklonalen Antikörper Ziege-anti-ABCE1 (N-12), Kaninchen-anti-ABCG1 (H-65) und Ziege-anti-ABCB9 (K-16) wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg bezogen.

Sekundäre Antikörper

Die entsprechenden Cy3-konjugierten Sekundärantikörper wurden von Acris Antibodies, Herford und die entsprechenden biotinylierten Antikörper von Linaris/Vector, Wertheim-Bettingen, bezogen. Die HRP-konjugierten Antikörper stammten von Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg.

ABCG2-Inhibitor

Als spezifischer ABCG2-Inhibitor wurde Fumitremorgin C verwendet, der von der Arbeitsgruppe Bates vom National Institute of Health in Bethesda MD, USA zur Verfügung gestellt wurde. Dieses, aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus*, gewonnene Mykotoxin inhibiert selektiv das ABCG2 Protein (Rabindran et al. 1998; Rabindran et al. 2000). Fumitremorgin C wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

3.1.5. Versuchstiere

Das untersuchte Gewebe wurde NMRI-Mäusen (retired breeders) entnommen, die aus der Zucht des Tierstalls der Pharmakologie der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Freichel, Experimentelle Pharmakologie, Universität des Saarlandes, und aus der Zucht der Anatomie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe Prof. Steiniger, stammten.

3.2. Methoden

3.2.1. Immunhistochemie

3.2.1.1. Verwendetes Gewebe

Die immunhistochemische Untersuchung von ATP-binding-cassette Transportern wurde an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von Hoden, Nebenhoden und Ductus deferens durchgeführt. Die Schnittdicke betrug 4 – 6 µm.

3.2.1.2. Einfachmarkierungen an Paraffinschnitten mittels Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)

Nach Entparaffinierung der Gewebeprobe mit Xylol für zweimal fünf Minuten erfolgte das Rehydrieren der Probe in einer absteigenden Ethanolreihe (100 - 80 % je 3 min; 70 % je 2 x 3 min) und das dreimalige Spülen der Probe in PBS-Puffer (je 5 min). Um ein Austrocknen der Gewebeproben zu vermeiden wurden sämtliche Markierungsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Als nächster Schritt folgte das Vorblocken der endogenen Peroxidase. Dazu wurden 20 mg Glucoseoxidase in 1 ml PBS – Puffer gelöst und kurz im Wasserbad (35°C) aktiviert, bevor der Gewebeschnitt zuerst für 45 Minuten bei 37 °C mit der Lösung und abschließend mit dem zugehörigen Primärantikörper inkubiert wurde. Der Primärantikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung zusammen mit Avidin (1:300) in PBS/BSA auf den Schnitt gegeben. Die hohe Affinität des Glycoproteins Avidin gegenüber Biotin ist für die hohe Spezifität dieses Verfahrens verantwortlich (ABC-Methode). Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden und erfolgte bei 4 °C.

Um den überschüssigen, nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen wurde zweimal in PBS gewaschen (2 x 7 min). Anschließend wurde der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper mit Biotin (1:50) in PBS/BSA auf den Schnitt gegeben und dieser für 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte

zur Ankopplung von Avidin und Peroxidase die Inkubation des Schnittes mit Vectastain (Avidin (1:50) + Peroxidase (1:50) in PBS) ebenfalls für 30 Minuten. Die Schnitte wurden kurz mit TBS gespült. Die Detektion des Immunkomplexes fand mit 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid durch Zugabe von 10 µl H₂O₂ (20 µl H₂O₂ 30% + 500 µl H₂O_{dest.}) statt. Ein bis zwei Tropfen der DAB-Lösung wurden auf die Probe pipettiert und nach 10 Minuten durch Waschen in PBS (5 min) entfernt.

Es folgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Ehrlich. Die Proben wurden hierfür kurz in Färbeküvetten in die Lösung (4 – 6 sek) eingetaucht und schließlich für eine Minute in Leitungswasser gebläut. Nach Ablauf der Färbung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % kurz, 90 %, 2mal 100 % je 1 min) dehydriert, zweimal in Xylol inkubiert (je 3 min) und abschließend in Vectashield® (Linaris, Wertheim-Bettingen) eingedeckt.

3.2.1.3. Gewinnung muriner Spermatozoen

Männliche Mäuse wurden mittels CO₂-Inhalation betäubt und zervikal disloziert. Die Nebenhodenschwänze wurden proximal des Ductus deferens freipräpariert und kurz in HS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Nebenhoden samt Samenleiter in eine Petrischale mit 1 ml HSB-Puffer gegeben. Nach vier bis fünf Querinzisionen der Nebenhodenschwänze wurden die Spermatozoen vorsichtig aus dem Samenleiter ausgestrichen. Für das anschließende Ausschwimmen der Spermatozoen aus dem Nebenhodengang (*Swim out*) wurde die Probe für 20 Minuten in den Wärmeschrank (37 °C und 5 % CO₂) gestellt. Während des Swim-outs wurden vier Reaktionsgefäße mit HS-Puffer befüllt und im Wasserbad (37 °C) angewärmt. Die Spermatozoensuspensionen wurden anschließend in 250 µl-Fractionen auf die vorbereiteten Gefäße verteilt. Nach dreimaligem Waschen in HS-Puffer erfolgte das Poolen der Zellen. Dazu wurde nach Zentrifugation (300 x g für 5 min) der Inhalt von zwei Gefäßen zusammengeführt. Bei beiden Gefäßen wurde der Überstand verworfen und das Sediment in ein mit 500 µl HS-Puffer aufgefülltes Eppendorfgefäß übertragen. Die letzte Probenmenge wurde in einem Gesamtvolumen von

1000 µl resuspendiert. Alle sich anschließenden Arbeiten wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei RT in HS-Puffer durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift konnten die Spermatozoen für die sich anschließenden Versuche weiterverwendet werden. Zur Bestimmung der Zellzahl diente eine Neubauer Zählkammer. Aus der gezählten Menge wurde die Zellzahl pro Milliliter nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spermatozoen/ml} = \text{gezählte Spermatozoen} \times \text{VF} \times 10^4$$

VF= Verdünnungsfaktor

3.2.1.4. Anfertigung der Spermatozoenausstriche

Nach der Spermatozoenpräparation und dem Waschen der Proben folgte die Weiterverdünnung der Proben bis zur Vereinzelnung der Spermatozoen. Die Kontrolle erfolgte mittels Lichtmikroskop.

Mit einer Pipette wurden 20 µl der Spermatozoensuspension auf die Mitte eines Objektträgers getropft und bei RT für 30 Minuten getrocknet. Zum Fixieren der Probe wurde der getrocknete Objektträger für 15 Minuten in eine mit Methanol vorbereitete Küvette gegeben. Nach vollständigem Verdampfen des Methanols schloss sich die Fluoreszenzfärbung der Spermatozoenausstriche an.

3.2.1.5. Immunfluoreszenz

Um ein Austrocknen der Gewebeproben zu vermeiden, fand die Durchführung der einzelnen Inkubationsschritte erneut in einer feuchten Kammer statt.

Die auf die silanisierten Objektträger gezogenen Paraffinschnitte wurden zweimal fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100 – 80 % je 3 min; 70 % 2 x 3 min) rehydriert. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde dreimal für fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen

wurde dem Primärantikörper BSA (5 %) hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 5 min PBS) wurde das Gewebe mit dem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer für 60 Minuten inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in der Verdünnung 1 : 250 in PBS verwendet. Die Betrachtung und Auswertung der Gewebepräparate erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Fluoreszenzfilter für Cy3. Nach dem letzten Waschschrift für dreimal fünf Minuten in PBS-Puffer erfolgte die Kernfärbung mit SYTOX green® dessen Emissionsmaximum bei 523 nm liegt. Die Kernfärbung erfolgt ebenso wie die Antikörperinkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer für 15 Minuten. Vor dem letzten Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wurden die Proben mit Aqua dest. gespült und anschließend mit Vectashild auf dem Objektträger fixiert.

3.2.2. Lipidanalyse

3.2.2.1. Lipidextraktion aus Spermatozoen

Die Lipidextraktion des gewonnenen Gewebes erfolgte in Anlehnung an die Methode von *Bligh* und *Dyer* (1959), bei der eine optimale Extraktion der Lipide durch Mischung der Gewebeproben mit Chloroform und Methanol erreicht wird (Bligh and Dyer 1959). Methanol und Chloroform sind ebenso wie Wasser und Methanol in beliebigen Verhältnissen mischbar. Wasser und Chloroform bilden zwei Phasen und sind nicht miteinander zu mischen. Gibt man Methanol als Lösungsvermittler dazu so sind auch Wasser und Chloroform mischbar. Um eine verbesserte Extraktion der Lipide zu erzielen wird eine 1 M KCl-Lösung verwendet. Sie führt zu einer Erhöhung der Polarität der wässrigen Phase und lässt eine exaktere Darstellung der Lipide zu.

Die Lipidextraktion wurde nach dem Protokoll von *Appelt* durchgeführt (Appelt). Hierzu wurden 80 µl der flüssigen Gewebeprobe entnommen und in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde mit 200 µl Methanol aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend zu einer homogenen Flüssigkeit gemörsert und für fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt. 100 µl Chloroform wurden zu der Suspension gegeben und für eine Minute geschüttelt. 100 µl 1 M KCl-Lösung wurde hinzugegeben, ebenfalls eine Minute geschüttelt und für eine Minute bei 800 x g zentrifugiert. Es bildete sich eine wässrige Unterphase aus. Die Unterphase wurde mit der Hamiltonspritze in ein neues Glasröhrchen überführt. Anschließend folgte ein zweiter Waschschrift unter Zugabe von Methanol, bevor die gesammelte gewaschene Unterphase in das Glasröhrchen überführt und im Wärmeblock getrocknet wurde.

Die Lipidextrakte wurden in 20 µl Chloroform/Methanol (2 : 1) als Lösemittel verdünnt. Es schloss sich die Methode der Dünnschichtchromatographie an.

3.2.2.2. Dünnschichtchromatographie der Membranlipide

Die Dünnschichtchromatographie (DC) stellt eine sensitive Methode zur Überprüfung der Lipidzusammensetzung der Spermatozoenmembran dar. Bevor die Lipidextrakte auf die Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen wurden, mussten die Platten eine Vorentwicklung durchlaufen. Dazu wurden die Platten 40 Minuten in das erste Laufmittel gestellt. Nachdem das Laufmittel die Oberkante erreicht hatte, wurde die Platte aus der Entwicklungskammer entnommen und getrocknet. Es wurden drei Glaskammern für die jeweiligen Laufmittel verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Es schloss sich die Aktivierung der Dünnschichtchromatographieplatte bei 110 °C für zehn Minuten im Heizschrank an. Vor jeder Versuchreihe war eine erneute Aktivierung der Platte nötig. Zum Aufnehmen und Auftragen der Lipidextrakte wurde eine 2 µl Hamilton-Spritze verwendet. Es folgte die Entwicklung der Platte. Die Lipidbanden wurden mit Hilfe einer Kupfersulfat-Phosphorsäure-Reagenz sichtbar gemacht. Es

resultierten Lipidbanden, die als Basis für die Lipidanalyse dienten. Die Dokumentation und Auswertung der dünnenschichtchromatographischen Platten erfolgte mittels eines Flachbett-Scanners. Die dargestellten Lipidbanden wurden mittels Dichtemessung ausgewertet. Es wurde zum einen mit Zugabe von FTC und zum anderen ohne Zugabe von FTC die Menge an Cholesterol in Spermatozoenmembranen quantifiziert.

3.2.3. Western Blot-Analyse

Bei der Western Blot-Analyse werden Proteine nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einer Elektroblo-Apparatur aus einem unfixiertem Trenngel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Als Transfersystem wurde in dieser Arbeit das NuPage-System von Invitrogen verwendet. Der Transfer der Proteine erfolgte mittels Sandwichblot bei 25 V und 160 mA für 60 min.

3.2.3.1. Herstellung der Gewebeextrakte und Proteinbestimmung

Zur Gewinnung der Proteinfractionen aus murinem Nebenhoden wurde zunächst der Nebenhodenschwanz freipräpariert und anschließend seine drei Abschnitte Caput, Corpus und Cauda in, mit 200 µl Homogenisierungspuffer (mit Proteaseinhibitoren) befüllte, Eppendorfgefäße gegeben. Es folgte die Homogenisierung mittels Pistille, eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis und das Zentrifugieren der Proben für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C. Der erhaltene Überstand enthielt die gelösten Plasmamembranproteine. Es schloß sich die Proteinkonzentrationsbestimmung an. Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines BCATM Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Bonn) durchgeführt. Es wurde zunächst entsprechend den Herstellerangaben eine Kalibriergerade mit BSA als Standard erstellt. Anschließend wurden jeweils die zu bestimmenden Proben und die Standardlösungen mit der BCA-Reagenz

versetzt. Nach kurzem Durchmischen auf dem Vortex und nach halbstündiger Inkubation bei RT konnte die Absorption bei $A_{562\text{nm}}$ gemessen werden. Die unbekannt Proteinkonzentrationen wurden über die gemessenen Absorptionen der BSA-Standardwerte bestimmt.

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

Zur Auftrennung von Proteinen aus dem Nebenhodenlysat wurden SDS-Polyacrylamidgele mit einer Acrylamid-Konzentration von 4 %-12 % verwendet. Der Gradient diente zur spezifischen Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Das gesamte Verfahren richtete sich nach dem Prinzip von *Lämmli* (1970). Die in NuPAGE LDS-Probenpuffer (4 x) gelösten (5 min bei 100 °C) und anschließend in NuPAGE Reducing Agent (10 x) behandelten Proteine (5 min bei 100 °C) wurden in die auf der Kathodenseite befindlichen Geltaschen pipettiert und mit Elektrophoresepuffer für 60 min bei 200 V und 120 mA aufgetrennt.

3.2.3.3. Proteinfärbung mit Ponceau-Rot

Die Kontrolle des Proteintransfers nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf die Membran erfolgte mittels Ponceau-Rot Färbung. Die Membran wurde mindestens fünf Minuten in der Ponceau-Rot Lösung unter gleichmäßigem Schwenken inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten mit Aqua dest. Gewaschen bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden.

3.2.3.4. Immunlogischer Nachweis der Proteine

Um unspezifische Bindungen des Nachweisantikörpers an die Membran zu verhindern, wurde die Membran nach halbstündiger Trocknung eine Stunde in Roti-Block (10 % in PBS, Roth, Nürnberg) abgesättigt. Danach wurde die Membran in eine Klarsichtfolie eingeschweißt, auf einem Orbitalrotator fixiert und auf niedrigster Stufe bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation dreimal für fünf Minuten mit PBS-T gewaschen. Nach Zugabe des Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers (Verdünnung 1 : 10000 in PBS), der an den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet, wurde die Membran eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte erneut ein Waschschrift für dreimal 15 Minuten in PBS-T-Puffer. Im direkten Anschluß erfolgte die Entwicklung der Membran mit Hilfe der ECL-Reagenz nach Angabe des Herstellers.

4. ERGEBNISSE

4.1. *Immunologischer Nachweis von ABCG2 innerhalb der Spermatogenese*

4.1.1. Immunhistochemische Ergebnisse

Die Expressionsstudie der Datenbank zeigt ein differentielles Verteilungsmuster von ABCG2 in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatogenese mit der stärksten Expression des Transporters in Spermatischen (Abb. 4). In Spermatischen Typ A und Typ B und in Spermatozyten ist sie im Vergleich deutlich erniedrigt. An Testisschnitten sollte deswegen immunhistochemisch die genaue Lokalisation des Transporters in den einzelnen Differenzierungsstufen des Keimepithels untersucht werden.

An der sich differenzierenden Akrosomkappe runder Spermatischen findet man die stärkste Reaktion, während der Rest der Zelle frei von ABCG2 ist. Es ist eine deutliche und prominente Immunfärbung sichtbar, die sich bei Betrachtung in einer höheren Vergrößerung bestätigt. Ebenso sind die Akrosomen einzelner elongierter Spermatischen ABCG2-positiv, was sich bei stärkerer Vergrößerung jedoch als schwächer ausgeprägt zeigt. Die Vorläuferzellen sind hingegen völlig frei von spezifischer Anfärbung. Der Transporter kann anhand einer gleichmäßigen Anfärbung in Sertolizellen lokalisiert werden, die von der Basalmembran bis an das Lumen des Tubulus heranreicht, während wiederum in den peritubulär gelegenen Myoidzellen keine Immunreaktion nachzuweisen ist. Innerhalb der Negativkontrolle sind weder die Akrosomkappe noch die Sertolizellen angefärbt.

Abbildungen 5 und 6 zeigen den immunhistochemischen Befund von ABCG2 innerhalb der Spermatogenese.

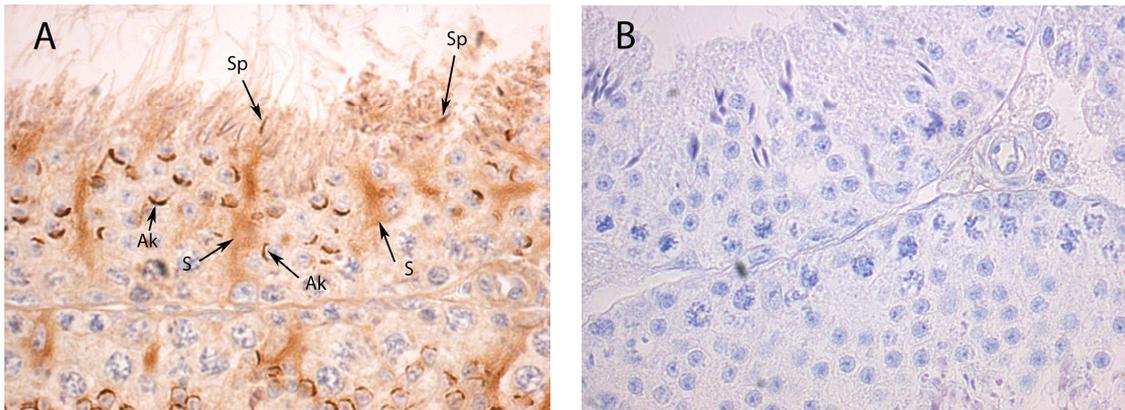


Abbildung 5 Nachweis von ABCG2 innerhalb der Tubuli seminiferi von Mäusen. (A) Die Sertolizellen (S) zeigen eine starke Immunreaktivität, die auch im sich differenzierenden Akrosom runder Spermatiden (Ak) und in elongierten Spermatiden (Sp) nachgewiesen werden kann. (B) Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper weist keine Anfärbungen auf. (Vergr.: 10 x 40).

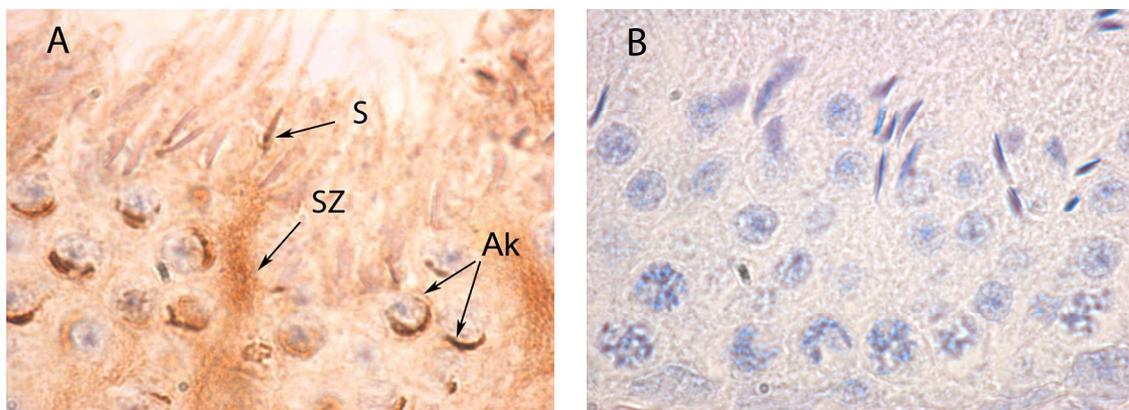


Abbildung 6 Nachweis von ABCG2 innerhalb der Spermatogenese. (A) Bei stärkerer Vergrößerung zeigt sich deutlich die Immunreaktion des ABCG2-Antikörpers in Sertolizellen (SZ). ABCG2 befindet sich an der Akrosomkappe runder Spermatiden (Ak) und in schwächerer Ausprägung in elongierten Spermatiden (S). (B) Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper zeigt keine Signale. (Vergr.: 10 x 100).

4.1.2. Fluoreszenznachweis

Als zusätzliche Darstellungsmethode von ABCG2 im murinen Keimepithel wurde die Immunzytochemie herangezogen. Die Ergebnisse, die zuvor mittels Immunhistochemie erbracht wurden, konnten mit Hilfe des immunfluoreszenzspezifischen Nachweises bestätigt werden.

Das Ergebnis der immunzytochemischen Untersuchung in Abbildung 7 zeigt, dass der Transporter verstärkt in Sertolizellen und im Bereich der Akrosomkappe runder Spermatiden detektiert wird. Der Nachweis von ABCG2 im Akrosom elongierter Spermatiden kann jedoch nicht erbracht werden, so dass sich sein Vorkommen in der Immunfluoreszenz-Färbung auf Sertolizellen und runde Spermatiden beschränkt.

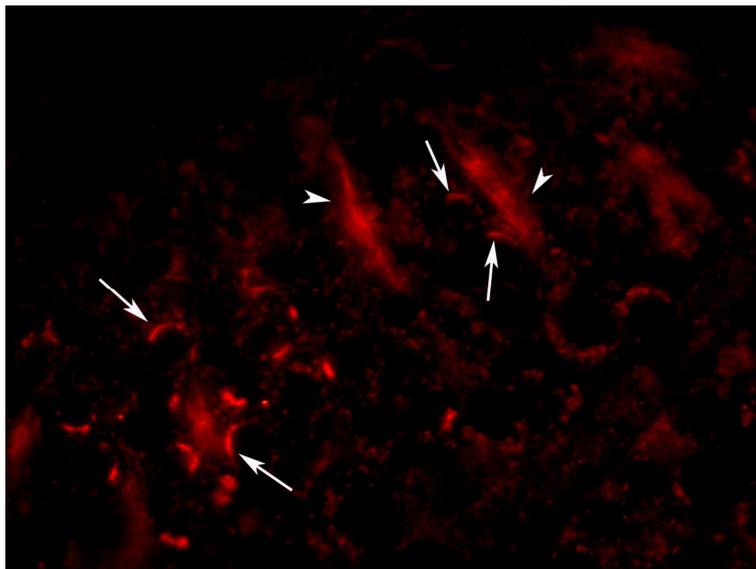


Abbildung 7 Lokalisation von ABCG2 innerhalb der Spermatogenese in der Immunfluoreszenz-Färbung. In Sertolizellen (Pfeilspitzen) und im akrosomalen Bereich von Spermatiden (Pfeile) kann ABCG2 eindeutig nachgewiesen werden. (Vergr.: 10 x 100).

4.2. *Nachweis von ABCG2 in reifen Spermatozoen*

Die Lokalisation von ABCG2 innerhalb der Spermatogenese ergibt eine deutlich ausgeprägte spezifische Immunreaktion in einzelnen Differenzierungsphasen. Diese sagt jedoch nichts über das Vorkommen des Transporters in Spermatozoen späterer Entwicklungsstadien aus, weswegen eine Immunfluoreszenz-Analyse an Spermatozoenausstrichen aus dem Epididymis durchgeführt wurde. In Abbildung 8 erkennt man, dass es dabei im akrosomalen Bereich des Spermatozoons zu einem eindeutigen spezifischen Signal des ABCG2-Antikörpers kommt. Auch im Mittelstück ist eine deutliche Immunreaktivität zu beobachten. Die spezifische Immunreaktion von ABCG2 ist in rot, die Kernfärbung in grün dargestellt.

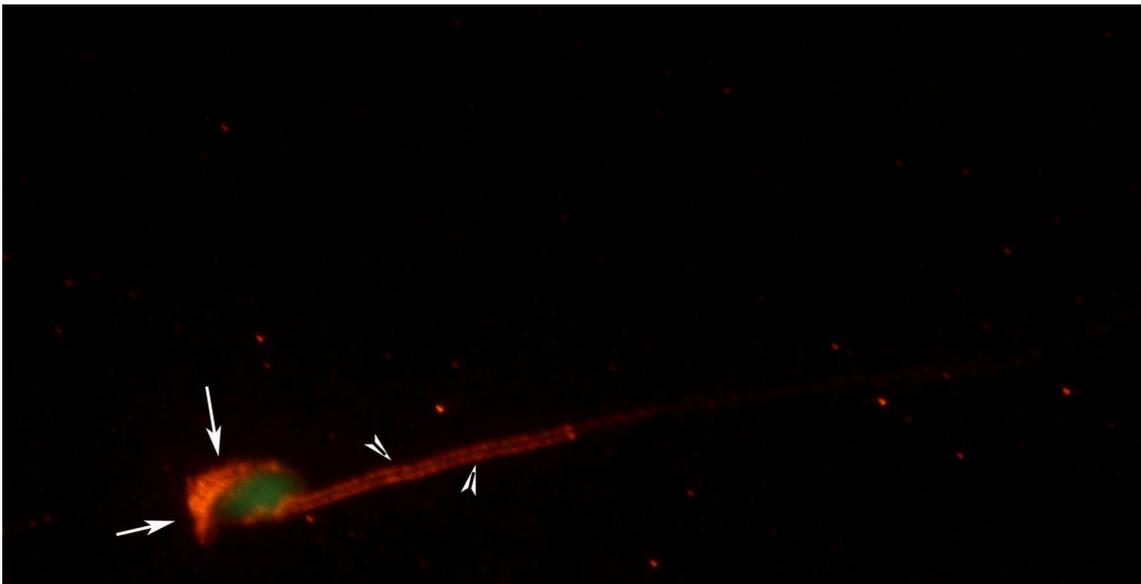


Abbildung 8 *ABCG2 Lokalisation im reifen Spermatozoon.* Das Spermatozoon wurde einer Doppelfärbung mit dem Kernfarbstoff SYTOX green® unterzogen. Im Bereich des Akrosoms zeigt sich eine stark ausgeprägte Immunreaktion (Pfeile). Im Mittelstück ist eine ebenso gut ausgeprägte Immunreaktion detektierbar (Pfeilspitze). (Vergr.: 10 x 100).

4.3. *ABCB9 innerhalb der Spermatogenese*

In Anlehnung an das aufgestellte Expressionsmuster für ABCB9 wurden murine Testisschnitte einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen, die zu keinem erkennbaren Ergebnis bezüglich seiner Lokalisation innerhalb der Spermatogenese führten. Weder in den Vorläuferzellen der Spermatogenese noch in den elongierten und reifen Spermatozoen ist eine nennenswerte Immunreaktion zu detektieren. Auch in den Sertolizellen ist keine spezifische Immunreaktion des ABCB9-Antikörpers erkennbar. Abbildung 9 zeigt das Keimepithel nach Behandlung mit dem anti-ABCB9-Antikörper.

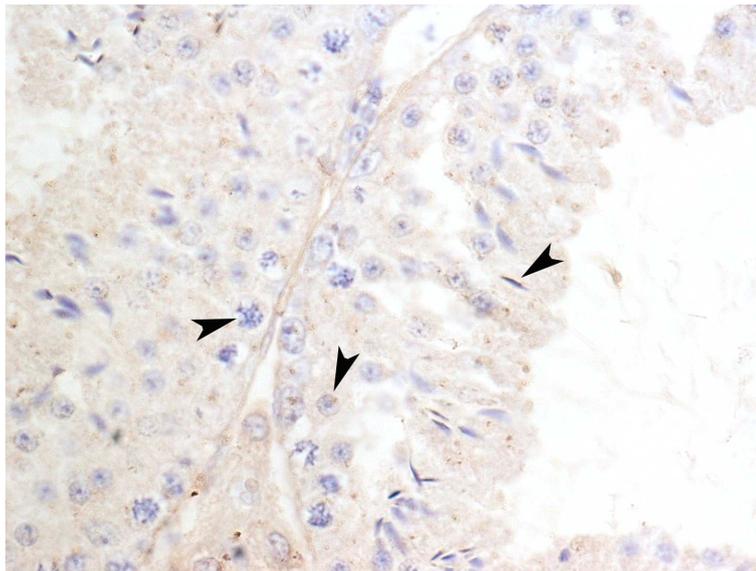


Abbildung 9 *ABCB9 kann im Testis der Maus in den Differenzierungsstufen der Spermatogenese nicht gefunden werden.* Es zeigt sich keine ABCB9-spezifische Anfärbung des Keimepithels (Pfeilspitzen). (Vergr. 10 x 20).

4.4. Lokalisation von ABCB9 in verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens

4.4.1. Immunhistochemische Ergebnisse

Die vorrausgegangene Analyse spricht für kein Vorkommen des ABCB9-Transporters im murinen Testis, allerdings ist eine starke ABCB9-spezifische Anfärbung im Bereich des Übergangs von Hoden zum Nebenhoden feststellbar. Zur genauen Untersuchung dieser Beobachtung wurden zunächst die drei Nebenhodenabschnitte (Caput, Corpus und Cauda epididymidis) präpariert, lichtmikroskopisch beurteilt und es erfolgte nach Herstellung der Paffinschnitte die Antikörperfärbung mit anti-ABCB9 und DAB-Markierung. In allen Abschnitten zeigt sich eine positive Anfärbung, wobei ein regional-spezifisches Verteilungsmuster von ABCB9 zu beobachten ist: ABCB9 wird am stärksten im Caput und Corpus epididymidis detektiert, während die Immunreaktion zum weiter distal gelegenen Cauda-Abschnitt deutlich abnimmt. Betrachtet man das Epithel des Nebenhodenkopfes, so findet man deutlich positive angefärbte Hauptzellen. Im apikal gelegenen Teil der Zellen können Bereiche dargestellt werden, die eindeutig ABCB9-positiv sind, während die basal gelegenen Zellkerne ABCB9-negativ sind.

Abbildungen 10 und 11 zeigen das regional-spezifische Verteilungsmuster von ABCB9 im Nebenhoden der Maus.

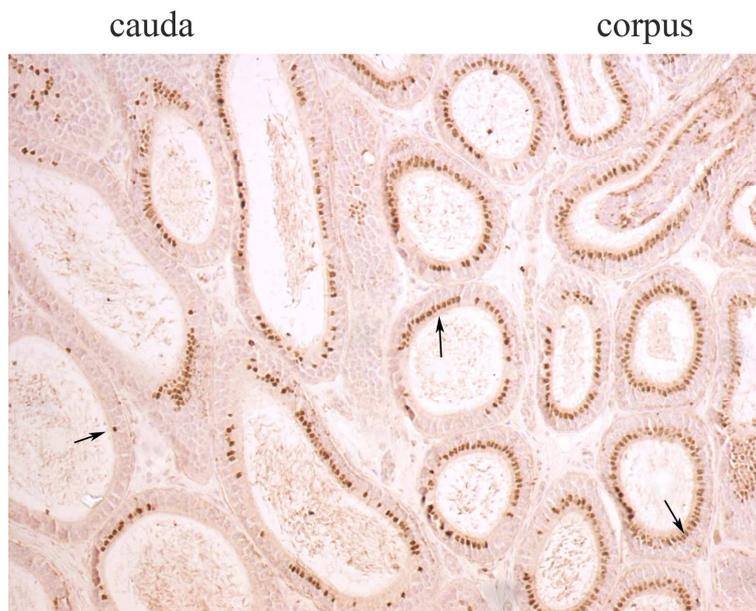


Abbildung 10 Darstellung eines regional-spezifischen Verteilungsmusters von **ABCB9** im murinen Nebenhoden. Mit Hilfe der Immunhistochemie kann gezeigt werden, dass ABCB9 im Nebenhodenepithel lokalisiert ist (Pfeile). Dargestellt ist der Übergang von Corpus zur Cauda epididymidis. ABCB9 ist im Corpus-Bereich deutlich stärker nachweisbar als im Cauda-Bereich. (Vergr. 10 x 20).

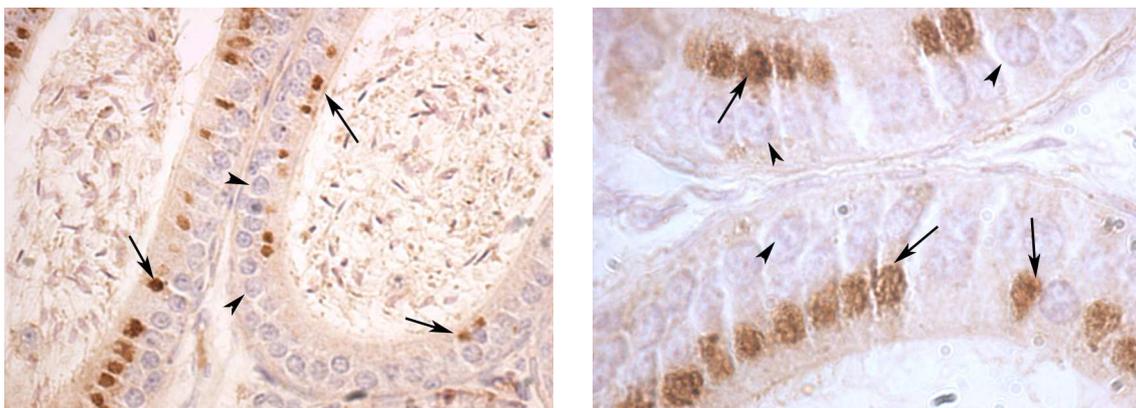


Abbildung 11 Immunhistochemische Lokalisation von **ABCB9** im **Corpus epididymidis**. **(A)** Die Pfeile (B9) deuten eine prominente Markierung der apikal gelegenen Bereiche der Epithelzellen an. Die basal gelegenen Zellkerne sind nicht angefärbt (Pfeilspitzen). (Vergr. 10 x 40). **(B)** (Vergr. 10 x 100).

4.4.2. Fluoreszenznachweis

Zwar zeigt sich immunhistochemisch ein regional-spezifisches Verteilungsmuster von ABCB9 in der Epididymis, jedoch wurde zur zusätzlichen Darstellung eine immunzytochemische Färbung des Nebenhodenkopfes durchgeführt, da dieser Bereich zuvor das stärkste Antikörper-Signal gezeigt hat. Die Doppelfärbung mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper und SYTOX green® erbringt folgendes Ergebnis: Das Vorkommen von ABCB9, das bereits bei der Immunhistochemie mit DAB-Markierung zu erkennen ist, findet sich auch bei der Fluoreszenzfärbung wieder. Auch hier kann ABCB9 deutlich im apikalen Bereich der Epithelzelle lokalisiert werden, während die basal gelegenen Zellkerne ABCB9-negativ sind.

Abbildung 12 zeigt die Doppelfärbung und den subzellulären Nachweis von ABCB9 in einem isolierten Ausschnitt des Nebenhodenkopfes.

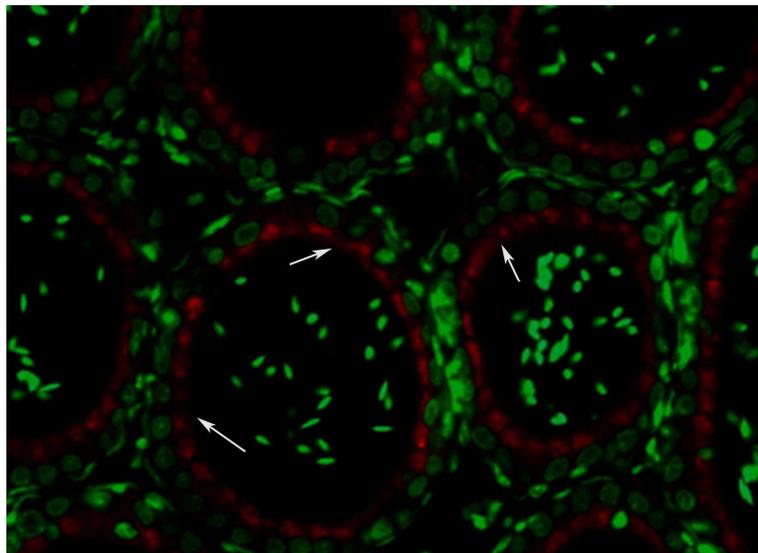


Abbildung 12 *Nachweis des ABCB9-Transporters im Caput epididymidis.* Die basal gelegenen Zellkerne des Nebenhodenepithels und die im Lumen der Tubuli seminiferi gelegenen Spermatozoen wurden mit SYTOX green® gefärbt. Es findet sich eine spezifische Anfärbung der Hauptzellen im apikalen Bereich (Pfeilspitzen). (Vergr. 10 x 40).

4.5. ***Nachweis einer regional spezifischen Expression von ABCB9 im Ductus epididymidis***

Mit Hilfe der Immunhistochemie kann die Lokalisation von ABCB9 innerhalb des Nebenhodens nachgewiesen werden. Um ABCB9 auf Proteinebene zu untersuchen wurde ein immunologischer Nachweis mittels Westernblot an den drei Nebenhodenabschnitten durchgeführt. Das Ergebnis zeigt ein regional-spezifisches Expressionsmuster von ABCB9. Entsprechend dem Molekulargewicht des ABCB9-Proteins von 84 kDa stellen sich deutliche Banden in Caput und Corpus des Nebenhodens dar, während in der Cauda epididymidis nur noch eine schwache Bande gefunden werden kann. Es zeigt sich dasselbe Verteilungsprofil wie bei der Immunhistochemie. ABCB9 wird am stärksten im proximalen Teil des Nebenhodens exprimiert, während die Expression in weiter distal gelegenen Abschnitten deutlich abnimmt. Abbildung 13 zeigt den Immunoblot zum Nachweis des ABCB9-Proteins im Nebenhoden.



Abbildung 13 ***Western-Blot-Analyse zum Nachweis von ABCB9 in verschiedenen Nebenhodenabschnitten.*** Die Analyse zeigt ein differentielles Verteilungsmuster des ABCB9-Proteins in den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens mit der stärksten Expression von ABCB9 im Caput epididymidis. Es können im Corpus und in der Cauda reaktive Banden in Höhe von 84 kDa beobachtet werden. In der Cauda ist nur eine sehr schwache Immunreaktion zu erkennen.

4.6. *Nachweis von ABCB9 in reifen Spermatozoen*

Nachdem ein regional-spezifisches Verteilungsmuster von ABCB9 im Nebenhoden sowohl in der Immunhistochemie als auch im Westernblot detektiert werden kann, sollte nun auch eine mögliche subzelluläre Lokalisation von ABCB9 in reifen Spermatozoen nachgewiesen werden. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, bei der sich eine Lokalisation von ABCB9 im akrosomalen Bereich des Spermatozoons darstellt, während der Übergang von Kopf zu Mittelstück ABCB9-negativ ist (Abb. 14).

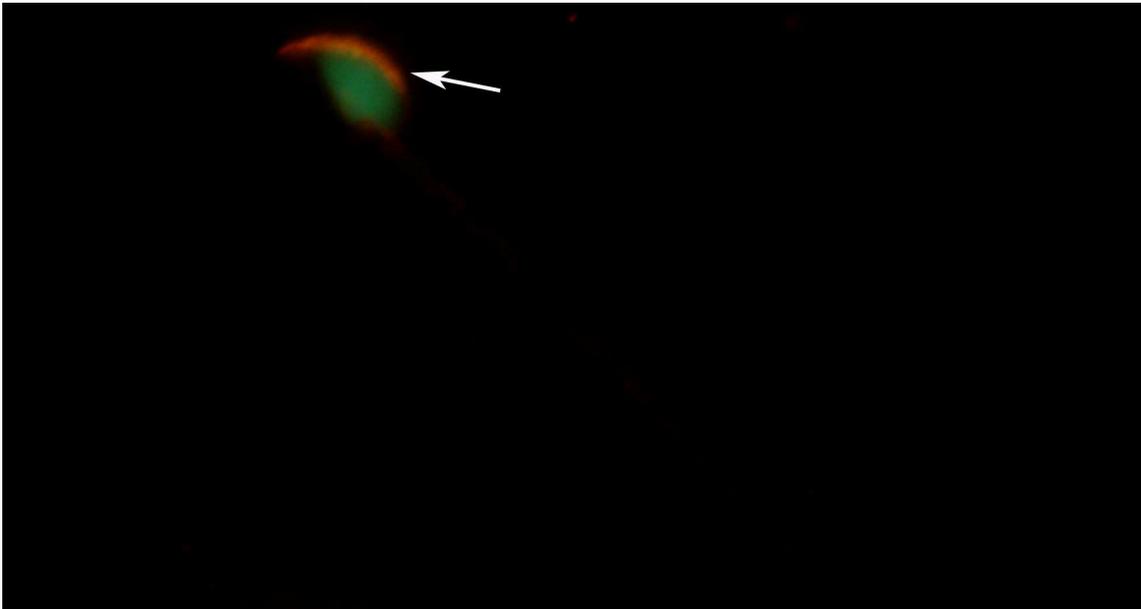


Abbildung 14 *Immunfluoreszenznachweis von ABCB9 in reifen Spermatozoen.* Der ABCB9-Nachweis erfolgte mit dem polyklonalen anti-ABCB9 Antikörper (1 : 100). In epididymalen Spermatozoen der Maus lässt sich ABCB9 deutlich im akrosomalen Bereich nachweisen (Pfeil). (Vergr. 10 x 100).

4.7. *ABCE1 innerhalb der Spermatogenese*

Anhand der Ergebnisse in Bezug auf die Lokalisation von ABCG2 und ABCB9 im männlichen Reproduktionstrakt sollte nun auch ein möglicher Nachweis von ABCE1 erbracht werden. Es ist in den Phasen der Spermatogenese eine Anfärbung zu detektieren, die dem anti-ABCB9 Antikörper allerdings nicht eindeutig zuzuordnen ist und für unspezifischen Hintergrund spricht. Gegenüber den oben beschriebenen Ergebnissen von ABCB9 und ABCG2 ist keine Immunreaktion des ABCE1-Antikörpers sowohl in den Differenzierungsstufen der Spermatogenese als auch in den Nebenhodenabschnitten erkennbar. Abbildung 15 zeigt ein Ergebnis nach DAB-Markierung in einem Ausschnitt eines Tubulus seminiferus.

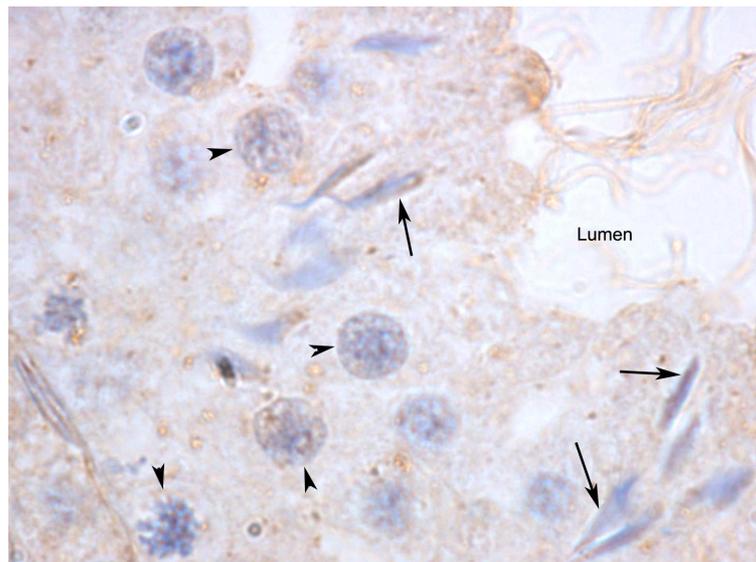


Abbildung 15 *Kein immunhistochemischer Nachweis von ABCE1 in den Stadien der Spermatogenese.* Weder die Vorläuferzellen (Pfeilspitzen) des Keimepithels noch die elongierten Spermatiden (Pfeile) weisen eine Färbung auf. (Vergr.10 x 40).

4.8. Nachweis von ABCE1 in reifen Spermatozoen

Nachdem ABCE1 immunhistochemisch in den verschiedenen Vorläuferzellen von Spermatozoen und im Nebenhoden nicht nachzuweisen ist, wird im Folgenden untersucht, ob ABCE1 in reifen Spermatozoen detektierbar ist. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzuntersuchung an Spermienaustrichen durchgeführt. Im Bereich des Akrosoms zeigt sich eine deutliche Immunfärbung, die sich wiederum im Mittelstück nur sehr schwach ausprägte. Abbildung 16 zeigt den Nachweis von ABCE1 innerhalb eines reifen Spermatozoons.

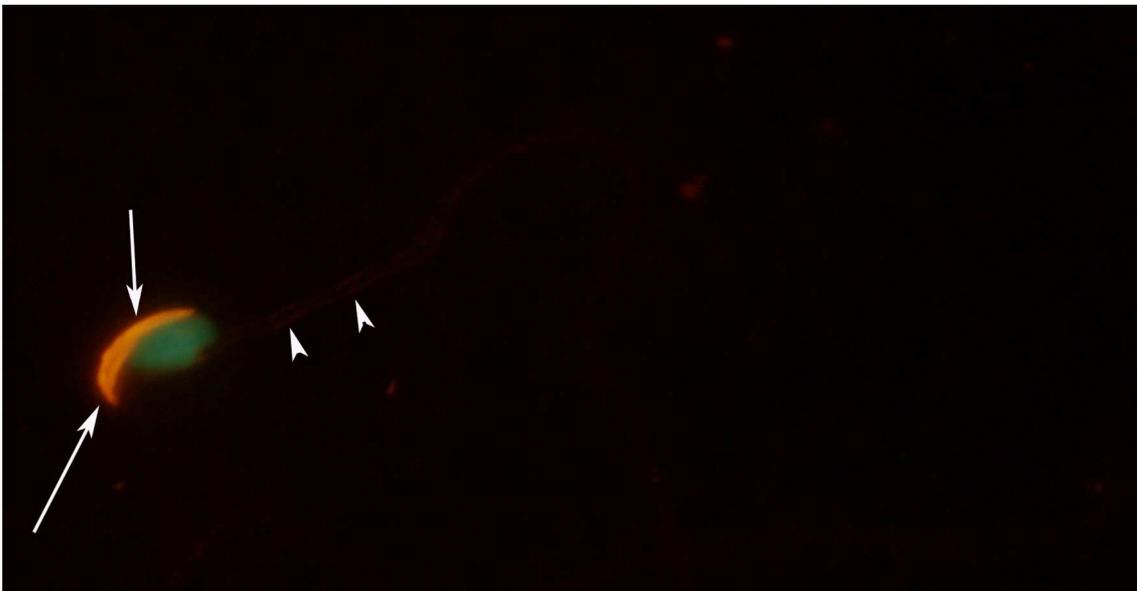


Abbildung 16 Immunfluoreszenznachweis von ABCE1 in reifen Spermatozoen.

Im Akrosom kann ABCE1 eindeutig nachgewiesen werden (Pfeilspitzen), während im Mittelstück eine sehr schwache Fluoreszenz detektierbar ist. (Vergr. 10 x 100).

4.9. *Nachweis von ABCG1 im Ductus epididymidis*

4.9.1. **Ergebnisse der Western-Blot-Analyse**

Als letzter der in dieser Arbeit gezeigten ABC-Transporter wurde ABCG1 einer Lokalisationsuntersuchung im Hodengewebe unterzogen. Um eine mögliche Expression von ABCG1 im Nebenhoden zu untersuchen, wurde ein Westernblot an den verschiedenen Abschnitten durchgeführt. Bei allen drei getesteten Abschnitten läßt sich eine eindeutige Antikörper-Reaktion in der Höhe von ABCG1 (75 kDa) darstellen. Mit der DAB-Färbung sowohl an Testis als auch Nebenhodenabschnitten kann der Nachweis des Transporters allerdings nicht erbracht werden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 17 zeigt den Immunoblot zum Nachweis des ABCG1-Proteins in allen untersuchten Nebenhodenabschnitten.

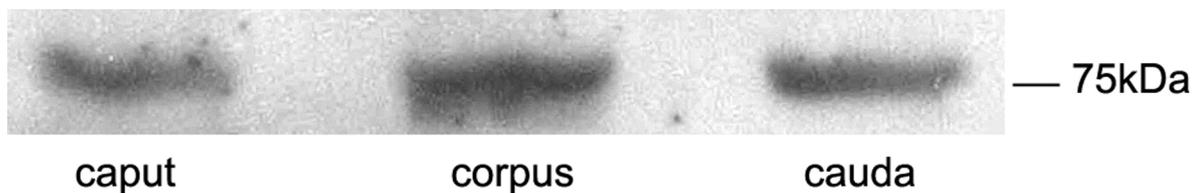


Abbildung 17 *Immunoblot zum Nachweis des ABCG1-Proteins im Nebenhoden.* Alle Abschnitte des Nebenhodens zeigen immunreaktive Banden in Höhe von ABCG1 (75 kDa).

4.10. Einfluss des ABCG2-spezifischen Inhibitors Fumitremorgin C auf den kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport muriner Spermatozoen

4.10.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis

Die Abnahme von Cholesterol aus der Spermatozoenmembran während des Prozesses der Kapazitation gilt als Voraussetzung für die sich anschließende Befruchtung des Spermatozoons im weiblichen Genitaltrakt (Visconti et al. 1999). Der genaue Mechanismus dieser Abnahme ist noch nahezu unbekannt.

Um eine potentielle Beteiligung von ABCG2 am kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport zu untersuchen, wurden Inkubationsversuche mit dem spezifischen ABCG2-Inhibitor FTC durchgeführt. Dabei wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) als Analysemethode eingesetzt.

Die DC erlaubt Aussagen über den Cholesterolgehalt in kapazitierten Spermatozoenmembranen. Um Bedingungen für eine Kapazitation zu gewährleisten wurde HSB-Puffer als Medium verwendet, der die Voraussetzungen für eine Kapazitation muriner Spermatozoen begünstigt. Anschließend wurde der Cholesterolgehalt in den Spermatozoenmembranen zu Beginn und nach zwei Stunden HSB-Inkubation mit und ohne Zugabe von FTC gemessen und densitometrisch ausgewertet um sie grafisch vergleichen zu können.

Kapazitierte Spermatozoen (HSB) zeigen nach zwei Stunden Inkubation und ohne FTC gegenüber dem zu Beginn gemessenen Wert einen geringeren Cholesterolgehalt in ihren Membranen auf. Der Gehalt nimmt nach zweistündiger Inkubation gegenüber dem Anfangswert von 37,59 Vol. % auf 11,40 Vol. % ab. Die kapazitierten mit FTC inhibierten Spermatozoenmembranen weisen einen annähernd gleichen Wert zwischen den zu Beginn und nach zwei Stunden gemessenen Werten auf (27,64 Vol. % vs. 30,27 Vol. %). Beim direkten Vergleich des Cholesterolgehaltes nach zwei Stunden Inkubation mit und ohne FTC kann somit ein inhibierender Effekt durch

die alleinige Zugabe von FTC auf den kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport in Spermatozoen nachgewiesen werden (11,40 Vol. % (HSB) vs. 30,27 Vol. % (HSB+FTC), t = 2h).

Abbildung 18 zeigt den gemessenen Cholesterolgehalt in Membranen kapazitierter Spermatozoen mit und ohne FTC zu Beginn und nach zwei Stunden Inkubation durch die Methode der Lipiddünnschichtchromatographie.

Inhibitorischer Effekt von FTC auf kapazitierte Spermatozoen

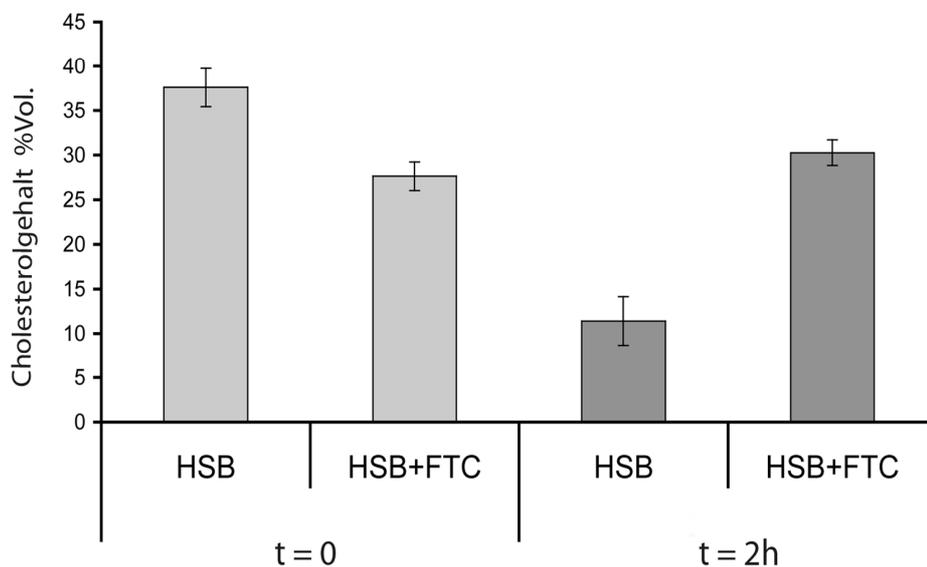


Abbildung 18 ***Effekt von FTC auf den kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport in Spermatozoen mittels Dünnschichtchromatographie.*** Der Cholesterolgehalt der kapazitierten, nicht mit FTC-inhibierten Spermatozoenmembranen (HSB) nimmt verglichen mit der Messung zu Beginn (t=0) nach zwei Stunden (t=2h) deutlich ab, während sich der Cholesterolgehalt in kapazitierten und inhibierten Spermatozoenmembranen (HSB+FTC) nach zwei Stunden gegenüber dem Zeitpunkt Null nicht wesentlich unterscheidet. (n=5)

Unter nicht-inhibierten Bedingungen (HSB) zeigt sich im Vergleich zu inhibierten Bedingungen (HSB+FTC) eine deutliche Reduktion des Cholesterolgehaltes nach zwei Stunden (11,40 Vol.% vs 30,27 Vol.%). Angegeben sind die Mittelwerte (n = 5) in Vol. % und die Standardfehler (se) des Cholesterolgehaltes in kapazitierten Spermatozoenmembranen. Eine Inhibition des ABCG2-Transporters durch FTC führt zu einem verminderten Transport von Cholesterol während der Kapazitation.

Tabelle 1 zeigt übersichtlich den Cholesterolgehalt in kapazitierten Spermatozoen nach vorausgegangener Lipidextraktion und anschließender dünnschichtchromatographischer Auftrennung.

Tabelle 1 Übersicht des Cholesterolgehaltes (vol %) in kapazitierten (HSB) Spermatozoenmembranen mit und ohne Zugabe von FTC nach der Dünnschichtchromatographie. Angegeben sind Mittelwerte (n=5) und Standardfehler (se) des Cholesterolgehaltes in Vol%.

	t=0	t=0	t=2 h	t=2h
	HSB	HSB+FTC	HSB	HSB+FTC
Vol. %	37,59	27,64	11,40	30,27
se ±	2,17	1,50	2,73	1,43

Tabelle 2 Übersicht der Fragestellung, der erbrachten Ergebnisse und der angewandten Methoden.

Nachweis von	Ergebnisse / Methode
<p>1. ABCG2</p>	<p>ABCG2 ist in der sich differenzierenden Akrosomkappe runder Spermatisden^{1,2} , im Akrosom elongierter Spermatisden¹ , in reifen Spermatozoen² und in Sertolizellen^{1,2} nachweisbar.</p> <p>Des Weiteren kann durch Inhibition von ABCG2 ein verminderter kapazitationsassoziierter Cholesteroltransport in Spermatozoen gezeigt werden⁴.</p>
<p>2. ABCB9</p>	<p>ABCB9 kann regional-spezifisch im Nebenhoden^{1,2,3} detektiert und im Akrosom reifer Spermatozoen² nachgewiesen werden.</p>
<p>3. ABCG1</p>	<p>Das ABCG1-Protein ist in den drei Nebenhodenabschnitten Caput, Corpus und Cauda nachweisbar³.</p>
<p>4. ABCE1</p>	<p>ABCE1 ist im Akrosom reifer Spermatozoen² nachweisbar.</p>

¹ DAB Markierung, ² Immunfluoreszenz, ³ Western Blot, ⁴ Methode der Lipiddünnschichtchromatographie

5. DISKUSSION

Die von Shima *et al.* veröffentlichten Daten zur Expression von ABC-Transportern im Urogenitaltrakt der Maus waren Anlass für die eigenen Untersuchungen. Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, die Lokalisation und das Vorkommen der Transporter ABCB9, ABCE1, ABCG1 und ABCG2 im murinen Hodengewebe näher zu charakterisieren. Es kann zudem zum ersten Mal ein möglicher Einfluss von ABCG2 auf den kapazitationsassoziierten Cholesterolefflux aus der Spermatozoenmembran gezeigt werden. Zuerst sollen die Ergebnisse für ABCG2 diskutiert werden, gefolgt von der Diskussion der erbrachten Daten für ABCB9, ABCE1 und ABCG1.

ABCG2 innerhalb der Spermatogenese

Um eine posttestikuläre Reifung der Spermatozoen und die sich anschließende Fertilisation zu gewährleisten, ist der männliche Organismus auf eine sich fehlerfrei vollziehende Spermatogenese angewiesen. Die einzelnen Zellen in den unterschiedlichen Differenzierungsphasen der Spermatogenese bilden die Grundlage für die Reifung der männlichen Keimzellen (Russell 1990). Zwar gelten die Stammzellen aufgrund ihrer niedrigen Teilungsrate als sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse wie Röntgenstrahlung, jedoch sind die proliferierenden und sich differenzierenden Spermatogonien aufgrund ihrer höheren Teilungsrate anfälliger gegenüber Noxen, welche die Spermatogenese beeinflussen können (Russell 1990; Russell 2004). Das sich entwickelnde Keimepithel wird von den Sertolizellen umgeben. Sie sind Teil der Blut-Hoden Schranke und übernehmen, neben der Synthese von Proteinen wie dem Androgen-Binding Protein, eine wichtige Funktion in der Entwicklung des Hodens (Griswold 1998). Verbunden mit den germinativen Zellen über intensive Zell-Zell-Kontakte sorgen sie für einen stabilen und gut organisierten Ablauf der Spermatogenese (Schulze 1992). Daneben besitzen sie eine mitogene Wirkung auf das Keimepithel und sind sowohl an der Spermiation, als auch an der

Migration der Keimzellen durch die Blut-Hoden Schranke beteiligt (Kierszenbaum 1994). In der 2008 veröffentlichten Studie von Enokizono *et al.*, die sich mit dem Nachweis von ABCG2 sowohl in der Blut-Hoden Schranke, als auch in der Blut-Hirn Schranke beschäftigte, konnte eine Beteiligung des ABCG2-Transporters in der Barrierefunktion gegenüber Xenobiotika in der Blut-Hoden Schranke aufgezeigt werden (Enokizono *et al.* 2008). Diese Beobachtungen interpretierten die Autoren als eine Regulatorfunktion von ABCG2 bei Membranpassagen von Xenobiotika. In einer von Fetsch *et al.* durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung konnte zudem das ABCG2-Protein in Sertolizellen nachgewiesen werden (Fetsch *et al.* 2006). Man vermutete eine Schutzfunktion von ABCG2 im Gewebe vor Zytotoxinen. Einen wichtigen Nachweis von ABCG2, in Bezug auf sein Vorkommen in der Spermatogenese, erbrachte die 2004 publizierte Expressionsstudie von Lassalle *et al.*, in der die Expression von ABCG2-mRNA in Spermatogonien, in Spermatozyten und in haploiden Spermatischen beschrieben wurde (Lassalle *et al.* 2004). Die Studie machte keine Aussage über ABCG2 in Sertolizellen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass ABCG2 im murinen Keimepithel während der verschiedenen Differenzierungsstufen der Spermatogenese auf Proteinebene nachweisbar ist.

Immunhistochemisch kann ABCG2 in der sich differenzierenden Akrosomkappe runder Spermatischen, in elongierten Spermatischen und in Sertolizellen eindeutig nachgewiesen werden. In elongierten Spermatischen zeigt sich eine schwache immunhistochemische Färbung im Bereich des Akrosoms. Als zusätzliche Darstellungsmethode wurde die fluoreszenzmikroskopische Analyse herangezogen. Die Befunde decken sich mit den Ergebnissen der Immunhistochemie und zeigen eine subzelluläre Lokalisation des Transporters in der Akrosomkappe runder Spermatischen und in Sertolizellen. Die Lokalisation innerhalb der Spermatogenese lässt eine Beteiligung von ABCG2 an der Keimzellentwicklung vermuten.

Die genaue Lage des Transporters im Keimepithel ist noch nicht bekannt und wurde weder in der Arbeit von Lassalle, noch in der von Fetsch genau beschrieben (Lassalle *et al.* 2004; Fetsch *et al.* 2006). In allen untersuchten

Proben der vorgelegten Arbeit kann ABCG2 in der akrosomalen Region detektiert werden. Rocchi *et al.* fanden immunhistochemische Hinweise für eine Lokalisation von ABCG2 innerhalb von Plasmamembranen in arzneimittel-resistenten Zelllinien, die von Litman *et al.* mittels Konfokalmikroskopie untermauert wurden (Litman *et al.* 2000; Rocchi *et al.* 2000). Zusammen mit den hier beobachteten Fakten bezüglich der Lokalisation von ABCG2 lassen diese Daten die Hypothese zu, dass ABCG2 speziell innerhalb der Spermatogenese in der Akrosommembran vorliegt.

Die Tatsache, dass ABCG2 in Sertolizellen detektiert werden kann, schließt zusammen mit den von Fetsch *et al.* erbrachten Daten eine potentielle Rolle des Transporters im Schutz der Zellen vor toxischen Einflüssen nicht aus (Fetsch *et al.* 2006). Dafür sprechen zudem die Daten, wie sie für P-gp beschrieben wurden. P-gp limitiert die Bioverfügbarkeit zytotoxischer Substanzen und verleiht Tumorzellen eine Resistenz gegen Chemotherapeutika (Endicott and Ling 1989; Ambudkar *et al.* 1999). Außerdem übernimmt P-gp eine wichtige Aufgabe im Schutz hämatopoetischer Stammzellen vor toxischen Substanzen (Sarkadi *et al.* 2006). Der Transporter konnte mittels Immunhistochemie in murinen testikulären Zellen lokalisiert werden (Melaine *et al.* 2002). Die Autoren schlossen aus der Präsenz von P-gp in Sertolizellen und peritubulären Zellen auf eine mögliche Transporter- und Schutzfunktion in der Blut-Hoden Schranke. Daneben zeigten sie die Lokalisation von P-gp in elongierten Spermatisden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und denen von Melaine *et al.* lassen eine Mitbeteiligung von ABCG2 in der Blut-Hoden-Schranke vermuten. ABCG2 könnte dabei eine zentrale Rolle im Transport toxischer Substanzen während der Keimzellentwicklung einnehmen. In den Arbeiten von Bart *et al.* wurde gezeigt, dass P-gp und ABCG2 in Endothelzellen und den myoiden Zellen der Tubuli seminiferi auf Proteinebene nachzuweisen waren (Bart *et al.* 2004). Ihre Analysen zeigten hingegen kein Vorkommen von ABCG2 und P-gp in Sertolizellen, was die Autoren auf ein Herausschleusen der Substrate des Transporters in das Lumen der Tubuli seminiferi zurückführten (Bart *et al.* 2004). Da in dieser Arbeit jedoch ABCG2 mit Hilfe des Antikörpers ABCG2-87405 in Sertolizellen detektiert werden kann, könnte es demnach sein,

dass das zu identifizierende Interaktionsepitop in maskierter Form vorliegt und somit eine Bindung des von Bart *et al.* verwendeten Antikörpers unmöglich macht.

ABCG2 in der Kapazitation

Ein wichtiges Ereignis der Kapazitation ist die Veränderung der Lipidzusammensetzung und die damit verbundene Entfernung von Cholesterol aus der Spermatozoenmembran. Der Efflux von Cholesterol und die daraus resultierende Induktion einer cAMP-Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung von Tyrosinresten an Zielproteinen gilt als ein Teil der Kapazitation (Visconti *et al.* 1999; Travis and Kopf 2002). Der genaue Mechanismus, durch den das Cholesterol während der Kapazitation die Membran verlässt, ist weitestgehend unklar.

Es ist bekannt, dass mehrere Transporter, die zu der ABCG-Unterfamilie zählen, am Cholesteroltransport in verschiedenen Geweben beteiligt sind. So wird den beiden Transportern ABCG1 und ABCG4 eine Regulationsfunktion in der Sterolakkumulation zugesprochen. Zudem vermitteln ABCG5 und ABCG8 die Cholesterolausscheidung in Dünndarm und Leber (Wang *et al.* 2004; Vaughan and Oram 2005; Gelissen *et al.* 2006; Kusuhara and Sugiyama 2007). Neuere Studien weisen darüber hinaus auf einen Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die ATPase-Aktivität des ABCG2-Transporters in somatischen Zellen hin. Mit Anstieg des Cholesterols zeigte sich eine erhöhte ATPase-Aktivität von ABCG2 (Pal *et al.* 2007; Telbisz *et al.* 2007). Die Autoren interpretierten die ATPase-Aktivität als Nachweis der Aktivität des Transporters. Die Ergebnisse lassen ABCG2 als Transporter für Cholesterol vermuten. Daneben konnte kürzlich gezeigt werden, dass die drei ABC-Transporter ABCA1 und ABCA7 und ABCG1 in Spermatozoen nachweisbar und am Cholesteroltransport während der Kapazitation beteiligt sind (Morales *et al.* 2008). Nach Inhibition der ABC-Transporter zeigte sich eine deutliche Reduktion des Cholesteroltransportes in Spermatozoen während der

Kapazitation. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Untersuchungen wurde in der Studie kein spezifischer Inhibitor verwendet. Durch Koinkubation mit den entsprechenden Antikörpern wurde die Entfernung des Cholesterols aus der Spermatozoenmembran anhand eines Cholesterolassays ermittelt. Nach Inhibition der beschriebenen Transporter zeigte sich eine Reduktion des Cholesteroltransportes um bis zu 40 %. Die Studie wies zudem eine bis zu 70 %-reduzierte Fertilisationsrate kokultivierter Oozyten nach Inhibition der beschriebenen ABC-Transporter nach. So konnte ein Zusammenhang zwischen ABC-Transportern und der Fertilisation festgestellt werden.

Mit dem Ziel, den Cholesterolgehalt in kapazitierten Spermatozoen nach Inkubation mit dem ABCG2-spezifischen Inhibitor FTC zu messen, wurde in dieser Arbeit die Methode der Lipiddünnschichtchromatographie herangezogen. So konnte eine mögliche Mitbeteiligung des ABCG2-Transporters auf den Cholesterolgehalt während der Kapazitation untersucht werden. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass es *in vitro* möglich war, den Vorgang der Kapazitation möglichst genau zu imitieren. Man brauchte daher Lipidextrakte aus Membranen kapazitierter Zellen. Als Kontrolle diente die aus derselben Gewebeprobe entnommene Spermatozoensuspension ohne Zusatz des Inhibitors. Beim direkten Vergleich zwischen dem Cholesterolgehalt in kapazitierten, inhibierten Spermatozoen zum Zeitpunkt Null und nach zwei Stunden zeigt sich kein wesentlicher Unterschied. Unter nicht inhibierten Bedingungen entspricht der Cholesterolgehalt in kapazitierten Spermatozoen zum Zeitpunkt Null 37,59 Vol. % (se \pm 2,17). Kapazitierte Spermatozoen ohne den ABCG2-spezifischen Inhibitor weisen nach zwei Stunden Inkubation einen niedrigeren Cholesterolgehalt auf (11,40 Vol. %; se \pm 2,73), während unter Inhibition mit FTC der Cholesterolgehalt in Spermatozoen nach zwei Stunden annähernd gleich ist (30,27 Vol. %; se \pm 1,43). Ähnlich den Ergebnissen von *Morales* lässt sich mit den hier erbrachten Ergebnissen zu ABCG2 ein weiterer Vertreter der ABC-Familie identifizieren, der eine Reduktion des kapazitationsassoziierten Cholesteroltransportes durch einen ABC-Transporter bewirkt. Der direkte Zusammenhang zwischen FTC und dem kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport lässt vermuten, dass ABCG2

aktiv an diesem Vorgang beteiligt ist. Ob mit FTC inhibierte Spermatozoen eine reduzierte Befruchtungsfähigkeit aufzeigen, müsste auf Basis der in dieser Versuchsreihe und in der Studie von *Morales* erarbeiteten Ergebnisse in weiteren Untersuchungen angestrebt werden (Morales et al. 2008).

Die Tatsache, dass in der vorgelegten Arbeit ABCG2 als Cholesteroltransporter identifiziert werden kann, könnte erklären, dass es in der Studie von *Morales* zu keinem kompletten Ausfall des Cholesteroltransportes nach Inhibition der drei ABC-Transporter ABCA1, ABCA7 und ABCG1 kommt.

Untersuchungen zur Lokalisation von ABCB9 und ABCG1 im murinen Nebenhoden

Von den in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transportern wird im Mäusetestis in erster Linie nur ABCG2 nachgewiesen. Entgegen den Erwartungen kann ABCB9 im Testis nicht lokalisiert werden. Diese Daten waren insofern überraschend, da der Transporter eine hohe Expression in Spermatozyten und Spermatischen aufzeigte (Shima et al. 2004). Jedoch kann ABCB9 in der darauf folgenden Untersuchung im Bereich des Übergangs von Hoden zum Nebenhoden detektiert werden. Deshalb wurde der Nebenhoden auf ein Vorkommen von ABCB9 in den einzelnen Abschnitten untersucht.

Mittels Immunhistochemie kann ABCB9 eindeutig im Nebenhoden lokalisiert werden. Die ABCB9-Immunreaktivität überwiegt im Nebenhodenkopf und nimmt kontinuierlich zum Nebenhodenschwanz hin ab. Im apikalen Bereich der Epithelzellen ist eine deutliche Akkumulation von ABCB9 zu erkennen, während die basal gelegenen Zellkerne ABCB9-negativ sind. Mit Hilfe der Immunzytochemie kann die erbrachte subzelluläre Lokalisation im Nebenhoden bestätigt und unterstützt werden.

ABCB9 ist nicht der einzige ABC-Transporter, der bisher im Nebenhoden detektiert werden konnte. Enokizono *et al.* beschrieben ein derartiges Vorkommen für ABCG2 (Enokizono et al. 2007a). ABCG2 konnte in unterschiedlichen Bereichen des Caput und Corpus epididymidis humaner und muriner Gewebeproben lokalisiert werden. Im Bereich des Caput zeigte sich

eine Immunreaktion im luminalen und adluminalen Bereich der Tubuli seminiferi. Im Corpus hingegen zeigten sich ABCG2-Signale in den dem Lumen zugewandten Membranen der Endothelzellen.

Die posttestikuläre Reifung der Spermatozoen findet erst während ihrer Passage durch den Nebenhodengang statt (Cooper 1995). Ausgehend von der Tatsache, dass ABCB9 in der vorgelegten Arbeit regional-spezifisch im Nebenhoden nachweisbar ist, kann eine Mitbeteiligung von ABCB9 an der Spermatozoenreifung vermutet werden. Über die genaue Funktion von ABCB9 im Epididymis, und über einen potentiellen Effekt des Transporters auf die Reifung der Spermatozoen konnten allerdings anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Aussagen gemacht werden.

Außer mit Hilfe der Immunhistochemie wurde die regional-spezifische Lokalisation von ABCB9 im Nebenhoden mittels Westernblot gezeigt und bestätigt. Die Untersuchung ergibt einen deutlichen Nachweis des ABCB9-Proteins in Caput und Corpus epididymidis. Im Gegensatz hierzu zeigt sich in der Cauda nur eine schwache immunreaktive Bande.

Die ductuli efferentes stellen den Übergang vom Hoden zum Nebenhodenkopf dar. Erst durch das Milieu des Nebenhodengewebes erlangen die Spermatozoen ihre Fähigkeit zur Motilität und Befruchtung (Bedford 1967).

Morales et al. beschrieben eine regional-spezifische Expression von ABCG1 im Nebenhoden der Maus. Sie zeigten eine funktionelle Beteiligung des Transporters am kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport. Analog zu ihrem Ergebnis belegt der parallel hier erbrachte Nachweis des Proteins die Expression von ABCG1 im Caput, Corpus und Cauda des Ductus epididymidis. Die Regulation der Tyrosin-Phosphorylierung über den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg ist für die epidymale Spermatozoenreifung und ihre Motilitäts-erlangung während der Nebenhodenpassage entscheidend (Mahony and Gwathmey 1999). Somit könnte ABCB9 eine Rolle bei der Kapazitation spielen, was durch den oben beschriebenen regional-spezifischen Nachweis von ABCB9 im Nebenhoden bestätigt wird.

Untersuchungen von ABCB9, ABCE1 und ABCG2 in Spermatozoen

Um die ABC-Transporter ABCB9, ABCE1 und ABCG2 auch in epidymalen Spermatozoen nachzuweisen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung an Ausstrichpräparaten isolierter Nebenhodenspermatozoen durchgeführt. Dabei kann ABCG2 in der akrosomalen Region und im Mittelstück der Flagellen nachgewiesen werden. Die ABCB9- und ABCE1-Immunreaktivität akkumuliert hingegen deutlich im Akrosombereich epidymaler Spermatozoen.

Die Tatsachen, dass ABCG2 sowohl in den Phasen der Spermatogenese detektiert, als auch erstmals seine Rolle auf den kapazitationsassoziierten Cholesteroltransport gezeigt werden kann, sprechen für eine wichtige Aufgabe des Transporters in Spermatozoen.

Morales *et al.* beschrieben eine ähnliche Lokalisation von ABCA1, ABCA7 und ABCG1 mittels Westernblot und Immunzytochemie in epidymalen Spermatozoen (Morales et al. 2008). Die ABCA1- und ABCA7-Signale wurden deutlich im akrosomalen Bereich lokalisiert. Die Autoren konnten, wie schon vorher beschrieben, mit ihren Befunden einen Zusammenhang zwischen ABC-Transportern und der Fertilisation feststellen. Die Tatsache, dass ABCB9 und ABCG2 dieselbe Lokalisation aufzeigen, schließt eine mögliche Mitbeteiligung der Transporter während der Kapazitation und der mit ihr verbundenen Fertilisation nicht aus.

Der in dieser Arbeit erbrachte alleinige Nachweis von ABCE1 in Spermatozoen lässt uns vermuten, dass er eine spezielle Funktion in diesen besitzt und kann die Hypothese über seine reine Regulation-, Translation- und Transkriptionsfunktion während der Proteinbiosynthese nicht belegen (Dong et al. 2004; Zhao et al. 2004).

Die hier präsentierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die genaue Lokalisation mit der sich daraus ergebenden Funktion der ABC-Transporter im murinen Reproduktionstrakt noch weithin ungeklärt ist. Darüber hinaus ergeben sich durch den hier erbrachten Nachweis, dass ABCG2 einen modulierenden Effekt auf das Ereignis der Kapazitation hat, zusätzliche neue Anhaltspunkte in

Bezug auf die Entwicklung des Spermatozoons und der damit verbundenen Fertilisation. Ausgehend von den Befunden, dass ABCG2 den Cholesteroltransport beeinflusst und somit einen indirekten Einfluss auf die Kapazitation nimmt, ist eine Mitbeteiligung des Transporter bei nachfolgenden Signaltransduktionsprozessen für die epidymale Spermatozoenreifung und bei der Erlangung ihrer Motilität während der Nebenhodenpassage denkbar. Beides sind Vorgänge, die für die Kapazitation entscheidend sind (Visconti et al. 1999; Travis and Kopf 2002).

Der Nachweis von ABC-Transportern ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Auf Basis der in der vorliegenden Dissertation erarbeiteten Ergebnisse können weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Rolle von ABC-Transportern im männlichen Genitaltrakt angestrebt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abele R, Tampe R (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* 1461: 405-419
- 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
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 361-398
- Appelt Quantitative Lipidanalyse biologischer Proben durch hochauflösende Dünnschichtchromatographie In, IMB Jena e.V.
- Asano A, Selvaraj V, Buttke DE, Nelson JL, Green KM, Evans JE, Travis AJ (2009) Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts. *J Cell Physiol* 218: 537-548
- Austin CR (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170: 326
- 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
- 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
- Barthelme D, Scheele U, Dinkelaker S, Janoschka A, Macmillan F, Albers SV, Driessen AJ, Stagni MS, Bill E, Meyer-Klaucke W, Schunemann V, Tampe R (2007) Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J Biol Chem* 282: 14598-14607

- Basso F, Amar MJ, Wagner EM, Vaisman B, Paigen B, Santamarina-Fojo S, Remaley AT (2006) Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 398-404
- Bedford JM (1967) Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J Exp Zool* 166: 271-281
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917
- Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71: 537-592
- Brandt H, Hoskins DD (1980) A cAMP-dependent phosphorylated motility protein in bovine epididymal sperm. *J Biol Chem* 255: 982-987
- Breitbart H (2002) Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 187: 139-144
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47: 381-389
- Cooper TG (1995) Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv Exp Med Biol* 377: 87-101
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 1277-1287
- Cross NL (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59: 7-11
- De Jonge C (1996) The cAMP-dependent kinase pathway and human sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 1: d234-240

- Dean M, Annilo T (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123-142
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017
- Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qiu H, Hinnebusch AG (2004) The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* 279: 42157-42168
- Doyle LA, Ross DD (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22: 7340-7358
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15665-15670
- Endicott JA, Ling V (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 58: 137-171
- 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
- Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y (2007a) Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol* 72: 967-975
- Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y (2007b) Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases. *Drug Metab Dispos* 35: 922-928
- 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
- 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
- Gadella BM, Flesch FM, van Golde LM, Colenbrander B (1999) Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q* 21: 142-146
- 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
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA (2008) Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* 52: 473-480
- Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W (2006) ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 534-540
- Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427
- Griswold MD (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9: 411-416
- Harrison RA (2004) Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 67: 337-352
- Harrison RA, Miller NG (2000) cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55: 220-228
- Heimerl S, Bosserhoff AK, Langmann T, Ecker J, Schmitz G (2007) Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res* 17: 265-273
- Higgins CF (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* 152: 205-210
- Hofacker M, Gompf S, Zutz A, Presenti C, Haase W, van der Does C, Model K, Tampe R (2007) Structural and functional fingerprint of the mitochondrial

- ATP-binding cassette transporter Mdl1 from *Saccharomyces cerevisiae*.
J Biol Chem 282: 3951-3961
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 107
- Inaba K (2007) Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Ann N Y Acad Sci* 1101: 506-526
- Jones R (1989) Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxf Rev Reprod Biol* 11: 285-337
- Kierszenbaum AL (1994) Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* 15: 116-134
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67: 271-284
- Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K (2002) The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 8: 22-28
- Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, Bedekovics T, Janaky T, Bassler J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo J* 24: 589-598
- Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 817-822
- Koshiba S, An R, Saito H, Wakabayashi K, Tamura A, Ishikawa T (2008) Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. *Xenobiotica* 38: 863-888
- Krishnamurthy P, Schuetz JD (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 381-410

- Kusuhara H, Sugiyama Y (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* 453: 735-744
- Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 20: 185-201
- 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
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113 (Pt 11): 2011-2021
- Mahony MC, Gwathmey T (1999) Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod* 60: 1239-1243
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61: 3458-3464
- Mao Q, Unadkat JD (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *Aaps J* 7: E118-133
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ (2004) Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265: 262-275
- Melaine N, Lienard MO, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H, Jegou B (2002) Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human. *Biol Reprod* 67: 1699-1707

- Meyer TH, van Endert PM, Uebel S, Ehring B, Tampe R (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* 351: 443-447
- Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE (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
- 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* 376: 472-477
- Morrow EH (2004) How the sperm lost its tail: the evolution of aflagellate sperm. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79: 795-814
- Oram JF, Vaughan AM (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 11: 253-260
- Oude Elferink RP, Paulusma CC (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch* 453: 601-610
- 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
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47: 1597-1598
- 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
- Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM (2000) Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60: 47-50

- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277: 18793-18800
- 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
- Rocchi E, Khodjakov A, Volk EL, Yang CH, Litman T, Bates SE, Schneider E (2000) The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 42-46
- Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Einarsson S (1990) Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 13: 238-243
- Russell LB (1990) Patterns of mutational sensitivity to chemicals in poststem-cell stages of mouse spermatogenesis. *Prog Clin Biol Res* 340C: 101-113
- Russell LB (2004) Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse. *Genetica* 122: 25-36
- Scharenberg C, Mannowetz N, Robey RW, Brendel C, Repges P, Sahrhage T, Jahn T, Wennemuth G (2009) ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and is associated with the acrosome. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 302-307
- 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: 507-512
- Schmitt L, Tampe R (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 12: 754-760
- Schulze C (1992) [Interactions among Leydig cells--peritubular cells-- Sertoli cells and their relevance to the regulation of spermatogenesis]. *Ann Anat* 174: 509-515

- Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD (2004) The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* 71: 319-330
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731
- Tanigawara Y (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther Drug Monit* 22: 137-140
- 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. *Biochim Biophys Acta* 1768: 2698-2713
- Travis AJ, Kopf GS (2002) The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110: 731-736
- Tusnady GE, Sarkadi B, Simon I, Varadi A (2006) Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett* 580: 1017-1022
- Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V, Riordan JR (1986) The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 956-962
- Vaughan AM, Oram JF (2005) ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem* 280: 30150-30157
- Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 323: 178-193
- 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
- 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
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS (1999) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214: 429-443
- 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 U S A* 101: 9774-9779
- Wang N, Tall AR (2003) Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1178-1184
- Wang X, Rader DJ (2007) Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 22: 368-372
- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF (2003) Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺ -channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130: 1317-1326
- Wolters JC, Abele R, Tampe R (2005) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the homodimeric ATP binding cassette transporter TAP-like (ABCB9). *J Biol Chem* 280: 23631-23636
- Zhang F, Zhang W, Liu L, Fisher CL, Hui D, Childs S, Dorovini-Zis K, Ling V (2000) Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. *J Biol Chem* 275: 23287-23294
- Zhao C, Haase W, Tampe R, Abele R (2008) Peptide specificity and lipid activation of the lysosomal transport complex ABCB9 (TAPL). *J Biol Chem* 283: 17083-17091

Zhao Z, Fang LL, Johnsen R, Baillie DL (2004) ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 104-111

7. PUBLIKATIONEN / DANK

7.1. *Publikationen*

Ein Teil der hier dargestellten Ergebnisse wurden unter dem Titel „**ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and is associated with the outer acrosomal membrane.**“ publiziert. *Biochemical and biophysical research communications* 378(2):302-307, 2009 (Scharenberg et al. 2009). *Christian Scharenberg, Nadja Mannowetz, Robert W. Robey, Cornelia Brendel, Philip Reppes, Tim Sahrhage, Thomas Jähn, Gunther Wennemuth*

7.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Gunther Wennemuth für die freundliche Überlassung dieses Themas und die Begleitung der Arbeit danken.

Meinem Freund und Kollegen Dr. med. dent. Philip Repges sage ich ebenfalls Danke. Bei der Auswertung der Ergebnisse und bei deren Analyse und kritischen Durchsicht gab er mir sehr gute fachliche und freundschaftliche Ratschläge und Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Institute für Anatomie und Zellbiologie sowohl an der Philipps-Universität Marburg/Lahn als auch der Universität des Saarlandes Homburg/Saar danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppen und für die hilfreiche Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt Frau Ingrid Lang für ihre immerwährende Hilfe und die vielen wertvollen Hinweise in der Immunhistochemie und bei der Anfertigung der Abbildungen. Frau Dr. Barbara Schäfer bin ich für ihre äußerst wertvolle Beratung und stets konstruktive Kritik, sich der Überarbeitung und der Korrektur dieser Arbeit anzunehmen, dankbar.

Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig und Herrn PD Dr. Stefan Rupf möchte ich für die Entlastung im beruflichen Umfeld, für die inspirierenden Diskussionen und die zahlreichen fachlichen Anregungen danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner beruflichen Laufbahn einschließlich der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.