



Peroxisomen im murinen Ovar

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Eva-Maria Friedl Barbara Distler, geb. Hesselbach
aus Würzburg

Gießen 2015





Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie II
des Fachbereiches 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktorin: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt
Gutachter: PD Dr. Andreas Hackethal
Betreuerin: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Tag der Disputation: 01. Dezember 2015





Widmung

Für meine lieben Eltern

Ingrid & Robert
Hesselbach





Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ovar und Oozyte	1
1.1.1	Entwicklung des humanen Ovars	4
1.1.2	Humane Follikulogenese	5
1.1.3	Murine Oogenese und Follikulogenese	7
1.1.4	Muriner Oestruszyklus	15
1.2	Peroxisomen	20
1.2.1	Charakterisierung	20
1.2.2	Biogenese der Peroxisomen	21
1.2.3	Metabolische Funktionen der Peroxisomen	24
1.2.4	Peroxisomale Biogeneseerkrankungen	28
1.2.5	Peroxisomen in Gonaden	28
2	Zielsetzung	32
3	Material und Methoden	33
3.1	Chemikalien und Geräte	33
3.1.1	Chemikalien, Farblösungen und Verbrauchsmaterialien	33
3.1.2	Kits	35
3.1.3	Antikörper	36
3.1.4	Geräte	37
3.2	Versuchstiere	38
3.3	Zyklusbestimmung der Maus	39
3.3.1	Synchronisation des Zyklus	39
3.3.2	Vaginale Zytologie	39
3.3.2.1	Durchführung eines Vaginalabstriches	39
3.3.2.2	Fixierung und Färbung des Vaginalabstriches	40
3.3.3	Histologische Beurteilung der Vagina	40
3.3.4	Hormonbestimmung (FSH) im Plasma	40
3.4	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	41
3.4.1	Testprinzip	41
3.4.2	Durchführung	42
3.5	Entnahme, Fixierung und Aufarbeitung der Gewebe	45
3.5.1	Anästhesie	45
3.5.2	Blutentnahme	45
3.5.3	Perfusionsfixierung	46
3.5.4	Entnahme der Ovarien, Uterus und Vagina	47
3.5.5	Dehydratation und Paraffin-Einbettung	48
3.5.6	Herstellung von Paraffinschnitten	48





3.6	Histologische Färbungen	50
3.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	50
3.6.2	Azan Färbung nach Heidenhain	51
3.6.3	Färbung nach Papanicolau	51
3.6.4	PAS-Färbung nach McManus	52
3.7	Immunfluoreszenzfärbung	53
3.7.1	Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung	53
3.7.2	Herstellung der Lösungen	53
3.7.2.1	PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline)	53
3.7.2.2	Trypsin-Lösung	53
3.7.2.3	Blocklösung: 4% PBSA + 0,05% Tween 20	53
3.7.2.4	Verdünungspuffer: 1% PBSA + 0,05% Tween 20	53
3.7.2.5	Citratpuffer	54
3.7.2.6	Mowiol und Propylgallat	54
3.7.3	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung	54
3.7.3.1	Entparaffinierung und Hydrierung	54
3.7.3.2	Antigenfreilegung und Antigenwiderherstellung	54
3.7.3.3	Blocken	55
3.7.3.4	Erstantikörper	55
3.7.3.5	Zweitantikörper	55
3.7.3.6	Kernfärbung	55
3.7.3.7	Eindecken der Gewebeschnitte	56
3.8	Apoptosis Detection Kit	57
3.8.1	Prinzip des ApopTag® Kit	57
3.8.2	Vorbereitung der Reagenzien des ApopTag® Kit	58
3.8.3	Durchführung des ApopTag® Kit	58
3.8.3.1	Enzymreaktion	58
3.8.3.2	Antikörper-Konjugat	58
3.8.3.3	Kernfärbung und Eindecken	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Auswahl der oestrischen Zyklusstadien	60
4.1.1	Etablierung des vaginalen Abstriches und der vaginalen Histologie zur Darstellung des murinen Zyklusstadiums	62
4.1.1.1	Vaginale Zytologie	62
4.1.1.2	Vaginale Histologie	65
4.1.2	Histologie der Ovarien	68
4.2	ELISA	72
4.2.1	Ermittlung Standardkurve	72
4.2.2	Volumenreihe	73
4.2.3	Probenauswertung	76





4.3	Immunfluoreszenzfärbung	79
4.3.1	Etablierung der Methode zur optimalen Darstellung der peroxisomalen Proteine in den Ovarien der Maus	79
4.3.1.1	Vorbehandlung und Antigenwiederherstellung an Paraffinschnitten	79
4.3.1.2	Antikörperverdünnungen	79
4.3.1.3	Auswertung mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie	80
4.3.1.4	Kontrollen der Immunfluoreszenzfärbung	80
4.3.2	Darstellung der peroxisomalen Proteine	82
4.3.2.1	PEX14-Färbung	82
4.3.2.2	Katalase-Färbung	83
4.3.2.3	Hydroxysteroid-(17- β)-Dehydrogenase 4	85
4.3.2.4	ABCD3 (PMP70)	87
4.3.3	Darstellung von Mitochondrien im Vergleich zu Peroxisomen	89
4.3.3.1	Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (OxPhos)	89
4.3.3.2	Markierung der Superoxid Dismutase 2 (SOD2)	90
4.3.4	Qualitative Analyse der Peroxisomen in den verschiedenen Follikelstadien der Zyklusphasen	93
4.3.4.1	Primordialfollikel	94
4.3.4.2	Primärfollikel	96
4.3.4.3	Sekundärfollikel	98
4.3.4.4	Tertiärfollikel	100
4.3.5	Quantitative Analyse der Peroxisomen	102
4.3.6	Darstellung peroxisomaler Netzwerke	106
4.4	Darstellung apoptotischer Zellen	109
5	Diskussion	111
5.1	Überblick	111
5.2	Murine Zyklusstadien	112
5.2.1	Vaginale Histologie und Zytologie	112
5.2.2	FSH-Bestimmung	113
5.3	Methodische Aspekte zum Nachweis peroxisomaler Proteine in den Ovarien	115
5.3.1	Antigenwiederherstellung	115
5.3.2	Spezifität und Sensitivität der Antikörper	115
5.4	Nachweis der peroxisomalen Proteine im Ovar	117
5.4.1	Quantifizierung der Peroxisomen in den verschiedenen Follikelstadien und Zyklusstadien mit Hilfe der PEX14-Markierung	117
5.4.2	Rolle der Peroxisomen in Entgiftungsprozessen der Zellen des Ovars	118
5.4.3	Peroxisomale β -Oxidation im Ovargewebe	120
5.4.4	Gonadale Hormonproduktion	122





5.4.5	Plasmalogensynthese der Peroxisomen in Ovarien	123
5.5	Darstellung apoptotischer Zellen	124
5.6	Auswirkung der Peroxisomendysfunktion in Ovarien bei AMH-cre induzierten granulosazellspezifischen <i>Pex13</i> Knock-out Mäusen	127
6	Zusammenfassung	131
7	Abkürzungsverzeichnis	133
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	135
8.1	Tabellen	135
8.2	Abbildungen	137
9	Literatur	139
10	Anhang	147
10.1	ELISA	147
10.1.1	Ermittlung der Standardkurve	147
10.1.2	FSH-Volumenreihe	147
10.2	Statistische Auswertung	152
11	Erklärung zur Dissertation	155
12	Danksagung	156





1 Einleitung

1.1 Ovar und Oozyte

Humane Ovarien

Die Ovarien sind beim Menschen paarig angelegt und intraperitoneal zu finden. Sie messen im Menschen durchschnittlich jeweils 3,5 x 1,8 x 1,3 cm und sind jeweils 7-14g schwer. Makroskopisch unterscheidet man einen lateralen oberen Pol (*Extremitas tubaria*) und einen medialen unteren Pol (*Extremitas uterina*), an dem das Ligamentum ovarii proprium ansetzt und zum Uterus verläuft. Das Ligamentum suspensarium ovarii setzt am oberen Pol an und strahlt in den dorsolateralen Anteil des Ligamentum latum ein. Da diese drei Bänder glatte Muskelzellen enthalten, sind sie für aktive Lageveränderungen verantwortlich (Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

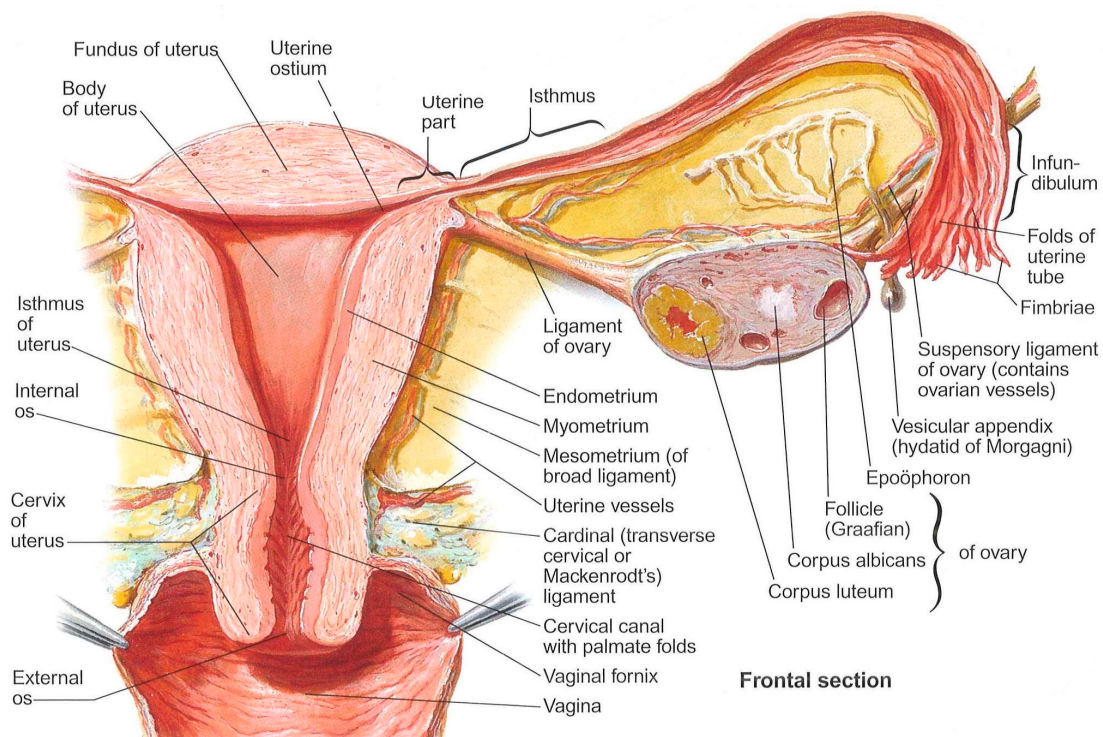


Abb. 1.1: Humane Anatomie der Adnexe, Uterus und Cervix; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 256

Murine Ovarien

Die murinen Ovarien sind mit Hilfe von Bändern des Mesovariums an der dorsalen Bauchwand befestigt. Topographisch sind sie am kaudalen Pol der Nieren zu finden. Sie sind jeweils von einem Beutel umgeben, der sie von der Bauchhöhle abgrenzt (Treuting und Dintzis, 2012).

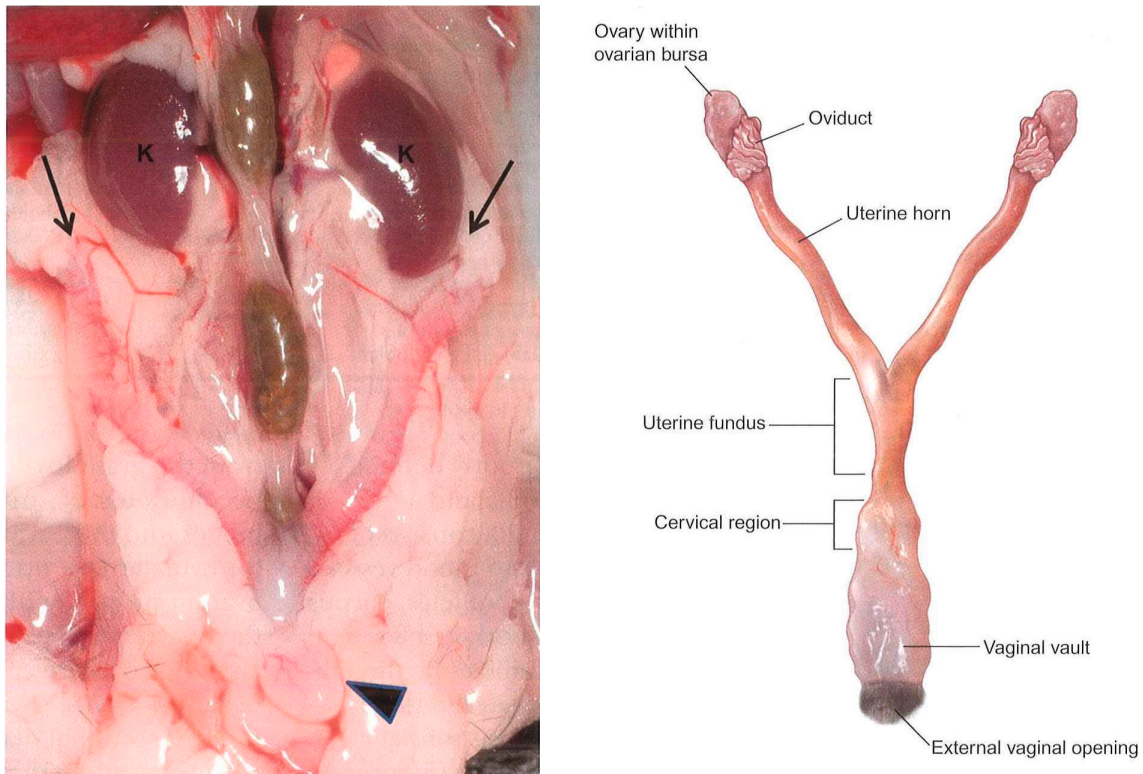


Abb. 1.2: Murine Anatomie der Ovarien, Uterus und Vagina; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 256

Mit (K) sind die Nieren gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die Ovarien, der Pfeilkopf deutet auf die Harnblase.

Histologie der Ovarien

Histologisch wird das Ovar in eine Rindenzone (*Cortex ovarii*) und eine Markzone (*Medulla ovarii*) unterteilt. Die Follikel befinden sich zum größten Teil in der Rindenzone, während das Mark reich an Blutgefäßen ist. Diese gelangen gemeinsam mit Lymphgefäßen und Nerven über das Mesovar in das Hilum ovarii und zweigen sich anschließend auf (Benninhoff und Drenckhahn, 2008).

Erstbeschreibung der Ovarien

1667 beschrieb Niels Stensen das erste Mal das Ovar in seiner Schrift *Historia dissecti piscis ex canum genere*, nachdem er seine Untersuchungen an einem Seehund durchführte.

Er widersprach erstmals den zeitgenössischen Anatomen, die die Keimzellen der Frau als *Testes muliebres*, als weibliche Hoden ansahen (Bierbaum et al., 1989).

Wörtliche Zitierung aus „*Historia dissecti piscis ex canum genere*“:

„Ovarium in utroque latere unum, quibus plurima ova continebantur, magnitudine, colore & figura inter se discrepantia. Erant ibi magna, mediocria, minima; erant alba, aqvea flavescencia; erant rotunda, oblonga, multis tuberculis inæqualia. Oblongis duobus sacculis similia erant ovaria, nec videre mihi licuit, qva inde exeant oviductum subitura ova.

De testibus femellarum.

In eadem Rajæ Anatome, communem opinionem sequutus, de utero dixi: illum id omne vivipares præstare, quod ab ovario, oviductu, ovo expectant ovipara. Inde vero, cum viderim, viviparorum testes ova in se continere; cum eorundem uterum itidem in abdomen, oviductus instar, apertum notarim; non amplius dubito, quin mulierum testes ovario analogi sint, quocunqve demum modo ex testibus in uterum, sive ipsa ova, sive ovis contenta materia transmittatur: ut alibi ex professo ostendam, si quando dabitur partium genitalium analogiam exponere, & errorem illum tollere, quo mulierum genitalia genitalibus virorum analogia creduntur.’ (Stensen, 1667)

„Auf beiden Seiten gibt es nur ein Ovar, in dem viele Eier enthalten waren, die sich hinsichtlich der Größe, der Farbe und des Aussehens unterschieden. Es waren dort große, mittlere und sehr kleine vorhanden; sie waren weiß, wässrig gelb; sie waren rund, länglich und uneben infolge vieler Wülste. Die Eierstöcke hatten eine Ähnlichkeit mit zwei verlängerten Säckchen. Es war mir nicht möglich zu sehen, von wo aus die Eier in den Eileiter hineingehen.

Von den Hoden der Weibchen

In derselben ‚Rajæ Anatome‘ sagte ich der allgemeinen Meinung über die Gebärmutter folgend: dass die Lebendgebärenden all jenes leisten, was aus dem Ei Gebärende von Eierstock, Eileiter und Ei erwarten.

Als ich jedoch sah, dass die Hoden der Lebendgebärenden in sich Eier enthalten, als ich deren Gebärmutter ebenfalls im Bauchraum nach der Gestalt eines Eileiters wahrnahm, zweifele ich nicht mehr, dass die Hoden der Frauen einem Eierstock analog sind. Auf welche Weise schließlich auch immer aus den Hoden entweder die Eier selbst oder die in den Eiern enthaltene Materie in die Gebärmutter übertragen wird. Wie ich anderswo fundiert zeigen werde, wenn ich einmal Gelegenheit haben werde, die Analogie der Teile der Genitalien darzulegen und jenen Irrtum zu beseitigen, wonach angenommen wird, dass die Genitalien der Frau den Genitalien der Männer analog sind.“

(Übersetzung von Domkapitular Monsignore Dr. Stefan Rambacher)

Niels Stensen (1638-1686) war ein dänischer Arzt und Anatom, sowie katholischer Priester und Bischof (Wieh, 1988). Zu seinen bedeutendsten wissenschaftlichen Erfolgen zählt neben der Erstbeschreibung der Ovarien auch die Erstbeschreibung des Ductus parotideus („Stensen-Gang“) (Reuter, 2004).

1.1.1 Entwicklung des humanen Ovars

Das genetische Geschlecht eines Menschen ist bereits in der Zygote durch Kombination des väterlichen und mütterlichen Chromosoms festgelegt. Jedoch entwickelt sich der Embryo bis zur siebten Entwicklungswoche als indifferente Gonade. Die Urkeimzellen, die ab der vierten Entwicklungswoche in Dottersack und im daran anliegenden Mesenchym der Allantoiswurzel histologisch zu erkennen sind, wandern ab der siebten Entwicklungswoche durch amöboide Zellbewegungen oder passiven Transport in die primitiven Keimstränge (proliferierte Zölomepithelzellen). Durch die Proliferation somatischer Zellen in den Keimsträngen wird die Verbindung zum Zölomepithel gehalten. Hierbei entsteht die Rindenzone (*Cortex ovarii*), in der die meisten weiblichen Keimzellen zu finden sind. Die Markzone (*Medulla ovarii*) entsteht durch Zurückbildung der zentralen Anteile der Gonadenanlage (Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

Die Keimzellen treten ab der zehnten Entwicklungswoche in die Proliferationsphase ein und folgen als Oogonien der mitotischen Teilung. Verschiedene Mitglieder der TGF- β Familie nehmen Einfluss auf diese Teilung. Activin steigert die Proliferation der Keimzellen (Martins da Silva et al., 2004), ebenso wie BMP2, BMP4 und BMP7 (De Felici et al., 2004).

Nach der mitotischen Teilung sind die Oogonien über Zellbrücken miteinander verbunden und durchlaufen nun die Prophasen der Meiose (Leptotän, Zygotän, Pachytän). Im anschließenden Prophasestadium Diplotän werden die Zellbrücken getrennt und die einzelnen Eizellen mit einer einschichtigen Lage Granulosazellen umgeben. Diese Entwicklung ist bis zur Geburt abgeschlossen und die Oozyten verharren bis zu Beginn der Pubertät im Ruhestadium (Diktyotän). Die erste Reifeteilung wird erst im heranreifenden Tertiärfollikel vollendet und die zweite Reifeteilung nach Ovulation und Befruchtung abgeschlossen (Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

Bis zum fünften Fetalmonat entstehen durch die Oogonienteilung bis zu sechs Millionen Eizellen, die sich bis zum Zeitpunkt der Geburt aufgrund von Degeneration auf eine Million Eizellen vermindern (Baker, 1963).

1.1.2 Humane Follikulogenese

Die Oozyten sind von Follikelepithelzellen umgeben. Im Primordialstadium ordnen sich die flachen Follikelepithelzellen einschichtig um die Oozyte, die 20-25µm misst.

Eine Kohorte von Primordialfollikeln beginnt aus noch unbekanntem Gründen zu wachsen und entwickelt sich zu Primärfollikeln, die ein kubisches bis hochprismatisches Follikelepithel umgibt. Zwischen Eizelle und Follikelepithel bildet sich eine Basalmembran (Zona pellucida), deren Proteine (ZP 1-3) bei der Befruchtung dem Spermium als Ankerproteine dienen und die Akrosomenreaktion auslösen. Der Transkriptionsfaktor FIGα reguliert die Genexpression der Zona pellucida Gene Zp1, Zp2 und Zp3 (Liang et al., 1997). Ebenso spielt der Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Organisation der Primordialfollikel (Eppig, 2001). Die frühe Entwicklung der Follikel wird ebenso von GDF-9 (Growth differentiation factor 9) beeinflusst. Die Expression des Wachstumsfaktors beginnt im Primärfollikel. Bis zur Ovulation ist mRNA von GDF-9 in den Oocyten nachweisbar, jedoch nicht im Primordialfollikel (McGrath et al., 1995). Ohne die Anwesenheit von GDF-9 ist zwar die Rekrutierung von Primordialfollikeln und deren Entwicklung zum Primärfollikel möglich, jedoch bleibt eine weitere Entwicklung der Follikel ohne den Wachstumsfaktor aus (Dong et al., 1996).

Das Follikelepithel umgibt die Oozyte im Sekundärfollikel in zwei- bis mehrschichtiger Anordnung und wird nun als Granulosaepithel bezeichnet. Zwischen den Zellen bilden sich flüssigkeitsgefüllte Spalträume, die im Tertiärfollikel zum Antrum folliculare konfluieren. Die Oozyte, die nun eine Größe von ca.120µm misst, nimmt im Tertiärfollikel eine exzentrische Position ein, so dass der Cumulus oophorus entsteht. Der sprungreife Follikel wird nun als Graafscher Follikel bezeichnet, der nach einem Anstieg von Hormonkonzentrationen im Blut ovuliert. Die zurückgebliebenen Follikelzellen bilden gemeinsam mit den Zellen der Theca interna nach der Ovulation das Corpus luteum. Die Zellen werden nach Lipideinlagerung als Granulosa- und Thakaluteinzellen bezeichnet, die in der Lage sind Progesteron und Inhibin A (ein α:βA heterodimeres Molekül der TGFβ-Familie) zu bilden. Inhibin A hemmt die FSH-Freisetzung im Hypophysenvorderlappen und das Wachstum anderer Follikel im Ovar (Hawkins und Matzuk, 2008). Die Hormonsteuerung ist entscheidend für die Entwicklung der Oozyte bis zur Ovulation. Der ovulatorische Zyklus ist eingebettet in einen hormonellen Kreislauf, der vom Hypothalamus gesteuert wird. Dieser ist in der Lage über die pulsatile Abgabe des GnRH aus dem Hypophysenvorderlappen FSH und LH zu stimulieren.



Zielstruktur des FSH sind die Granulosazellen. FSH induziert die Proliferation der Granulosazellen, steigert die Expressierung von FSH-Rezeptoren auf deren Oberfläche und aktiviert das Enzym Aromatase. Dadurch sind die Zellen in der Lage, Östrogene aus Androgenen zu bilden und somit das Follikelwachstum zu steigern.

Die Produktion von Androgenen wird durch LH in der Theca interna stimuliert. Diese bildet mit der Theca externa die Theca folliculi, die als umliegendes Stromagewebe den Follikel umgibt. Für die Induktion der Ovulation ist die Freisetzung von LH aus der Hypophyse nötig, die mit einer positiven Rückkopplung auf einen Östrogenanstieg reagiert. Die Ausstattung an FSH-Rezeptoren ist entscheidend für die Selektionierung eines dominanten Follikels.

Da Östrogen die FSH-Ausschüttung in der Hypophyse hemmt, ist der dominante Follikel aufgrund seiner Rezeptordichte in der Lage, dieses hormonelle Defizit aufzufangen. Des Weiteren ist der dominante Follikel in der Lage, hohe Mengen an Östrogen zu produzieren, die zu einer gesteigerten Bildung von Östrogenrezeptoren führen. Somit ergibt sich ein autokriner Regelkreis, der den dominanten Follikel zur Ovulation heranreifen lässt (Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

1.1.3 Murine Oogenese und Follikulogenese

Die primordialen Keimzellen können mit Hilfe der Färbung ihrer alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelingt bereits am 7.Tag postkoital in den mesodermalen Anteil des Dottersackes. Die weiblichen Keimzellen können darüber hinaus noch aufgrund des Barr-Körperchens lokalisiert werden.

Um den 8. Tag wandern die Keimzellen mit amöboiden Bewegungen vom Dottersack zum Endoderm des Dickdarms und über das dorsale Mesenterium des Darms zum medialen Anteil der Urogenitalleiste. Die Gonadenanlage ist zunächst indifferent. Am 11.Tag wandern Zölomepithelzellen ein, nehmen die Keimzellen auf und bilden die primären Keimstränge. Zwischen diesen bilden sich Kapillaren und Bindegewebszellen. Bei den Männchen verlieren die Keimstränge ihre Verbindung zum oberflächlichen Zölomepithel und differenzieren später zu den Tubuli seminiferi.

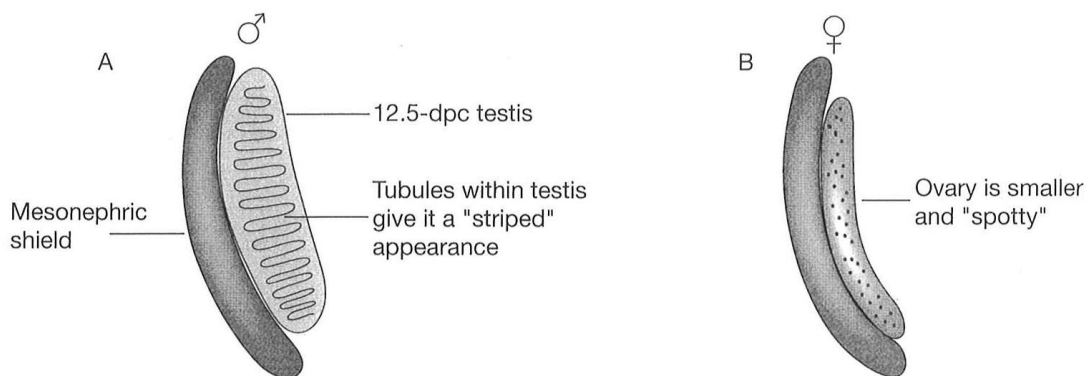


Abb. 1.3: Vergleich von Ovar und Testes am 12.Tag; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 236

Nach Ausbildung der primären Keimstränge imponiert die männliche Gonadenanlage gestreift. Die Weibliche Gonadenanlage zeigt ein gesprenkeltes Aussehen, das den frühen Ooogenien entspricht.

Die primären Keimstränge des Weibchens entwickeln sich zunächst zurück und bilden anschließend durch Proliferation des Zölomepithels sekundäre Keimstränge aus, die im Unterschied zum Männchen ihre Verbindung zur Oberfläche nicht verlieren. Hierbei entsteht die Rinde des Ovars. Um den 15.Tag werden die Ovarien vom Gewebe der Müllerschen Gänge umgeben. Hierbei wird die ovarielle Kapsel gebildet. Distal bilden die Müllerschen Gänge die Eierstöcke und die Hörner des Uterus, um nach Verschmelzung dorsal der Blase als Cervix uteri zu imponieren. Die Vagina geht ebenso auf den Müllerschen Gänge zurück (Kaufmann und Bard, 1999, Fox et al., 2007).

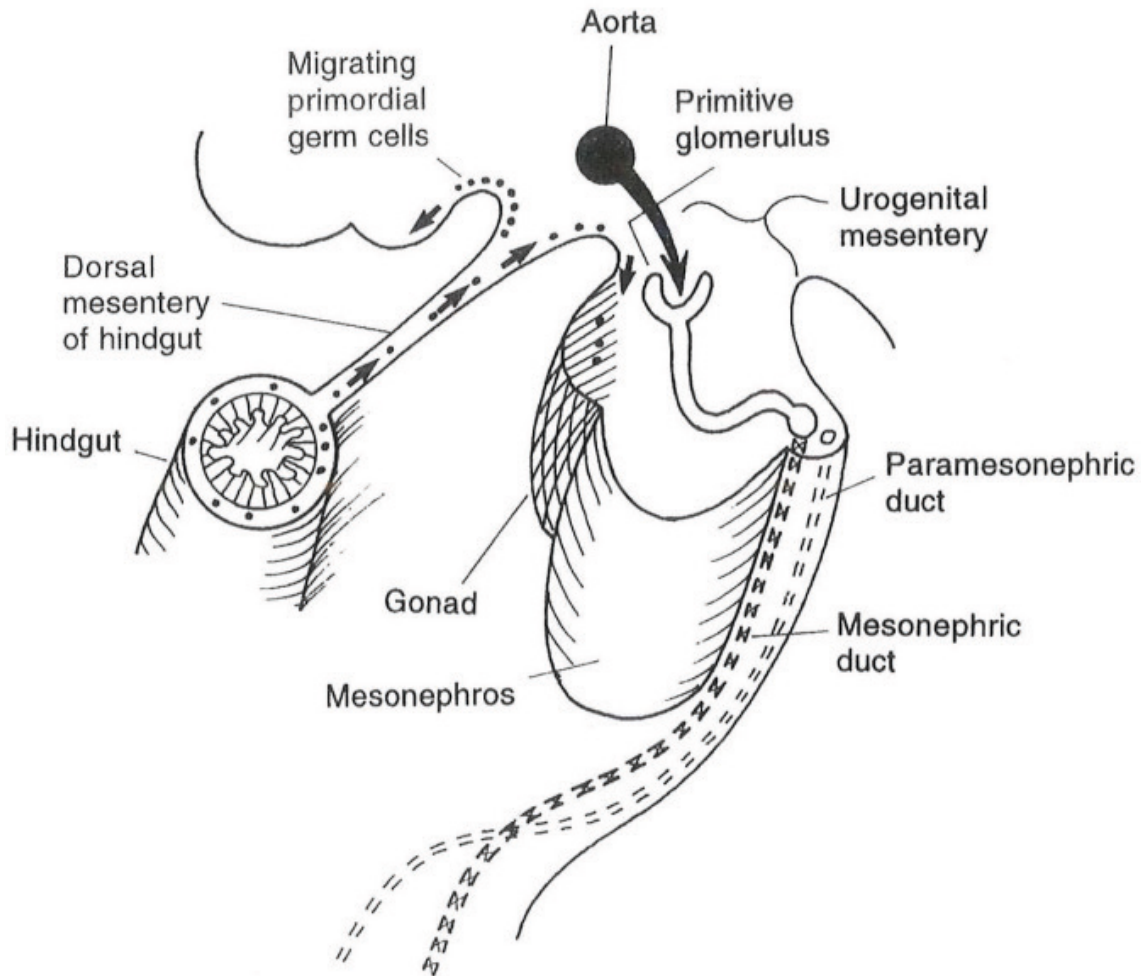


Abb. 1.4: Darstellung der Keimzellwanderung; entnommen aus Kaufmann und Bard (1999), Seite 119

Die Keimzellen wandern am 8.Tag vom Endoderm des Dickdarms und über das dorsale Mesenterium des Darms zum medialen Anteil der Urogenitalleiste. Der Paramesonephritische Gang entwickelt sich später zum Müllerschen Gang.

Am 5.Tag postnatal liegen alle Oozyten im Diplotän-Stadium vor. Die Oocyten sind von Granulosazellen umgeben, die eine große Rolle beim Wachstum und bei der Differenzierung der Eizellen spielen. Die Granulosazellen haben den gleichen embryonalen Ursprung wie die Sertoli-Zellen der Hoden.

Die Oozyte wird von den Granulosazellen durch die Zona pellucida getrennt. Diese 7µm große Zone wird durch drei saure, sulfatierte Glycoproteine gebildet (ZP1, ZP2 und ZP3), wobei ZP3 als Rezeptor für die Spermien fungiert und die Akrosomenreaktion auslöst.

Mehr als die Hälfte der Oozyten degenerieren bis zur 3.-5.Woche postnatal, bis die Maus um die 6.Woche ihre Geschlechtsreife erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sind in jedem Ovar um die 10.000 Eizellen verschiedener Follikelstadien zu finden (Nagy et al., 2003).



Die murine Follikulogenese unterliegt ebenso dem Einfluss der Gonadotropine FSH und LH, sowie dem Dialog zwischen Oozyte, den umgebenden Granulosazellen und den Theca-Zellen. Jedoch sind die Ovarien nach der Geburt für Gonadotropine unempfindlich, da sie bis zum 5.Tag postnatal keine Rezeptoren für FSH und LH exprimieren. Die Anzahl der Rezeptoren steigt zwischen dem 6.-9.Tag (Fox et al., 2007).

Die Oozyte sezerniert GDF-9, BMP15 und BMP16, die für die Reifung der Follikel nötig sind. Die Sekretion von Activin und Inhibin erfolgt durch die Granulosazellen, während die Thecazellen mit TGF β 1, TGF β 2, BMP4 und BMP7 Einfluss auf die Follikulogenese nehmen (Hawkins und Matzuk, 2008).

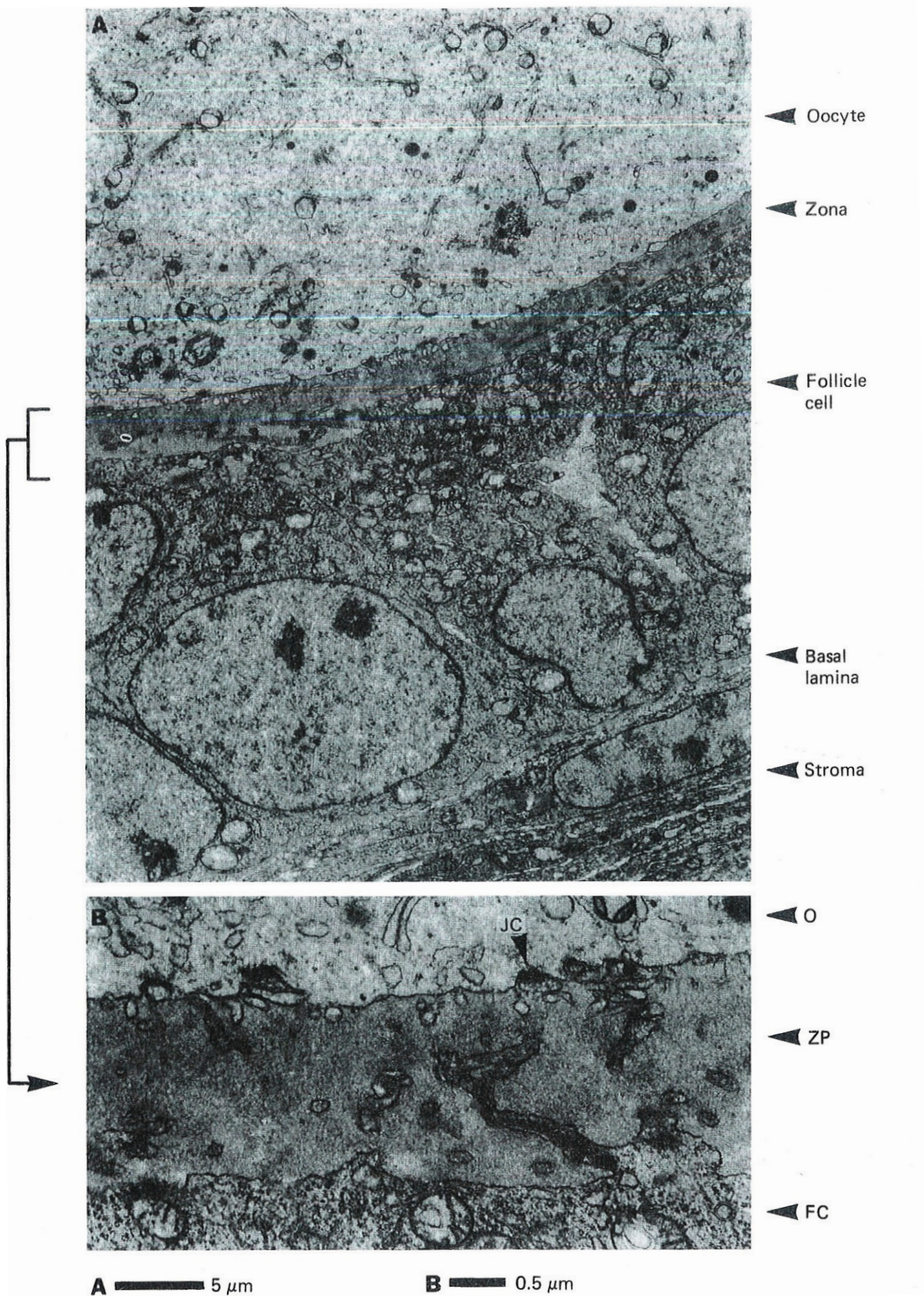


Abb. 1.5: Größenverhältnis zwischen Oozyte und Follikelzelle; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 47

In (A) ist die Oozyte, die Zona pellucida, die Follikelzelle mit der Basalmembran und das Stroma zu sehen. Eine Vergrößerung zeigt in (B) die Zona pellucida (ZP), die zwischen Oozyte (O) und Follikelzelle (FC) liegt



Die Klassifikation der Follikelstadien geht zurück auf Torben Pedersen und Hannah Peters (Pedersen und Peters, 1968). Hierbei wurden die Follikel aufgrund ihrer Morphologie klassifiziert:

Primordialfollikel

Typ 1 bis Typ 2 (Oozyte bis 20µm)

Primärfollikel

Typ 3a und Typ 3b: die Follikelepithelzellen umgeben die Eizelle komplett (Oozyte 20-70µm)

Sekundärfollikel

Typ 4 und Typ 5a: zwei bis drei Lagen an Follikelepithelzellen umgeben die Eizelle (Oozyte >70µm)

Tertiärfollikel

Typ 5b bis Typ 8: mehrere Lagen an Follikelepithelzellen umgeben die Eizelle. Es findet sich zunehmend Liquor folliculare bis zum Typ 8 (Graafscher Follikel).

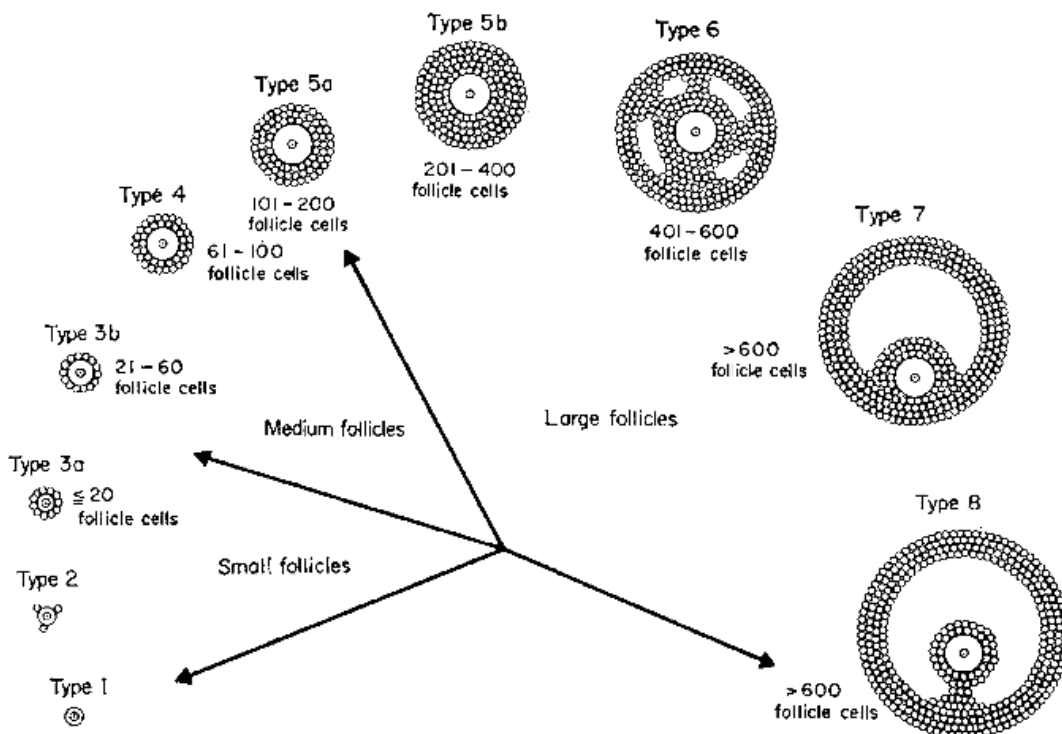


Abb. 1.6: Klassifizierung der Follikel; entnommen aus Pedersen und Peters (1968), Seite 556



Yoshida et al. (2009) verwenden in Anlehnung an Pedersen und Peters folgende Klassifikation:

This article	Pedersen and Peters (1968)	Characteristics and Synonyms
Small	Small, Type 1a to 3a	Primordial and primary follicles. Type 3a follicle is a primary follicle with complete ring surrounding small oocyte.
Medium	Medium, Type 3b to 5a	Type 3b follicle is a primary follicle with complete ring surrounding growing oocyte. Secondary follicles and preantral follicles less than 70 μ on the largest cross-section
Large	Large, Type 5b to 8	Type 5b follicle is preantral one with a fully grown oocyte surrounded by many layers of granulosa cells. Type 6 follicle is a small antral one with a large oocyte with many layers of granulosa cells and scattered areas of fluid. Type 7 follicle is a antral one with single cavity containing follicle fluid. The cumulus oophorus has formed, but not be formed the stalk. Type 8 follicle is a large antral follicle with a single cavity with follicle fluid and a well-formed cumulus stalk. Type 8 follicle is also termed as Graafian or preovulatory follicles.

Tabelle 1.1: Klassifikation; entnommen aus Yoshida et al. (2009), Seite 191

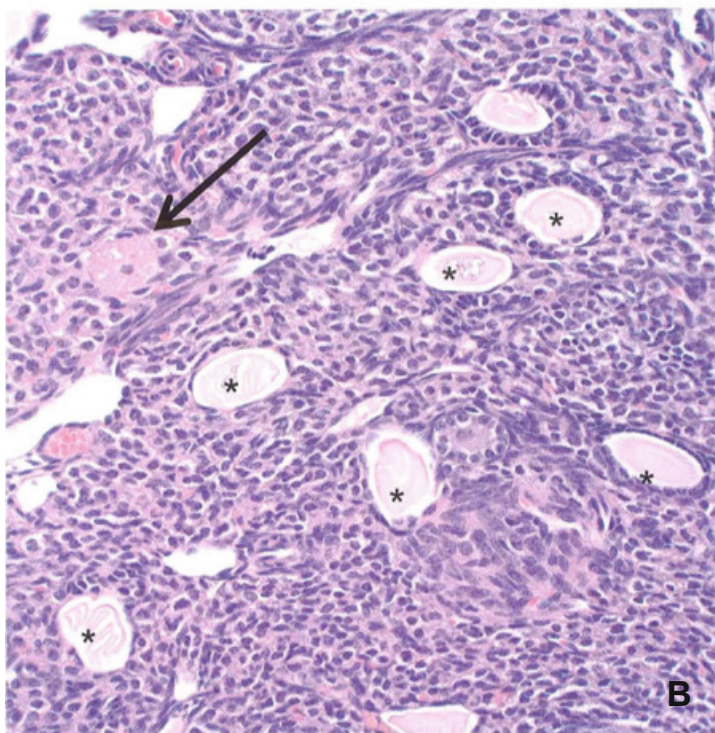
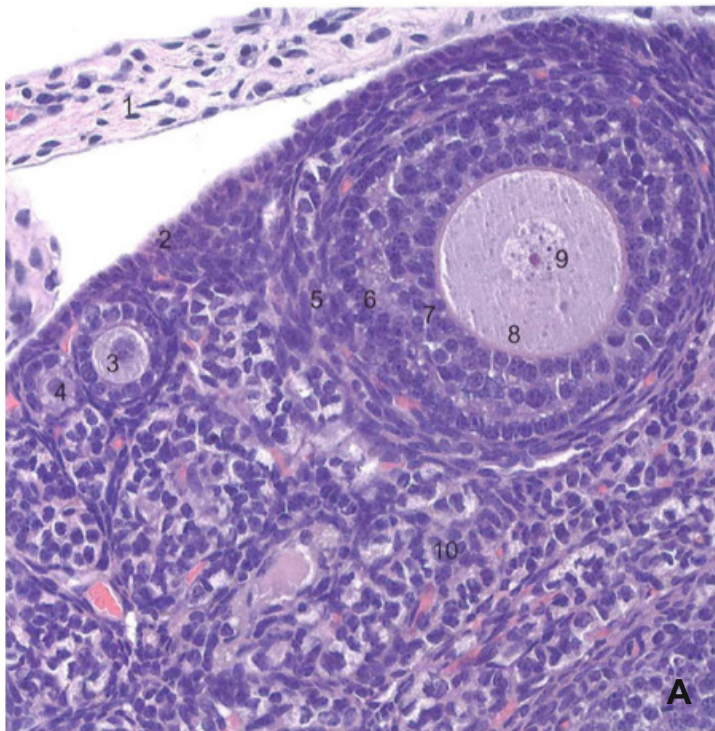


Abb. 1.7: Histologie des murinen Ovars; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 260

In (A) ist die ovarielle Kapsel (1) zu sehen. Primordialfollikel (4) findet man unter den germinalen Epithelzellen (2) der Tunica albuginea. Zum Zeitpunkt der Ovulation rupturiert die Zelllage der Germinalen Epithelzellen und die Eizellen mit den umgebenden Zellen werden in den präovariellen Raum entlassen. Primärfollikel (3), Thekazellen (5), Luteinzellen (6), Granulosazellen(8), Oozyte (9) und Stroma (10).

In (B) sind mit * degenerierende oder atretische Follikel markiert. Der Pfeil zeigt auf eine Zelle mit leicht bräunlichem Zytoplasma, die öfter bei älteren Mäusen beobachtet wird.

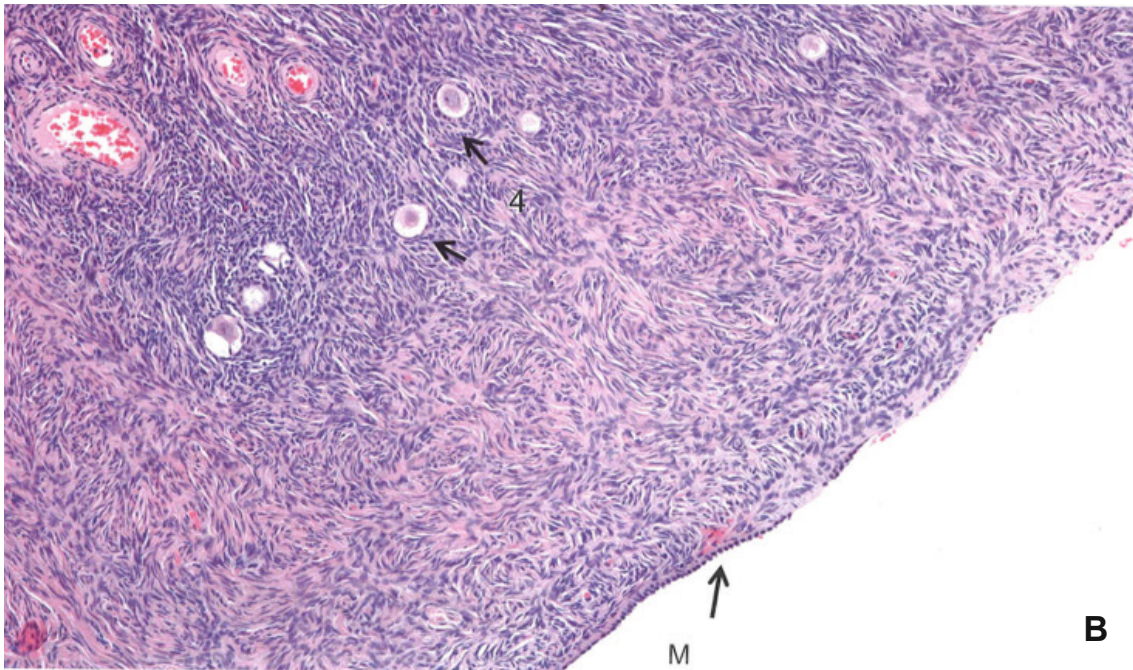
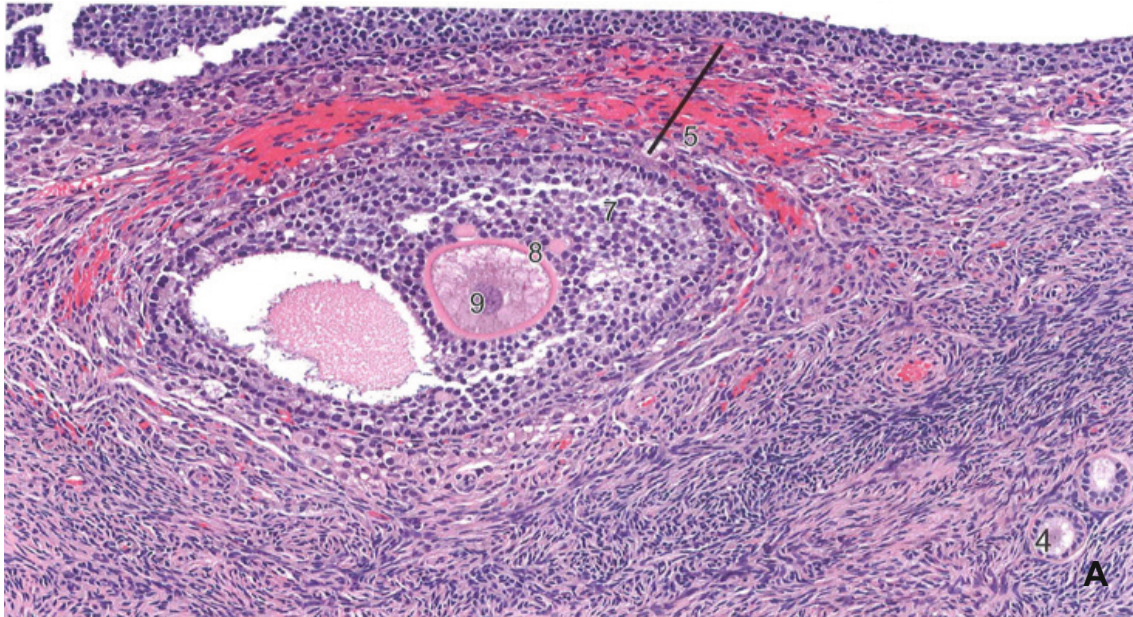


Abb. 1.8: Menschliches Ovar mit Oocyte (A) und Primordialfollikeln (B); entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 261

Das Oberflächenepithel sind flache Mesothelzellen (M) analog zu den germinalen Epithelzellen der Maus. Die Basisstruktur ist gleich der Maus. Primordialfollikel (4), Thekazellen (5), Granulosazellen (7), Zona pellucida (8) und Oocyte (9).

1.1.4 Muriner Oestruszyklus

Um die 6. Woche postnatal erreicht die weibliche Maus ihrer Geschlechtsreife und tritt in den Östruszyklus ein, der jeden vierten Tag zur Ovulation führt (Nagy et al., 2003).

Bereits 1922 hat Edgar Allen den Zyklus der Maus anhand der zyklischen Veränderungen der Ovarien, des Uterus, der Vagina und der Vulva beschrieben. Darüber hinaus stellte er fest, dass die Ovulation den Zyklus in anabole und katabole Prozesse unterteilt. Die Follikelreifung geht mit einer Proliferation der Schleimhaut in der Vagina und dem Uterus einher, während nach der Ovulation eine Degeneration zu finden ist. Im Unterschied zur humanen Lutealphase (Sekretionsphase) beschreibt Allen, dass mehrere Corpora lutea gleichzeitig zu sehen sind, so dass diese keinen Einfluss auf den oestrischen Zyklus haben (Allen, 1922).

Nach den Arbeiten von Allen und Long und Evans (Long und Evans, 1922) sind die Zusammenhänge zwischen Follikelreifung und Epithelveränderungen in Uterus und Vagina bekannt. Besonders anhand der vaginalen Veränderungen kann man den Zyklus in vier Abschnitte unterteilen (Zondek und Aschheim, 1926):

Dioestrus (Ruhestadium)

1. **Prooestrus** (Proliferationsphase)
2. **Oestrus** (Brunst)
3. **Metoestrus** (Abbauphase)

Die einzelnen Phasen können nach ihrer vaginalen Zytologie unterschieden werden.

Im **Oestrus** kommt es zur massenhaften Abstoßung von kernlosen Epithelien (Schollen). Die Vagina ist weit geöffnet und trocken. Die vordere Scheidenwand ist unter der Klitoris verdickt. Die Verhornung der obersten Epithelschichten hat eine biologische Bedeutung. Nach Kohabitation bilden die in der Vagina liegenden Schollen mit Anteilen des Spermias einen Pfropf, der die Vagina für eine weitere Kohabitation verschließt (Zondek und Aschheim, 1926).

Die Vagina verschließt sich wieder im **Metoestrus**, die Schwellung der Vulva ist rückläufig und der Vaginalabstrich erhält eine flüssige Konsistenz. Im mikroskopischen Bild nimmt die Anzahl der Schollen ab, während die Anzahl von Leukozyten zunimmt (Allen, 1922).

Im **Dioestrus** findet man eine unauffällige Vulva und eine verschlossene Vagina. Im Vaginalabstrich finden sich neben einer abnehmenden Anzahl an Leukozyten auch Epithelien und Schleimfäden. Dieser Schleim wird von Zylinderzellen sezerniert, die im his-



tologischen Bild der Vagina zu sehen sind. Die Sekretion des Schleims wird im Stadium des **Prooestrus** eingestellt. Das mikroskopische Bild zeigt nur Epithelzellen (Zondek und Aschheim, 1926). Die Vagina beginnt sich zu öffnen und die Vulva ist geschwollen und gerötet (Allen, 1922).

Zondek und Aschheim veröffentlichten eine Zusammenfassung der Veränderungen in Ovar und Vagina während des Oestruszyklus, die in Tabelle 1.2 dargestellt ist.

	Ovarium	Scheide	Scheidensekret
Dioestrus	Corpora lutea früherer Zyklen, kleine bis mittelgroße Follikel	1 Reihe zylindrischer Basalzellen; 1-2 Reihe polygonaler Zellen; 1 (-2) Reihen Schleim sezernierender Zylinderzellen, vereinzelt Leukozyten	<i>Schleim,</i> Leukozyten, Epithelien
Prooestrus	Corpora lutea früherer Zyklen, größere Follikel mit einer Follikelhöhle	1 Reihe Basalzellen; darüber: 8-10 Reihen polygonaler Zellen, deren oberste Schicht zu verhornen beginnt; darüber: 1 (-2) Reihen Schleim enthaltender, aber nicht mehr Schleim sezernierende Zellen, die sich abstoßen. Kernteilungen in den unteren Lagen.	<i>Epithelien</i>
Oestrus	Große Follikel mit großer Follikelhöhle, kleine Granulosazellen, umgeben von 2 bis 3 Reihen Thekazellen. Beginn der Corpus luteum Bildung.	1 Reihe Basalzellen; 8-10 Reihen polygonaler Zellen (geschichtetes Plattenepithel); Abstoßung der oberern Reihe verhornter Zellen ins Scheidenlumen. In den unteren Lagen noch einige Kernteilungen.	<i>Schollen</i>
Metoestrus	Junge Corpora lutea	1 Reihe Basalzellen; Die polygonalen Zellen sind von Leukozyten durchsetzt; Die Polygonalzellen stoßen sich zur Basalschicht ab. Keine Kernteilungen.	<i>Leukozyten,</i> Epithelien, Schollen

Tabelle 1.2: Zyklusveränderungen in Ovar und Vagina; entnommen aus Zondek und Aschheim (1926), Seite 980

2009 charakterisierten Yoshida, Sanbuissyo et al. die histologischen Veränderungen des Ovars in den verschiedenen Zyklusphasen. Die Nummerierung der Follikel bezieht sich im Folgenden auf die Klassifikation nach Pedersen und Peters (1968).

Im **Prooestrus** sind besonders die präovulatorischen Follikel (Graafsche Follikel, Typ 8) prominent, die im Bereich der Oberfläche zu finden sind. Deren Granulosazellen zeigen eine kuboide und/oder polygonale Form. Die Follikel Typ 7 und manche Follikel Typ 6 sind atretisch. Das Corpus luteum beginnt zu degenerieren, was an den Vakuolen im Zytoplasma und der steigenden apoptotischen Zellzahl zu sehen ist. Gelegentlich wird eine zentrale Nekrose beobachtet.

Das Fehlen von großen Follikeln (Typ 7 und Typ 8) und eine große Anzahl an atretischen Follikeln sind im **Oestrus** erkennbar. Neu gebildet Corpora lutea sind nach der Ovulation sichtbar, die spindelförmige basophile Lutealzellen und Kapillare beinhalten.

Im **Metoestrus** findet man wieder vermehrt Follikel Typ 7 und gelegentliche Follikel Typ 8. Atretische Follikel wurden in allen Follikelstadien beobachtet. Die Corpora lutea nehmen an Größe zu, um sich im anschließenden Dioestrus wieder zu verkleinern. Die basophilen Lutealzellen zeigen prominente Nucleoli.

Die Anzahl der großen Follikel (Typ 7 und Typ 8) nimmt im Dioestrus zu, jedoch steigt die Anzahl weiter zum Prooestrus. Ihre maximale Größe nehmen die Corpora lutea in diesem Stadium ein. Die Lutealzellen imponieren mit schaumigen eosinophilem Zytoplasma und gelegentlich wird zentral fibröses Gewebe beobachtet (Yoshida et al., 2009).

Die statistische Auswertung ist der Tabelle 1.3 zu entnehmen.

Follicle/CL	Prooestrus	Estrus	Metoestrus	Dioestrus
No. of rats examined	13	11	12	12
Follicles				
Small	15,9 ± 2,5	15,8 ± 3,3	17,0 ± 2,0	20,4 ± 4,4
Medium	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,5	2,0 ± 0,5	2,7 ± 0,4
Large	16,7 ± 1,7	20,9 ± 0,1	18,0 ± 1,4	18,8 ± 2,2
Type 8	2,5 ± 0,3	0	0	0,8 ± 0,3
Atresia	10,8 ± 1,1	8,5 ± 1,4	11,9 ± 1,9	14,5 ± 1,6
CL				
Newely formed	0	1,6 ± 0,4	0	0

Tabelle 1.3: Follikelanzahl des Ovars; entnommen aus Yoshida et al. (2009), Seite 195

Hormonelle Veränderungen im Oestruzyklus

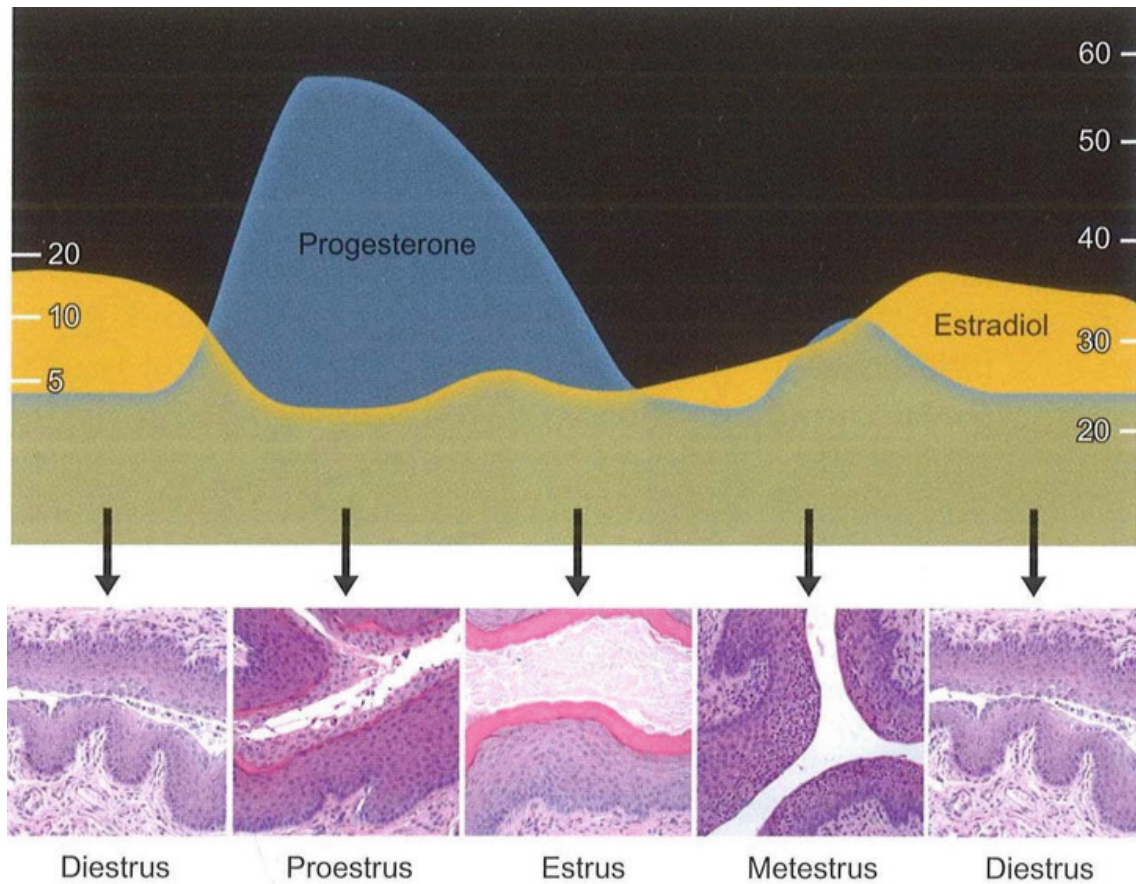


Abb. 1.9: Muriner Oestruzyklus; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 270

Morphologische Veränderung des Mucosa der Vagina in Abhängigkeit der hormonellen Veränderungen im murinen Oestruzyklus.

Während der Prooestrus-Phase stimuliert die ansteigende Konzentration von Östrogenen das Follikelwachstum und die Zellteilung im Uterus und der Vagina. Eine entscheidende Rolle im Follikelwachstum spielt das Follikelstimulierende Hormon (FSH), ein dimeres Glykoprotein mit den Untereinheiten α und β , das von den gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens sezerniert wird. FSH-Rezeptoren konnten auf den Granulosazellen aller Follikelstadien nachgewiesen werden. Bei Abwesenheit oder Defekt dieser Rezeptoren entwickeln sich die Follikel bis zum frühen Stadium des Antralfollikels, wobei ein weiteres Wachstum nicht möglich ist. Der Follikel wird atretisch, so dass die späte Follikulogene FSH-abhängig ist.

Die höchsten Konzentrationen von FSH werden im Prooestrus gemessen. Die Östrogenkonzentration erreicht hier ebenso ihren Zenit und induziert einen LH-Peak, der 12 Stunden später im Oestrus die Ovulation auslöst (Fox et al., 2007, Demeestere et al., 2012).



Eine Darstellung über die Veränderungen der FSH-Konzentrationen im Oestruszyklus wird in der folgenden Abbildung 1.10 gezeigt.

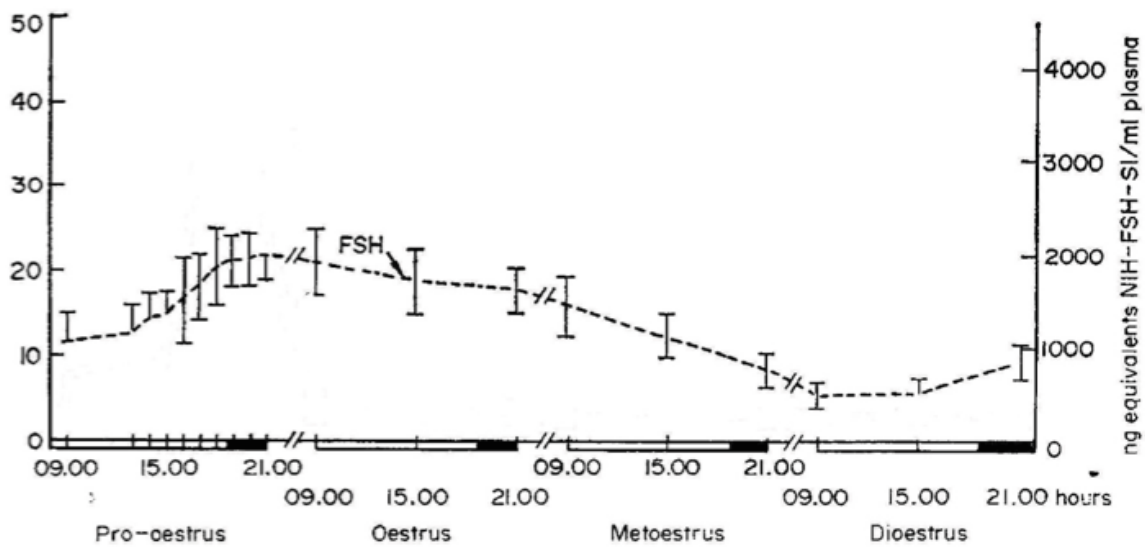


Abb. 1.10: FSH-Konzentrationen im Oestruszyklus; entnommen aus Murr et al., (1973), Seite 224

Die Abbildung zeigt die FSH-Plasmakonzentrationen in [ng/ml] von Mäusen mit spontanem Oestruszyklus. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelperioden.

Der Oestruszyklus kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Parkes beschrieb eine *Hinausschiebung* des Oestrus bei längerem Zusammensein eines Weibchens mit einem vasektomierten Männchen. Den Grund hierfür sieht Parkes in einem mechanischen Stimulus auf die Cervix durch den nach Kohabitation gebildeten Vaginalpfropf (Parkes, 1926).

1.2 Peroxisomen

1.2.1 Charakterisierung

1954 beschrieb Rhodin mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in der Niere winzige Zellbestandteile, die er *Microbodies* nannte (Rhodin, 1955). Gemeinsam mit Baudhuin gelang es De Duve die Microbodies aus Leberzellen zu isolieren. Sie entdeckten durch ihre Untersuchungen Wasserstoffperoxid-produzierende Oxidasen und Catalase, welche in der Lage sind, das zytotoxische Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff zu reduzieren (De Duve und Baudhuin, 1966). De Duve gab den Microbodies den Namen *Peroxisomen* (De Duve, 1965) und erhielt für seine Forschung 1974 den Nobelpreis für Medizin gemeinsam mit Albert Claude und Georg E. Palade für ihre Entdeckungen zur strukturellen und funktionellen Organisation der Zelle.

Neben Novikoff und Goldfisher (1969) gelang es auch Fahimi (1969), die Peroxisomen im Licht- und Elektronenmikroskop nachzuweisen. Der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ist in der Lage das Enzym Katalase darzustellen, indem er die peroxidativen Komponenten färbt (Novikoff und Goldfisher, 1969, Fahimi und Baumgart, 1999, Fahimi, 1969, Fahimi, 1968).

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in allen eukaryontischen Zellen zu finden sind. Morphologisch imponieren sie meist als kugelige Organellen von 0,2-0,5µm im Durchmesser. Daneben sind in manchen Zellen auch Peroxisomen in schlauchförmiger Gestalt zu finden.

Besonders prominent ist das Vorkommen von Peroxisomen in den metabolischen Organen Leber und Niere (Baumgart, 1997).

Elektronenmikroskopisch imponieren sie mit feingranulärer, homogener Matrix und sind von einer einfachen Membran umgeben. Jedoch finden sich bei verschiedenen Spezies auch kristalline Einschlüsse (Hruban und Rechcigl, 1969).

Die Anzahl der Peroxisomen, besonders in der Leber, lässt sich durch die Behandlung mit verschiedenen Substanzen vermehren. Dies wurde von Lazarow 1977 das erste Mal beschrieben (Lazarow und De Duve, 1976, Lazarow, 1977). Hierzu zählen u.a. Fibrate, Prostaglandine und Leukotriene, die gemeinsam mit dem intrazellulären PPAR α -Rezeptor (Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren) in der Lage sind, sich an die PPAR-Responselemente in Gen-Promotoren zu binden und die entsprechenden Gene zu transkribieren. Diese Targetgene umfassen u.a. die Enzyme der β -Oxidation in Pero-

xisomen und Mitochondrien und die Lipoproteinlipase. Dies führt zu einer Senkung des LDL-Cholesterin und einer verminderten Synthese von VLDL-Cholesterin (Kersten et al., 2000).

Neben den Enzymen der β -Oxidation und des Wasserstoffperoxidstoffwechsels wurden eine Vielzahl anderer Proteine in den Peroxisomen nachgewiesen, die in den verschiedenen Körperzellen variieren können, so dass eine effiziente Anpassung an den Stoffwechsel gegeben ist. Mehr als 50 peroxisomale Enzyme sind an verschiedenen metabolischen Prozessen der Entgiftung von Radikalen und dem Lipidstoffwechsel beteiligt (Platta und Erdmann, 2007). Es ist nicht nur eine Variabilität der Proteinausstattung gegeben, auch die Peroxisomen selbst unterscheiden sich in den einzelnen Zellen in Größe, Form und Anzahl (Thoms und Erdmann, 2005).

1.2.2 Biogenese der Peroxisomen

Die Studien der Peroxisomen an Hefezellen haben geholfen, die Biosynthese auch in menschlichen Zellen zu verstehen. Man hat sich darauf verständigt, die Gene, die in der Peroxisomenbiosynthese involviert sind, als *PEX-Gene* zu bezeichnen. Die korrespondierenden Proteine werden als *Peroxine* bezeichnet (Wanders, 2004).

Es werden nun zwei Modelle diskutiert, die für die Biosynthese der Peroxisomen verantwortlich sind. Zunächst wurde angenommen, dass die Peroxisomen durch Anknospung vom endoplasmatischen Retikulum entstehen. In neueren Untersuchungen hat man festgestellt, dass das endoplasmatische Retikulum der Entstehungsort für die peroxisomale Membran bei der De-Novo-Synthese ist. Pex3p ist ein integrales Protein in der Membran der Peroxisomen. Man fand dieses Protein konzentriert an verschiedenen Loci des endoplasmatischen Retikulums und beschrieb diese Orte als prä-peroxisomales Retikulum.



Das andere Modell beschreibt die Entstehung der Peroxisomen durch Proliferation und Teilung bereits vorhandener Peroxisomen (Platta und Erdmann, 2007).

Die Abbildung 1.11 zeigt eine Übersicht über die peroxisomale Biosynthese.

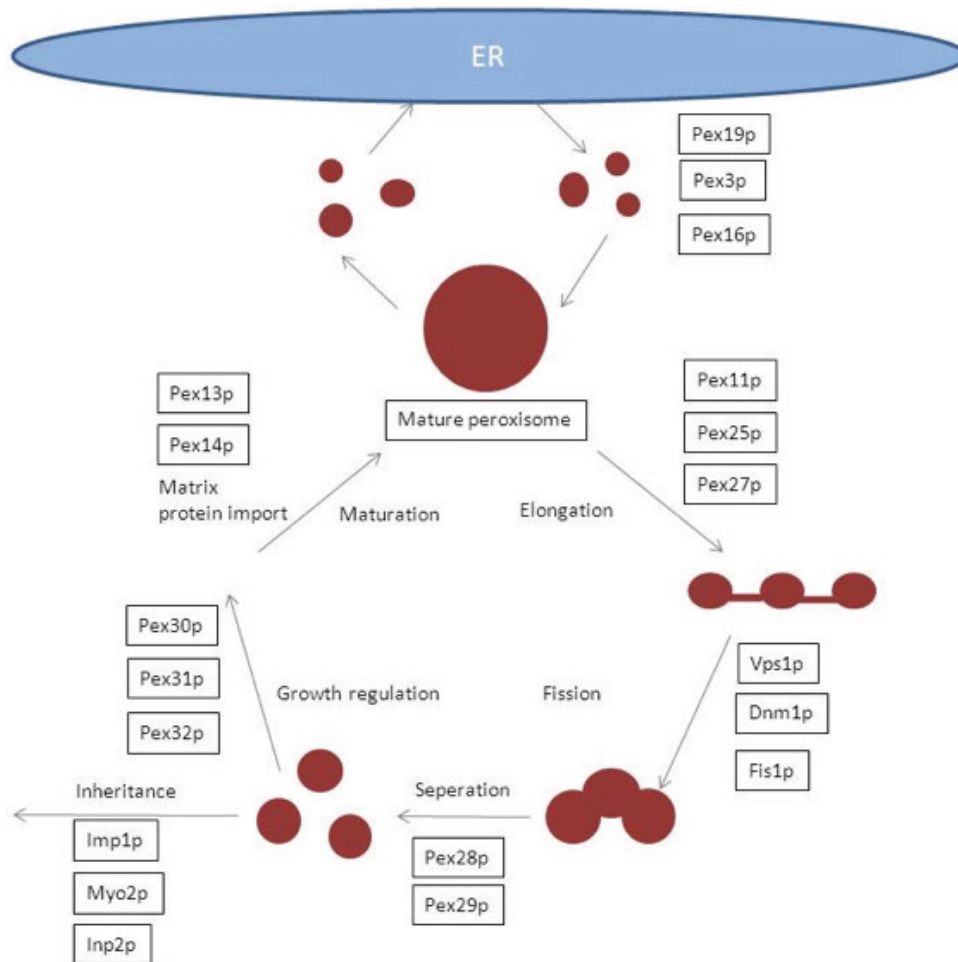


Abb. 1.11: Biogenese der Peroxisomen

Diese Abbildung beruht auf dem Modell von Platta und Erdmann (2007). Pex19p, Pex3p und Pex16p ermöglichen die Entstehung und den Import von peroxisomalen Membranproteinen. Es wird diskutiert, ob diese Peroxine auch Einfluss auf die De-Novo-Entstehung von Peroxisomen aus dem endoplasmatischen Retikulum haben. Für die Proliferation ist eine Verschmelzung der Membranproteine mit einem reifen Peroxisom nötig. Nach der Fusion erfolgt die Elongation, für die Pex11p, Pex25p und Pex27p vorhanden sein müssen, wobei Pex11p das wichtigste Protein ist, das unabhängig von der metabolischen Aktivität die peroxisomale Teilung fördert (Li and Gould, 2002). Die Separation der Peroxisomen wird durch Pex28p und Pex29p kontrolliert. Die Anzahl der Peroxisomen wird durch Pex30p, Pex31p und Pex32p reguliert, während bei der Reifung eine große Anzahl an Proteinen beteiligt ist, die den Import von Matrix- und Membranproteinen reguliert.

Peroxisomen besitzen im Unterschied zu den Mitochondrien keine eigene DNA. Die PEX-Gene werden transkribiert, um anschließend an freien Polyribosomen die Peroxine zu synthetisieren. Posttranslational werden die Proteine in bestehende peroxisomale Membranen importiert (Lazarow und Fujiki, 1985).

Die neu synthetisierten Proteine besitzen eine spezifische Sequenz, die ihnen den Import in die Peroxisomen ermöglicht. Man unterscheidet zwei Signalsequenzen: PTS1 und PTS2. Die PTS1-Sequenz befindet sich C-terminal und besteht aus einem Tripeptid mit der Aminosäureabfolge Serin-Lysin-Leucin (SKL). Die Sequenz von PTS2 findet sich N-terminal und besteht aus dem Motiv Arg/Lys-Leu/Val/Ile-X5-Gln/His-Leu (X steht für jede Aminosäure). Die Signalsequenzen werden von löslichen Rezeptoren erkannt und fungieren als Liganden an membranständigen Rezeptoren der Peroxisomen (Wanders, 2004). Pex5p ist ein löslicher Rezeptor, der in der Lage ist, PTS1 zu erkennen, das Protein zu binden und als Ligand an den membranständigen Rezeptorkomplex (bestehend aus Pex14p, Pex13p und Pex17p) zu binden. Nach Freisetzung der Proteine in die Matrix der Peroxisomen, kann Pex5p nach ATP-abhängiger Ubiquitinierung wieder in das Cytosol diffundieren oder in einem Proteasom abgebaut werden. PTS2-beherbergende Proteine werden von Pex7p erkannt, der meist mit dem Co-Rezeptor Pex20p vorzufinden ist. Der Co-Rezeptor ist nötig für die Erkennung als Ligand am membranständigen Rezeptor (Platta und Erdmann, 2007).

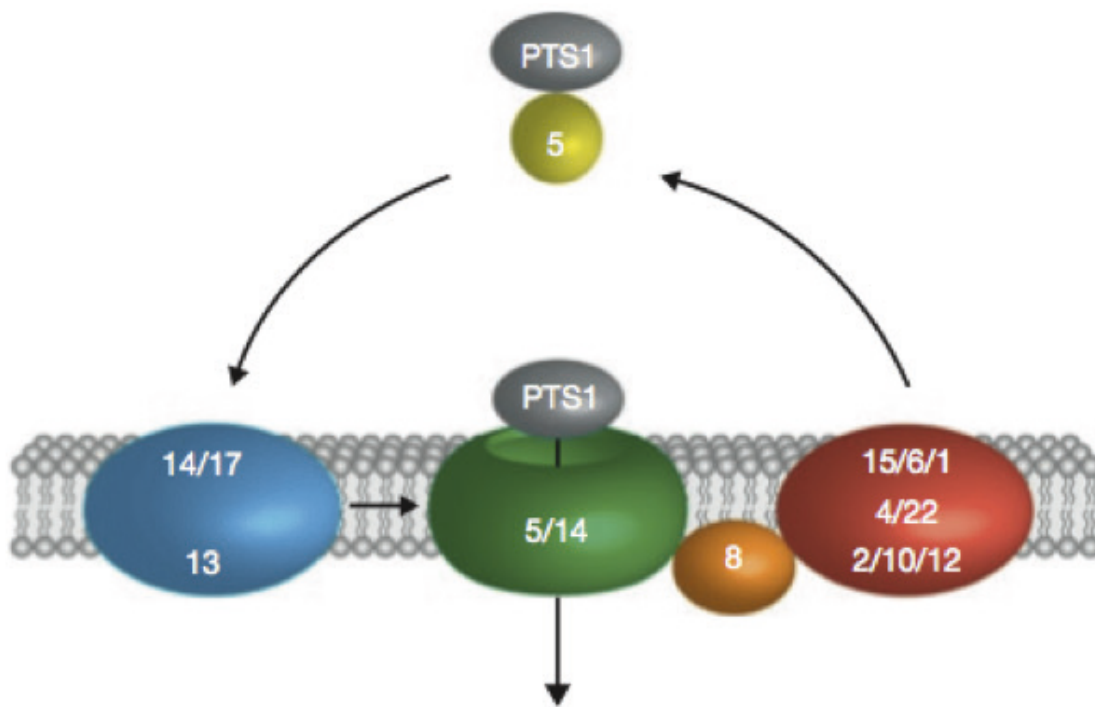


Abb.1.12: Matrixprotein-Import in Peroxisomen; entnommen aus Meinecke et al. (2010), Seite 277

Die Abbildung zeigt die Bindung des Pex5p-PTS1-Komplexes (grauer Komplex) an den membranständigen Rezeptor, bestehend aus Pex14p, Pex17p und Pex13p (blauer Komplex). Nach Ausbildung des Pex5p-Pex14p-Tunnel, wird das Protein in die Matrix freigesetzt. Nach Bindung von Pex8p (orange) kann der Export-Komplex (roter Komplex), bestehend aus dem Ubiquitinierungskomplex (Pex4p, Pex22p, Pex2p, Pex10p, Pex12p) und dem ATPase-Komplex (Pex1p, Pex6p, Pex15p), nach ATP-abhängiger Ubiquitinierung den Rezeptor wieder in das Cytosol entlassen.

1.2.3 Metabolische Funktionen der Peroxisomen

Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen

Bereits die Namensgebung von De Duve, der die *Microbodies* als Peroxisomen bezeichnete, lässt auf deren prominenteste Aufgabe schließen. Der oxidative Stress in der Zelle geht mit einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) einher, die in der Lage sind, einen toxischen Effekt auf die DNA, die Proteine und Lipide auszuüben. Zu den peroxisomalen Oxidasen zählen u.a. Acyl-CoA-Oxidase, Urat-Oxidase, Xanthin-Oxidase und D-Aminosäure-Oxidase (Schrader and Fahimi, 2006). Ebenso hat oxidativer Stress Wirkung auf den Alterungsprozess (Terlecky et al., 2006).

Zwar sind peroxisomale Enzyme für einen großen Anteil des oxidativen Stresses verantwortlich, sie sind jedoch als Vertreter der ROS in der Lage, neben dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanionen ($\bullet O_2^-$), auch Reaktive Stickstoffverbindungen (RNS), u.a. Nitritoxid ($\bullet NO$), durch Enzyme abzubauen. Zu den wichtigsten Vertretern der abbauenden Enzyme zählen u.a. neben der Katalase die Glutathion-Peroxidase, die Cu/Zn Superoxid-Dismutase 1 und die Epoxid-Hydrolase. Dies unterstreicht die Schlüsselrolle der Organellen in der Produktion und Neutralisierung von Reaktiven Verbindungen, insbesondere von Wasserstoffperoxid (Schrader and Fahimi, 2006).

β -Oxidation

Neben den Mitochondrien sind die Peroxisomen an dem Fettstoffwechsel beteiligt. Der Abbau der Fettsäuren erfolgt im Rahmen der β -Oxidation, die sich in einen Zyklus von vier Phasen einteilen lässt: Dehydrierung, Hydratisierung, erneute Dehydrierung und Thiolyse. Bei jeder Zykluswiederholung wird eine C2-Einheit in Form von Acetyl-CoA abgespalten, die dem Citratzyklus zugeführt wird und unter ATP-Gewinnung zu CO_2 und H_2O abgebaut wird.

Die β -Oxidation in Mitochondrien und Peroxisomen unterscheiden sich in den abzubauenden Substraten, nämlich den Fettsäuren und Fettsäuren-Derivaten. Während die Mitochondrien einen großen Teil der Fettsäuren (Nahrungsfette wie Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure) abbauen, werden schwer lösliche, toxische und bioaktive Lipide, sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA), 2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure und Di- und Trihydroxycholestansäure (DHCA und THCA), sowie Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene) von peroxisomalen Enzymen katabolisiert (Wanders, 2004).

In der Arbeit von Nenicu und Kollegen (2007) werden die Enzyme zweier β -Oxidationswege in somatischen Zellen der Hoden beschrieben. Der erste Weg ist durch Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren (englisch PPARs – Peroxisome proliferator-

activated receptors) induzierbar und katabolisiert geradkettige Acyl-CoAs und Eikosenoiden mit Hilfe verschiedener Enzyme: Acyl-CoA-Oxidase (ACOX1), *multifunctional protein 1* (EHHADH oder MFP1) und Thiolase A. Der zweite Weg ist nicht induzierbar und katalysiert mit Hilfe der Enzyme *branched-chain Acyl-CoA-Oxidase* (ACOX2 und ACOX3 in Mäusen), *multifunctional protein 2* (HSD17B4 oder MFP2) und *sterol carrier protein X* (SCPX) die Oxidation der Cholesterol-Seitenketten und des *branched-chain* 2-methyl-Acyl-CoAs (Nenicu et al., 2007). Dieser zweite Weg spielt auch eine Rolle bei der Inaktivierung gonadaler Steroidhormone (Moeller and Adamski, 2006).

Untersuchungen von Fan und Kollegen 1996 zeigten, dass bei homozygoten Knock-out Mäusen für ACOX eine Akkumulation von langkettigen Fettsäuren im Blut zu sehen ist. Die Mäuse waren lebensfähig, aber in der Entwicklung retardiert. Männliche und weibliche Mäuse waren zum Untersuchungszeitpunkt von 6-20 Wochen steril. Bei den männlichen Mäusen konnten histologisch weder Leydig-Zellen, noch Spermatozoen oder reife Spermien nachgewiesen werden. In diesem Artikel ist leider über die weiblichen Knock-out Mäuse nichts beschrieben (Fan et al., 1996).

α -Oxidation

Fettsäuren können am C-3 Atom (β -C-Atom) eine Methylgruppe aufweisen, die eine Zuführung in die β -Oxidation nicht ermöglicht. Zuvor muss eine oxidative Decarboxylierung am α -C-Atom erfolgen, um anschließend die decarboxylierte Säure mittels β -Oxidation abzubauen, die in Peroxisomen stattfindet.

Beim Krankheitsbild des Refsum-Syndroms ist das Enzym Phytanoyl-CoA-Hydroxylase defekt, so dass die α -Oxidation von Phytansäure zu 2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure nicht erfolgen kann, die normalerweise anschließend der β -Oxidation zugeführt wird. Es entsteht eine Akkumulation von Phytansäure und das Krankheitsbild des adulten Refsum-Syndroms beim Menschen (Wanders et al., 2001).

Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

Die Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren (englisch Peroxisome proliferator-activated receptors) gehören zu den nukleären Hormonrezeptoren, die erstmals von Issemann und Green beschrieben wurden (Issemann and Green, 1990). Zur Familie der PPARs zählt PPAR α , PPAR β (ebenso bekannt als PPAR δ oder NUC1) und PPAR γ . Während PPAR α in Zellen des braunen Fettgewebes, der Leber, den Nieren, des Herzens und der Skelettmuskeln stark exprimiert wird, ist PPAR γ im Fettgewebe und in den Zellen des Kolons, des Immunsystems und der Retina stark ausgeprägt. Das höchste Vorkommen von PPAR β ist in Zellen des Darms, der Nieren und des Herzens zu finden.

PPARs sind ligandenabhängige Rezeptoren, die die Transkription wichtiger Gene metabolischer Proteine regulieren. Hierbei wird das PPAR-Protein, nach Bindung eines Liganden, in den Kern transportiert, um dort an das entsprechende Response-Element im Gen-Promotor (PPRE) zu binden und die Gentranskription zu beeinflussen. PPAR α stimuliert auf diese Weise die Oxidation von Fettsäuren in verschiedenen Organellen (Mitochondrien, Peroxisomen, Microsomen), die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle und die Synthese von Lipoproteinen. Die Lipolyse von Triglyceriden, die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen des Fettgewebes und die Bindung und Aktivierung von Fettsäuren im Zytosol wird durch PPAR γ stimuliert. Eine Übersicht über die Funktionen der PPARs bietet Abbildung 1.13.

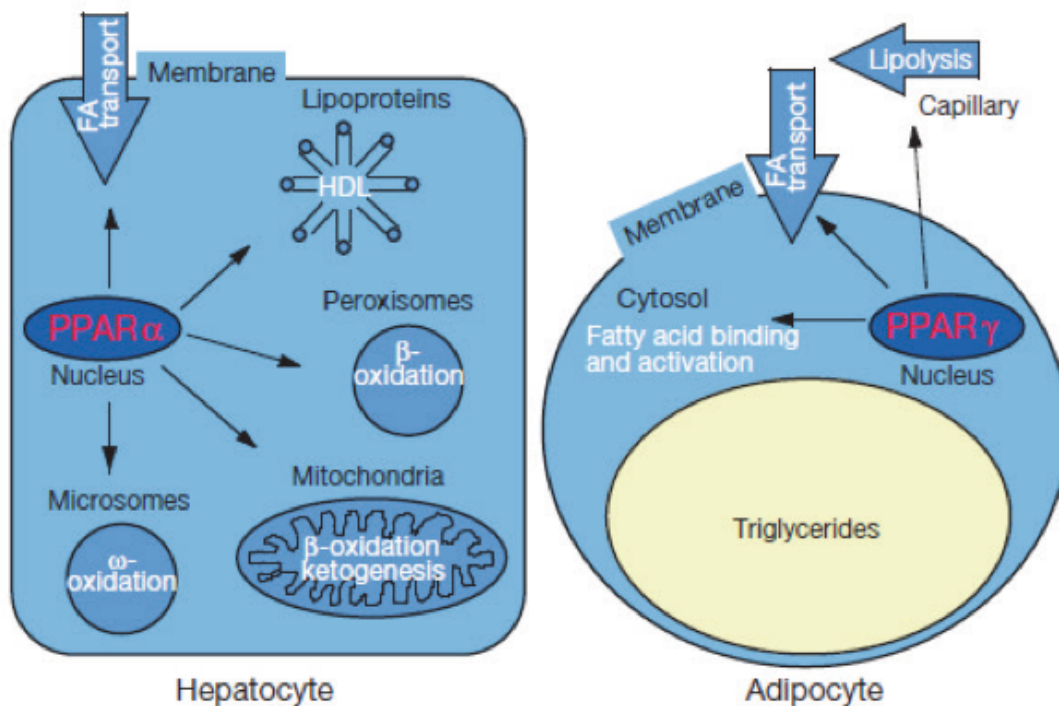


Abb. 1.13: Funktionen der PPARs; entnommen aus Kersten et al. (2000), Seite 422

PPAR α stimuliert die Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien, Peroxisomen und Microsomen, ebenso die Aufnahme von Fettsäuren und die Synthese von Lipoproteinen. PPAR γ stimuliert die Lipolyse von Triglyceriden, die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen des Fettgewebes, sowie deren Bindung und Aktivierung im Zytosol.

Vor Bindung des PPARs an den Promotor, muss dieser zuvor durch einen Liganden aktiviert werden. Man unterscheidet endogene Liganden (mehrfach gesättigte Fettsäuren, Eikosanoide z.B. 8-HETE, Prostaglandine (PGJ2, PGA1, PGI2) und Leukotriene) von exogenen Liganden (Herbizide, Nicht-steroidale Antirheumatika NSARs, Fibrate, Glitazone). Die höchste Affinität eines endogenen Liganden an PPAR γ besitzt das Prostaglandin 15-desoxy- δ 12,14 – Prostaglandin J2. Somit lässt sich durch Anwendung von

Medikamenten (z.B. Fibrate, Glitazone) den Metabolismus beeinflussen (Kersten et al., 2000, Komar, 2005).

Die PPARs zeigen ebenso Auswirkungen auf die Funktion der Ovarien. Aus Gründen der Übersicht wird dies unter *1.2.5 Peroxisomen* in Gonaden besprochen.

Lipidsynthese in Peroxisomen

Peroxisomen sind in die Biosynthese von Isoprenoiden involviert, die das Grundgerüst für Retinsäure, Cholesterol und Plasmalogen bilden. Weiterhin sind Peroxisomen an der Synthese von vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und Plasmalogen beteiligt, die anhand ihrer Doppelbindung Membranen gegen den Angriff reaktiver Sauerstoffverbindungen schützen.

Plasmalogene sind Etherlipide, die einen Anteil von 18% der Phospholipide im menschlichen Körper einnehmen und einen wesentlichen Anteil am Aufbau von Biomembranen haben. Die ersten beiden Schritte der Biosynthese werden in den Peroxisomen vollzogen. Zunächst werden die freien Hydroxylgruppen des Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) verestert. Diese Reaktion wird durch die Dihydroxyacetonphosphat-Acytransferase (GNPAT bzw. DAPAT) katalysiert. Im anschließenden Schritt wird durch die Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS bzw. DHAPS) eine Etherbindung ausgebildet. Beide Enzyme sind Bestandteil der peroxisomalen Matrix (Nagan und Zoeller, 2001).

Rodemer und Kollegen beschrieben 2003 die Inaktivierung der Etherlipid-Synthese bei Mäusen, die das defekte Enzym Dihydroxyacetonphosphat-Acytransferase DAPAT trugen (Knock-out DAPAT $-/-$). Hierbei konnten Plasmalogene nicht mehr gebildet werden, die zu den häufigsten Etherlipiden zählen. Allgemein war bei diesen Mäusen eine Wachstumsretardierung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu sehen. In den männlichen Knock-out Mäusen wurden atrophe Hoden nachgewiesen, ebenso waren im Nebenhoden keine Spermien nachweisbar. So kann von einer Infertilität bei männlichen DAPAT $-/-$ Knock-out Mäusen ausgegangen werden.

Die Ovarien der weiblichen Knock-out Mäuse wurden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in Hinblick auf die Größe kleiner beschrieben, jedoch imponierten sie mit einer intakten Follikulogenese. Es waren Stadien der Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel zu sehen. Ebenso erschien die Entwicklung der Oozyten, Zona pellucida, Granulosa, Theka interna, Corpus rubrum und luteum unauffällig. So ist davon auszugehen, dass die Ovulation bei Abwesenheit von Etherlipiden intakt ist. Da man jedoch eine numerische Reduktion der Sekundär- und Tertiärfollikel sowie der Corpora lutea feststellte, kann man bei weiblichen DAPAT $-/-$ Knock-out Mäusen eine Subfertilität konstatieren (Rodemer et al., 2003).

1.2.4 Peroxisomale Biogeneseerkrankungen

Neben dem adulten und infantilen Refsum-Syndrom gehen verschiedene schwerwiegende Krankheitsbilder auf Peroxisomen-Dysfunktionen zurück. Neben den Störungen, die auf Defekten der peroxisomalen Enzyme beruhen, findet man vor allem Krankheitsbilder, die auf eine Einschränkung der peroxisomalen Biosynthese zurück zu führen sind.

Das bekannteste Beispiel einer Erkrankung, die auf einer Entwicklungsstörung der Peroxisomen (englisch PBDs - peroxisome biogenesis disorders) beruht, ist das Zellweger-Syndrom (Cerebrohepatorenales Syndrom, CHRS). 1964 beschrieben Zellweger und Kollegen das erste Mal ein familiäres Syndrom, das klinisch mit multiplen congenitalen Defekten manifest wurde (Bowen et al., 1964). Ebenso zeigten Goldfischer und Kollegen 1973, dass die Abwesenheit der Peroxisomen mit diesem Syndrom, das klinisch mit cerebralen, renalen und skeletalen Abnormalitäten, herabgesetzter Muskelspannung, Leberzirrhose, Eisen- und Lipidspeicherung und in schweren Fällen einer Überlebenszeit von sechs Monaten einherging. Bei diesen Patienten waren keine Peroxisomen in Leberzellen und Zellen des proximalen Tubulus in der Niere zu finden (Goldfischer et al., 1973).

PBDs beruhen auf Defekten, die autosomal-rezessiv vererbt werden und die den Aufbau der Peroxisomen, deren Teilung oder den verminderten Import von Matrixproteinen betreffen. Mehr als dreizehn verschiedene PEX-Gene wurden bei Menschen mit dem Auftreten der PBDs assoziiert. Mit dem Zellweger-Syndrom sind in über 85% der Fälle die Gene PEX1, PEX6 und PEX 26 betroffen, die eine Rolle bei der Wiederbereitstellung der Rezeptoren Pex5p und Pex7p spielen, so dass der PTS1 und PTS2- Matrixproteinimport eingeschränkt ist. Zu den PBDs zählen neben dem Zellweger-Syndrom und dem Refsum-Syndrom auch die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und die rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata (RCDP) (Steinberg et al., 2006).

1.2.5 Peroxisomen in Gonaden

Die Erstbeschreibung der Peroxisomen in Leydig-Zellen geht auf das Jahr 1972 zurück (Reddy and Svoboda, 1972). In dem gleichen Jahr war es Böck mit Hilfe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gelungen, elektronenmikroskopisch die Katalaseaktivität der Peroxisomen im Ovar der Maus darzustellen. Er zeigte, dass die Peroxisomen in Luteinzellen der Corpora lutea mit einer braunen Anfärbung imponierten. Ebenso waren die angefärbten Vesikel in der Nähe des Kernes zu finden, nicht nur in sphärischer, sondern auch in elongierter und tubulärer Struktur mit einem Durchmesser von weniger als 1µm. Die interstitiellen Zellen zeigten weit weniger Peroxisomen als die Luteinzellen, während die

Granulosazellen großer Tertiärfollikel Peroxisomen mit einem Durchmesser von 0,2µm besaßen, die als elongierte oder tubuläre Formation seltener als in den Luteinzellen beobachtet wurden. Insgesamt sind die Peroxisomen des Ovars nicht mit denen der Leber- oder Nierenzellen zu vergleichen. Sie sind kleiner, unregelmäßiger geformt und weisen kein kristallines Zentrum auf. Eine größere Ähnlichkeit besteht mit vergleichbaren Organellen in der Nebennierenrinde und den Alveolarzellen vom Typ II (Bock, 1972). Die Erstbeschreibung von Peroxisomen in Oozyten wurde von Roels und Kollegen in Oozyten von Wachteln durchgeführt. Allerdings konnten von diesen Autoren keine Peroxisomen in Oozyten späten Follikelreifungsstadien nicht nachgewiesen werden (Roels et al., 1996).

Den angeblichen immunzytochemischen Nachweis von Katalase in Peroxisomen in Oozyten der Ratte erbrachte 2000 Figueroa, der dieses Enzym hauptsächlich in der Peripherie der Oozyte nachweisen konnte (Figueroa et al., 2000). Er zeigte in seiner Arbeit weiterhin, dass auch die Markierung der Peroxisomen mit einem Antiserum gegen peroxisomale Gesamtproteine (englisch TPP – total peroxisomal proteins) ein ähnliches Färbemuster auftrat. Das Vorkommen von Peroxisomen in den männlichen Keimzellen und somatische Zellen des Hodens beschrieb 2007 eine Doktorandin unserer Arbeitsgruppe Anca Nenicu.

Mit Hilfe von morphologisch sensitiven Methoden gelang es, u.a. diese Enzyme nicht nur in den Leydig- und Sertoli-Zellen, sondern auch in den Spermatogonien und späten Stadien der Spermatogenese des Hodens nachweisen (Nenicu et al., 2007).

Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) in Ovarien

Einen großen Effekt auf die Funktion der Ovarien zeigen die PPARs (englisch Peroxisome proliferator-activated receptors). Alle drei Isoformen, PPAR α , PPAR β und PPAR γ werden in Ovarien exprimiert. Die mRNA von PPAR α wurde überwiegend in Ovarien der Ratte in Theka- und Stromazellen vorgefunden, während die mRNA von PPAR δ in allen Zellen des Ovars nachgewiesen werden konnte. Ebenso unterscheiden sich die verschiedenen Isoformen in Ihrer Ligandenbindung. So zeigen die Fibrate eine hohe Affinität für PPAR α , in höheren Konzentrationen kann auch PPAR γ aktiviert werden. Durch endogene Faktoren (z.B. Fettsäuren, Prostaglandine) und exogene Faktoren (Herbizide, NSARs) lassen sich somit die PPARs aktivieren und Einfluss auf die ovarielle Funktion nehmen (Komar, 2005). Eine Beispiel hierfür ist die Inhibition der Ovulation und die „reversible weibliche Infertilität“ aufgrund der Einnahme von NSARs (Stone et al., 2002). Intensiv untersucht wurde bisher die Funktion von PPAR γ in Ovarien. PPAR γ ist zunächst in den Granulosazellen zu finden und hat so Einfluss auf diese Zellen und die Reifung

der Eizelle. Es wurde gezeigt, dass die Expression von PPAR γ als Antwort auf den LH-Anstieg herunter reguliert wird. Cui und Kollegen zeigten 2002, dass bei fehlender PPAR γ -Expression, ein Drittel der durch cre/loxP-Technologie erzeugten PPAR γ Knock-out Mäuse (Entfernung des Exon2 des PPAR γ -Gens) steril bzw. zwei Drittel der Mäuse subfertil waren. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der numerischen Anzahl der Primordial-, Primär- und Präantralen/Antralen-Follikeln, der Größe der Corpora lutea und keine veränderte Antwort auf exogene Gonadotropine gefunden werden. Im Uterus dagegen konnte nur eine Implantationsanlage bei der Gruppe mit geringer PPAR γ -Expression gefunden werden, während in der Kontrollgruppe 5-7 Implantationen zu sehen waren. Da die PPAR γ -Expression nicht im Uterus, sondern in den Ovarien verändert war, konstatierten Cui und Kollegen, dass die ovarielle Funktion zur Induktion der Implantation nicht ausreichend war (Cui et al., 2002).

Die Aktivierung von PPAR γ kann ebenso Einfluss auf die Progesteronsekretion der ovariellen Zellen nehmen, wobei diese von der Zellart, dem Differenzierungsgrad der Zelle, dem Zyklusstadium und der Spezies abhängig ist. Bei bovinen Lutealzellen zeigte die Gabe von einem endogenen PPAR γ –Liganden (Prostaglandin J2) eine Konzentrationssteigerung von Progesteron (Lohrke et al., 1998). Ebenso reagierten Thekazellen, die von Schweinen gewonnen wurden, mit einem Anstieg der Progesteronkonzentration, nachdem sie mit natürlichen und synthetischen PPAR γ -Liganden versetzt wurden (Schoppee et al., 2002).

Komar und Kollegen konnten 2003 zeigen, dass es einen inversen Zusammenhang zwischen der Expression der mRNA von PPAR γ und P450 $_{scc}$, dem limitierenden Enzym in der Progesteronsynthese, in Granulosazellen und Thekagewebe von Ratten gibt (Komar and Curry, 2003).

Die inverse Proportionalität der Expression von PPAR γ und P450 $_{scc}$ sowie die Reduktion der Expression von PPAR γ in Abhängigkeit von der LH-Konzentration zeigen, dass die Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors entscheidend für die Ovulation und Luteinisierung der Follikelzellen ist. Ebenso wirft der klinische Einsatz von Medikamenten zur Aktivierung von PPAR γ (Fibrate oder Insulin-Sensitizer Thiazolidindione) die Frage auf, wie sehr die Expression der ovariellen Gene und deren Funktion durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors beeinflusst wird (Komar, 2005).

Gonadale Steroidhormone

Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenasen gehören zu der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen und Reduktase, sowie der Aldoketoreduktasen. Es sind zehn verschiedene humane Isoformen des Enzymes bekannt, die eine große Rolle bei der Aktivierung und

Inaktivierung von Steroidhormonen spielen. Hierbei katalysiert das Enzym die Oxidation oder Reduktion an der Position C17 von C18- und C19 – Steroidhormonen.

Peroxisomen beherbergen das Enzym Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase 4 (HSD17B4), ebenso Multifunctional Protein-2 (MFP2) genannt (Dieuaide-Noubhani et al., 1996), das in der Lage ist, die Oxidation von Estradiol zu Estron zu katalysieren. Das größte Vorkommen dieses Enzyms ist in der Leber, den Nieren, den Ovarien und den Hoden. Das Gen HSD17B4 kann durch Progesteron und Liganden des PPAR α stimuliert werden (de Launoit und Adamski, 1999, Moeller und Adamski, 2006).

Huyghe und Kollegen zeigten 2006, dass die Inaktivierung des MFP-2 Gens und somit die Inaktivierung der β -Oxidation zur Infertilität von männlichen Mäusen führt. Es wurde in den Sertoli-Zellen der Hoden eine Akkumulation von Neutrallipiden gezeigt, die zur Atrophie der Hoden im Alter von vier Monaten führte. Es konnten Cholesterinester und neutrale Glykolipide in den Fettansammlungen nachgewiesen werden, ebenso erhöhte Konzentrationen von Substraten der peroxisomalen β -Oxidation (langkettige Fettsäuren und Phytansäure) (Huyghe et al., 2006).

Die Mutation im HSD17B4-Gen wird ebenso mit dem Perrault Syndrom in Verbindung gebracht. Diese Erkrankung ist durch Innenohrtaubheit, selten neurologische Manifestationen und Ovariendysgenese bei weiblichen Patienten charakterisiert (Pierce et al., 2010).

2 Zielsetzung

Bis auf eine Studie von Roels und Kollegen 1996 und Figueroa und Kollegen 2000, bei der angeblich Katalase-positive Strukturen in Oozyten mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz gezeigt wurden, gibt es bisher keine Informationen über die Enzymzusammensetzung der Peroxisomen während der Follikelreifung (Roels et al., 1996, Figueroa et al., 2000).

Peroxisomen sind jedoch sicherlich auch im Ovar in eine Vielzahl von metabolischen Prozessen eingebettet. Da Peroxisomen die Liganden für PPARs durch β -Oxidation regulieren (Karnati und Baumgart-Vogt, 2008) und PPARs die weibliche Fertilität beeinflussen, könnte die Dysfunktion der Peroxisomen in verschiedenen Zelltypen im Ovar zu einer Störung der ovariellen Funktion und weiblichen Fertilität führen. Beispielhaft konnte dies in einer Studie von Rodemer und Kollegen in Knock-out Mäusen mit defekter Plasmalogensynthese gezeigt werden (Rodemer et al., 2003). Da es bisher keine Daten zur Charakterisierung der Peroxisomen in Oozyten gibt, war das Hauptziel dieser Dissertation die quantitative und qualitative Darstellung des peroxisomalen Kompartimentes in Oozyten während der Follikulogenese zu beschreiben. Hierbei sollte die Einteilung der Follikelgröße nach Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel gewählt werden.

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sollten nach Optimierung der Methode die Markierung peroxisomaler Proteine in Oozyten, Granulosazellen, Thekazellen und Luteinzellen erfolgen, die eine Aussage über Form, Verteilung und Enzymzusammensetzung der Peroxisomen ermöglichen könnte. Dabei sollte eine morphometrische Analyse die Veränderung des peroxisomalen Kompartimentes während der Follikulogenese in Oozyten quantitativ erfassen. Darüber hinaus sollten die Zyklusstadien der Maus berücksichtigt und die Unterschiede zwischen Oozyten in den verschiedenen Zyklusphasen herausgearbeitet werden. Für die Erfassung der Zyklusstadien sollte neben dem Vaginalabstrich auch die Histologie der Vagina dienen und die FSH-Konzentration im Plasma mit Hilfe eines ELISAs gemessen werden.

Über eine exakte Beschreibung der Veränderungen des peroxisomalen Kompartimentes und dessen Enzymzusammensetzung während der Zyklus- und Follikelreifung könnte man auf eine wichtige Funktion der Organellen für die weibliche Fertilität schließen.



3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien, Farblösungen und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien	Hersteller, Ort
Azokarmin G	Merck, Darmstadt
Anilinblau, wasserlöslich	Chroma Gesellschaft, Köngen/Neckar
Anilin	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt
DAPI	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin Y, wässrig	Chroma Gesellschaft, Köngen/Neckar
Eisessig (96% Essigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harris Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm, Ulm
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Ketamin	Ratiopharm, Ulm
Mowiol	Farbwerke Hoechst, Frankfurt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
0,9% Natriumchlorid-Lösung, steril	Braun, Melsungen
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Orange-G	Chroma Gesellschaft, Köngen/Neckar
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Periodsäure	Merck, Darmstadt
Polychrome Eosin-Azur-Lösung: Polychromlösung 3b (EA 50)	Carl Roth, Karlsruhe
Propylgallat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rompun (Xylazin)	Bayer, Leverkusen
Schiffssches Reagenz	Merck, Darmstadt
Sedastress (Azepromazin)	WDT Eurovet
Toto 3 iodid	Life Technologies, Darmstadt
Trinatriumcitratdihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wolfrumphosphorsäure	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

Tabelle 3.1: Chemikalien





Für die lichtmikroskopischen Färbungen wurden Farblösungen selbst hergestellt, die in der Tabelle 3.2 aufgelistet sind. Die Herstellung erfolgte nach Romeis-Mikroskopische Technik (Mulisch und Welsch, 2012).

Farblösung	Herstellung
Azokarmin-Farblösung	0,1g Azocarmin G in 100ml Aqua dest., aufkochen, abkühlen, filtrieren, und vor Gebrauch 1ml Eisessig hinzufügen.
Anilinblau-Orange-G Färbelösung	0,5g Anilinblau, wasserlöslich und 2g Orange G in 100ml Aqua dest. Lösen, 8ml Eisessig zusetzen, aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren.
Anilinethanol	1ml Anilinöl (Merck, Darmstadt) in 1000ml 96% Alkohol
Eosin, 0,1%, wässrig	0,1g Eosin Y (Chroma Gesellschaft, Köngen/N.) in 100ml Aqua dest lösen und mit 1 Tropfen Eisessig auf 100ml Farblösung ansäuern
Essigsäure-Ethanol	1ml Eisessig in 100ml 96% Ethanol
Orange-G Färbelösung	0,5g Orange G (Firma) in 100ml 96% Ethanol lösen und 0,015g Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt) zusetzen.
0,5%-Periodsäurelösung	0,5g Periodsäure in 100ml Aqua dest. lösen
5% wässrige Phosphowolframsäure	5g Wolframphosphosäure in 100ml Aqua dest. lösen
Polychrome Eosin-Azur-Lösung: Polychromlösung 3b (EA 50)	Karl Roth, Karlsruhe

Tabelle 3.2: Farblösungen



Die Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3.3 zu finden.

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläschen	Fischer Scientific, Schwerte
Einbettkassetten	Leica, Bensheim
EinbettSchälchen, Metall	Leica, Bensheim
Eppendorfggefäße	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Fischer Scientific, Schwerte
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) Röhrchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glasgefäße	Labor-Brand, Gießen
Injekt Spritze	Braun, Melsungen
Immersionsöl	Leica, Bensheim
Kanüle (0,45mm x 23mm)	Terumo, Haasrode (Belgien)
Laborflaschen	Fischer, Schwerte
Mandrin/Stylet	Braun, Melsungen
Messzylinder	Duran®, Wertheim
Mikrotomklingen	Medizin AG, Köln
PAP-Pen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin Paraplast Plus	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Save Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
SuperFrost Plus Objektträger	R.Langensbrink, Emmendingen
Tubes Standard 13800	Sarstedt, Nürnberg

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien

3.1.2 Kits

a) Für die Hormonbestimmung (FSH) im Plasma wurde folgender ELISA-Kits verwendet:

ELISA-Kit for Mouse follicle-stimulation hormone,

Cat.No.: E0830Mu, Usan Life Science, Whuan, P.R. China

b) Die Darstellung der apoptotischen Zellen in Paraffinschnitten erfolgte mit folgendem Kit:

ApopTag® Red *In Situ*

Apoptosis Detection Kit, S7165

Chemicon International, USA & Canada



3.1.3 Antikörper

Die Tabellen 3.4 und 3.5 geben eine Übersicht über die Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Inkubation verwendet wurden.

Um die geeignete Antikörperkonzentration zu finden, wurden zunächst für alle Antikörper Verdünnungsreihen an Gewebeschnitten von Ovarien durchgeführt. Die Tabellen zeigen neben der verwendeten Verdünnung auch die Herkunft der Antikörper.

Der Verdünnungspuffer war 1% PBSA + 0,05% Tween 20 (siehe 4.7.2.4).

Antikörper	Verwendete Verdünnung	Hersteller
Rabbit Anti-PEX14	1:2000	Prof. Crane, Brisbane Qld, Australien
Rabbit Anti-Catalase 2	1:2000	Prof. Crane, Brisbane Qld, Australien
Rabbit Anti-SOD2	1:2000	Abcam, 332 Cambridge Science Park CG4 0WN, UK
Rabbit Anti-Hydroxysteroid-(17-β)-Dehydrogenase 4	1:500	Prof. Crane, Brisbane QLD, Australien
Rabbit Anti-ABCD3-(PMP70)	1:500	Alfred Völkl, Heidelberg
Mouse Anti-OxPhos Complex III	1:2000	Invitrogen/Mol.Probes Deutschland

Tabelle 3.4: Primärantikörper

Antikörper	Verwendete Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488	1:300	Invitrogen/Mol.Probes Deutschland
Anti-Mouse IgG Texas Red	1:300	Vector/Linaris, USA

Tabelle 3.5: Sekundärantikörper



3.1.4 Geräte

In Tabelle 3.6 sind alle Geräte aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Firma, Ort
CLSM	Leica, Wetzlar
Einbettautomat TP 1020	Leica, Wetzlar
Einbettstation	PSI, Basel (Schweiz)
Fluoreszenzmikroskop (DMRD)	Leica, Wetzlar
Heizmagnetrührer	IKAMAG®, Staufen
Kühlschrank -20°C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Kühlschrank -80°C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Mikroskop mit Kamera	Olympus
Mikrotom RM 2135	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	LG, Willich
Paraffin-Ausgießstation „Paramat“	Paul Scherrer Institut, Villingen, Schweiz
Perfusor Pumpdrive 5001	Heidolph, Schwabach
pH-Meter inolab pH720	WTW series, Weilheim
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Bedford, MA, USA
Streckbad WB 24	E.Vieth, Mikrotome, Wiesmoor
Timer TR 118	Oregon Scientific GmbH, Neu-Isenburg
Wärmeplatte	Medax, Kiel
Wärmeschrank 60°C	Heraeus, Hanau
Wage	Mettler Toledo
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 3.6: Geräte



3.2 Versuchstiere

Die Versuchstiere waren nullipara, nongravide Mäuse C57BL/6J Wildtyp der Firma Charles River, Deutschland. Die Organentnahme erfolgte jeweils in der 12.-16. Woche.

Die Tiere wurden in autoklavierten Käfigen (21 cm x 37 cm x 15 cm) bei ständig verfügbarem Leitungswasser über Trinkflaschen und sterilisiertem pelletiertem Pressfutter (Standarddiät) gehalten im Zentralen Tierstall der Universität gehalten und für den Vaginalabstrich und die Perfusion in das Labor gebracht. Die Raumtemperatur betrug 18-20°C. Die Belichtungszeit betrug im Durchschnitt 8 Stunden pro Tag (Tageslicht). Die Haltung der Tiere erfolgte unter Berücksichtigung der Richtlinien des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland.

3.3 Zyklusbestimmung der Maus

3.3.1 Synchronisation des Zyklus

Um alle Stadien des murinen Zyklus zu erfassen, wurde zunächst versucht die Zyklen der Mäuse zu synchronisieren. W. K. Whitten beschrieb 1958 erstmals, dass der Zyklus mehrerer weiblicher Mäuse durch Pheromone im männlichen Urin stimuliert werden kann. Allein der Geruch des Männchens als Stimulans sei ausreichend (Whitten, 1958).

Zur Synchronisation der Zyklen von zehn weiblichen Mäusen wurden im Tierstall jeweils fünf Tiere in einen Käfig gebracht. Zwischen den zwei Käfigen wurde ein Käfig mit einer männlichen Maus positioniert, so dass ein olfaktorischer und visueller Austausch der Tiere möglich war.

Nach ca. zwei Wochen wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen von jeweils zwei Mäusen ein Vaginalabstrich angefertigt, Blut entnommen und die Organe (Ovarien, Uterus und Vagina) entnommen (siehe 3.5).

Da die Ergebnisse meist keine eindeutige Zuordnung der Mäuse zu einem Zyklusstadium zuließen, da oft das zytologische Bild von Zwischenstadien zu finden war, wurden alle 24 Stunden ein Vaginalabstrich durchgeführt, um anhand der Zytologie das Zyklusstadium zu bestimmen.

3.3.2 Vaginale Zytologie

3.3.2.1 Durchführung eines Vaginalabstriches

Um das Zyklusstadium der Maus bestimmen zu können, wurde alle 24 Stunden ein Vaginalabstrich durchgeführt.

Hierfür wurde ein Mandrin/Stylet (18G x 45 mm, Braun, Melsungen) verwendet, der vor dem Abstrich mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) benetzt wurde. Das gewonnene Zellmaterial wurde auf einen Objektträger ausgestrichen.

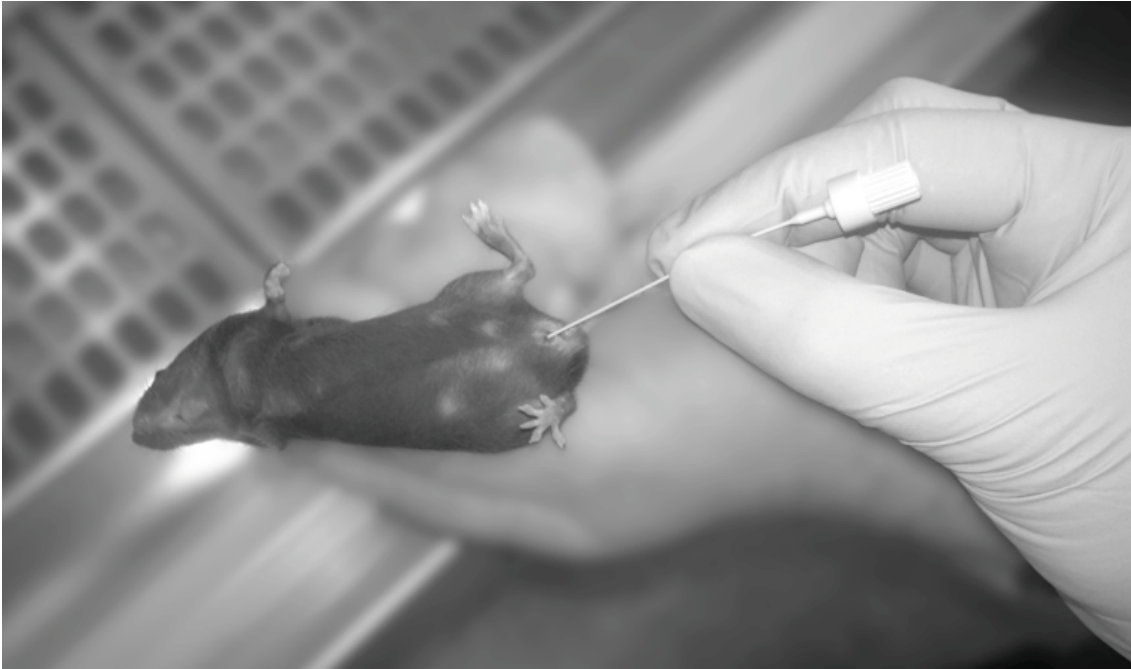


Abb. 3.1: Durchführung des Vaginalabstriches

3.3.2.2 Fixierung und Färbung des Vaginalabstriches

Das Zellmaterial wurde 10 min in 96% Alkohol feucht fixiert (Mulisch und Welsch, 2012).

3.3.3 Histologische Beurteilung der Vagina

Neben Ovarien und Uterus wurde den Mäusen auch die Vagina entnommen, fixiert, in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte für die Lichtmikroskopie hergestellt (siehe 3.4).

Um den vaginalen Abstrich mit dem histologischen Bild der Vagina vergleichen zu können, wurde diese ebenso nach *Papanicolaou* gefärbt.

3.3.4 Hormonbestimmung (FSH) im Plasma

Die FSH-Konzentration zum Zeitpunkt der Organentnahme wurde mit Hilfe des ELISA festgestellt.

3.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die Konzentrationsbestimmung des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) wurde mittels eines fertigen ELISA-Kits durchgeführt.

3.4.1 Testprinzip

Im Test-Kit befand sich eine Mikrotiterplatte, deren Oberfläche mit einem Antikörper gegen FSH beschichtet ist. Die Wells wurden zunächst mit dem Standard bzw. den Plasmaproben versetzt. Hierbei band sich FSH an den beschichteten Antikörper. Nach Entfernen des Standards bzw. der Proben wurde ein polyklonaler Antikörper gegen FSH, der mit Biotin markiert ist, in die Wells gegeben und inkubiert. Die nicht-gebundenen polyklonalen Antikörper wurden anschließend durch einen Waschvorgang aus den Wells entfernt.

Da Biotin eine hohe Bindungsaffinität zum Protein Avidin besitzt, wurde anschließend ein Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat in die Wells gegeben. Nach der Inkubation wurden die überschüssigen Konjugat-Moleküle aus den Wells gewaschen.

Um die Reaktionen sichtbar zu machen und die FSH-Konzentration quantifizieren zu können, gab man im anschließenden Schritt TMB (Tetramethylbenzidin), das Substrat der Meerrettichperoxidase, in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Das Substrat ergab nach der Umwandlung durch das Enzym einen sichtbaren Farbumschlag, dessen Intensität nach einer definierten Inkubationszeit durch das Stop-Reagenz (Schwefelsäure) begrenzt wurde. Die Intensität der Farbreaktion wurde photometrisch bei 450 nm und 570 nm gemessen, wobei die Farbintensität proportional zur FSH-Konzentration ist.

Für die Konzentrationsermittlung der Proben wurden deren photometrisch gemessenen Werte mit einer Standardkurve verglichen, die man aus den Standardkonzentrationen erhielt.



3.4.2 Durchführung

a) Vorbereitung der Reagenzien

Alle Bestandteile des Kits wurden auf Raumtemperatur (18-20°C) gebracht.

Reagenzien	Durchführung
Standard	Der Standard wird mit 1ml Standard Diluent versetzt und wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vorsichtiges Mischen. Die Konzentration der Stocklösung beträgt nun 20 μ U/ml.
Proben	Die Plasma-Proben werden auf Raumtemperatur gebracht.
Assay Diluent A und B	Je 3 ml des Assay Diluent A und B werden mit jeweils 3 ml aqua dest. versetzt.
Detection Reagent A und B	Die Stocklösungen werden vorsichtig gemischt. Die Detection Reagenzien A und B werden mit Assay Diluent A und B 1:100 verdünnt. 30 μ l Detection A + 2970 μ l Assay Diluent A 30 μ l Detection B + 2970 μ l Assay Diluent B
Wash Solution	10 ml des Wash-Solution-Konzentrates (30x) werden mit 290 ml aqua dest. versetzt.
TMB Substrat	Die benötigte Menge, 3 ml, wird mit einer sterilen Pipettenspitze aspiriert.

Tabelle 3.7: Vorbereitung der Reagenzien (ELISA)

Die verschiedenen Standardkonzentrationen werden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (Abbildung 3.2) hergestellt.

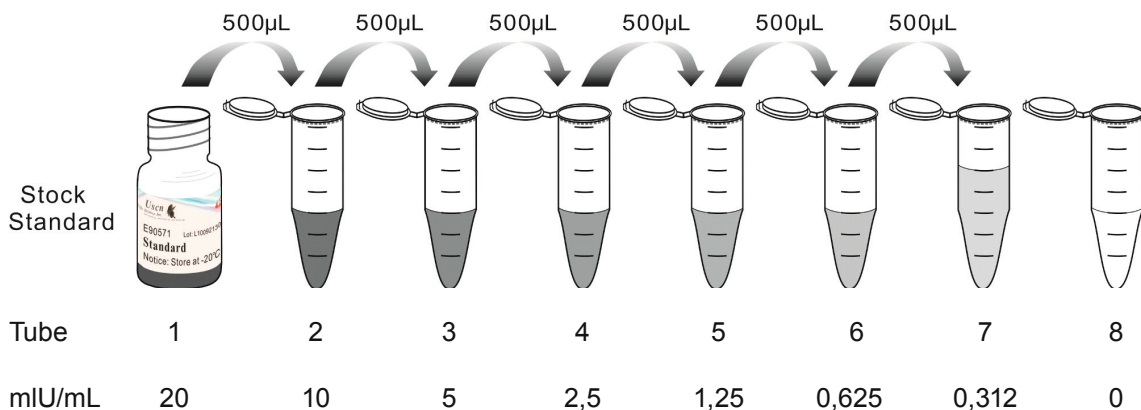


Abb. 3.2: Standardverdünnungsreihe nach der Anleitung des ELISA-Kits



b) Durchführung des ELISAs

Die Standard-Verdünnungsreihe (je 100µl) und die Proben werden nach dem Schema (Tabelle 3.8) pipettiert. Inkubation für 2 Stunden bei 37°C.

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Standard										
	20 mIU/ml	10 mIU/ml	5 mIU/ml	2,5 mIU/ml	1,25 mIU/ml	0,625 mIU/ml	0,312 mIU/ml	0 mIU/ml			
B	EMH										
	05/09 100 µl	06/09 40 µl	19/09 100 µl	20/09 100 µl	03/10 60 µl	04/10 80 µl	06/10 40 µl	07/10 100 µl	09/10 100 µl	10/10 100 µl	14/10 40 µl

Tabelle 3.8: Pipettierschema (ELISA)

Zeit und Temperatur	Durchführung
	Die Proben und der Standard werden aus den Wells entnommen. Kein Waschen.
1 Stunde, 37°C	Jeweils 100 µl des Detection Reagent A werden in die Wells gegeben.
	Die Lösungen werden aspiriert und jedes Well wird mit 400 µl Waschlösung gewaschen. Dabei werden die 400 µl für 1-2 Minuten im Well belassen und anschließend durch Aufklopfen der Platte auf Papier entfernt. Der Waschvorgang wird drei Mal wiederholt.
30 Minuten, 37°C	Jeweils 100 µl des Detection Reagent B werden in die Wells gegeben.
	Der Waschvorgang wird fünf Mal wiederholt.
15-25 Minuten, 37°C (vor Licht geschützt)	Jeweils 90 µl der Substrat-Lösung werden in die Wells gegeben.
	Jeweils 50 µl der Stop-Lösung werden in die Wells gegeben
	Messung der Extinktion bei 450 nm und 570 nm.

Tabelle 3.9: Durchführung (ELISA)



Mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe konnte eine Standardkurve erstellt und die Konzentrationen der Proben hiermit errechnet werden. Leider war es bei der Blutentnahme nicht immer möglich, ausreichend Blut und Plasma zu gewinnen, so dass der ELISA mit unterschiedlichen Plasmamengen (siehe Tabelle 3.8) durchgeführt wurde.

Aus diesem Grund wurde ein zweiter ELISA durchgeführt, um festzustellen, ob die unterschiedlichen Volumina Auswirkung auf die Konzentration des FSH haben.

Der ELISA wurde nach dem Schema der Tabelle 3.10 ausgeführt.

Well	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Standard							
	20 mIU/ml	10 mIU/ml	5 mIU/ml	2,5 mIU/ml	1,25 mIU/ml	0,625 mIU/ml	0,312 mIU/ml	0 mIU/ml
B	Standard							
	100 µl	100 µl	100 µl					
C	Standard							
	80 µl	80 µl	80 µl					
D	Standard							
	60 µl	60 µl	60 µl					
E	Standard							
	40 µl	40 µl	40 µl					

Tabelle 3.10: FSH Volumenreihe (ELISA)

3.5 Entnahme, Fixierung und Aufarbeitung der Gewebe

Vor der Organentnahme wurde ein vaginaler Abstrich durchgeführt, die Vulva und Vaginae wurden makroskopisch beurteilt und die Tiere gewogen (siehe 4.1). Ebenso wurde zur Antikoagulation intraperitoneal Heparin (1 ml) injiziert.

3.5.1 Anästhesie

Zur Anästhesie kamen nach einem Schema, das nach Prof. Th. Ruelicke in unserem Labor verwendet wird, folgende Medikamente zur Verwendung:

- a) Ketamin, Ratiopharm (100mg/ml)
- b) Rompun, Bayer (Xylazin 20mg/ml)
- c) Sedastress, WDT Eurovet (Azepromazin 10mg/ml)

In Abhängigkeit vom Körpergewicht der Maus wurde nach Tabelle 3.11 die Dosierung der Anästhesie gewählt, in eine Spritze aufgezogen, gemischt und intraperitoneal appliziert.

Medikamente	Dosierung
Ketamin	65 mg/ kg Körpergewicht
Xylazin	13 mg/kg Körpergewicht
Azepromazin	2 mg/kg Körpergewicht

Tabelle 3.11: Dosierung der Anästhesie

3.5.2 Blutentnahme

Nach Wirkungseintritt der Anästhesie wurden die Tiere in Rückenlage an allen Extremitäten fixiert. Der Thorax wurde nach einem Hautschnitt mittels Durchtrennung der Rippen parasternal eröffnet, so dass die Sicht auf das Herz frei war. Die Herzspitze wurde mit einer Schere abgetrennt, um mit einer Kanüle und Injekt-Spritze (5 ml) Blut im linken Ventrikel zu aspirieren. Das gewonnene Material wurde sofort in ein EDTA-Röhrchen gegeben, um die Gerinnung zu verhindern. Das Blut wurde anschließend bei 3200rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde vom Sediment getrennt und bei -80°C tiefgefroren.



3.5.3 Perfusionsfixierung

Nach Eröffnung des Abdomens mit einer Schere wurde über den eröffneten linken Ventrikel die Aorta mittels einer Knopfkanüle katheterisiert und mit einer Klemme am Ventrikel befestigt. Über den Perfusor wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) vorgespült und anschließend mit 4% Paraformaldehyd-Lösung (Tabelle 3.12) perfundiert.

Den Erfolg der Perfusion konnte man makroskopisch an der Entfärbung der inneren Organe, insbesondere der Leber, feststellen.

Reagenzien	Herstellung
Paraformaldehyd	12g Paraformaldehyd wird in 100ml Aqua dest. gegeben und auf ca. 60°C erhitzt. Zugabe von einigen Tropfen NaOH, bis sich die Lösung klärt.
Saccharose	6g zur PFA-Lösung hinzufügen.
PBS-Puffer (10fach konzentriert)	30ml zur PFA-Lösung hinzufügen und mit Aqua dest. auf 250ml auffüllen. PH-Wert auf 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 300ml auffüllen.

Tabelle 3.12: 4% Paraformaldehyd (PFA) mit 2% Saccharose



3.5.4 Entnahme der Ovarien, Uterus und Vagina

Nach abgeschlossener Perfusion wurden die Leber und die Darmschlingen nach kranial verlagert. Nach Auffinden des Uterus wurden dessen Hörner nach kranial verfolgt und die dort liegenden Ovarien entnommen.

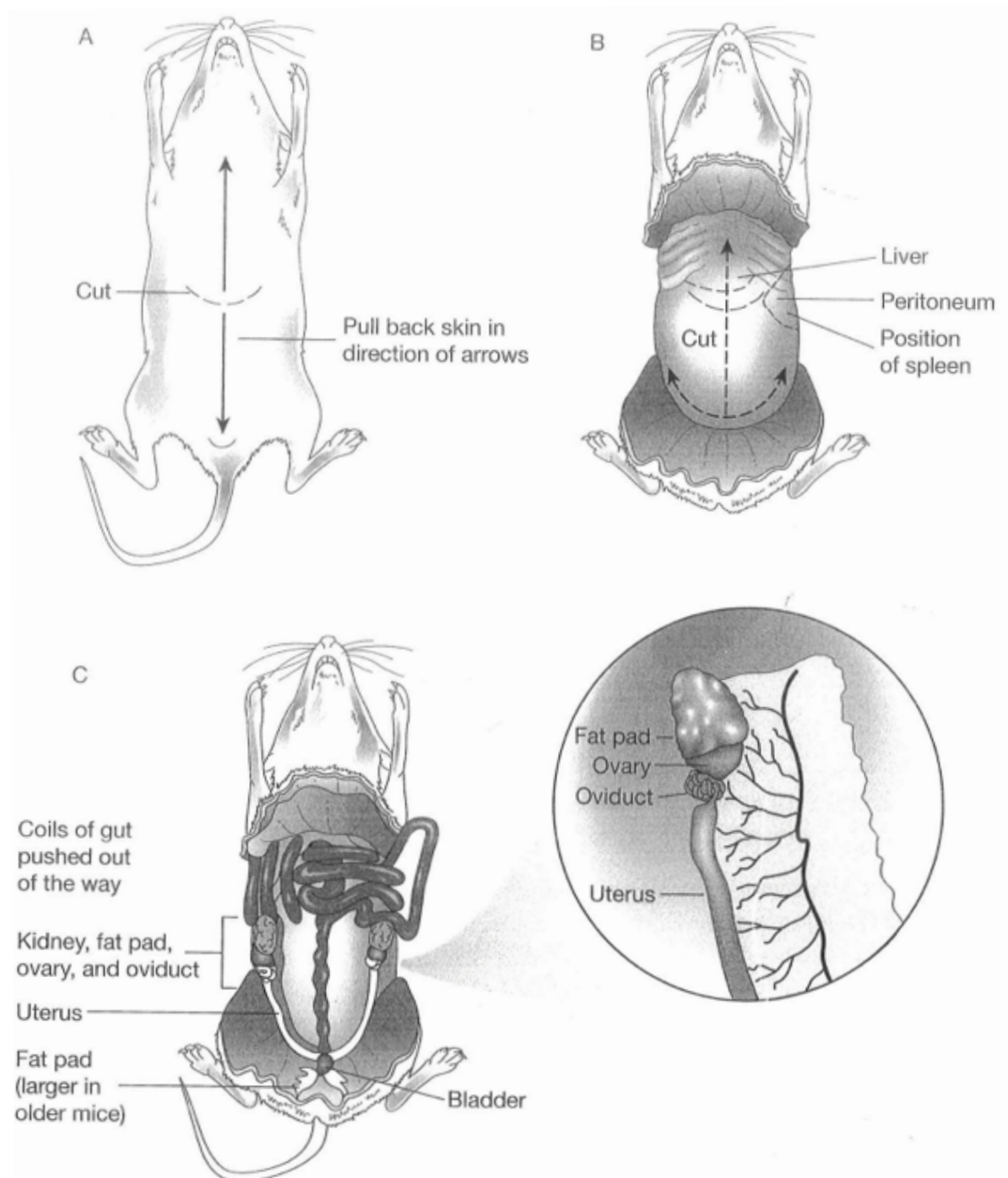


Abb. 3.3: Präparation der Maus; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 193

Abbildung (A) zeigt die Schnittführung zur Eröffnung des Thorax und Abdomens. Nach Präparation der Haut, zeigt sich der mit Peritoneum bedeckte Bauchraum (B). Nach Eröffnung werden die Darmschlingen nach kranial verlagert (C).

Der Uterus wurde präpariert und oberhalb der Vagina mit einer Schere abgetrennt.
Die Vagina wurde vom hinten liegendem Rektum abgetrennt und entnommen.

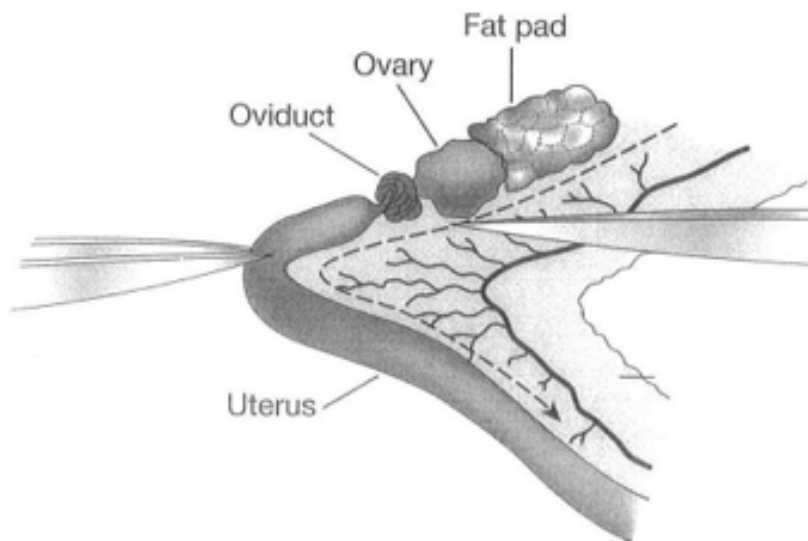


Abb.3.4: Präparation der Ovarien; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 195

Die Ovarien, der Uterus und die Vagina wurden anschließend in 4%-Paraformaldehyd-Lösung (Tabelle 3.12) für 24h immersionsfixiert.

3.5.5 Dehydratation und Paraffin-Einbettung

Nach der Immersionsfixierung wurden die Organe mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und in Paraffin eingebettet.

Für die Entwässerung stand eine automatische Gewebeinfiltration (Leica TP 1020) zur Verfügung, die nach folgenden Vorgaben arbeitete:

für jeweils zwei Stunden wurde das Gewebe in 70%, 80%, 90%, 96% und drei Fraktionen 99% Alkohol belassen und anschließend die gleiche Zeit in drei Fraktionen im Intermedium Xylol I, II und III überführt.

Anschließend wurden die Gewebeprobe mit Hilfe von Metallformen und einer Einbettstation bei ca. 60°C in Paraffinblöcke gegossen.

3.5.6 Herstellung von Paraffinschnitten

Mit einem Mikrotom (Leica RM 2135) wurden aus den Paraffinblöckchen verschiedene Schnitte hergestellt. Die Dicke der Schnitte war abhängig von der weiteren Vorgehensweise.



Für die Lichtmikroskopie wurde eine Schnittdicke von 6 μm gewählt, während die Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenz-Färbungen 1 μm dick geschnitten wurden. Nach kurzem Kühlen der Paraffinblöcke im Gefrierschrank wurden die Schnitte vom Mikrotom mit Hilfe von Pinseln abgenommen und in ein Wasserbad (ca. 40°C) überführt, wobei sich das Paraffin mit dem Gewebe ausdehnte. Anschließend wurden die Paraffinschnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen und zum Trocknen auf eine Wärmeplatte (ca. 40°C) gegeben. Nach der Trocknung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in Präparatekästen aufbewahrt.



3.6 Histologische Färbungen

Um eine erste Charakterisierung der Gewebe zu erhalten, wurden verschiedene histologische Färbungen durchgeführt. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Tabelle 3.13) und Azan-Färbung (Tabelle 3.14) wurde bei den Gewebeschnitten vom Uterus und den Ovarien durchgeführt, um eine Übersicht über deren histologische Strukturen zu erhalten.

Die Paraffinschnitte der Vagina wurden nach Papanicolau (Tabelle 3.15) gefärbt, um eine Darstellung des Zyklusstadiums zu erhalten. Ebenso wurde unterstützend eine PAS-Färbung (Tabelle 3.16) durchgeführt.

3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung wurde nach folgender Methode (Mulisch und Welsch, 2012) durchgeführt:

Medium	Zeit
Entparaffinieren in Xylol I, II und III	jeweils 5 min
99% Ethanol I und II, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol	jeweils 3 min
Aqua dest.	Spülen
Hämatoxylin nach Mayer	10 min
„Bläuen“ in fließendem Leitungswasser	10 min, anschließend kurz in Aqua dest. spülen
Eosin, wässrig, 0,1%	2 min
96% Ethanol	kurz spülen
99% Ethanol I und II	jeweils 3 min
Xylol I, II und III	jeweils 5 min
Eukitt	Eindecken

Tabelle 3.13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung



3.6.2 Azan Färbung nach Heidenhain

Die Färbung wurde nach folgender Methode (Mulisch und Welsch, 2012) durchgeführt:

Medium	Zeit
Entparaffinieren in Xylol I, II und III	jeweils 5 min
99% Ethanol I und II, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol	jeweils 3 min
Aqua dest.	Spülen
Azocarmin (56°C)	15 min
Aqua dest.	Spülen
Anilin-Ethanol	differenzieren
Essigsäure-Ethanol	30-60 sec
5% wässrige Phosphorwolframsäure	1 h
Aqua dest.	Spülen
Anilin-Orange-G-Essigsäure, konzentriert	3 min
96% Ethanol I und II, 99% Ethanol I und II	jeweils 2 min
Xylol I, II und III	jeweils 5 min
Eukitt	Eindecken

Tabelle 3.14: Azan-Färbung nach Heidenhain

3.6.3 Färbung nach Papanicolau

Die Vaginalabstriche wurden nach Papanicolau (Mulisch und Welsch, 2012) gefärbt:

Durchführung	Zeit
Bewässerung durch absteigende Ethanolreihe: 80%, 70%, 50%, aqua dest	jeweils 2 min
Harris Hämatoxylin	4 min
Differenzieren in 0,03N HCl	1-2x eintauchen
Bläuen in fließendem Leitungswasser	10 min
Aufsteigende Ethanolreihe: 50%, 70%, 80%, 96%	jeweils 30 sec
Orange-G Färbelösung	4 min
Spülen in 3 Portionen 96% Ethanol	jeweils 2x eintauchen
Polychrome Eosin-Azur-Lösung	4 min
Spülen in 3 Portionen 96% Ethanol	jeweils 2x eintauchen
Vollständig entwässern in 2 Portionen 100% Ethanol	jeweils 2 min
2 Portionen Xylol	jeweils 2 min
Eukitt	Eindecken

Tabelle 3.15: Färbung nach Papanicolau





3.6.4 PAS-Färbung nach McManus

Die Färbung wurde nach folgender Methode (Mulisch und Welsch, 2012) durchgeführt:

Medium	Zeit
Entparaffinieren in Xylol I, II und III	jeweils 5 min
99% Ethanol I und II, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol	jeweils 3 min
Aqua dest.	Spülen
0,5% wässrige Periodsäure	10 min
Aqua dest.	Spülen
Schiffssches Reagenz (Raumtemperatur)	30 min
Aqua dest.	Spülen
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	Spülen
Hämalaun nach Mayer	2 min
Aqua dest.	Spülen
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	Spülen
50%, 70%, 80%, 96% Ethanol	jeweils 3 min
99% Ethanol I und II	jeweils 3 min
Xylol I, II und III	jeweils 5 min
Eukitt	Eindecken

Tabelle 3.16: PAS-Färbung

3.7 Immunfluoreszenzfärbung

3.7.1 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Man unterscheidet eine direkte und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Bei der direkten Immunfluoreszenz werden die Antigene mit einem spezifischen Antikörper markiert, der selbst mit einem Fluorochrom konjugiert ist. Überschüssige Antikörperkonjugate werden abgespült. Die Fluorochrome werden mit entsprechenden Wellenlängen im Fluoreszenzmikroskop angeregt und emittieren Licht, das detektiert werden kann. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird zunächst ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das Gewebe gegeben. Nach der Bindung an das Antigen werden die überschüssigen Antikörper abgewaschen. Anschließend wird das Gewebe mit einem Antikörper inkubiert, der gegen den Fc-Teil als Zielstruktur gerichtet ist und mit einem Fluorochrom markiert ist. Nachdem die nicht-gebundenen Sekundärantikörper abgewaschen sind, kann bei Anregung durch bestimmte Wellenlängen im Fluoreszenzmikroskop das emittierende Licht des Fluorochroms detektiert werden. Für die Darstellung der peroxisomalen Proteine wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung gewählt.

3.7.2 Herstellung der Lösungen

3.7.2.1 PBS-Puffer (*Phosphate-Buffered Saline*)

Zunächst wurde der Puffer in einer zehnfachen Konzentration hergestellt. 87,6 g NaCl, 22,8 g K₂HPO₄ und 6,8 g KH₂PO₄ wurden in 1 Liter Aqua dest. gelöst.

Vor Gebrauch wurde die konzentrierte Lösung 1:10 verdünnt und mittels pH-Meter auf pH 7,4 eingestellt.

3.7.2.2 *Trypsin-Lösung*

0,1 g Trypsin wurde in 100 ml PBS-Puffer gelöst und anschließend 1:10 verdünnt, so dass eine 0,01%-Trypsin-Lösung verwendet werden konnte.

3.7.2.3 *Blocklösung: 4% PBSA + 0,05% Tween 20*

0,8 g BSA wurde in 200 ml PBS gelöst und anschließend mit 100 µl Tween 20 versetzt.

3.7.2.4 *Verdünpuffer: 1% PBSA + 0,05% Tween 20*

2 g BSA wurde in 200 ml PBS gelöst und anschließend mit 100 µl Tween 20 versetzt.

3.7.2.5 Citratpuffer

Zur Herstellung des Citratpuffers wurden zunächst zwei Stocklösungen hergestellt. Für Lösung A wurden 2,1010 g Citronensäuremonohydrat mit 100 ml Aqua dest. versetzt.

14,705 g Trinatriumcitratdihydrat wurden mit 500 ml Aqua dest. für die Lösung B zusammen gegeben.

Anschließend wurden 15 ml der Lösung A und 85 ml der Lösung B gemischt, mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und mit Hilfe des pH-Meter auf pH 6,0 eingestellt.

3.7.2.6 Mowiol und Propylgallat

Für das Eindeckmedium Mowiol wurden 20 g Mowiol 4-88 in 80 ml PBS gelöst und mit 40 ml Glycerin versetzt. Die aliquotierten Anteile wurden bei -20°C aufbewahrt.

Zur Herstellung des Bleichschutzes Propylgallat wurden 2,5 g n-Propylgallat in 50 ml PBS gelöst und mit 50 ml Glycerin versetzt. Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

3.7.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung findet an zwei Tagen statt. Von den entnommenen Ovarien wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 1 µm nach 3.5.6 hergestellt.

3.7.3.1 Entparaffinierung und Hydrierung

Die Paraffinschnitte wurden über Nacht in den Wärmeschrank bei 60°C und anschließend zur Entparaffinierung in Xylol gegeben. Die Hydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50%) für jeweils zwei Minuten.

3.7.3.2 Antigenfreilegung und Antigenwiderherstellung

Gewebeproben, die mit Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet sind, benötigen nach der Entparaffinierung und Hydratisierung eine Vorbehandlung. Hierbei werden bestehende Aldehyd-veränderte Antigene demaskiert, das Antigen freigelegt und somit zugänglicher für eine Antigen-Antikörperreaktion gemacht.

Diese Vorbehandlungsreaktion wird meist mit Hilfe von Protease- oder Hitzbehandlungen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kombination der Protease- und Mikrowellenbehandlung gewählt (Dinges et al., 2000).

Das Enzym Protease katalysiert die Spaltung von Proteinquervernetzungen, um blockierende Verbindungen an Antigenen wieder freizulegen. Diese Reaktion ist abhängig von der Fixierung und der Art des Gewebes.

In dieser Arbeit wurde die Protease Trypsin verwendet, deren Konzentration (0,01% Trypsin) auf dem modifizierten Protokoll von Grabenbauer und aus den Erfahrungen unseres Labors beruht (Nenicu et al., 2007, Karnati und Baumgart-Vogt, 2008, Grabenbauer et al., 2001). In verschiedenen Vorversuchen zeigte sich, dass eine Protease-Zeit von 9 Minuten bei den entnommen Ovarien zu optimalen Ergebnissen führte.

Die Hitzebehandlung wurde mit Hilfe der Mikrowelle durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit Citratpuffer 3x5 min behandelt.

3.7.3.3 Blocken

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken, wurde eine Lösung aus Albuminserum in PBS (4%) und 0,05% Tween 20 verwendet. Ziel der Behandlung war es, die unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermindern.

3.7.3.4 Erstantikörper

Mit Hilfe von verschiedenen Vorversuchen zeigte sich, welche Antikörperverdünnung die optimalsten Ergebnisse erbrachte (siehe Tabelle 3.4). Die Antikörper wurde mit einer Lösung aus Albuminserum in PBS (1%) und 0,05% Tween verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und über Nacht in einer feuchten Kammer belassen.

3.7.3.5 Zweitantikörper

Nach Entfernen des Erstantikörpers durch Waschen wurde der Zweitantikörper mit einer Lösung aus Albuminserum in PBS (1%) und 0,05% Tween 1:300 verdünnt und auf die Gewebeschnitte gegeben.

3.7.3.6 Kernfärbung

Für die Kernfärbung wurden DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) und Toto-3-iodid verwendet. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich besonders in Adenin-Thymin-reichen Regionen der DNA interkaliert. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop emittiert DAPI blaues bis cyanes Licht (Wellenlänge 400-500 nm).



Toto-3-iodid ist ein Farbstoff, der Nukleinsäuren färbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop liegt sein Emissionsmaximum bei 660 nm, wenn er mit einer Wellenlänge von 640 nm exzitert wird.

3.7.3.7 Eindecken der Gewebeschnitte

Für das Eindecken der Gewebeschnitte wurde eine Lösung aus dem Eindeckmedium Mowiol und dem Bleichschutz Propylgallat verwendet. Der Anteil von Propylgallat an der Lösung betrug 25%. Die Schnitte wurden nach Trocknung des Eindeckmediums bei 4°C aufbewahrt.

Neben den Proben sind Negativkontrollen mitgeführt worden, um die Qualität und Aussagekraft der Färbung zu sichern.

Eine Zusammenfassung der Immunfluoreszenzfärbung findet sich in Tabelle 3.17.

Durchführung	Zeit
Tag 1	
Xylol I, Xylol II, Xylol III (Entparaffinieren)	jeweils 5 min
99% Ethanol I und II, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol	jeweils 3 min
Aqua dest. I, Aqua dest. II	jeweils 3 min
0,01% Trypsin	9 min bei 37°C (Wärmeplatte)
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Citratpuffer (pH 6,0), Mikrowelle bei höchster Stufe	3 x 5 min
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
4% BSA in PBS (Blocken), feuchte Kammer	2 h
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Primärantikörper, feuchte Kammer	über Nacht
Tag 2	
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Sekundärantikörper, feuchte Kammer	2 h
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Dapi + Toto-3-iodide (Kernfärbung)	10 min
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Aqua dest.	Spülen
Mowiol + Propylgallat	Eindecken

Tabelle 3.17: Durchführung Immunfluoreszenzfärbung

3.8 Apoptosis Detection Kit

Um apoptotische Zellen in den Ovarien darzustellen, wurde der ApopTag® Red verwendet.

3.8.1 Prinzip des ApopTag® Kit

Der ApopTag® basiert auf der Verwendung der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Methode. Die fragmentierte DNA (Einzelstrang- und Doppelstrand DNA) der apoptotischen Zellen besitzt freie 3'-OH Enden. An diesen Hydroxygruppen setzt das Enzym TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) an und katalysiert das Anhängen von Nukleotiden, die mit Digoxigenin markiert sind. Die überschüssigen Nukleotide werden abgewaschen. Im anschließenden Schritt reagiert ein spezifischer Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit dem Farbstoff Rhodamin markiert ist, mit dem Antigen Digoxigenin. Die nicht-gebundenen Antikörper werden durch Waschung entfernt.

Der Farbstoff Rhodamin emittiert Licht, nachdem er im Fluoreszenzmikroskop mit einer Wellenlänge von 543nm angeregt wurde. Das emittierte Licht kann fotografisch dokumentiert werden (Anleitung des ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kits, Seite 5-6 und 14-16).

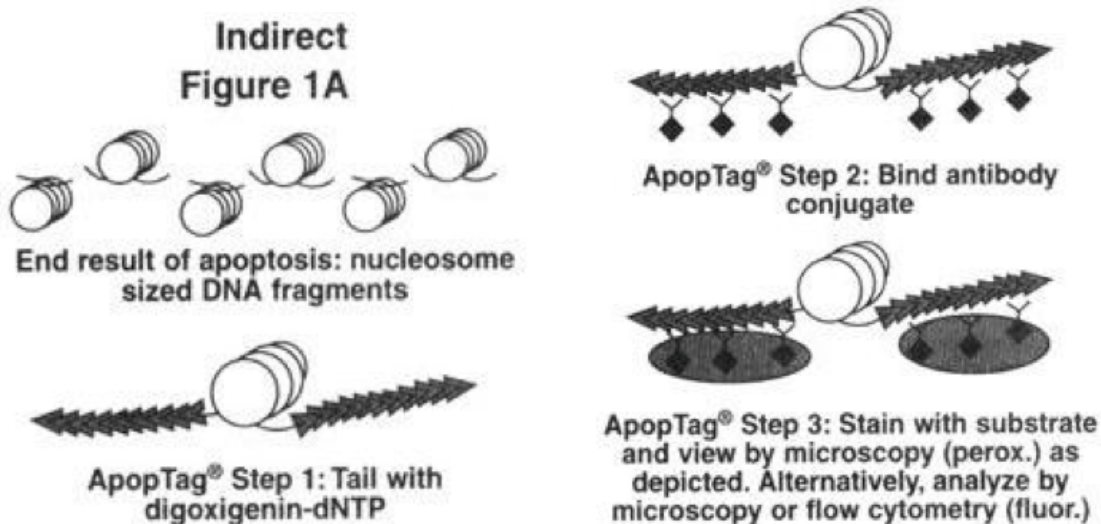


Abb. 3.5: Prinzip des TUNEL Assay; entnommen aus der Anleitung des ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kits, Seite 6



3.8.2 Vorbereitung der Reagenzien des ApopTag® Kit

Die Reagenzien werden auf Raumtemperatur (18-20°C) gebracht.

Reagenzien	Durchführung
TdT Enzym	Das TdT Enzym wird mit dem Reaktions- Puffer verdünnt. 77 µl Reaktions-Puffer + 33 µl TdT
Stop/Waschlösung	1 ml Stop/Waschlösung + 34 ml Aqua dest.
Rhodamin-Antikörper-Lösung	68 µl Blocklösung + 62 µl Anti-Digoxigenin Konjugat

Tabelle 3.18: Vorbereitung der Reagenzien des ApopTag® Kit

3.8.3 Durchführung des ApopTag® Kit

Von den entnommenen Ovarien wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 1 µm nach 3.5.6 hergestellt.

Die getrockneten Paraffinschnitte wurden über Nacht, oder mindestens 1 Stunde, bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt.

Die Gewebeschnitte wurden analog der Immunfluoreszenzfärbung entparaffiniert, hydriert und zur Antigenfreilegung und Antigenwiederherstellung mit einer Protease- und Hitzebehandlung unterzogen.

3.8.3.1 Enzymreaktion

Die Gewebeschnitte werden anschließend in den Äquilibrierungspuffer gegeben, um das optimale pH-Milieu für den folgenden Schritt zu erzeugen. Das Enzym TdT katalysiert das Anhängen von Nukleotiden an freie Hydroxgruppen der fragmentierten DNA, die mit Digoxigenin markiert sind. Um diese Reaktion zu stoppen, werden die Gewebeschnitte in eine Stopp-Lösung gebracht. Die nicht gebundenen Nukleotide werden durch den anschließenden Waschschrift entfernt.

3.8.3.2 Antikörper-Konjugat

Der verwendete Antikörper ist mit einem Farbstoff (Rhodamin) markiert. Die Zielstruktur des Antikörpers ist Digoxigenin, das an die Nukleotide gekoppelt ist. Die überschüssigen Antikörper werden im anschließenden Waschschrift entfernt.



3.8.3.3 Kernfärbung und Eindecken

Die Kernfärbung und das Eindecken der Gewebeschnitte erfolgen analog der Immunfluoreszenzfärbung. Die getrockneten Gewebeschnitte werden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Eine Übersicht der ApoTag®-Färbung findet sich in Tabelle 3.19.

Durchführung	Zeit, Temperatur
Xylol I, Xylol II, Xylol III (entparaffinieren)	jeweils 5 min
99% Ethanol I und II, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol	jeweils 3 min
Aqua dest. I, Aqua dest. II	jeweils 3 min
0,01% Trypsin	9 min bei 37°C (Wärmeplatte)
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Citratpuffer (pH 6,0), Mikrowelle bei höchster Stufe	3 x 5 min
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Äquilibrierungspuffer	Mindestens 10 s bei Raumtemperatur. Danach wird der Puffer vorsichtig abgenommen.
TdT Enzym	1 h bei 37°C
Stop/Waschpuffer	Die Schnitte 15 s im Puffer bewegen und dann 10 min bei Raumtemperatur im Puffer inkubieren.
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 1 min
Anti-Digoxigenin Konjugat	30 min bei Raumtemperatur, vor Licht schützen
Waschen in PBS (pH 7,4)	4 x 2 min
Dapi + Toto-3-iodide (Kernfärbung)	10 min
Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 min
Aqua dest.	Spülen
Mowiol + Propylgallat	Eindecken

Tabelle 3.19: Durchführung des ApopTag® Kit

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der oestrischen Zyklusstadien

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Peroxisomen im Ovar in Abhängigkeit vom Zyklus der Maus. Der murine Zyklus ist oestrisch und kann in vier Phasen unterteilt werden, die mit Hilfe der vaginalen Zytologie und der Histologie von Ovar, Uterus und Vagina nachgewiesen werden (Zondek und Aschheim, 1926). Im Rahmen dieser Arbeit wurde besonderer Wert auf die vaginale Zytologie und deren korrespondierende Histologie gelegt.

Um die Auswahl der Versuchstiere zu vereinfachen, wurde zunächst versucht, die Zyklen von zehn Mäusen zu synchronisieren, um nach drei Wochen jeweils zwei Mäuse an aufeinander folgenden Tagen zu perfundieren.

Tiere	Gewicht	Alter	Makroskopie
EMH 04/09	21,48g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rosa
EMH 05/09	21,55g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rosa
EMH 06/09	21,16g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rötlich
EMH 07/09	21,78g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rötlich
EMH 08/09	21,04g	12-13 Wochen	kleines Lumen, Vulva geschwollen, rötlich
EMH 09/09	21,45g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva unauffällig, rötlich
EMH 10/09	22,65g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rötlich
EMH 11/09	21,15g	12-13 Wochen	kleines Lumen, Vulva geschwollen, rötlich
EMH 12/09	22,09g	12-13 Wochen	kleines Lumen, Vulva unauffällig, rosa
EMH 13/09	21,67g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rosa

Wie sich herausstellte, wurden bei den Abstrichergebnissen häufig auch nicht eindeutig zuordenbare Zwischenstadien gefunden. Dies beschrieben auch schon Zondek und Aschheim 1926. Sie weisen darauf hin, dass die Scheidenveränderungen sich nicht plötzlich in der ganzen Ausdehnung der Vagina entwickeln, da sich Sekret eines vorangegangenen Stadiums noch in einer Vaginalbucht befinden kann, dass beim Abstrich mit erfasst werden kann (Zondek und Aschheim, 1926).

Aus diesem Grund wurde die Methode des Vaginalabstriches optimiert, um Mäuse einem eindeutigen Zyklusstadium zuordnen zu können.



Deshalb wurde alle 24 Stunden ein Vaginalabstrich durchgeführt und darauf geachtet, dass der Mandrin bei jeder Maus 2-3mm intravaginal eingeführt wurde, um so eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Tiere	Gewicht	Alter	Makroskopie
EMH 01/10	21,0g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva geschwollen, rosa
EMH 03/10	18,5g	12-13 Wochen	enges Lumen, Vulva unauffällig, rosa
EMH 04/10	18,0g	12-13 Wochen	weites Lumen, Vulva unauffällig, rosa
EMH 06/10	24,4g	12-13 Wochen	enges Lumen, Vulva unauffällig, rosa
EMH 07/10	23,4g	13 Wochen	enges Lumen, Vulva unauffällig, rosa
EMH 08/10	24,8g	13 Wochen	weites Lumen, Vulva unauffällig, rosa
EMH 09/10	24,4g	13 Wochen	enges Lumen, Vulva geschwollen, rosa
EMH 12/10	21,0g	13 Wochen	enges Lumen, Vulva geschwollen, rosa
EMH 14/10	22,4g	14 Wochen	enges Lumen, Vulva unauffällig, rosa

Mit Hilfe von Zytologie und Histologie konnte den Zyklusstadien Oestrus, Metoestrus und Dioestrus jeweils zwei Mäuse und dem Prooestrus eine Maus zugeordnet werden.

Tabelle 4.1 enthält eine Aufstellung der ausgewählten Tiere.

Maus	Gewicht bei Organentnahme	Alter	Zyklusstadium
EMH 05/09	21,55g	12-13 Wochen	Oestrus
EMH 06/09	22,16g	12-13 Wochen	Oestrus
EMH 09/09	21,45g	12-13 Wochen	Metoestrus
EMH 03/10	18,5g	12-13 Wochen	Dioestrus
EMH 04/10	18,0g	12-13 Wochen	Metoestrus
EMH 06/10	24,4g	12-13 Wochen	Prooestrus
EMH 09/10	24,2g	13 Wochen	Dioestrus

Tabelle 4.1: Übersicht der ausgewählten Tiere

4.1.1 Etablierung des vaginalen Abstriches und der vaginalen Histologie zur Darstellung des murinen Zyklusstadiums

4.1.1.1 Vaginale Zytologie

Um die Aussagekraft der Färbung der Vaginalabstriche zu optimieren, wurden im Vergleich die Färbungen nach *Giemsa* (Zettl et al., 2005) und nach *Papanicolaou* (siehe Tabelle 3.15) durchgeführt.

Giemsa-Färbung

Es erwies sich, dass die besten Färbungen mit einer Fixierung des Zellmaterials mit 96% Ethanol für 10 Minuten zu erkennen waren, bei der der Objektträger vier Mal für jeweils 4 Minuten mit der Giemsa-Lösung bedeckt und anschließend mit Aqua dest. abgespült wurde. Die Abstriche wurden nach Trocknung mikroskopisch ausgewertet.

Die Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse der Färbungen.

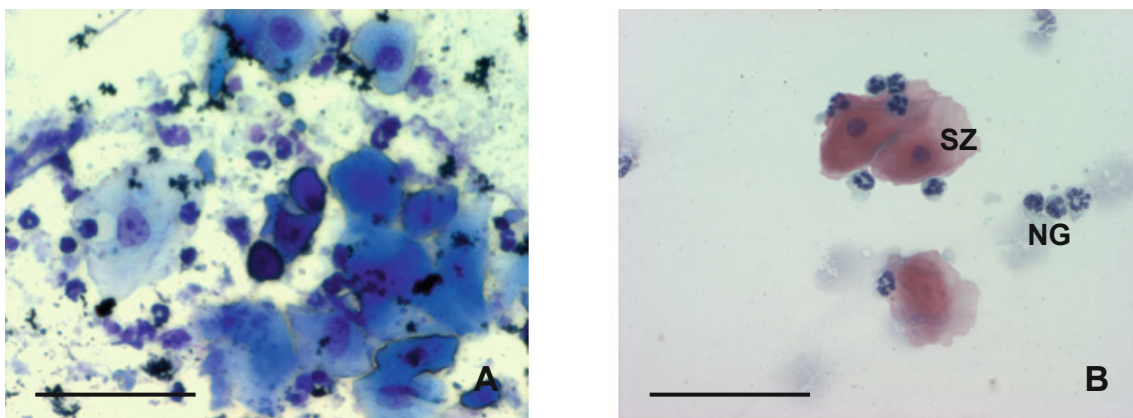


Abb. 4.1.: Färbungen nach Giemsa und nach Papanicolau

Figurenlegende Seite 63

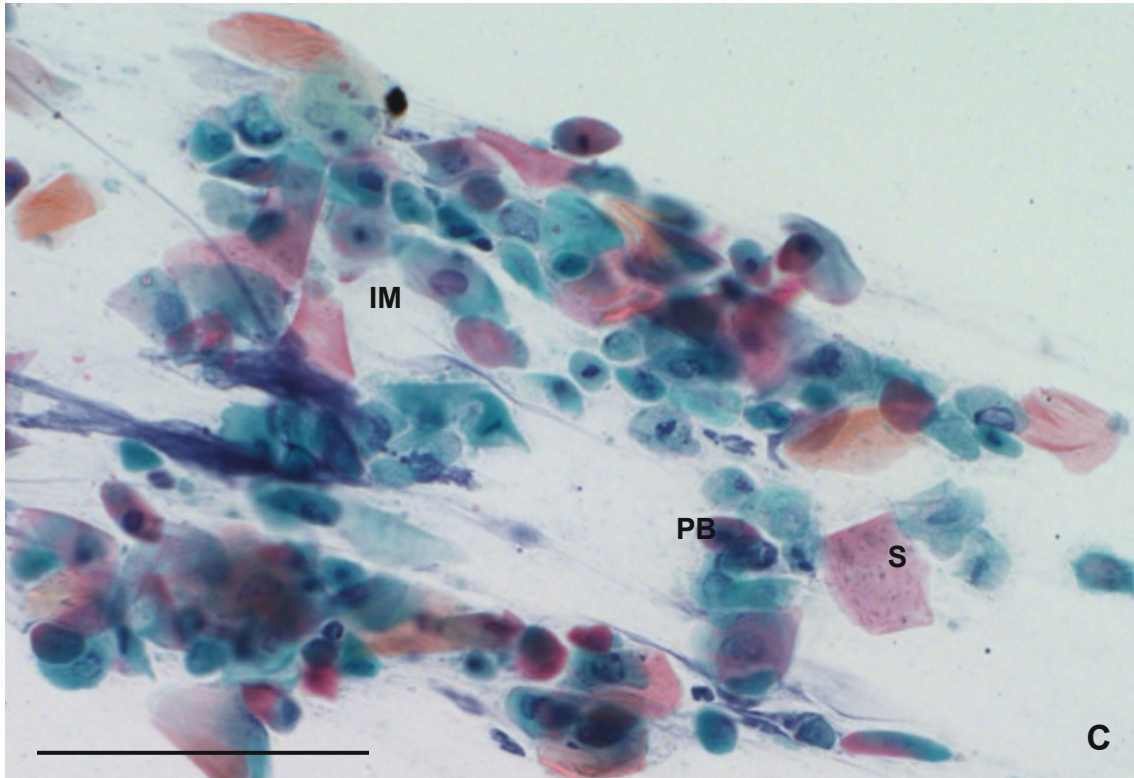


Abb. 4.1: Färbungen nach Giemsa und nach Papanicolaou (Dioestrus)

Die Abbildung (A) zeigt die Färbung nach Giemsa. Hier beträgt die Länge des Maßstabes 20 μm . Im Vergleich zeigen die Abbildungen (B) und (C) die Färbung nach Papanicolaou. In Abbildung (B) sind die Superfizialzellen (SF) und neutrophilen Granulozyten (NG) gekennzeichnet. In Abbildung (C) sind die Parabasalzellen mit PB, die Intermediärzellen mit IM und die Schollen mit S gekennzeichnet. Die Länge des Maßstabes in Abbildung (B) beträgt 20 μm und in Abbildung (C) 100 μm .

Mit Hilfe der Abbildung 4.1 ist zu erkennen, dass die Färbung nach Papanicolaou zwar zeitintensiver war, jedoch eine elegante und optimale Zuordnung der Zellen zulies. Parabasalzellen besitzen eine große Kern-Plasma-Relation und zyanophiles Zytoplasma. Die Kerne verkleinern sich in den Intermediärzellen und die Kern-Plasma-Relation nimmt ab. In den Superfizialzellen sind kleine, dunkle Zellkerne vorhanden. Das Zytoplasma ist transparent-eosinophil. Die Schollen sind eosinophil orange-rosa angefärbt und besitzen keine Zellkerne mehr.

Bei den abgenommenen Abstrichen war die unterschiedliche Dauer der verschiedenen Zyklusphasen auffällig.



Aufgrund der Zytologie ergaben sich charakteristische Bilder:

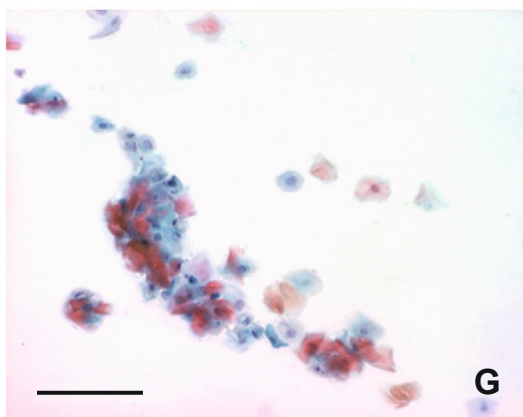
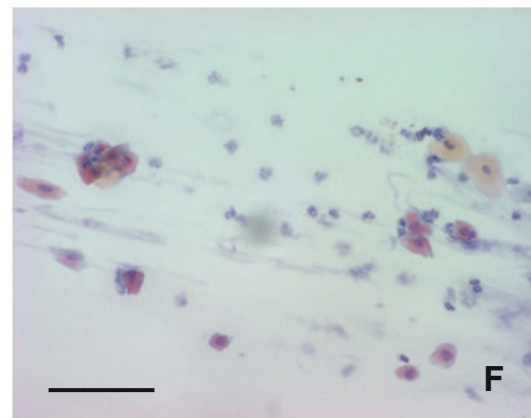
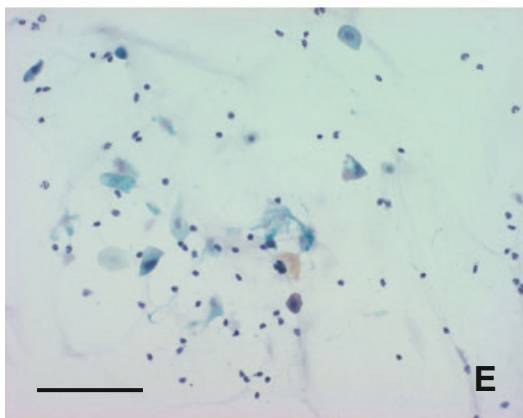
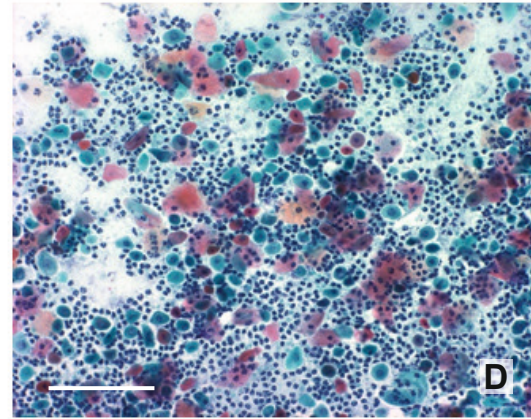
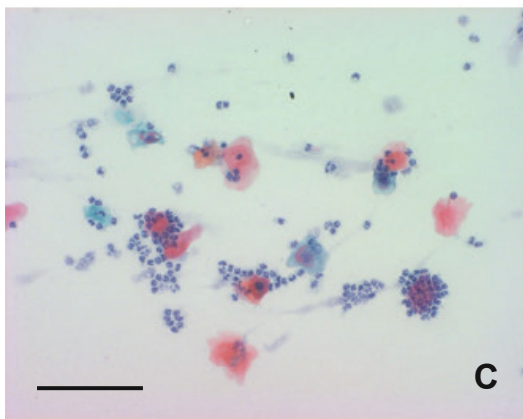
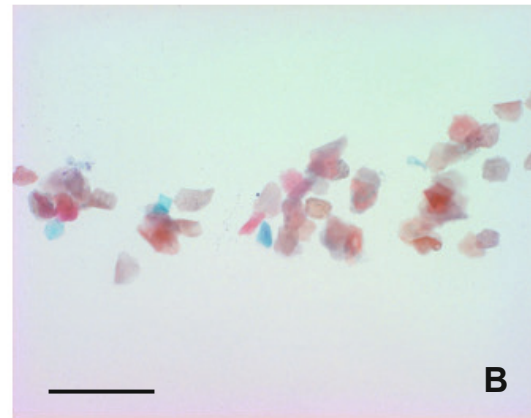
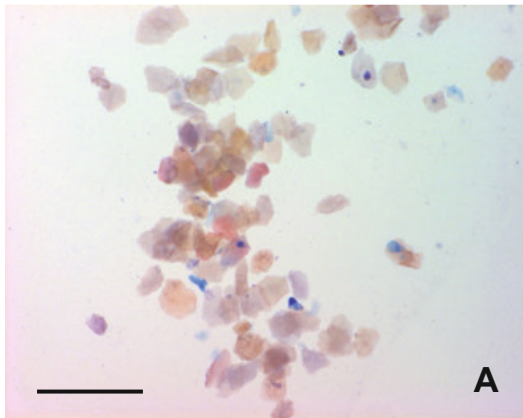


Abb. 4.2: Vaginalabstriche
Figurenlegende Seite 65

Abb. 5.2: Vaginalabstriche

Oestrus: Abbildung (A) zeigt die vaginale Zytologie von EMH 05/09, während der Abstrich von EMH 06/09 in Abbildung (B) zu sehen ist. Beide Abstriche zeigen Schollen.

Metoestrus: Die vaginale Zytologie von EMH 09/09 ist in Abbildung (C) gezeigt. Neben Superficialzellen und Schollen sind Leukozyten zu sehen. Massenhaft Leukozyten sind im Vaginalabstrich von EMH 04/10 in Abbildung (D) vorhanden.

Dioestrus: Neben Intermediär- und Parabasalzellen fallen in Abbildung (E) von EMH 03/10 vereinzelt Leukozyten und Schleim auf. Die ist ebenso in Abbildung (F) von EMH 09/10 zu sehen.

Prooestrus: Die Abbildung (G) zeigt neben Parabasalzellen auch Intermediär- und Superficialzellen. Die Länge der Maßstäbe entspricht 120µm.

Die Färbungen wurden so optimiert, dass alle Stadien eindeutig nachzuweisen waren. Die oestrische Phase war durch verhornte Zellen (Schollen) im Vaginalabstrich gekennzeichnet. Ähnlich wie bei der Arbeit von Zondek und Aschheim 1926 waren die Schollen kernlos und färben sich aufgrund ihres Keratingehaltes orange-rosa (eosinophil). Das mikroskopische Bild des Metoestrus war von Leukozyten bestimmt. Daneben waren auch vereinzelt Epithelzellen und Schollen zu finden. Ebenso war im dioestrischen Bild der Schleim im vaginalen Abstrich vorhanden und es waren Parabasal- und Intermediärzellen zu erkennen. Das Bild des Prooestrus zeigte nur Epithelzellen. Mikroskopisch konnten Parabasal-, Intermediär- und Superficialzellen nachgewiesen werden.

4.1.1.2 Vaginale Histologie

Die Vaginae wurden nach Entnahme, Fixierung, Paraffineinbettung und Gewebeschnitt (siehe 3.5) nach *Papanicolaou* gefärbt, so dass eine Vergleichbarkeit mit der Vaginalzytologie gewährleistet wurde. Mit Hilfe der Färbung konnten Schleim-sezernierende Zellen im Vaginalepithel gezeigt werden, die im Stadium des Dioestrus für den Schleim im vaginalen Abstrich verantwortlich sind. In der PAS-Färbung konnten die Schleim-tragenden Zellen mit einer dunkelvioletten Färbung erkannt werden.



Vaginale Histologie

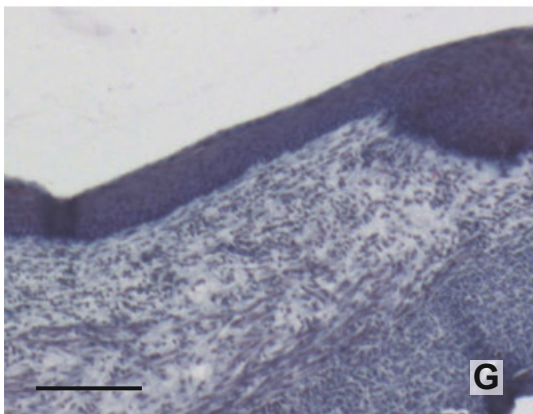
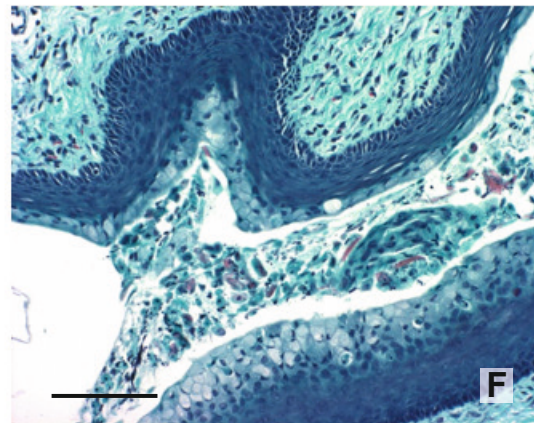
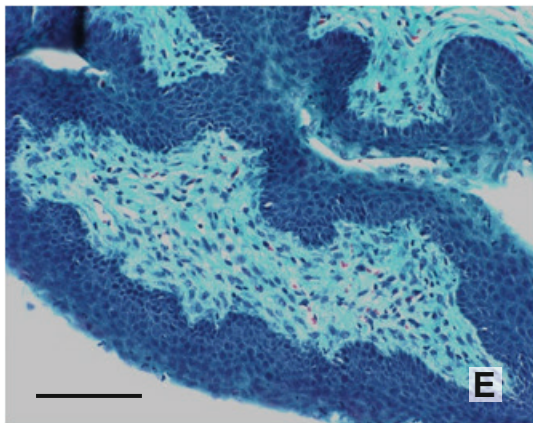
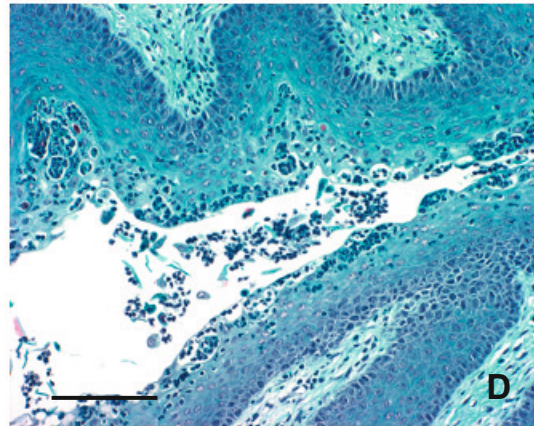
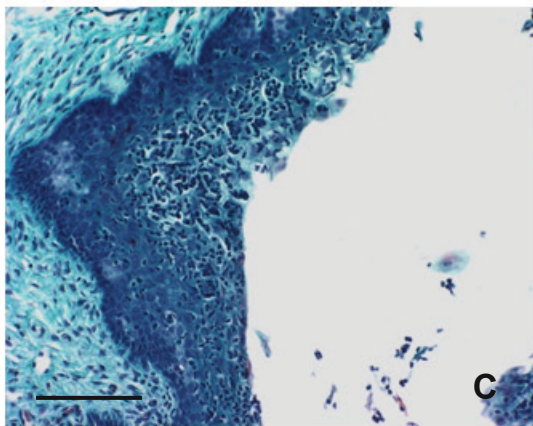
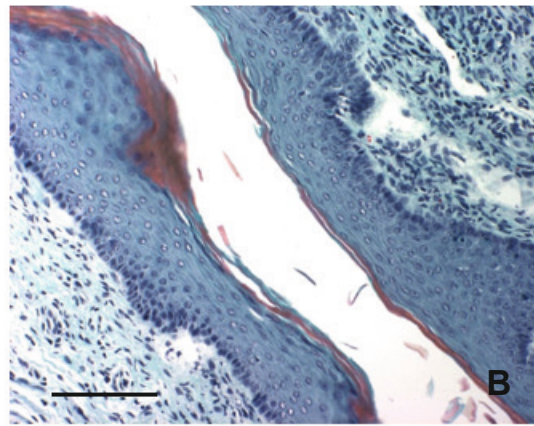
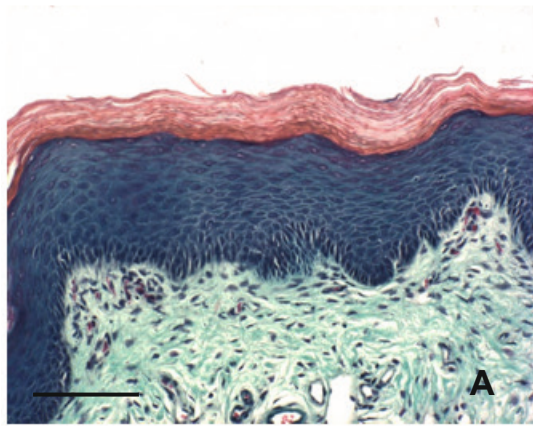


Abb. 4.3: Vaginalhistologie
Figurenlegende Seite 67

Abb. 4.3: Vaginalhistologie

Oestrus: In Abbildung (A) ist das hoch aufgebaute Vaginalepithel von EMH 05/09 zu sehen. Die obersten Zellschichten verhornten und wurden luminal abgestoßen. Diese Verhornung ist ebenso in Abbildung (B) von EMH 06/09 dargestellt.

Metoestrus: Auffällig ist in der Abbildung (C) von EMH 09/09 und der Abbildung (D) von EMH 04/10 die Leukozyten-Durchwanderung des Vaginalepithels nachzuweisen.

Dioestrus: Die Abbildung (E) zeigt das Vaginalepithel von EMH 03/10, während in (F) das Epithel von EMH 09/10 zu sehen ist. Prominent in beiden Abbildungen sind die luminal gelegenen Schleim-sezernierende Zellen.

Prooestrus: In Abbildung (G) ist das flache Vaginalepithel von EMH 06/10 zu sehen.

Die Länge der Maßstäbe entspricht 120µm.

Wie von Zondek und Aschheim 1926 beschrieben, konnten alle Stadien der Vaginalveränderungen nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich im Oestrus eine Verhornung der luminalen Zellschichten des Plattenepithels. Diese verhornten Zellen waren als Schollen im vaginalen Abstrich zu erkennen. Eine Durchwanderung von Leukozyten des Vaginalepithels erbrachte die Färbung des Metroestrus im mikroskopischen Bild, die korrespondierend auch das Bild des Vaginalabstrichs dominierten.

Im Dioestrus nahm die Anzahl der Leukozyten im Vaginalepithel ab. Es bildeten sich Zylinderzellen aus, die Schleim sezernierten. Dieser war prominent im Vaginalabstrich zu sehen und an der Konsistenz beim Abstreichen zu merken.

Im Prooestrus war die Sekretion des Schleimes eingestellt. Die Zylinderepithelzellen waren nicht mehr zu erkennen. Es fand sich ein flaches Epithel, das im Verlauf des Prooestrus proliferierte.

Um die schleim-sezernierenden Zellen im Dioestrus besser darstellen zu können, wurde eine PAS-Färbung durchgeführt. Die Zellen mit Schleim zeigten eine dunkelviolette Färbung. In der Phase des Prooestrus, die dem Dioestrus folgt, war keine dunkelviolette Färbung in Zellen des Vaginalepithels im histologischen Bild mehr zu sehen.

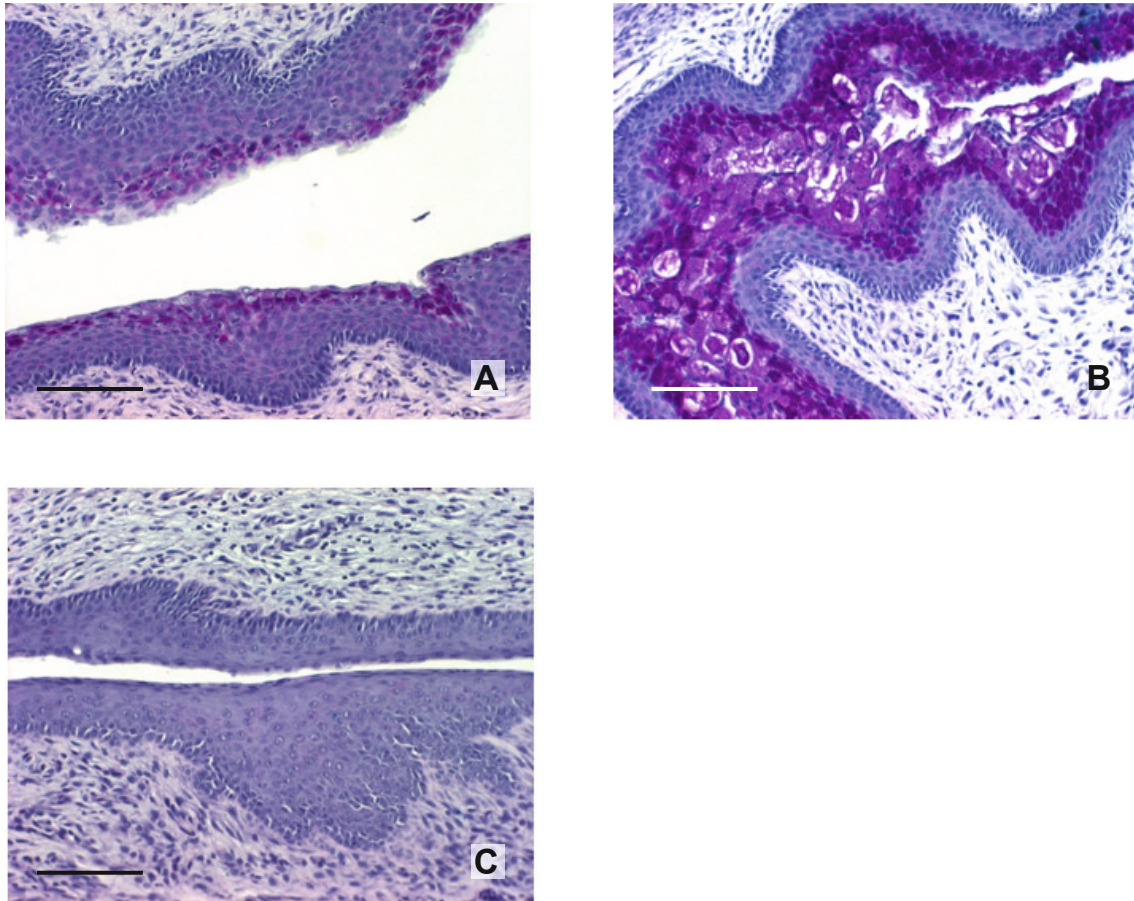


Abb. 4.4: PAS-Färbung nach McManus der Vaginae

Die Abbildungen (A) und (B) zeigen die vaginale Histologie des Dioestrus (EMH 03/10 und EMH 09/10). In der dargestellten PAS-Färbung zeigen sich prominent die luminal gelegenen Zylinderzellen, die sich dunkelviolettfärbend anfarben.

Die Negativ-Kontrolle ist in Abbildung (C) zu sehen. Hier zeigt sich ein flaches Epithel des Prooestrus, das keine Schleim-sezernierenden Zellen trägt. Dementsprechend ist keine dunkelviolettfärbende Färbung zu sehen. Die Länge der Maßstäbe entspricht 120µm.

4.1.2 Histologie der Ovarien

Neben der Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin wurde auch die Azan-Färbung nach Heidenhain verwendet, deren Name sich aus den Farbkomponenten Azokarmin und Anilinblau zusammensetzt, wobei neben den kollagenen und retikulären Fasern auch die Zona pellucida blau eingefärbt wird (Mulisch und Welsch, 2012).

a) Oestrus

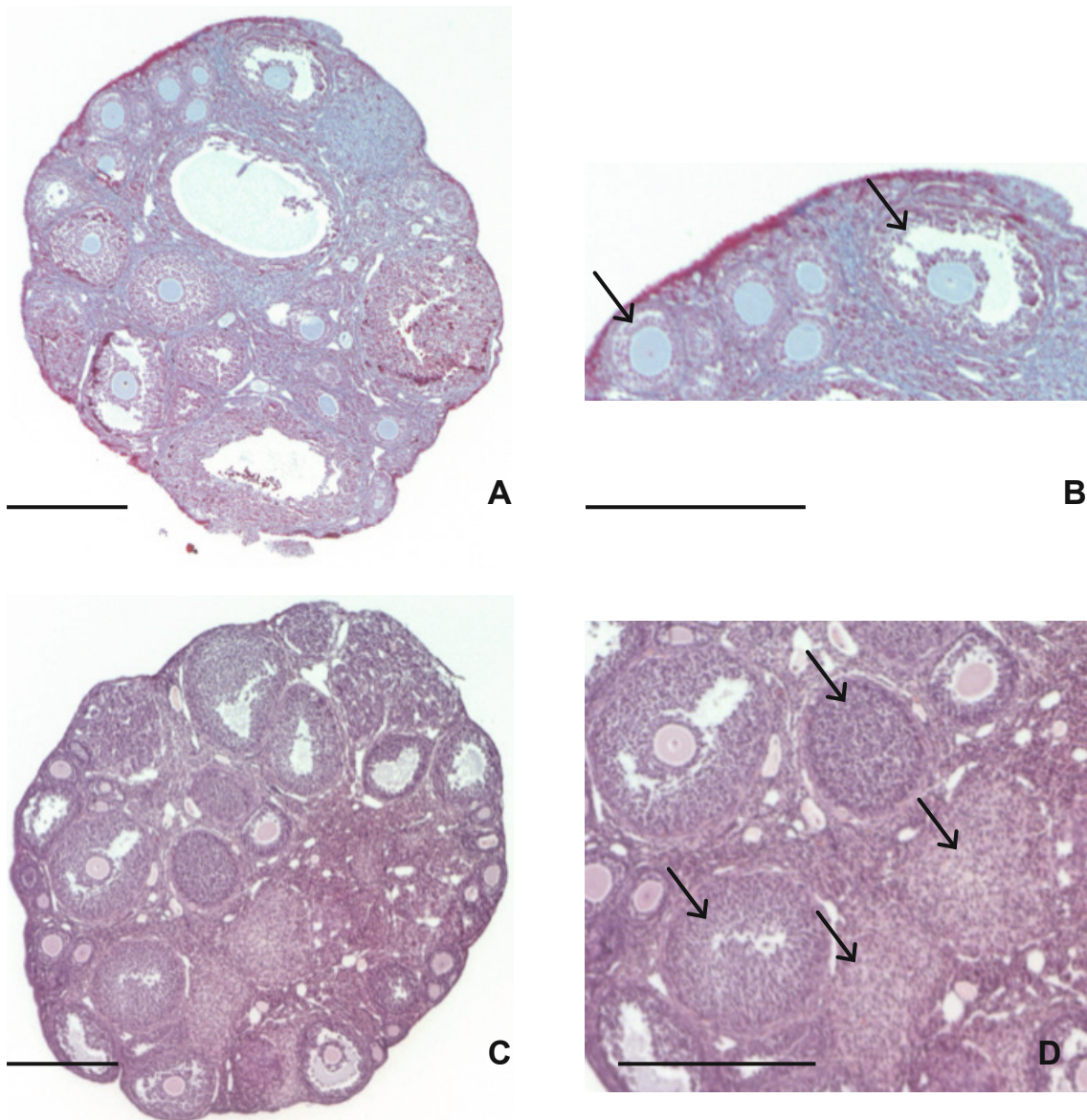


Abb. 4.5: Histologie der Ovarien im Oestrus

Abbildung (A) zeigt das Ovar von EMH 05/09 in der Azan-Färbung. Auffällig waren neben den verschiedenen Follikelstadien die frühen Tertiärfollikel, die nahe der Oberfläche zu finden waren. Diese Follikel sind in Abbildung (B) mit einem Pfeil gekennzeichnet. Abbildung (C) zeigt das Ovar von EMH 06/09 in der HE-Färbung. Prominent mehrere Corpora lutea, die in Abbildung (D) mit einem Pfeil gekennzeichnet sind. Die Länge der Maßstäbe entspricht 400µm.

In den Ovarien waren verschiedene Follikelstadien zu erkennen. Auffällig waren unterschiedliche Corpora lutea und frühen Tertiärfollikel, die unterhalb der Ovarienoberfläche zu sehen waren.



b) *Metoestrus*

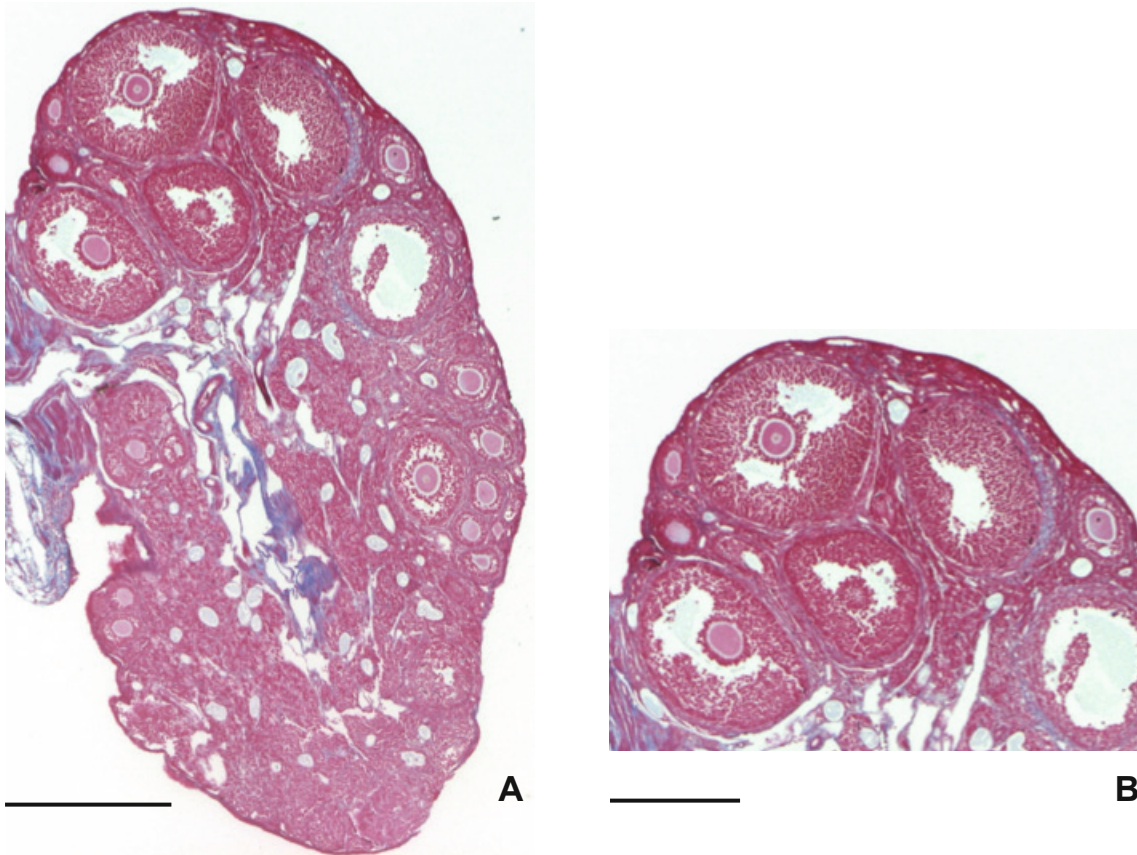


Abb. 4.6: Histologie der Ovarien im Metoestrus

Abbildung (A) zeigt neben verschiedenen Follikelstadien besonders Tertiärfollikel von Typ 7 und Typ 8, die in Abbildung (B) mit einem Pfeil markiert sind. Die Abbildungen zeigen das Ovar von EMH 09/09 und sind nach Azan gefärbt. Die Länge der Maßstäbe entspricht 400µm.

In den Ovarien waren neben den verschiedenen Follikelstadien Tertiärfollikel vom Typ 7 und Typ 8, ebenso mehrere Corpora lutea zu erkennen.



c) *Dioestrus*

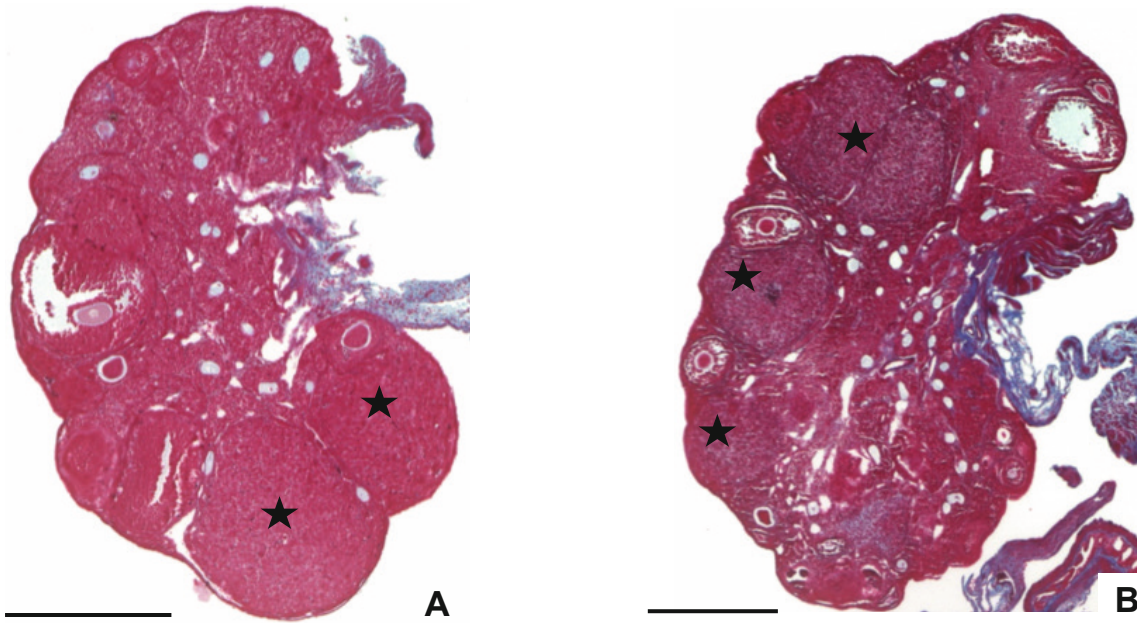


Abb. 4.7: Histologie der Ovarien im Dioestrus

Die Abbildung (A) zeigt das Ovar von EMH 03/10 in Azan-Färbung. Neben dem Follikel Typ 8 waren besonders die großen Corpora lutea (★) auffällig. Diese waren ebenso prominent in EMH 09/10 vorhanden, wie in Abbildung (B) dargestellt. Die Länge der Maßstäbe entspricht 400µm.

Prominent in den Ovarien des Dioestrus waren die großen Corpora lutea zu sehen. Ebenso waren große Follikel (Typ 7 und Typ 8) zu sehen.

d) *Prooestrus*

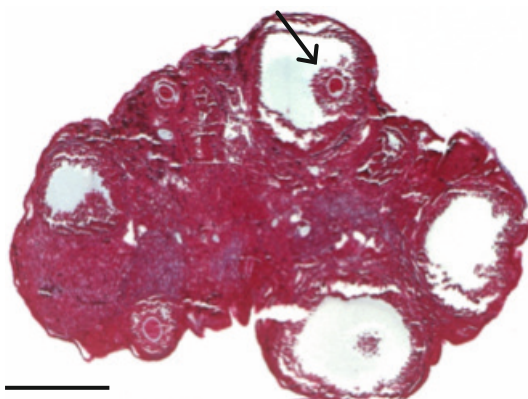


Abb. 4.8: Histologie der Ovarien im Prooestrus

Das Ovar von EMH 06/10 ist in Azan gefärbt. Auffällig waren große, sprungreife Follikel vom Typ 8 (siehe Pfeil). Die Länge des Maßstabes beträgt 400µm.

Im Prooestrusstadium zeigten sich hauptsächlich im Bereich der Oberfläche präovulatorische Follikel gesehen. Die Größe der Corpora lutea nahm ab.



4.2 ELISA

Der ELISA diente als Nachweisverfahren zur Konzentrationsbestimmung des Follikel-stimulierenden Hormones (FSH). Das Ziel der Konzentrationsbestimmung war die Darstellung der unterschiedlichen FSH-Konzentrationen im Verlauf des murinen Zyklus der. Diese Unterschiede sollten der eindeutigen Zuordnung der Mäuse zum entsprechenden Zyklusstadium dienen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, war das exakte Arbeiten bei der Blutaspiration aus dem Ventrikel vor der Perfusion, der Zentrifugierung der Proben und der Plasmagewinnung notwendig. Das Plasma wurde bis zur Durchführung des ELISAs bei -80°C tief gefroren.

4.2.1 Ermittlung Standardkurve

Um die Konzentration an FSH im Blut der Mäuse bestimmen zu können, wurden die photometrisch gemessenen Werte mit einer Standardkurve verglichen. Es wurden die Extinktionswerte der definierten Standardkonzentrationen und der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm und 570 nm gemessen, wobei die Ergebnisse zur Errechnung einer Standardkurve dienten. Man konnte sehen, dass die Werte der unterschiedlichen Standardkonzentrationen fast exakt auf der errechneten Standardkurve lagen. Mit diesem Ergebnis konnte das exakte Arbeiten nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte der verschiedenen Standardkonzentrationen sind der Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Standardkonzentration	Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)
20 mIU/ml	1,139	0,082
10 mIU/ml	0,663	0,064
5 mIU/ml	0,363	0,096
2,5 mIU/ml	0,239	0,085
1,25 mIU/ml	0,157	0,079
0,625 mIU/ml	0,127	0,077
0,312 mIU/ml	0,109	0,093
0 mIU/ml (Leerwert)	0,099	0,082

Tabelle 4.2: Messung der Standardkonzentration

Die Extinktionswerte wurden voneinander subtrahiert (450nm-570nm). Um mögliche Störfaktoren (z.B. Verschmutzung der Wells) zu minimieren, wurde anschließend der Leerwert von den Extinktionswerten subtrahiert (vgl. Tabelle 10.1 und 10.2).



Mit Hilfe von Microsoft Excel ergab sich aus den gemessenen Standardwerten folgende Standardkurve:

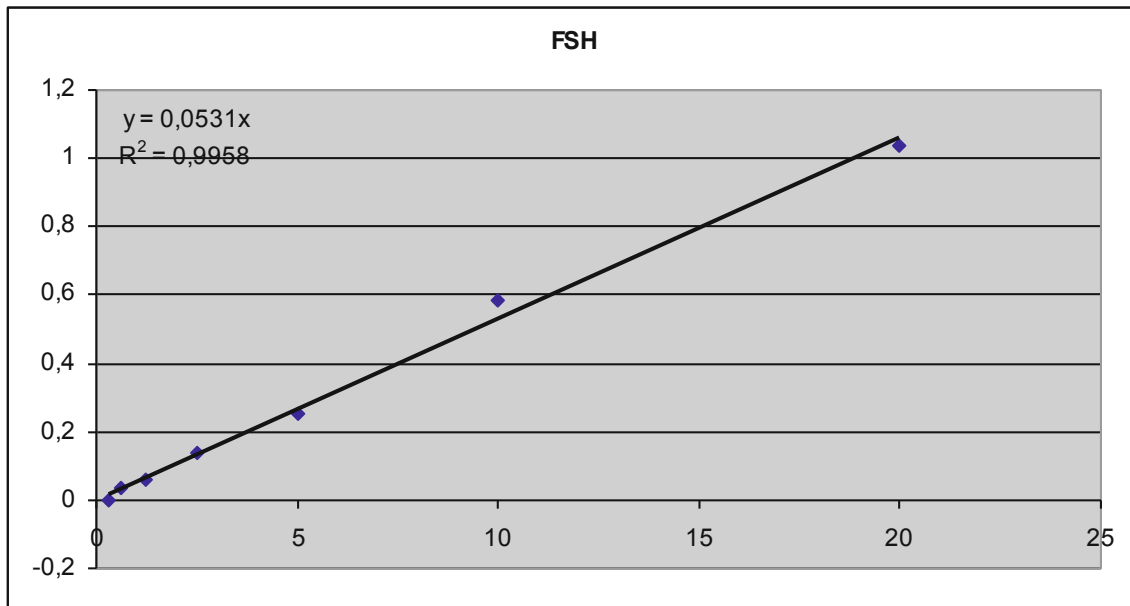


Abb. 4.9: Standardkurve (FSH)

Auf der Abszisse wurden die Standardkonzentrationen aufgetragen, während die Extinktionswerte orthogonal dargestellt wurden.

4.2.2 Volumenreihe

Vor der Perfusion über den linken Ventrikel der Mäuse ist es leider aus diesem nicht immer gelungen ausreichend Blut zu aspirieren, um nach der Zentrifugation mit 100 μ l Plasma den ELISA durchzuführen (vgl. Tabelle 3.8).

Um einen Einfluss des Volumens auf die ELISA-Testergebnisse zu überprüfen, wurde ein ELISA mit unterschiedlichen Volumina von Standardlösungen mit gleicher FSH-Konzentration durchgeführt (Tabelle 3.10). Die photometrische Messung ergab folgende Werte:

Standardkonzentration	Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)
20 mlU/ml	3,041	0,134
10 mlU/ml	2	0,079
5 mlU/ml	0,896	0,082
2,5 mlU/ml	0,465	0,144
1,25 mlU/ml	0,198	0,074
0,625 mlU/ml	0,139	0,067
0,312 mlU/ml	0,127	0,07
0 mlU/ml (Leerwert)	0,146	0,111

Tabelle 4.3: Extinktionswerte der FSH-Volumenreihe



Nach Subtraktion der Extinktionswerte (450nm-570nm) und des Leerwertes (siehe Tabelle 10.3 und 10.4) ergab sich folgende Standardkurve:

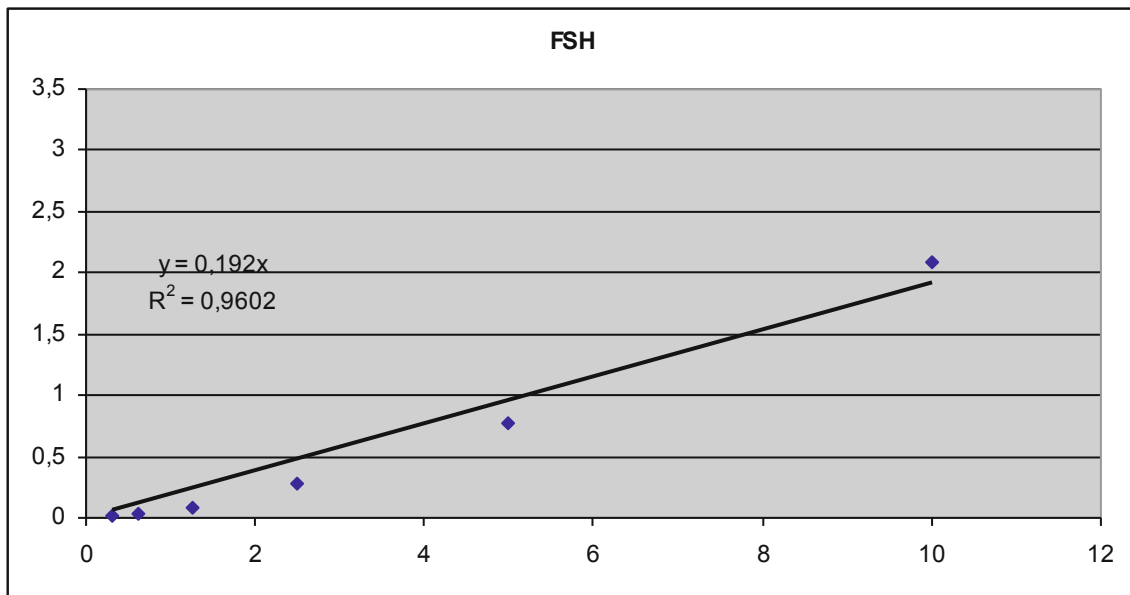


Abb. 4.10: Standardkurve (FSH) der Volumenreihe.

Auf der Abszisse wurden die Standardkonzentrationen aufgetragen, während die Extinktionswerte orthogonal zu finden sind.

Die gemessenen Extinktionswerte der unterschiedlichen Volumina wurden im Anhang gelistet (Tabellen 10.5 bis 10.8). Für jedes Standardvolumen wurde jeweils der Mittelwert der Extinktionswerte ermittelt.

Hieraus ergaben sich im Vergleich der Mittelwerte mit der Standardkurve folgende Werte:

Volumen	Extinktionswert	Konzentration [μ l U/ml]
100 μ l	1,966	18,512
80 μ l	1,442	13,578
60 μ l	0,952	8,964
40 μ l	0,367	3,456

Tabelle 4.4: Konzentrationen der FSH-Volumenreihe

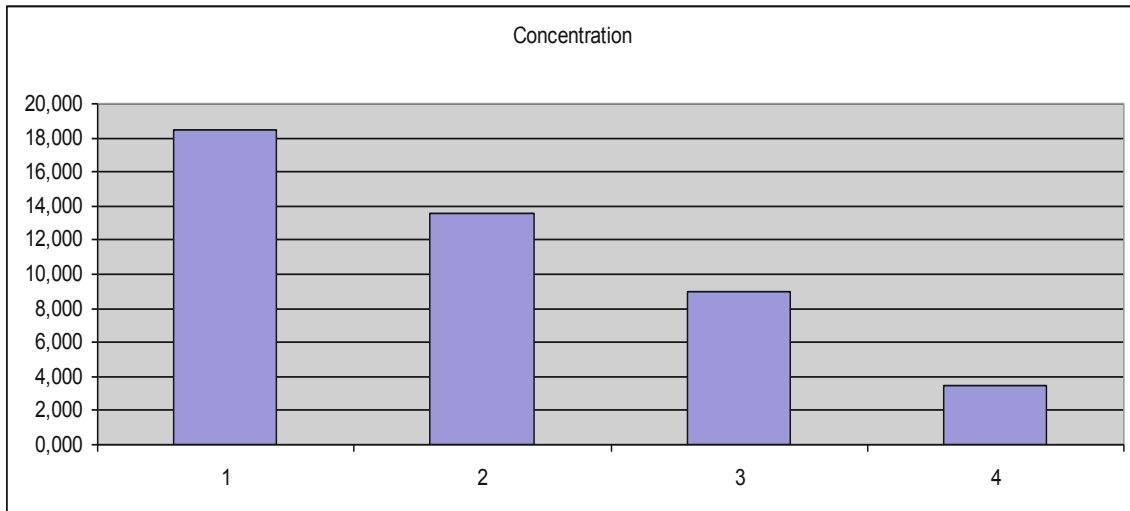


Abbildung 4.11: ermittelte Unterschiede der Konzentrationen aus der Volumenreihe

Die Ergebnisse zeigten, dass das Volumen einen großen Einfluss auf die FSH-Konzentration hatte. Um eine exakte FSH-Konzentration der Proben zu ermitteln, wurden Faktoren berechnet, um die Volumenunterschiede zu korrigieren (Tabelle 4.5).

Volumen	Extinktion	Faktor
100 μ	1,966	
80 μ l	1,442*f = 1,966	f (80 μ l) = 1,363
60 μ l	0,952*f = 1,966	f (60 μ l) = 2,065
40 μ l	0,367*f = 1,966	f (40 μ l) = 5,357

Tabelle 4.5: Faktorenberechnung



4.2.3 Probenauswertung

Die Resultate der bei 450 nm und 570 nm gemessenen Proben wurden in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Proben	Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)
EMH 05/09	0,128	0,104
EMH 06/09	0,07	0,06
EMH 19/09	0,098	0,083
EMH 20/09	0,229	0,078
EMH 03/10	0,081	0,061
EMH 04/10	0,083	0,069
EMH 06/10	0,098	0,077
EMH 07/10	0,083	0,075
EMH 09/10	0,063	0,069
EMH 10/10	0,102	0,073
EMH 14/10	0,114	0,076

Tabelle 4.6: Extinktionswerte der Proben

Nach Subtraktion der Extinktionswerte und des Leerwertes (Tabelle 8.9 und 8.10) konnten die Konzentrationen der Proben durch den Vergleich der Extinktionswerte mit der Standardkurve ermittelt werden. Die Ergebnisse konnten erst verglichen werden, nachdem das Probenvolumen berücksichtigt wurde und die FSH-Konzentration der Probe mit dem entsprechenden Faktor (Tabelle 4.5) korrigiert wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Probe	Probenvolumen	Extinktion	Korrigierte Extinktion	Konzentration
EMH 05/09	100µl	0,007	0,007	0,066
EMH 06/09	40µl	-0,007	-0,037	-0,348
EMH 19/09	100µl	-0,002	-0,002	-0,019
EMH 20/09	100µl	0,134	0,134	1,262
EMH 03/10	60µl	0,003	0,006	0,056
EMH 04/10	80µl	-0,003	-0,004	-0,038
EMH 06/10	40µl	0,004	0,021	0,198
EMH 07/10	100µl	-0,009	-0,009	-0,085
EMH 09/10	100µl	-0,023	-0,023	-0,217
EMH 10/10	100µl	0,012	0,012	0,113
EMH 14/10	40µl	0,021	0,112	1,055

Tabelle 4.7: Extinktionen und Konzentrationen der Proben

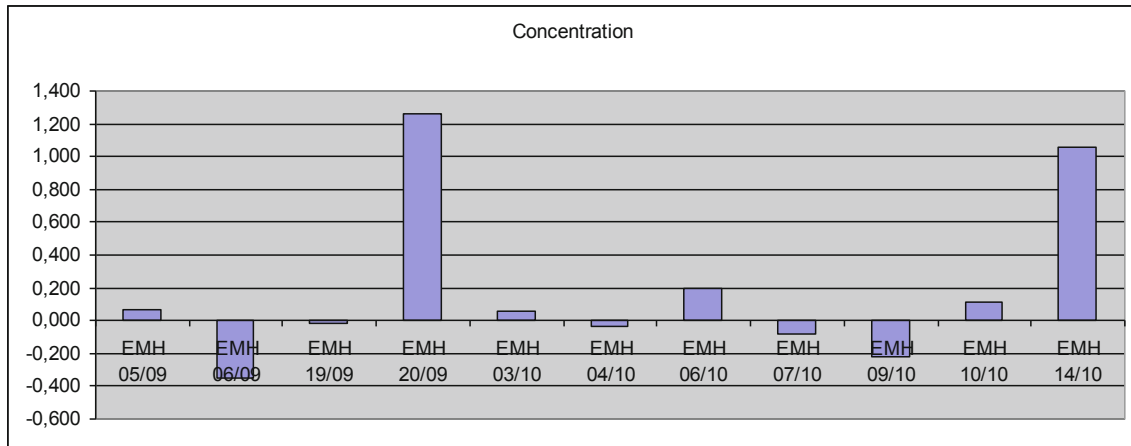


Abb.4.12: Konzentrationen der Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Tiere ausgesucht, die anhand des vaginalabstriches eindeutig einem definierten Zyklusstadium zugeordnet werden konnten.

Zur besseren Übersicht wird hier deren FSH-Konzentrationen nochmals aufgeführt:

Probe	Extinktion	Konzentration
EMH 05/09	0,007	0,066
EMH 06/09	-0,037	-0,348
EMH 03/10	0,006	0,056
EMH 04/10	-0,004	-0,038
EMH 06/10	0,021	0,198
EMH 09/10	-0,023	-0,217
EMH 14/10	0,112	1,055

Tabelle 4.8: FSH-Konzentrationen der ausgewählten Tiere

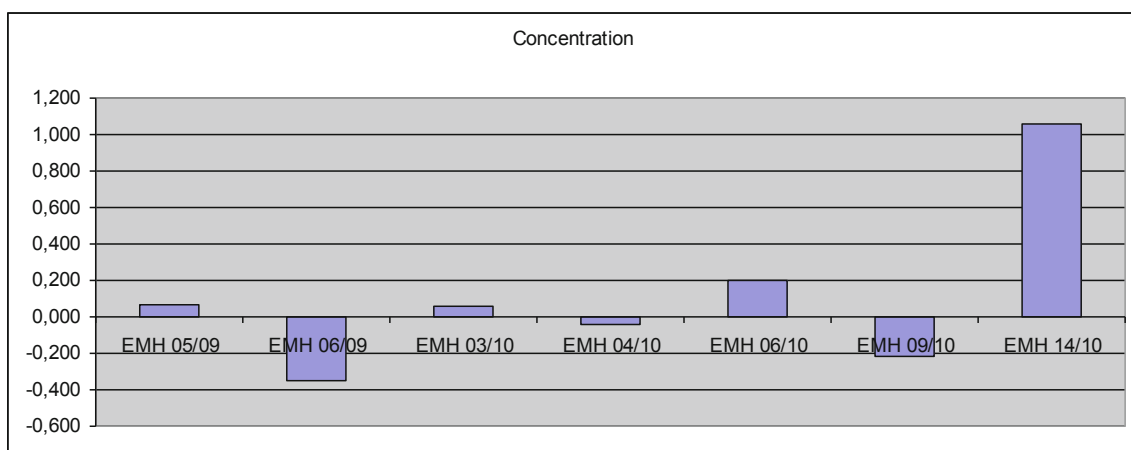


Abb. 4.13: FSH-Konzentrationen der ausgewählten Tiere



Zusammenfassend konnte man feststellen, dass die gemessenen FSH-Konzentrationen keine eindeutige Zuordnung der Tiere zu einem Zyklusstadium zuließen. Betrachtet man die Konzentrationen der Proben in der Abbildung 4.13 kann man erkennen, dass es große Unterschiede zwischen zwei Tieren gab, die mit Hilfe der vaginalen Zytologie und Histologie eindeutig einem Zyklusstadium zugeordnet werden konnten (z.B. EMH 05/09 und EMH 06/09 für den Oestrus).

Jeweils zwei Tiere (mit Ausnahme des Prooestrus) wurden mit Hilfe der vaginalen Zytologie und Histologie einem Zyklusstadium zugeordnet. Sogar bei diesen Tierpaaren eines Zyklusstadiums unterschieden sich die FSH-Konzentrationen, so dass wir auf die Einordnung der Tiere in ein bestimmtes Zyklusstadium mit Hilfe der FSH-Konzentration verzichtet haben.

4.3 Immunfluoreszenzfärbung

4.3.1 Etablierung der Methode zur optimalen Darstellung der peroxisomalen Proteine in den Ovarien der Maus

Ein etabliertes Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung, das in unserem Labor verwendet wird, wurde für den Nachweis der peroxisomalen Proteine in Ovarien angepasst.

Ein etabliertes Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung, das in unserem Labor verwendet wurde, konnte für den Nachweis der peroxisomalen Proteine in Ovarien angepasst werden.

4.3.1.1 Vorbehandlung und Antigenwiederherstellung an Paraffinschnitten

Bei Antigenwiederherstellung wurden Proteinquervernetzungen gespalten und blockierende Verbindungen der Antigene entfernt, womit die Antigene demaskiert wurden und einer Antikörperbindung zugänglicher waren. Die Protease- und Hitzebehandlung war notwendig für den Nachweis der peroxisomalen Proteine. Ohne die enzymatische Vorbehandlung wären diese nicht darstellbar gewesen. Die Fixierung und Einbettung war ein wichtiger Faktor für die Wahl der Behandlungsdauer der Protease. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fixierung der Ovarien mit 4% Paraformaldehyd und nachfolgender Paraffineinbettung wurden in eigenen Voruntersuchungen optimale Ergebnisse bei einer Verdauungslänge von 9 Minuten und anschließender Mikrowellenbehandlung erreicht. Bei längeren Proteasezeiten wurde das Gewebe und besonders die Zellkerne überverdaut. Hierbei kam es zum Herauslösen der DNA und zu einer verminderten Immunreaktion, weshalb die Proteasezeit immer genau eingehalten wurde.

4.3.1.2 Antikörperverdünnungen

Die optimale Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper wurde in verschiedenen Verdünnungsreihen (von 1:10 bis 1:5000) etabliert. Neben der Anwendung des Primärantikörpers gegen Pex14, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Antikörper gegen Katalase, SOD2, ACOX, Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase 4 und ABCD3 (PMP70) verwendet. Die bei den Vorversuchen ermittelten optimalen Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper sind der Tabelle 4.9 zu entnehmen.

Antikörper	Verwendete Verdünnung
Rabbit Anti-PEX14	1:2000
Rabbit Anti-Catalase	1:2000
Rabbit Anti-ABCD3-(PMP70)	1:500
Rabbit Anti-SOD2	1:2000
Rabbit Anti Hydroxysteroid-(17-beta)-dehydrogenase 4	1:500
Mouse Anti-OxPhos Complex III	1:2000
Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488	1:300
Anti-Mouse IgG Texas Red	1:300

Tabelle 4.9: Darstellung der optimalen Antikörperkonzentrationen

4.3.1.3 Auswertung mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie

Im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie ergaben die Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) eine verbesserte Auflösung und Darstellung der individuellen Organellen, weil unspezifische Fluoreszenz aus den anderen Ebenen über das Pinhole herausgefiltert wurde. Es wurden drei verschiedene Laserlinien verwendet.

Alexa Fluor 488 besitzt ein Exzitationsmaximum bei 493 nm und ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Das Exzitationsmaximum von Texas Red liegt bei 596 nm und das Emissionsmaximum bei 613 nm. Der Kernfarbstoff Toto-3-iodide besitzt ein Exzitationsmaximum bei 642 nm und ein Emissionsmaximum bei 660 nm.

Aufgrund der Exzitationsmaxima wurden die Laser mit 488 nm, 549 nm und 633 nm gewählt. Mit dieser Kombination konnten die Dreifachfluoreszenzen sowohl Peroxisomen, Mitochondrien und Zellkerne optimal als unterschiedliche subzelluläre Kompartimente darstellen.

4.3.1.4 Kontrollen der Immunfluoreszenzfärbung

Es wurden stets Negativkontrollen mitgeführt. Dabei wurde anstatt des Primärantikörpers ein entsprechendes Volumen an PBS verwendet und die Negativkontrollen getrennt von den markierten Gewebeschnitten gewaschen, um eine Bindung des Antikörpers während des Waschschrilles zu verhindern. Der Sekundärantikörper wurde analog zum Färbeprotokoll verwendet. Diese Methode ermöglichte den Ausschluss von unspezifischen Färbungen durch die Sekundärantikörper. Die Negativ- und Positivkontrolle ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

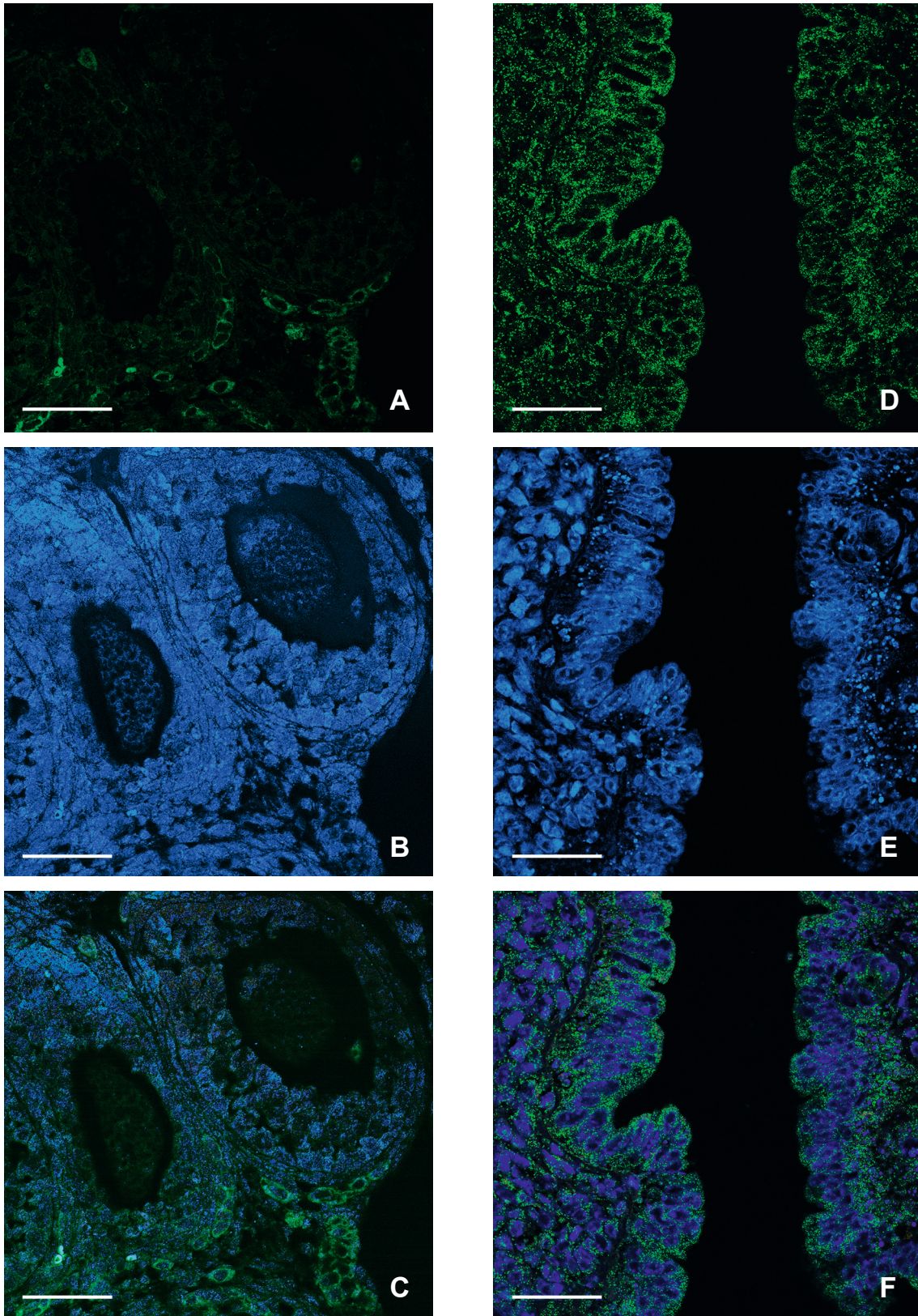


Abb. 4.14: Kontrollen der Immunfluoreszenz

Abgebildet ist die Negativkontrolle in (A)-(C). Es wurde anstatt des Primärantikörpers PBS aufgetragen und anschließend konnte nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz detektiert werden. In (B) imponiert die Kernfärbung nach Toto-3-iodide, während (C) eine Überlagerung der Bilder (A) und (B) ist. In (D)-(F) ist die Positivkontrolle abgebildet. Es wurde hierfür das Gewebe des Uterus gewählt. In (D) zeigt sich die Markierung von PEX14 und in (E) imponiert die Kernfärbung nach Toto-3-iodide. (F) zeigt eine Überlagerung der Bilder (D) und (E). Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.2 Darstellung der peroxisomalen Proteine

Für die Darstellung der Peroxisomen in den Ovarien wurden verschiedene Proteine gewählt, die mit Primärantikörper markiert werden konnten. Es wurde die Färbung der Oozyten, der Granuloazellen und der umliegenden Zellen qualitativ beurteilt.

4.3.2.1 PEX14-Färbung

Zielstruktur dieser Färbung war das peroxisomale Membranprotein PEX14. Das Protein ist integraler Bestandteil der Peroxisomenmembran und erkennt lösliche zytosolische Rezeptoren, die eine PTS1-Sequenz tragen.

Die Färbung erbrachte ein prominentes, feines und punktförmiges Muster der Peroxisomen. Besonders stark waren die Peroxisomen in den Zellen der Corpora lutea nachzuweisen. Die Verteilung der peroxisomalen Fluoreszenzen in den Oozyte, den umgebenden Granulosazellen und den Zellen der Theka interna und externa waren gleichartig.

Es wurde deutlich, dass PEX14 das beste Markerprotein zum peroxisomalen Nachweis im Rahmen dieser Arbeit war.

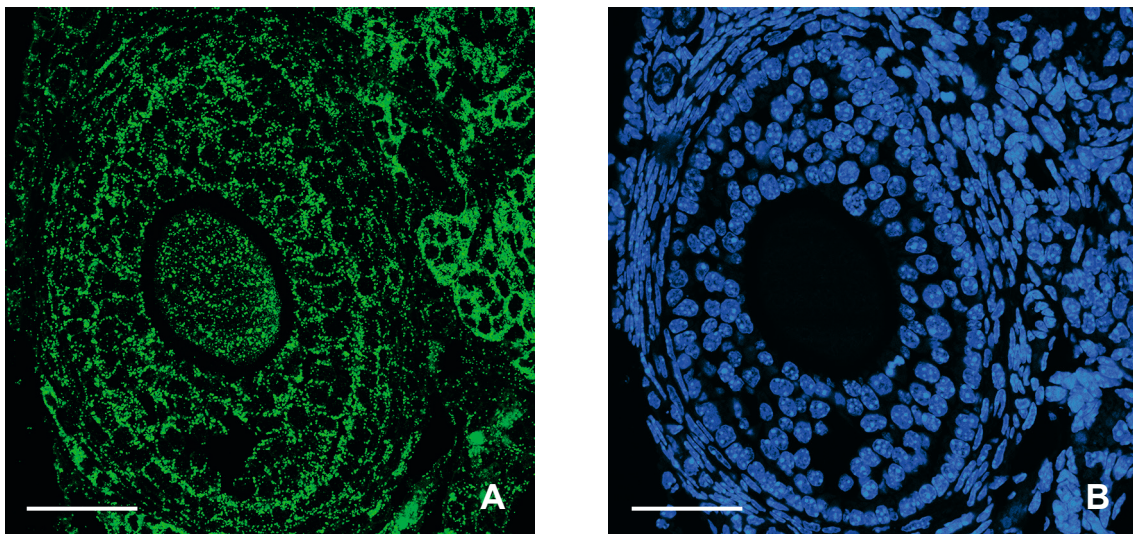


Abb. 4.15: Darstellung des peroxisomalen Biogenesproteins PEX14p

Figurenlegende Seite 83

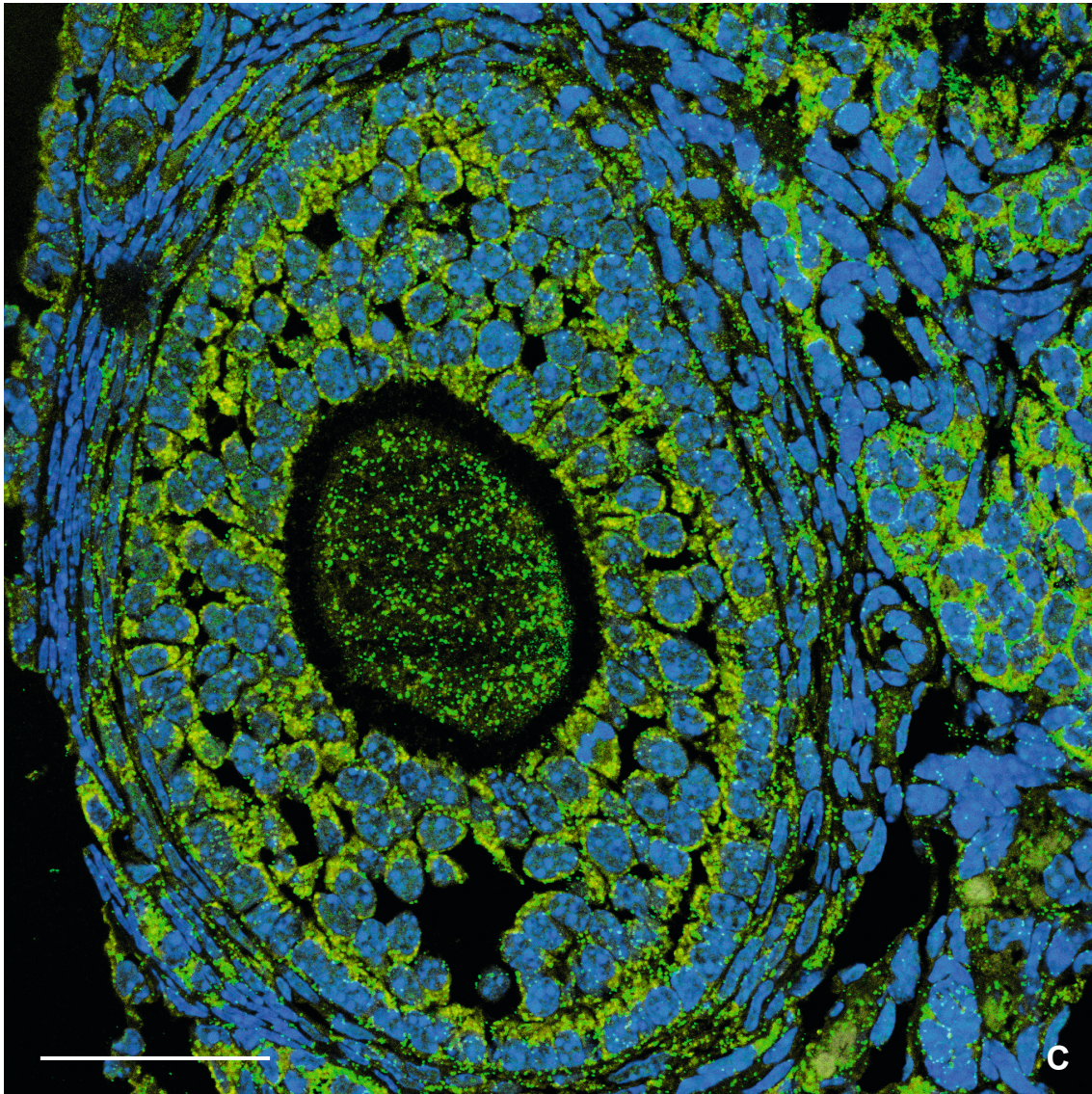


Abb. 4.15: Darstellung des peroxisomalen Biogenesproteins PEX14p

(A) zeigt die Markierung des PEX14-Proteins und in (B) ist die Kernfärbung zu sehen. (C) ist eine Überlagerung aus (A) und (B). Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.2.2 Katalase-Färbung

Katalase ist das prominenteste Enzym der Peroxisomen, das Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser reduziert. Die Fluoreszenzen imponieren als feine, runde Strukturen. Die Oozyten der unterschiedlichen Stadien waren kaum Katalase markiert. Die stärkste Fluoreszenz konnte in den Granulosazellen und den Zellen der Corpora lutea.

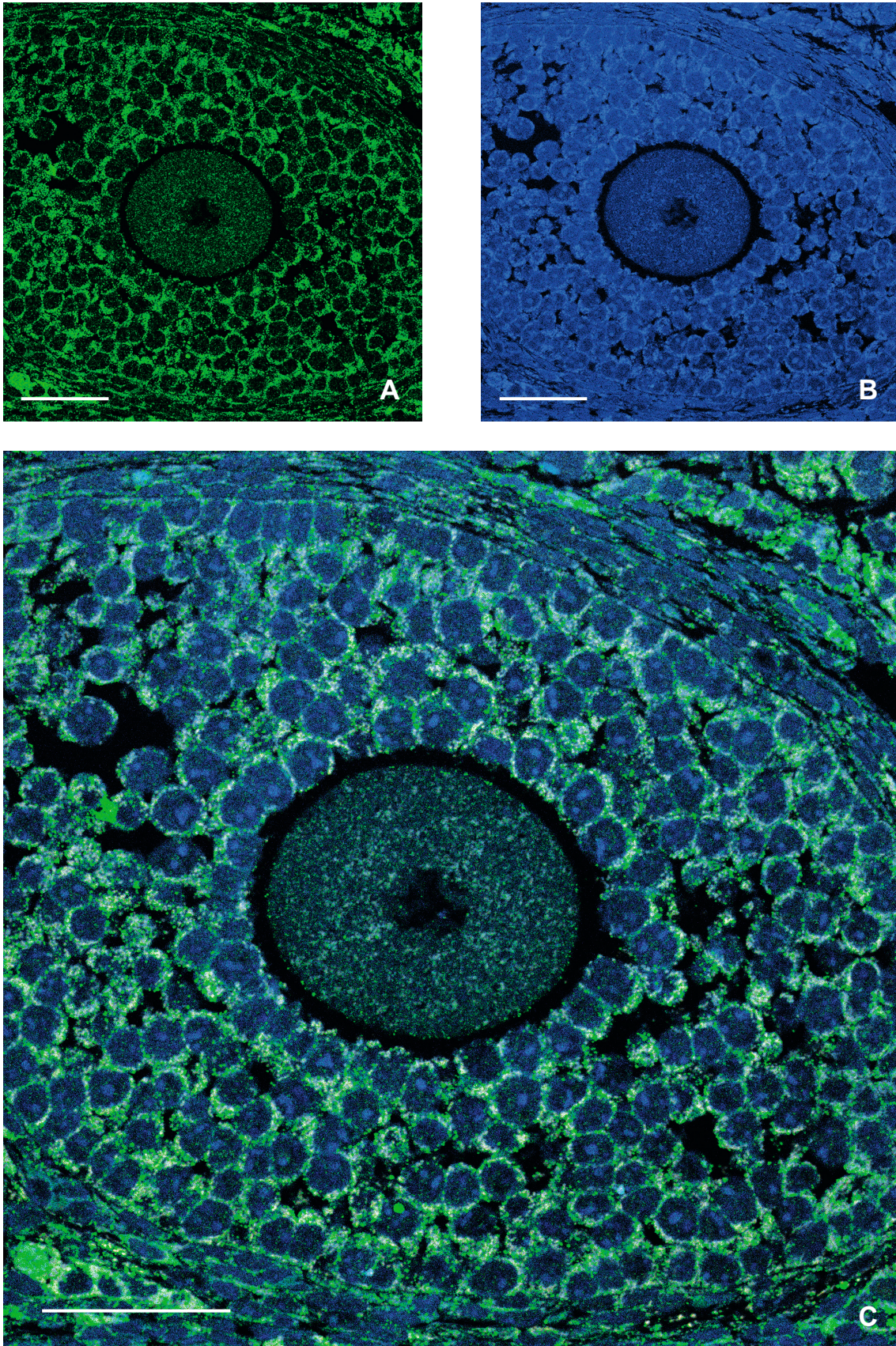


Abb. 4.16: Darstellung der peroxisomalen Katalase

In (A) ist die Markierung der Catalase zu sehen. Diese war in den Granulosazellen ausgeprägter zu sehen als in der Oozyte. (B) zeigt die Kernfärbung, während (C) eine Überlagerung der Bilder (A) und (B) ist.

4.3.2.3 Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase 4

Sechs verschiedene Formen der 17 β -Dehydrogenase katalysieren die Reaktionen des Östrogens und Androgens an der Position C17. Das Gen HSD17B4 transkribiert eine 3kb mRNA, die an den Ribosomen zur 737 AS-langen peroxisomalen Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase Typ 4 translatiert wird. Diese ist in der Lage, die Oxidation von Estradiol unter Reduktion von Estron zu katalysieren. Die größte Expression von Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase ist in der Leber, den Nieren, den Ovarien und den Hoden gefunden worden. Das Gen HSD17B4 kann durch Progesteron und Liganden des PPAR α stimuliert werden (de Launoit und Adamski, 1999).

Das Enzym Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase wurde in der Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper markiert. Die Fluoreszenz in der Oozyte imponierte fein granuliert. In den Granulosazellen und Zellen der Theka externa ist das Enzym stark exprimiert, während die Zellen der Theka interna kaum eine Färbung erbrachten.

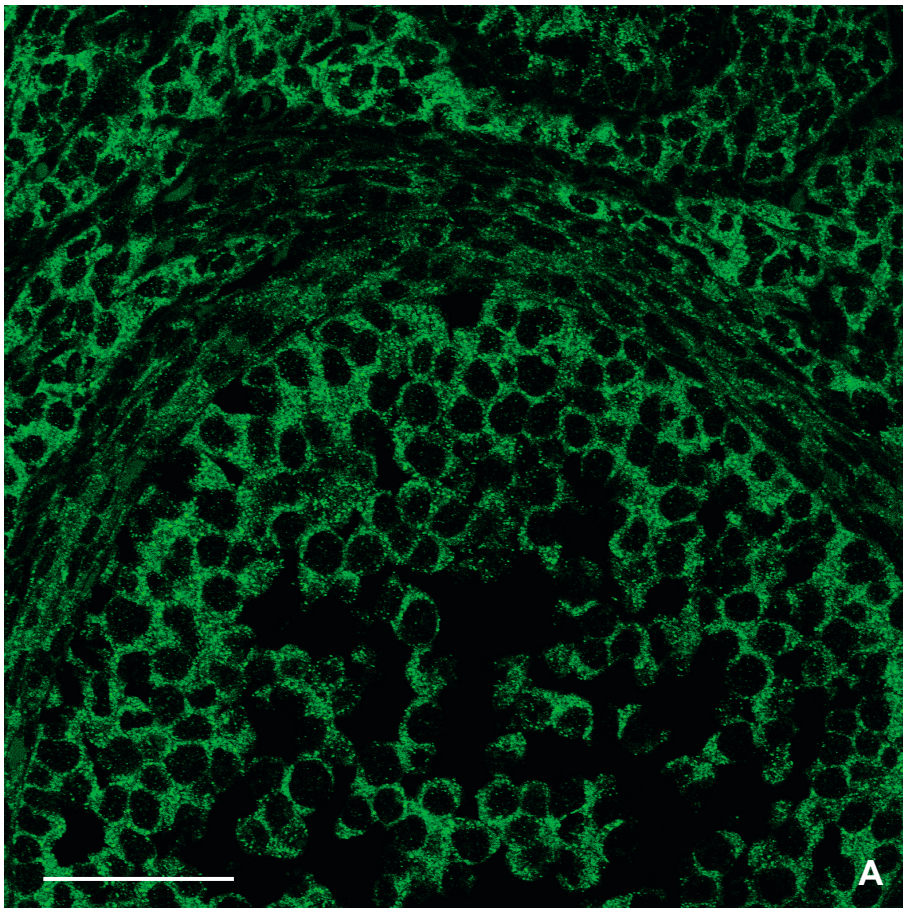


Abb. 4.17: Darstellung der Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase

Figurenlegende Seite 86

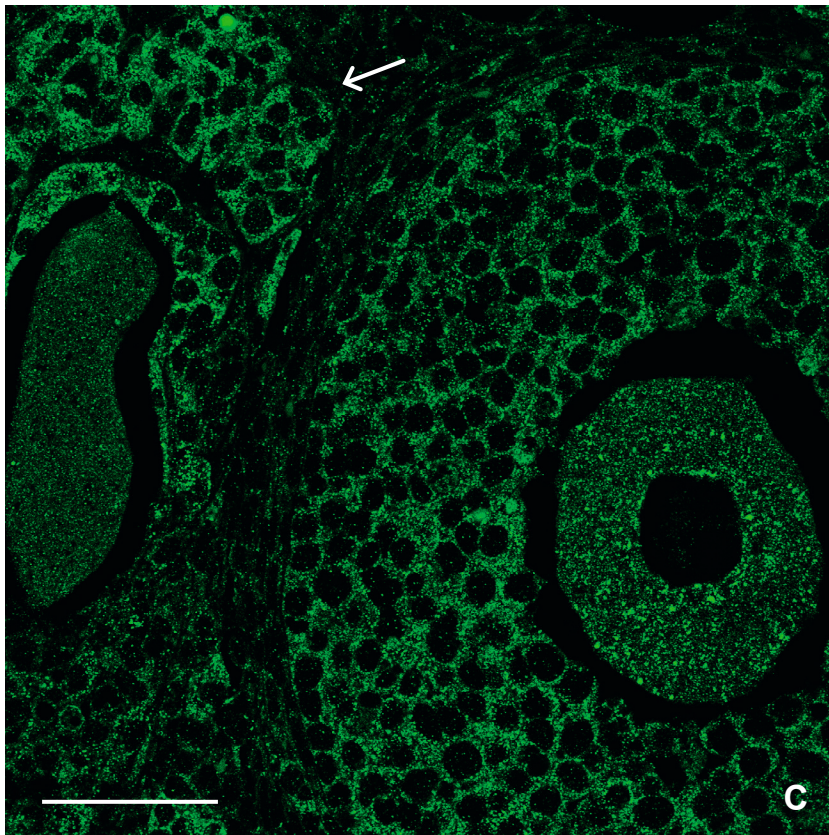
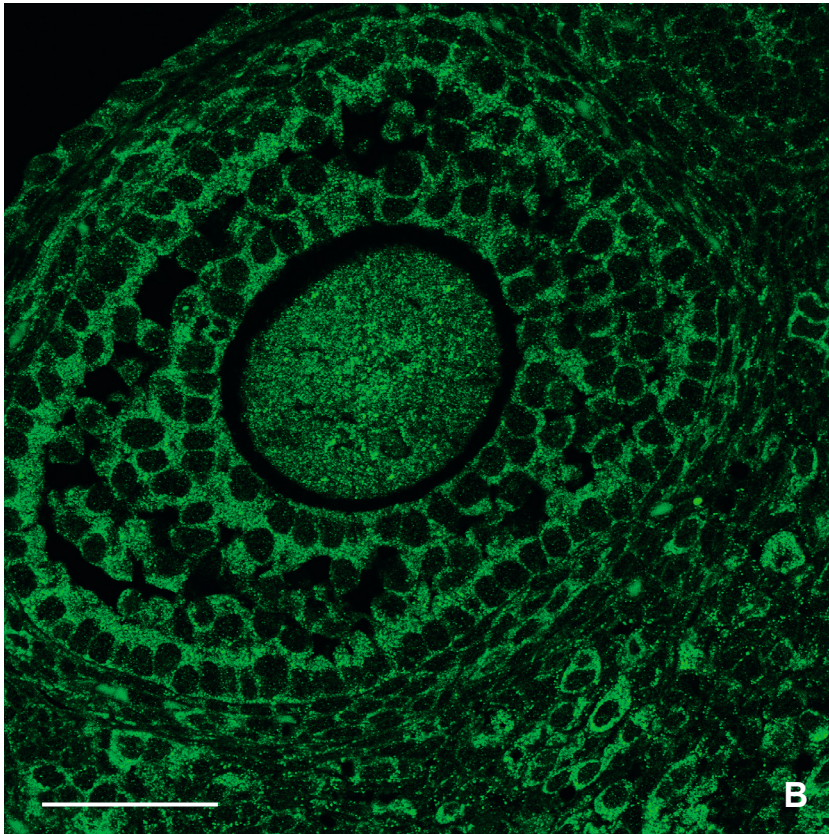


Abb. 4.17: Darstellung der Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase 4

Neben dem Follikel ist in (A) die Theka interna und Theka externa zu sehen. (B) zeigt die feine Granulierung in Oozyte und Granulosazellen, während in (C) die starke Expression in den Luteinzellen (\rightarrow) gezeigt wird. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40 μ m.

4.3.2.4 ABCD3 (PMP70)

Zur β -Oxidation von Fettsäuren sind neben den Mitochondrien auch die Peroxisomen befähigt. Zunächst müssen die Fettsäuren durch die membranständige Acyl-CoA-Synthetase aktiviert werden. Peroxisomen besitzen zwei membranständige Isoformen. Nach Aktivierung der Fettsäuren zu Acyl-CoA werden diese über ABC-Transporter (ABCD1-4) in die peroxisomale Matrix zur β -Oxidation importiert (Wanders und Waterham, 2006).

In der Immunfluoreszenzfärbung wurde der ABCD3-Transporter (PMP70) mit dem Primärantikörper markiert.

Eine sehr starke Fluoreszenz von rundlichen Strukturen war in Oozyten nachzuweisen, besonders in Tertiärfollikeln. Die peroxisomalen Proteine in Sekundärfollikeln waren weniger stark markiert. Ebenso zeigte sich eine prominente Markierung in den Zellen der Theka externa und den Luteinzellen. Die Granulosazellen und Zellen der Theka interna zeigten eine schwächere, fein granuläre Expression.

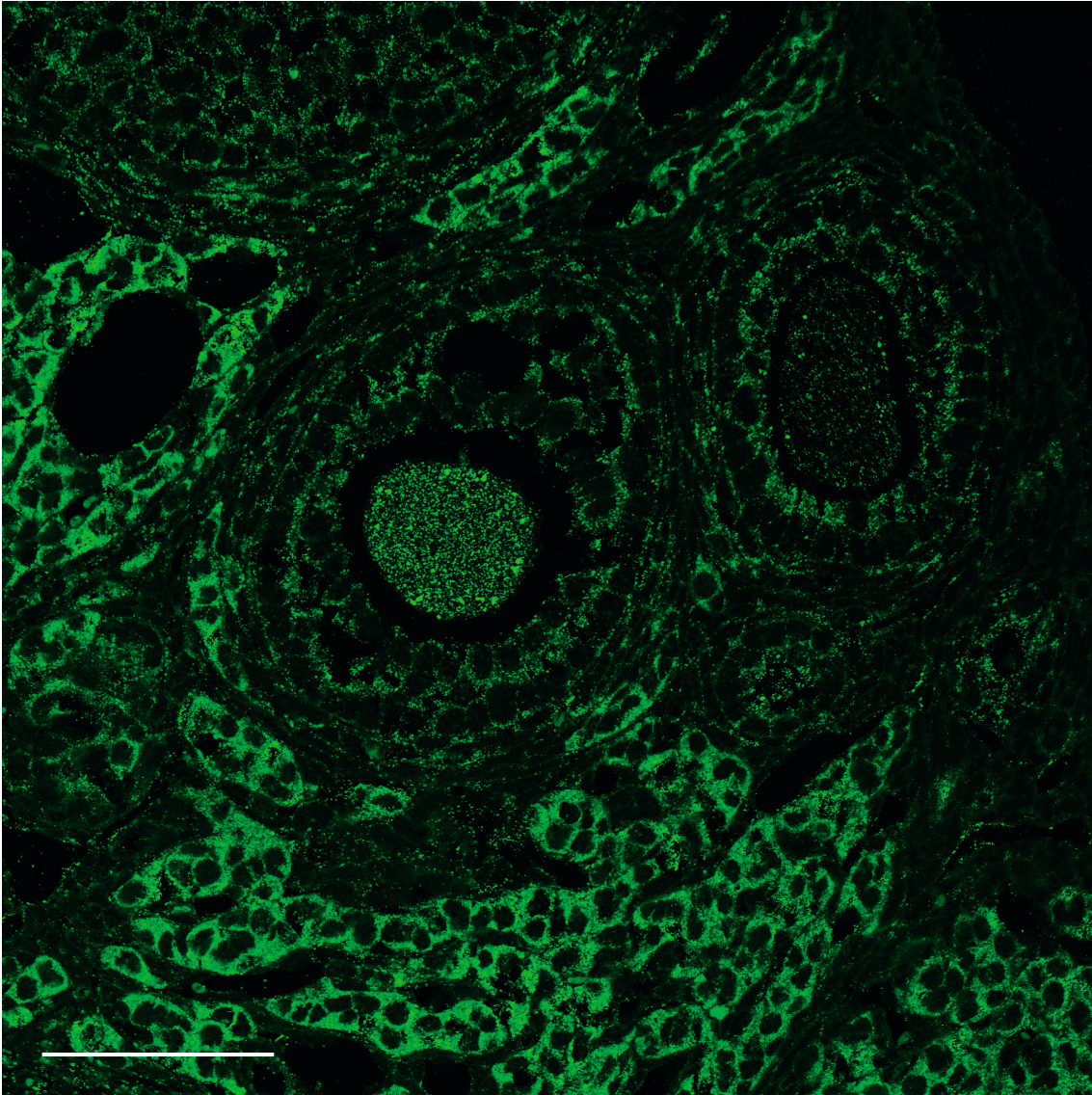


Abb. 4.18: Darstellung des ABCD3-Transporters (PMP70)

Die Markierung des ABCD3-Transporters war in der Oozyte des Tertiärfollikels stärker ausgeprägt als in der Oozyte des Sekundärfollikels. Des Weiteren war eine starke Expressierung in den Luteinzellen zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.3 Darstellung von Mitochondrien im Vergleich zu Peroxisomen

Mitochondrien und Peroxisomen sind Organellen, die beide zur β -Oxidation von Lipiden befähigt sind.

4.3.3.1 Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (OxPhos)

Um das Verteilungsmuster der beiden darzustellen, wurde eine Färbung mit Antikörpern gegen Pex14 der Peroxisomen und mit Antikörpern gegen den Komplex III (OxPhos) der Atmungskette, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, durchgeführt. Der Abbildung 4.19 ist zu entnehmen, dass die Organellen getrennt voneinander imponieren und ein signifikanter Unterschied in Verteilung und Intensität von Mitochondrien und Peroxisomen besteht.

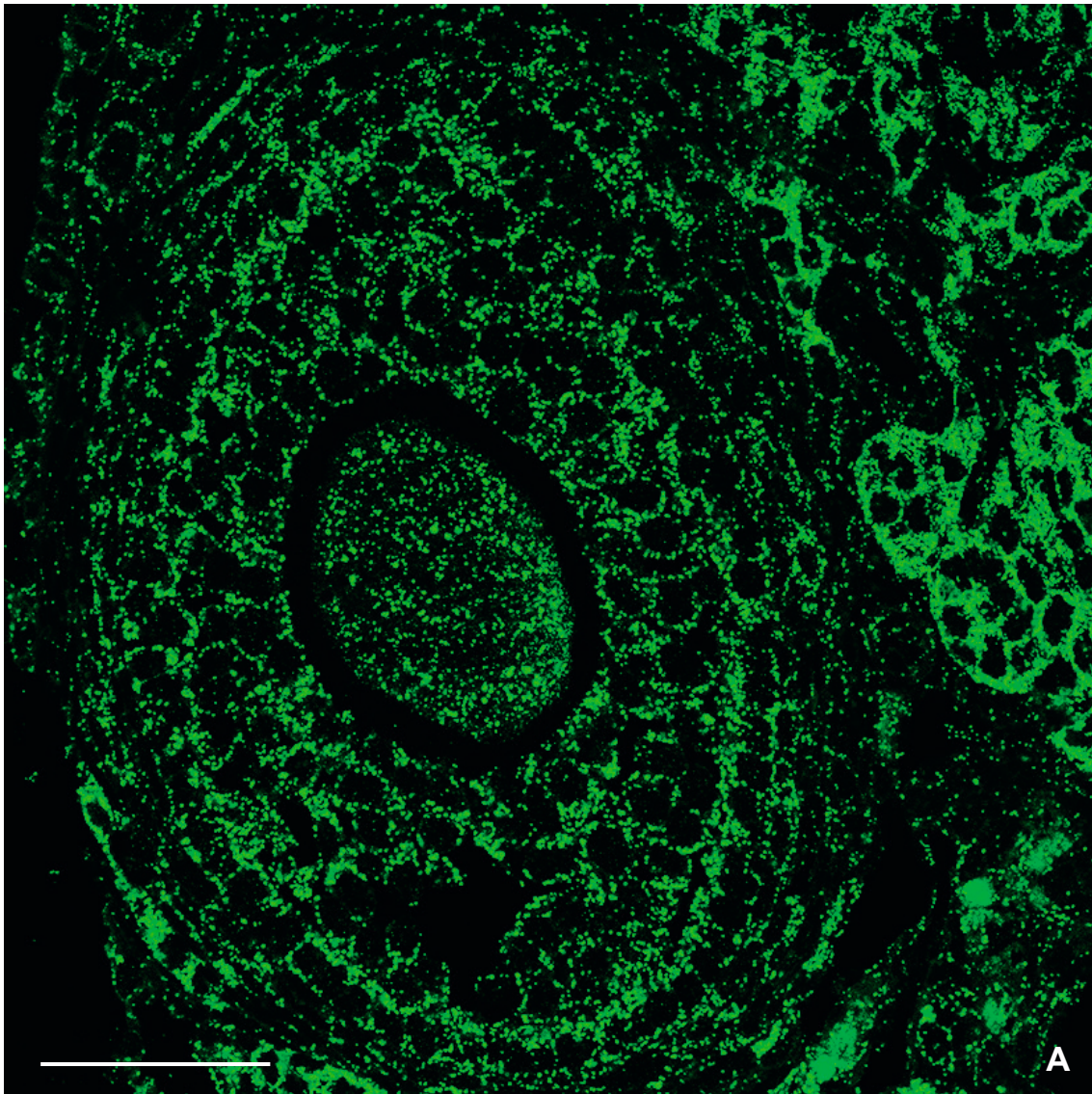


Abb. 4.19: Darstellung der Mitochondrien im Vergleich zu den Peroxisomen

Figurenlegende Seite 90

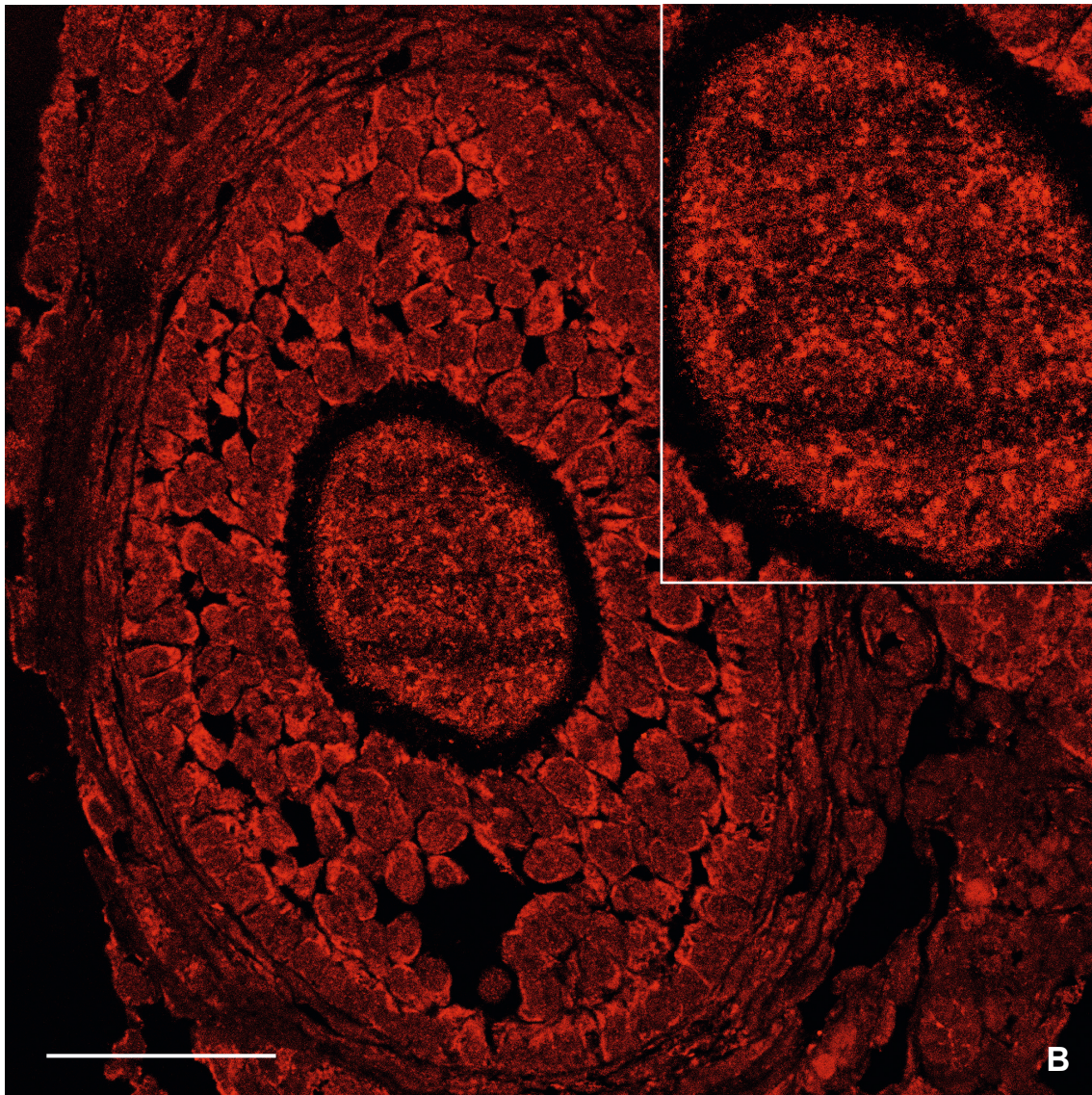


Abb. 4.19: Darstellung der Mitochondrien im Vergleich zu den Peroxisomen

In Abbildung (A) ist die Markierung der PEX14-Proteine gezeigt. Es fällt auf, dass sich die Verteilung und die Intensität der Peroxisomen von den Mitochondrien unterscheidet, die mit Hilfe der Darstellung des OxPhosIII-Komplexes in (B) zu sehen sind. Imponierend erbrachte die Färbung der Mitochondrien in den Oozyten großer Follikel kreisrunde Aussparungen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.3.2 Markierung der Superoxid Dismutase 2 (SOD2)

Bisher wurde fälschlicherweise angenommen, dass die Mangan Superoxid Dismutase (SOD2) ein integraler Bestandteil der peroxisomalen und mitochondrialen Membran sei. Karnati und Kollegen konnten 2013 nachweisen, dass SOD2 nur in den Mitochondrien, jedoch nicht in Peroxisomen lokalisiert ist (Karnati et al., 2013). Das Molekül ist analog einem Tetramer mit je einem zentralen Manganion in aufgebaut. Zu den Aufgaben der Superoxiddismutase zählen die Inaktivierung von Superoxidanionen und die Stabilisierung des Redoxpotentials an der mitochondrialen Membran (Singh et al., 1999).

In der Immunfluoreszenzfärbung wurde die SOD2 in den Ovarien markiert. Auffällig war die ausgeprägte Fluoreszenz in den Granuloazellen, die plump und stäbchenhaft imponierte. Es war eine diskrete Zunahme der Anzahl in Richtung Oozyte zu sehen. Die Strukturen in der Oozyte waren weniger fluoreszierend, grob granulär und vereinzelt stäbchenförmig.

Die Zellen der Theka interna waren kaum markiert, während die Zellen der Theka externa eine starke Exprimierung zeigten. Die Luteinzellen zeigten ebenso eine starke Fluoreszenz in plumper und stäbchenhafter Form.

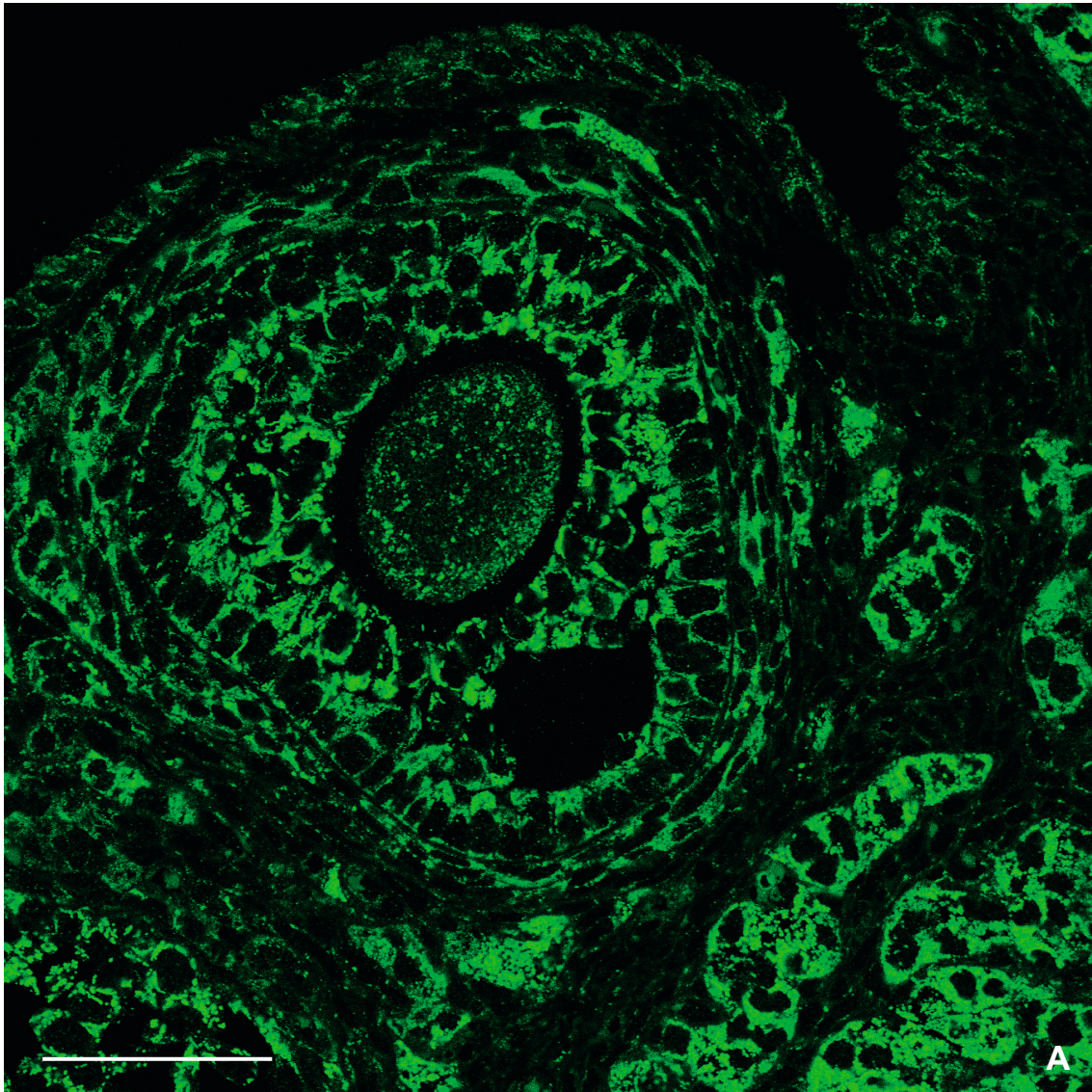


Abb. 4.20: Darstellung der mitochondrialen Superoxiddismutase (SOD2)

Figurenlegende Seite 92

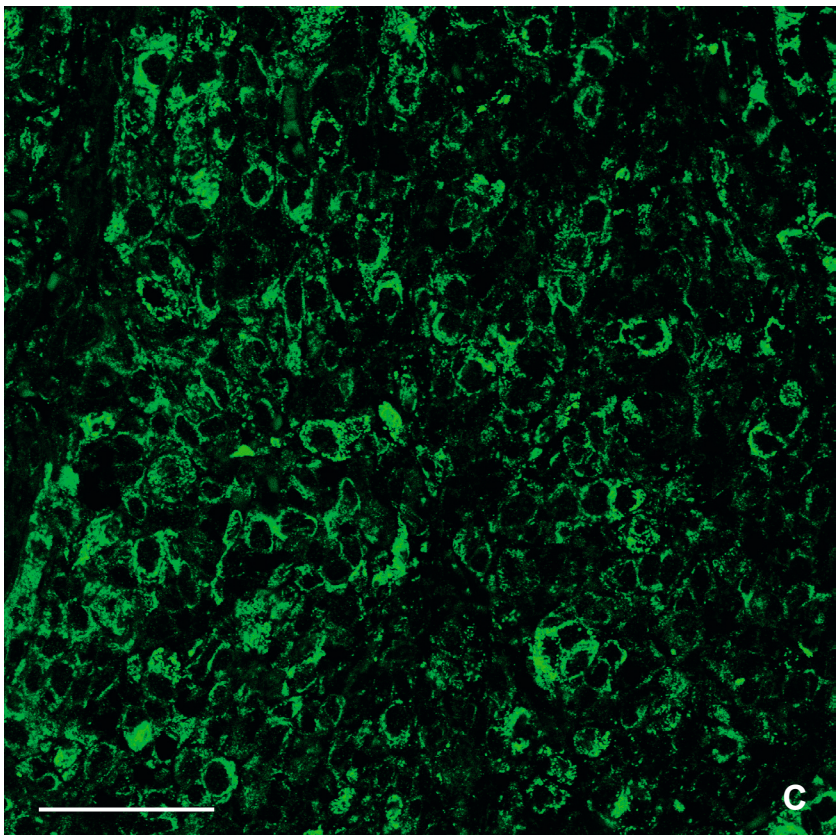
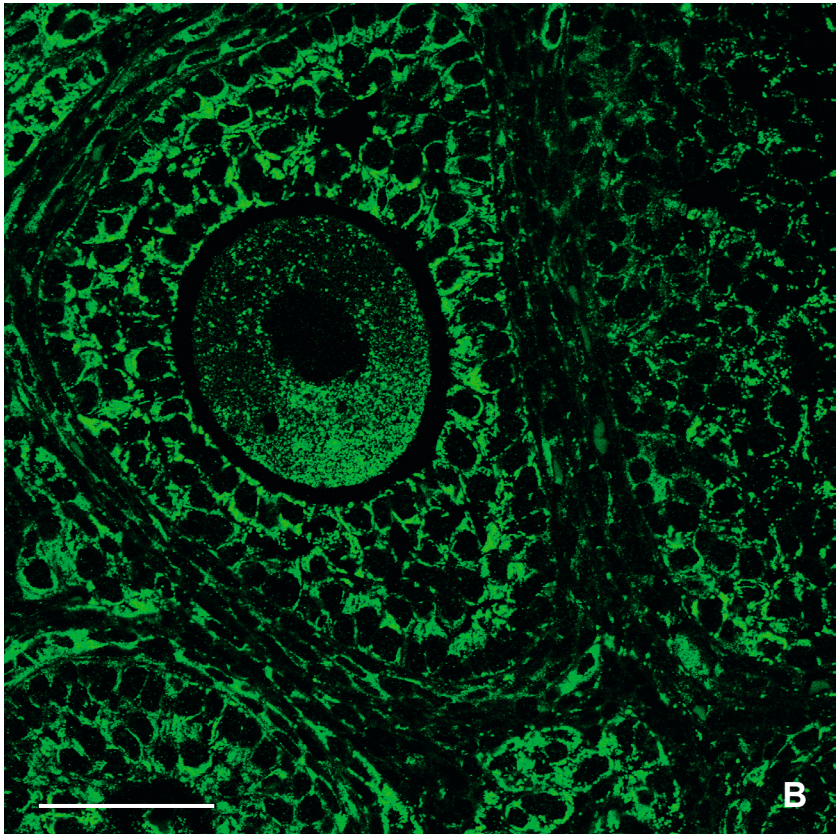


Abb. 4.20: Darstellung der mitochondrialen Superoxiddismutase (SOD2)

Die Abbildungen (A) und (B) zeigen Tertiärfollikel, Abbildung (C) Zellen eines Corpus luteum. Besonders prominent erbrachte die Färbung eine plumpe und stäbchenhafte Form der Mitochondrien. Ebenso waren im Zellkern, analog zur Färbung des Komplexes III der Atmungskette, in den Oozyten großer Follikel rundliche Aussparungen zu sehen.

4.3.4 Qualitative Analyse der Peroxisomen in den verschiedenen Follikelstadien der Zyklusphasen

Die verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen der peroxisomalen Proteine erbrachten das Ergebnis, dass zur Darstellung der Peroxisomen in den Follikelzellen das peroxisomale Biogeneseprotein PEX14 als bestes Markerprotein geeignet war. Mit Hilfe des PEX14-Antikörpers und des korrespondierenden Sekundärantikörpers konnten die Zellorganellen durch die Fluoreszenz in allen Follikelstadien lokalisiert werden: Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel. Ebenso konnte die Färbung auch zur anschließenden quantitativen Darstellung der Peroxisomen genutzt werden.

Die Abbildungen 4.21 bis 4.28 zeigen die Fluoreszenzaufnahmen des Markerproteins. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Peroxisomen sowohl in der Oozyte, als auch in den umgebenden Granulosazellen lokalisiert waren. Das Fluoreszenzmuster war in allen Zellen gleich verteilt und nicht an einer spezifischen Stelle konzentriert nachzuweisen. Auffällig war eine Zunahme der Peroxisomenflächendichte an der Gesamtfläche der Oozyte mit zunehmender Reifung des Follikels, so dass die Peroxisomen in der Oozyte des Tertiärfollikels in hoher Dichte vorhanden waren.

In den unterschiedlichen Zyklusstadien konnten keine Unterschiede in Hinblick auf die Dichte, die Verteilung und die Fluoreszenzintensität der Peroxisomen gesehen werden.

4.3.4.1 Primordialfollikel

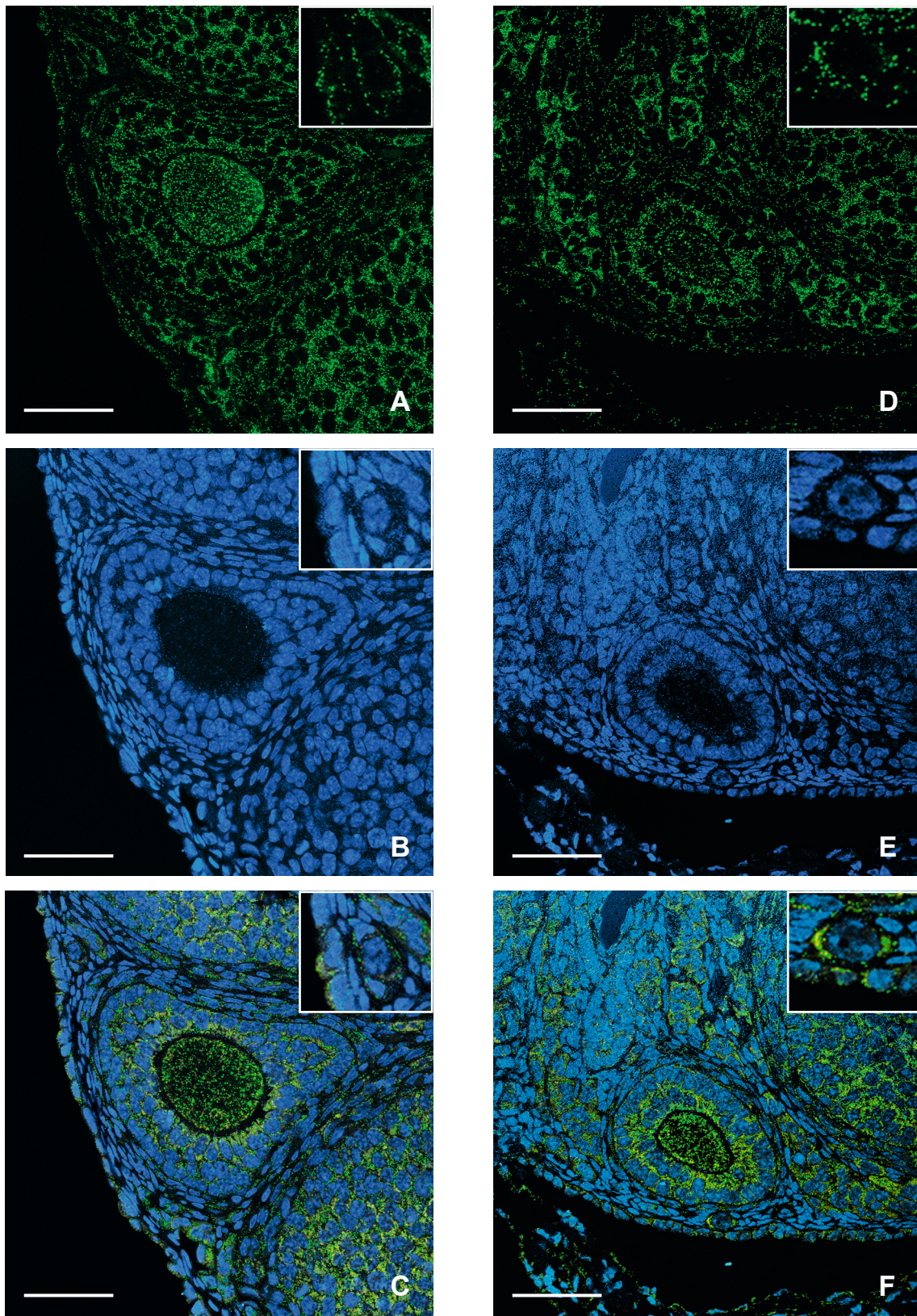


Abb. 4.21: Primordialfollikel des Oestrus und Metoestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Oestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Prooestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

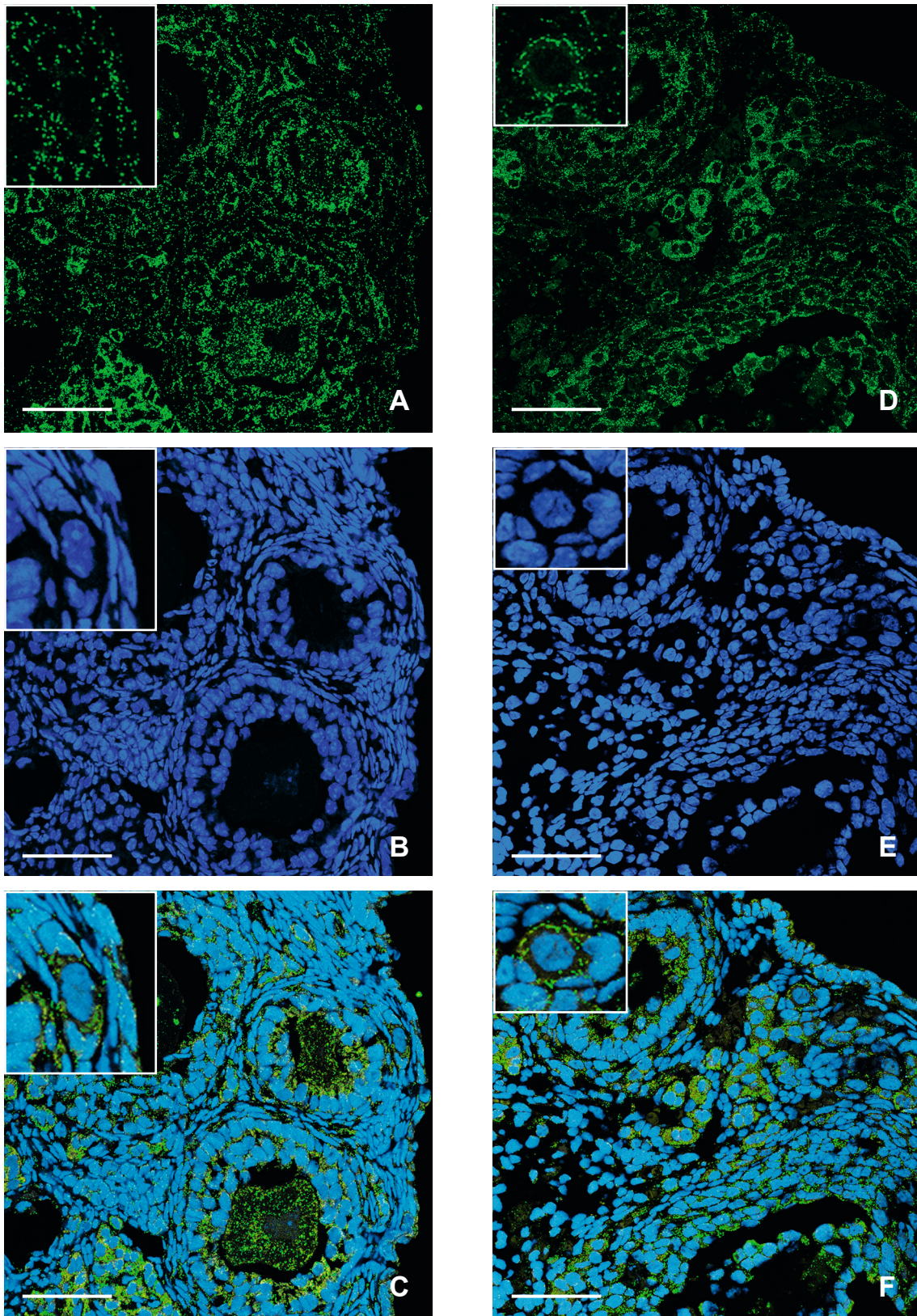


Abb. 4.22: Primordialfollikel des Dioestrus und Prooestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Dioestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Prooestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.4.2 Primärfollikel

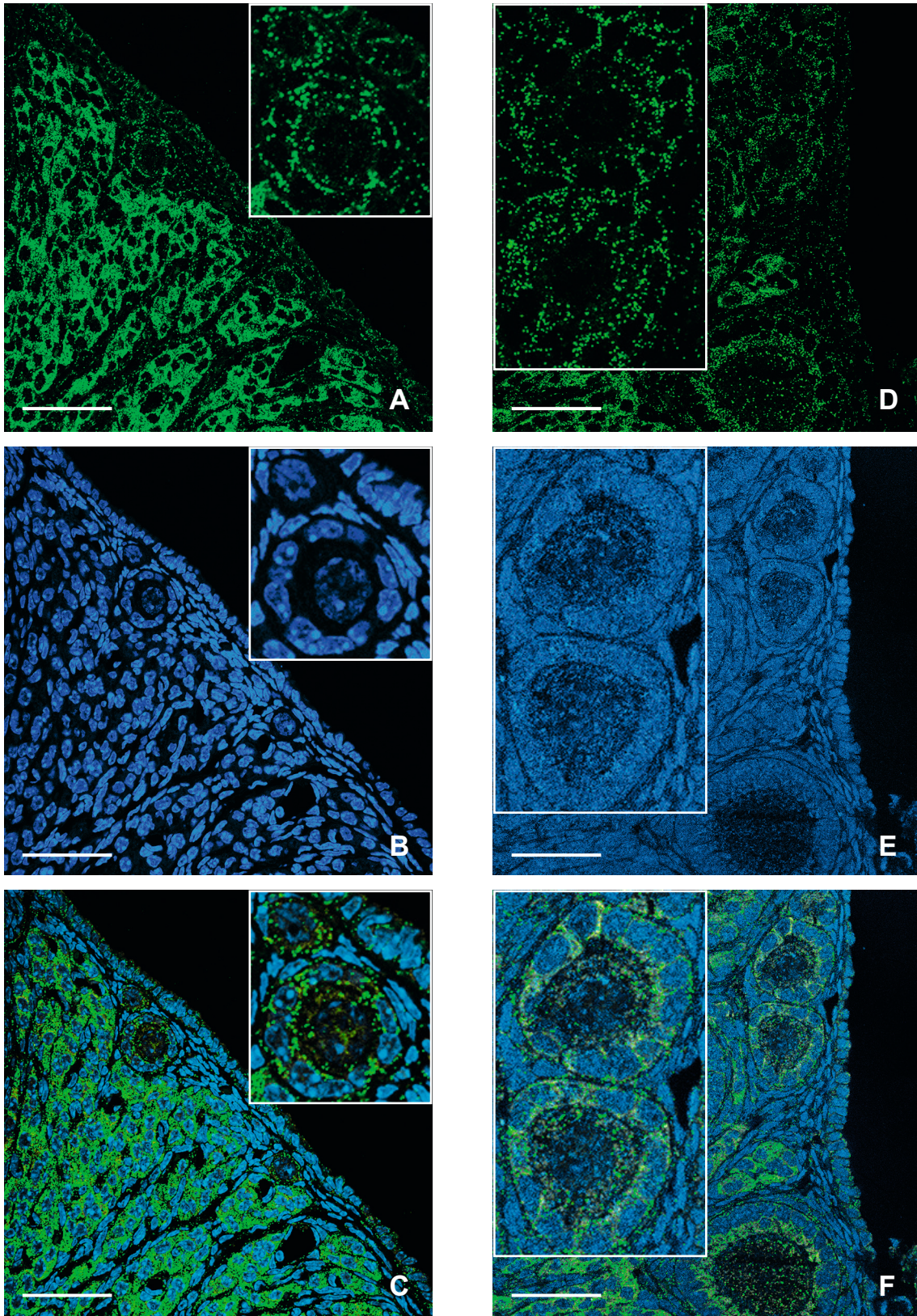


Abb. 4.23: Primärfollikel des Oestrus und Metoestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Oestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Metoestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge

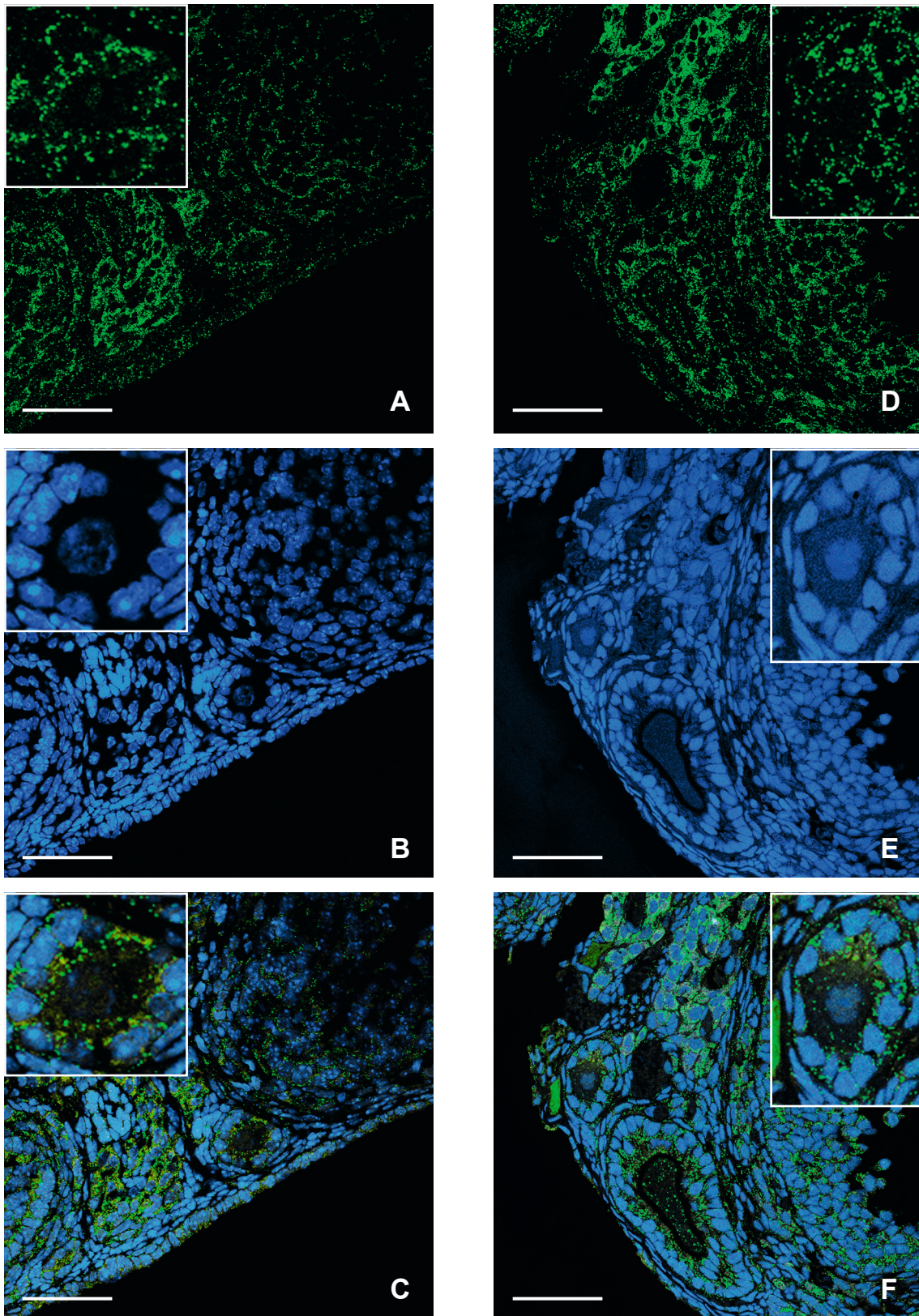


Abb. 4.24: Primärfollikel des Dioestrus und Prooestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Dioestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Prooestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.4.3 Sekundärfollikel

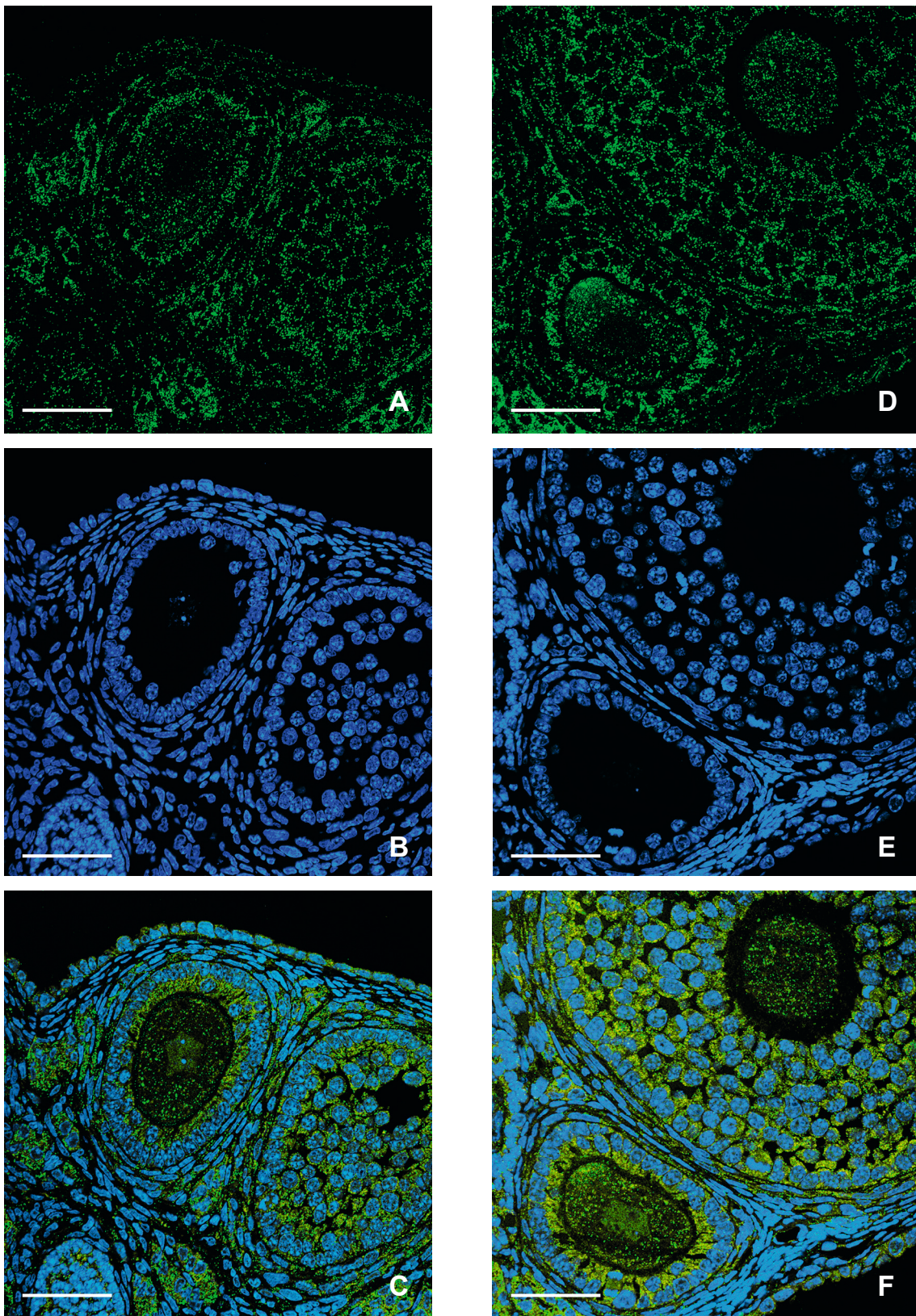


Abb. 4.25: Sekundärfollikel des Oestrus und Metroestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Oestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Metroestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

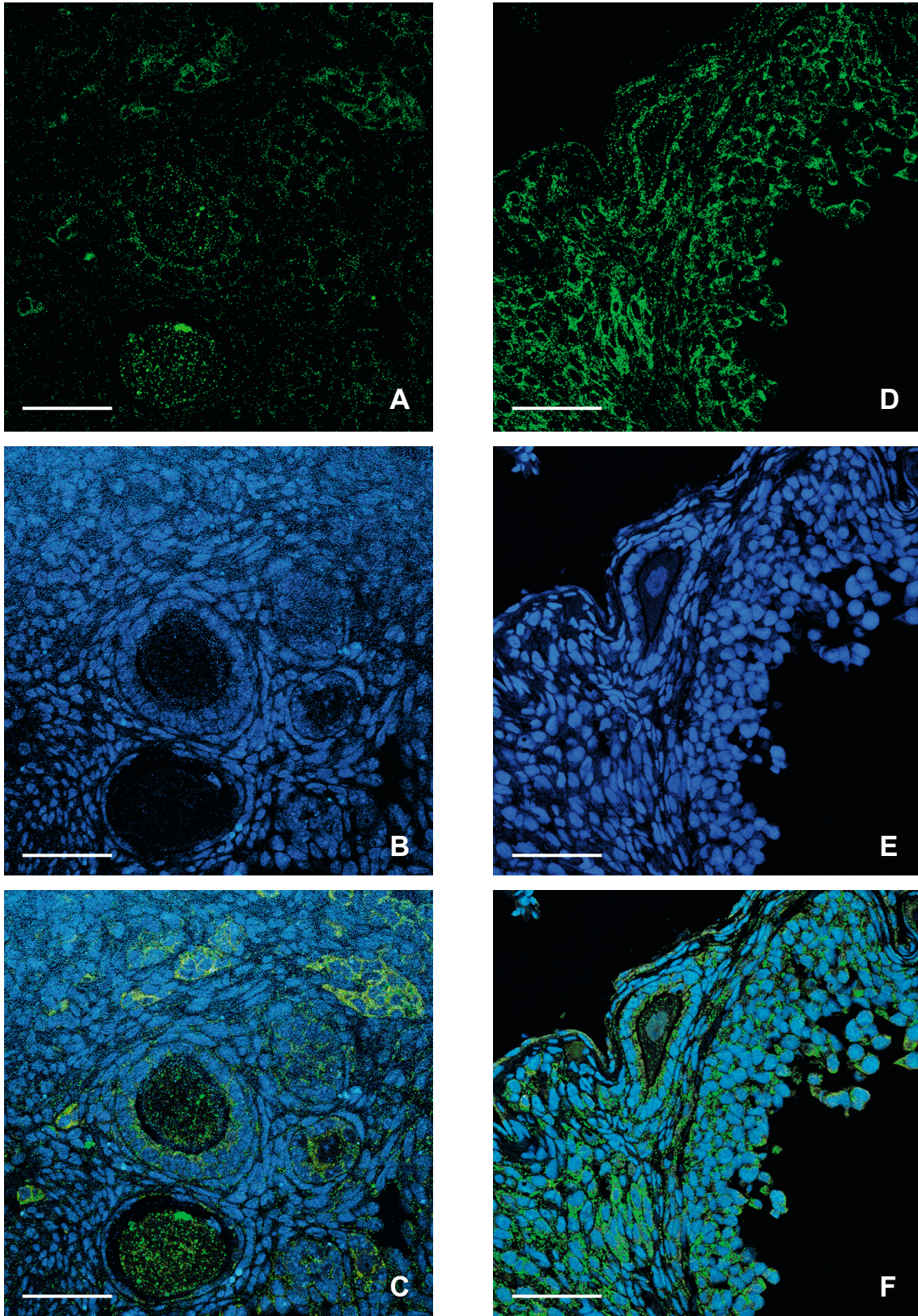


Abb. 4.26: Sekundärfollikel des Dioestrus und Prooestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Dioestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Prooestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.4.4 Tertiärfollikel

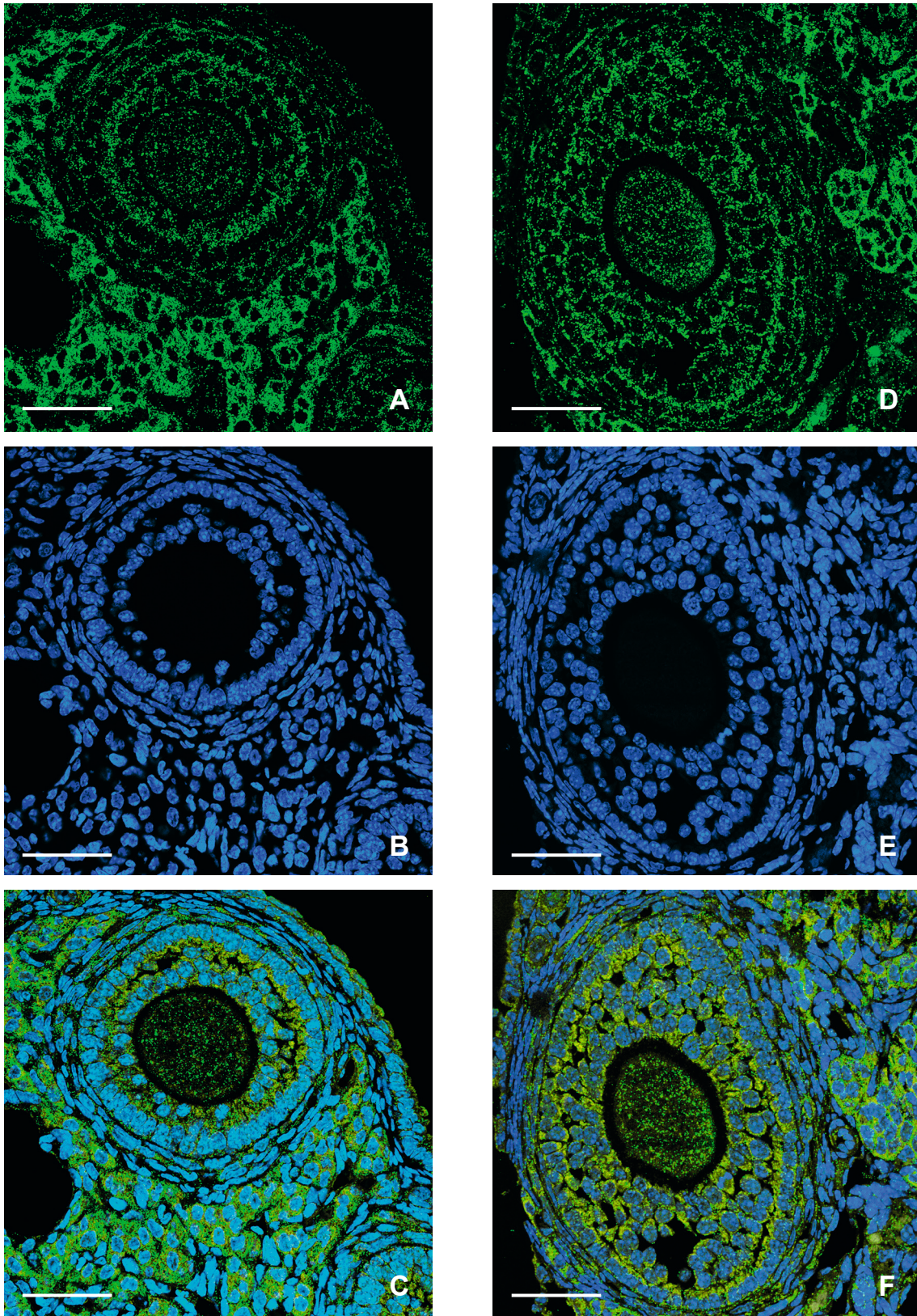


Abbildung 4.27: Tertiärfollikel des Oestrus und Metoestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Oestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Metoestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

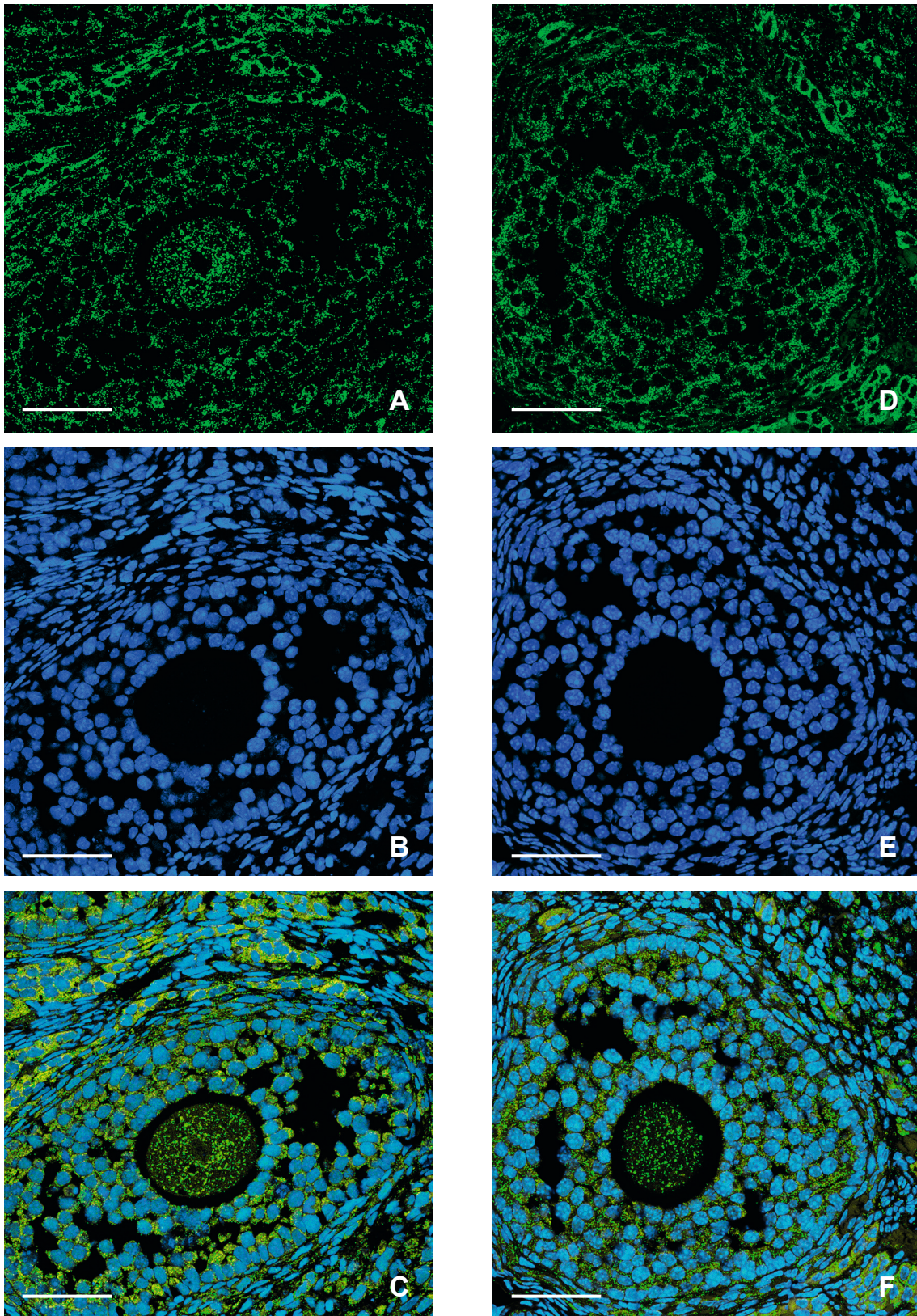


Abbildung 4.28: Tertiärfollikel des Dioestrus und Prooestrus

Die Abbildung (A) zeigt die PEX14-Markierung des Dioestrus, während die Kernfärbung in (B) zu sehen ist. (C) zeigt eine Überlagerung der Bilder (A) und (B). Analog sieht man die PEX14-Markierung des Prooestrus in (D) und die Kernfärbung in (E). Die Überlagerung der Bilder (D) und (E) ist in (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe beträgt 40µm.

4.3.5 Quantitative Analyse der Peroxisomen

Flächenbestimmung der Peroxisomen in den Oozyten

Mit Hilfe des Softwareprogrammes ImageJ® war es möglich, die Fläche der Peroxisomen bezogen auf die Fläche der Oozyte zu messen. Um den Einfluss des Hintergrundes gering zu halten, wurde für alle Aufnahmen ein definierter Messbereich gewählt, in dem die spezifische Fluoreszenz als Peroxisom erkannt wurde. Die Fläche der Oozyte wurde markiert (wobei der Bereich des Nukleus ausgespart wurde), so dass anschließend die Fläche der Peroxisomen im Vergleich zur Oozyte mit Hilfe ihrer Fluoreszenzdetektion errechnet werden konnte.

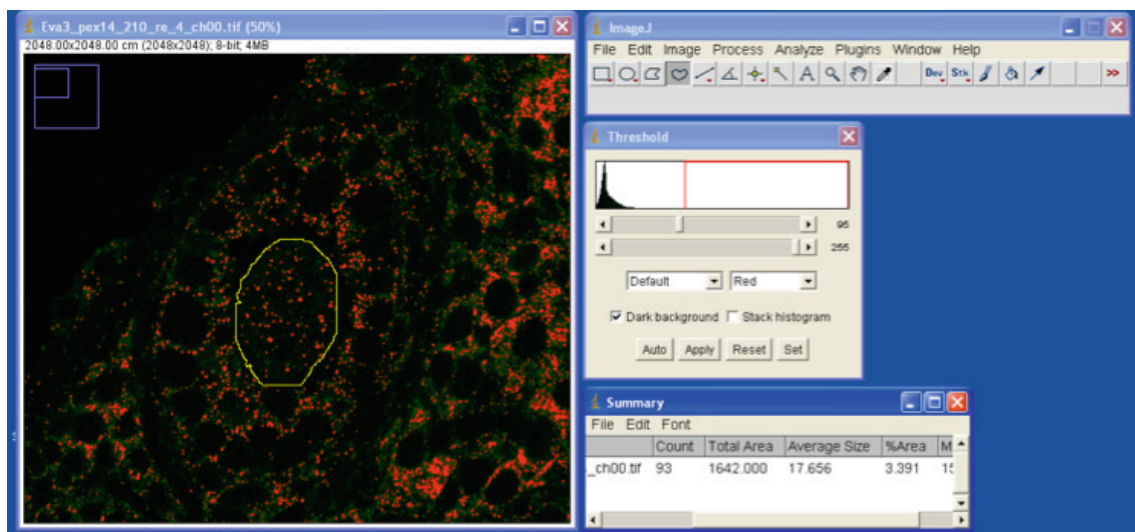


Abbildung 4.29: Flächenbestimmung der Peroxisomen.

Nach Markierung der Oozytenfläche (unter Aussparung des Nukleus) und Festlegung des Messbereiches (Current Range: 95-255) konnte die Fläche der Peroxisomen berechnet werden.

Bestimmung der Gewebeschnitttiefe mit Hilfe des CLSM

Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Rotationsmikrotomes (Leica RM 2135) manuell von einem Paraffinblock geschnitten. Da bei diesem Vorgang die Gewebeschnitte nicht immer exakt 1 µm betrug, wurden die Schnitttiefen mit Hilfe des CLSM gemessen. Die Messung erfolgte an fünf verschiedenen Stellen der Schnitte und es wurde anschließend der Mittelwert für den jeweiligen Schnitt errechnet.

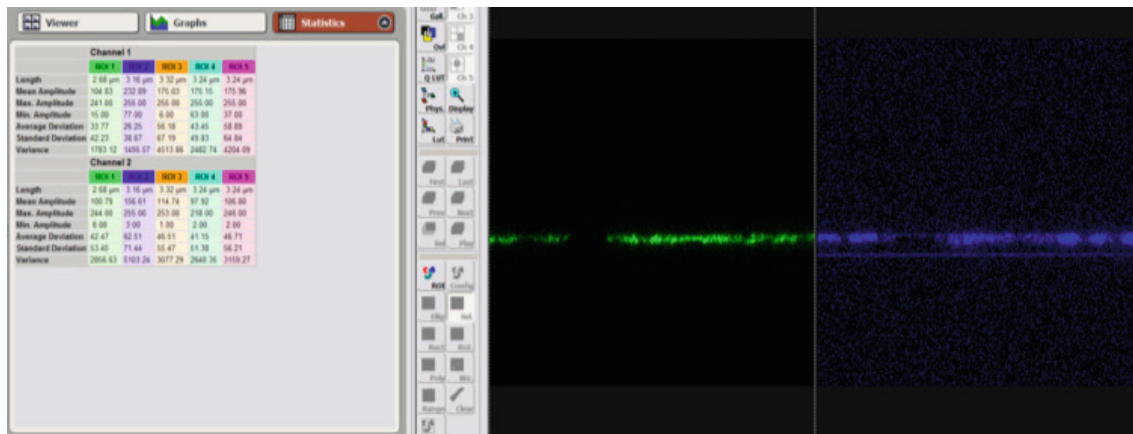


Abbildung 4.30: Messung der Schnitttiefe

An fünf verschiedenen Stellen wurde die Schnitttiefe gemessen (ROI1-ROI5) und anschließend der Mittelwert gebildet. Auf der rechten Seite sieht man die Markierung von PEX14 (grüne Fluoreszenz) und die Kernfärbung. Die Messung wurde mit Hilfe der PEX14-Färbung vorgenommen..

Berechnung der Flächendichte der Peroxisomen

Die Bilder wurden mit Hilfe des CLSM fotografisch dokumentiert. Bei der gewählten Einstellung ist die Größe des Bildes 2048 x 2048 Pixel und entspricht somit 190µm x 190µm.

Aufgrund dieser Einstellung und der ermittelten Fläche und Gewebeschnitttiefe konnte die Flächendichte der Peroxisomen errechnet werden.

Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 15.0.1 von Dr. Phillip Grant (ehemaliger Mitarbeiter unserer Abteilung, jetzt am Institut für Psychologie, Fachbereich 06, in Gießen) berechnet.

Es wurde der Flächenanteil der Peroxisomen an der Gesamtfläche berechnet, indem der erste Wert durch den zweiten geteilt wurde. Der Varianzanteil aus diesem Quotienten (im Folgenden Peroxisomenflächendichte), der über die Dicke des individuellen Schnittes erklärt wird, wurde mittels des allgemeinen linearen Modells (GLM englisch general linear model) auspartialisiert und die restlichen Varianzanteile als standardisierte Residuen (i.e., Mittelwert = 0, Standardabweichung = 1) gespeichert. Diese Methode ermöglicht, in Anlehnung an eine schrittweise Regression, diejenigen Effekte auf die abhängige Variable zu entfernen, die auf konfundierende Variablen zurückgehen. Die standardisierten Residuen fungierten in anschließenden Mittelwertvergleichen als abhängige Variable.

Zunächst wurde analysiert, ob Mittelwertsunterschiede zwischen einzelnen Tieren oder einzelnen Schnitten bestanden. Es ergaben sich hierbei sowohl für den Faktor Tier ($F_{6, 222}=8,48$; $p<0.001$) als auch für den Faktor Schnitt ($F_{44, 184}=4,24$; $p>0.001$) signifikante Mittelwertsunterschiede, so dass wie oben beschrieben die Varianzanteile mit Hilfe des GLM entfernt wurden, die durch diese beiden Faktoren erklärt wurden.

Daraufhin wurde der Effekt des Zyklusstadiums auf die Flächendichte der Peroxisomen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet, wobei keine signifikanten Mittelwertsunterschiede gefunden werden konnten ($F_{3, 225}=0,005$; $p=1.0$). Signifikante Unterschiede zwischen den Follikelreifungsstadien wurden ebenfalls mittels einfaktorieller ANOVA untersucht, wobei sich ein signifikanter Haupteffekt des Follikelreifungsstadiums zeigte ($F_{3, 225}=7,03$; $p<0.001$). In anschließenden post-hoc Test, die mit dem Bonferoni-Verfahren durchgeführt wurden, zeigte sich, dass dieser Effekt auf einen signifikanten Anstieg der Peroxisomendichte in den Tertiärfollikeln gegenüber den Primordial- und Sekundärfollikeln zurückging (jeweils $p<0.001$; s. Tabelle 10.12). In einer ex-post-facto ANOVA wurden daher die Tertiärfollikel ausgeschlossen, und es zeigte sich nun kein signifikanter Haupteffekt des Follikelreifungsstadiums mehr ($F_{2, 140}=0,977$; $p=0.379$).

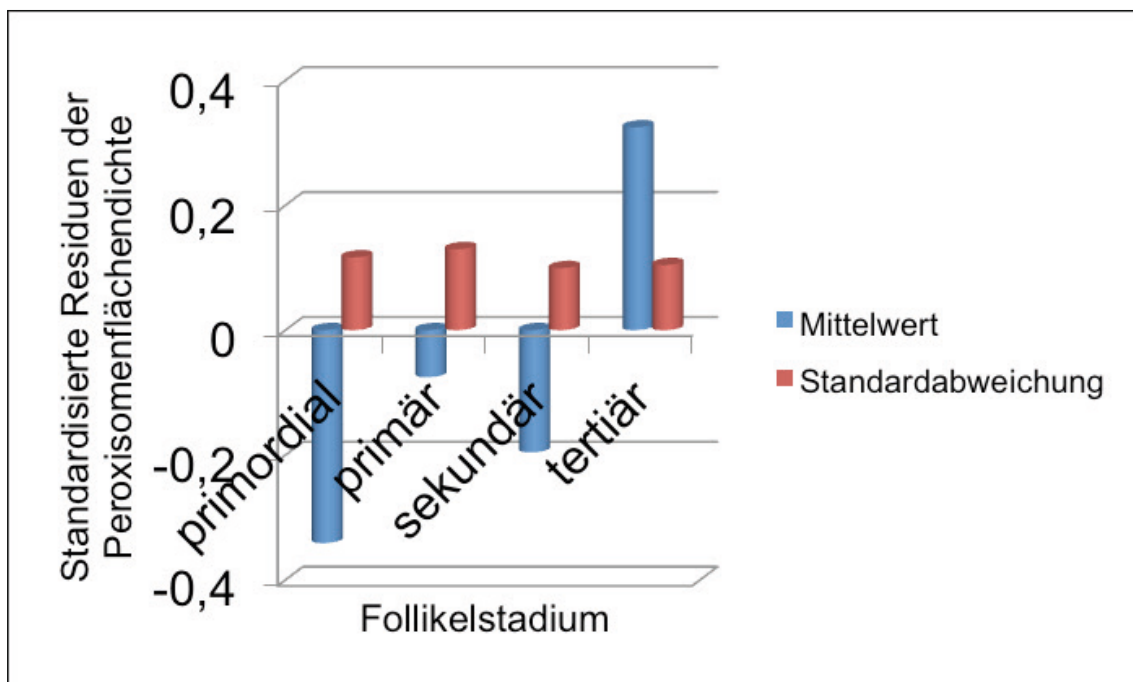


Abb. 4.31: Statistische Auswertung

Die Abbildung zeigt den errechneten Mittelwert und die Standardabweichung (SEM englisch standard error of the mean)

Mittels GLM-Analyse wurde zum Schluss ein signifikanter Interaktionseffekt (partielles $\eta^2=0,9$) zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium gefunden ($F_{9,213}=2,353$; $p=0.015$; siehe Abbildung 4.32 und Tabelle 10.12 im Anhang), der interessanterweise bei Ausschluss der Tertiärfollikel stärker wurde (partielles $\eta^2=0,143$; $F_{6,131}=3,65$; $p=0.002$; siehe Tabelle 10.13 im Anhang).

Betrachtet man die Abbildung 4.32, sinkt die Konzentration der Peroxisomen in den Primordialfollikeln vom Prooestrus zum Oestrus, um mit einem linearen Anstieg zum Metroestrus zu steigen und leicht zum Dioestrus zu fallen. Dagegen steigt die Konzentration der Peroxisomen in den Primärfollikeln vom Prooestrus zum Oestrus linear, um zum Metroestrus und anschließend zum Dioestrus abzunehmen. Die Peroxisomenflächendichte in den Sekundärfollikeln findet ihren Zenit im Dioestrus, um über den Prooestrus und Oestrus wieder bis zum Metroestrus zu fallen. Es folgt anschließend der lineare Anstieg zum Dioestrus. Die Tertiärfollikel besitzen zu allen Zeiten den oestrischen Zyklus eine hohe Peroxisomenflächendichte, so dass der Zenit im Prooestrus zu sehen ist und leicht über den Zyklus abfällt. Die Peroxisomenflächendichte der Tertiärfollikel ist über die ganze Zeit des oestrischen Zyklus so hoch, dass der Anstieg im Dioestrus auf den ganzen Zyklus kaum einen großen Unterschied ausmacht, weshalb der Interaktionseffekt auch stärker wird, wenn man die Tertiärfollikel aus der Analyse ausschließt (Tabelle 10.13 im Anhang).

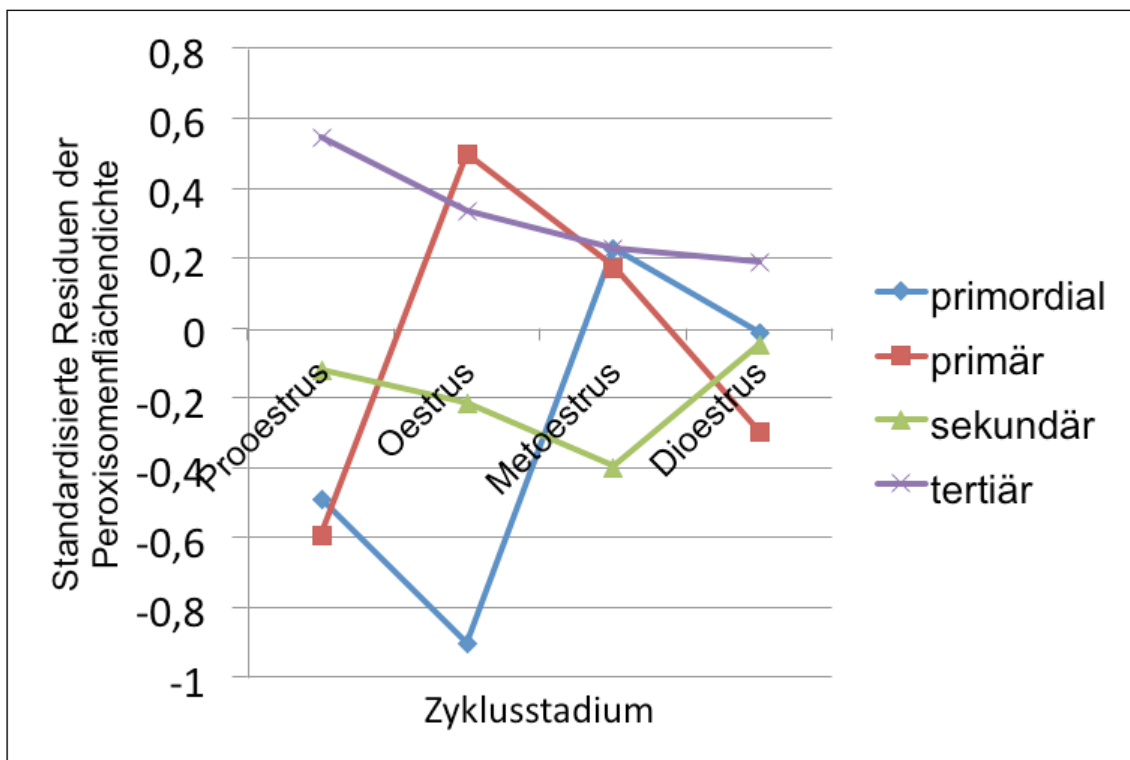


Abb. 4.32: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium



4.3.6 Darstellung peroxisomaler Netzwerke

Im Rahmen dieser Arbeit wurden peroxisomale Strukturen beobachtet, die in unserer Arbeitsgruppe schon bei der PEX14p-Markierung von Tests aufgefallen sind. Diese imponierten in der Oozyte von Sekundärfollikeln mit einer hohen Fluoreszenz und meist in zirkulärer Anordnung. Die Form der Oozyte war nicht mehr rund, sondern oft eingezogen deformiert.

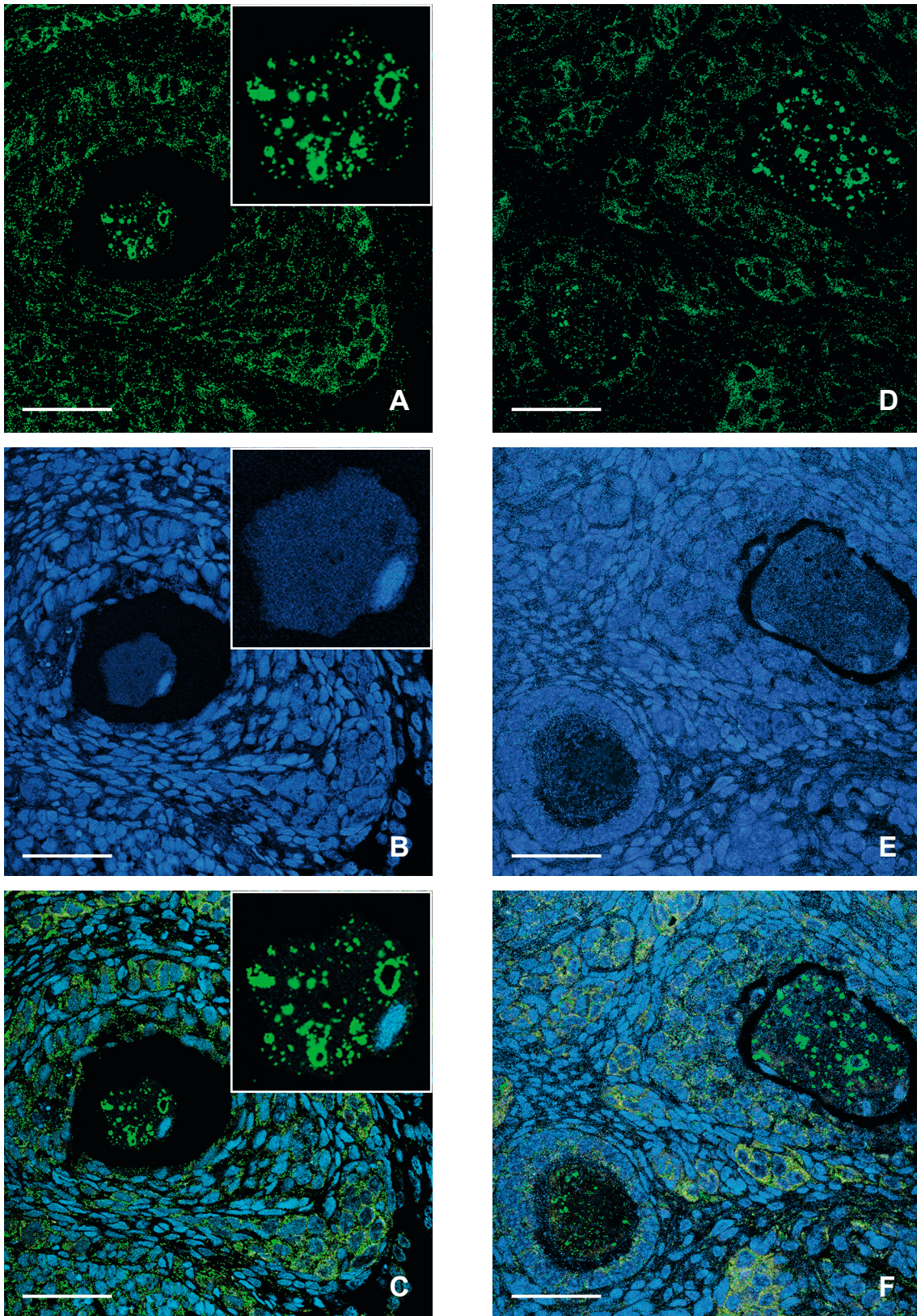


Abb. 4.33: Darstellung peroxisomaler Netzwerke I

Die Abbildungen (A) und (D) zeigen die PEX14-Markierung in Oocyten von Sekundärfollikeln, die eine zirkuläre Formation einnehmen. Die Oocyten, Abbildung (B) und (E), sind endrundet, deformiert und zeigen Einbuchtungen. Die Überlagerungen sind in den Abbildungen (C) und (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe entspricht 40µm.

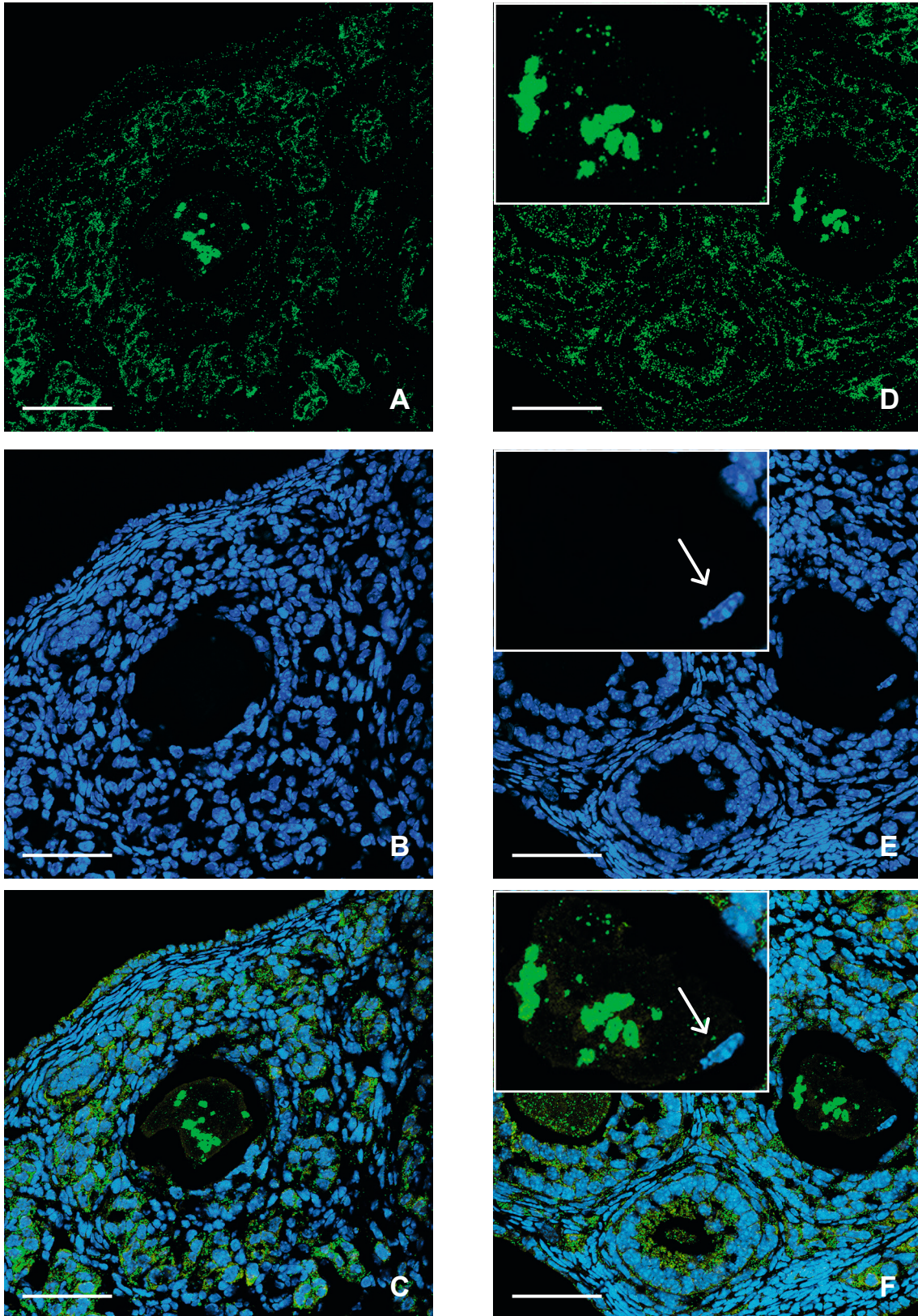


Abbildung 4.34: Darstellung peroxisomaler Netzwerke II

Die Abbildungen (A) und (D) zeigen die PEX14-Markierung in Oocyten von Sekundärfollikeln, die eine zirkuläre Formation einnehmen. Die Oocyten, Abbildung (B) und (E), sind endrundet, deformiert und zeigen Einbuchtungen. Besonders auffällig ist der zentrale Zellkern in (E), der mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet ist. Die Überlagerungen sind in den Abbildungen (C) und (F) zu sehen. Die Länge der Maßstäbe entspricht 40µm.

4.4 Darstellung apoptotischer Zellen

In Kapitel 5.5.4 sind Zellen beschrieben, die nach Markierung mit Antikörpern gegen PEX14p und Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase unbekannte Strukturen zeigen. Da die Oozyten, die diese Strukturen enthalten, deformiert imponieren, sind wir davon ausgegangen, dass es sich um apoptotische Zellen handelt und die Organisation der Apoptose hier in Zusammenhang mit den Peroxisomen steht.

Um die Apoptose nachzuweisen, wurden Paraffinschnitte von den Ovarien verwendet, in denen die peroxisomalen Netzwerke gesehen wurden. Anhand dieser Gewebeschnitte wurde mit Hilfe des ApopTag® Red versucht die Apoptose der Zellen darzustellen.

Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod, der von intrinsischen oder extrinsischen Faktoren ausgelöst werden kann. Sie dient als Gegenspieler der Mitose zur Zellregulation im Organismus.

Zunächst kondensiert der Zellkern und die DNA wird fragmentiert, so dass DNA-Fragmente mit freien Hydroxygruppen am 3'-Ende entstehen.

Die Zelle beginnt zu schrumpfen und organisiert sich in eine Vielzahl von Membrangebundenen Vesikeln, die von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden (Kerr et al., 1972).

Nach Durchführung des ApopTag® Red an den Gewebeschnitten der Ovarien, wurden diese mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet: die mit Rhodamin markierten, apoptotischen Anteile die Kernfärbung mit Dapi.

Zusammenfassend kann man konstatieren, dass die Oozyte, die mit peroxisomalen Netzwerken in der PEX14p-Färbung imponiert, DNA-Fragmente mit freien Hydroxygruppen am 3'-Ende enthält. Somit ist die Apoptose dieser Eizellen anzunehmen.

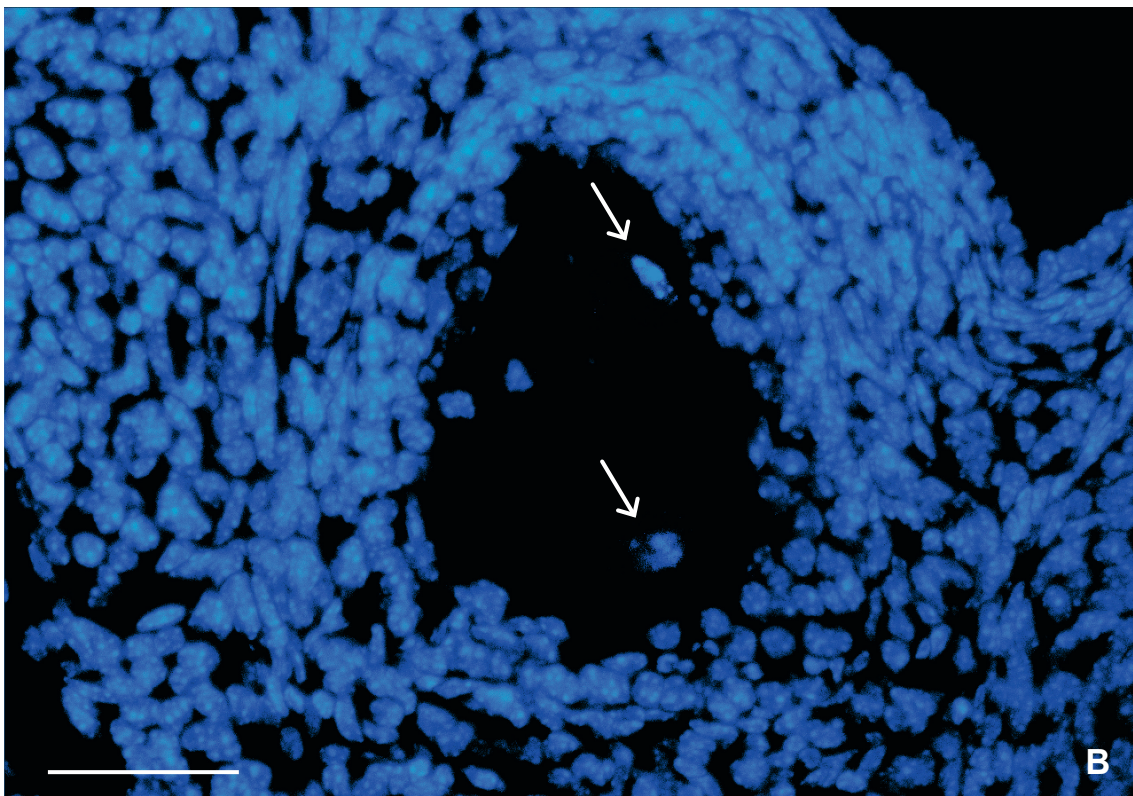
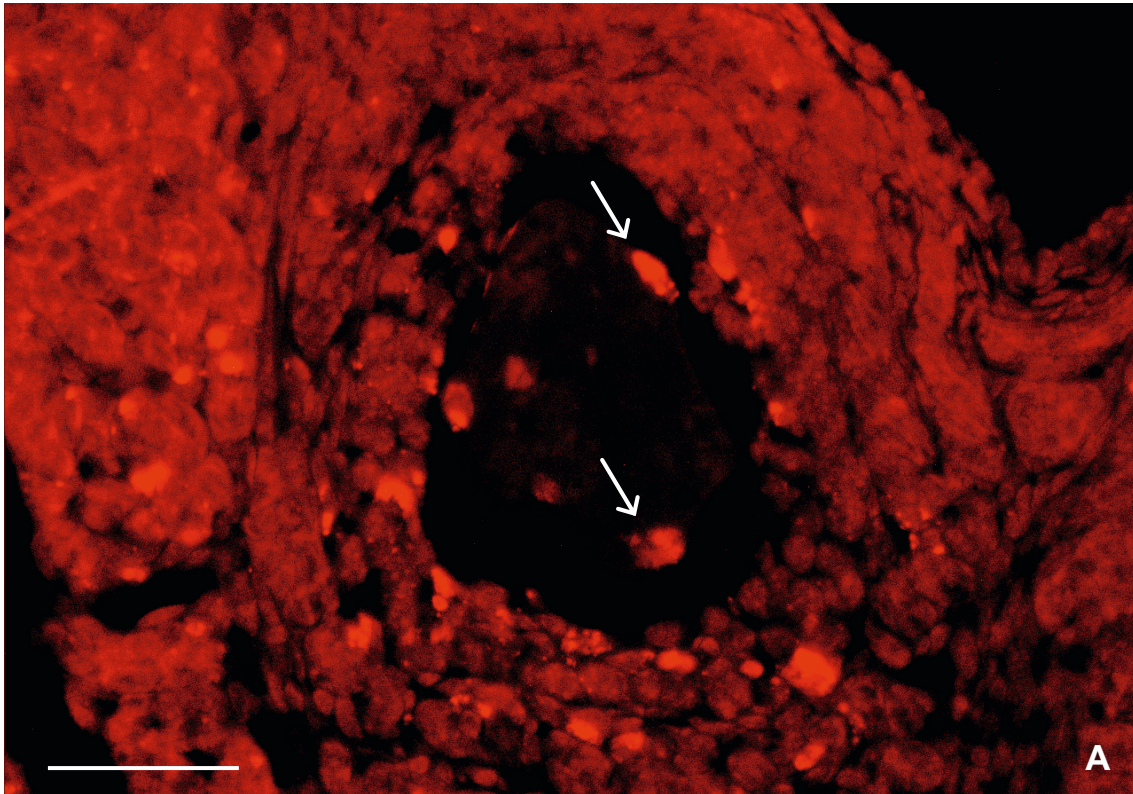


Abbildung 4.35: Darstellung einer apoptotischen Oozyte

In (A) ist die Oozyte mit Einbuchtungen entrundet. Randständig zeigt die Oozyte eine Fluoreszenz, die mit der Lokalisation des Zellkernes identisch ist, die mit der Kernfärbung zu sehen ist. Beide analogen Strukturen wurden mit einem Pfeil markiert.

Eine apoptotische Markierung der Granulosazellen ist ebenso zu sehen.

(B) zeigt die Kernfärbung mit DAPI. Die Länge der Maßstäbe beträgt 740µm.

5 Diskussion

5.1 Überblick

Peroxisomen sind Organellen, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. In den Zellen des Hodens (Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und Zellen der Spermatogenese) wurde das peroxisomale Kompartiment bereits dargestellt und charakterisiert (Nenicu et al., 2007). Peroxisomen in Oozyten wurden bisher kaum charakterisiert. Elektronenmikroskopisch wurde sie von der Gruppe von Roels ist Oozyten des Wachtelovars erstbeschrieben. Jedoch waren mit dieser Methode Oozyten in maturen Tertitäfollikelstadien nicht nachweisbar (Roels et al., 1996).

Im Jahr 2000 versuchten Figueroa und Kollegen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und der Elektronenmikroskopie Peroxisomen in Oozyten der Ratte nachzuweisen (Figueroa et al., 2000). Wie jedoch in meiner Dissertation gezeigt werden konnte, sind die Beschreibungen der Peroxisomenlokalisation von Figueroa et al. fehlerhaft. Bis zu dieser Dissertation lagen keine weiteren Untersuchungen zur Charaktersisierung unterschiedlicher peroxisomaler Proteine in Oozyten und somatischen Zellen des Ovars vor. In meiner Arbeit wurde das peroxisomale Kompartiment in den verschiedenen Follikeln mit Hilfe von unterschiedlichen Markerproteinen qualitativ beschrieben und die Flächendichte der Peroxisomen in den verschiedenen Oozytenstadien quantitativ ermittelt. Als Markerprotein zur peroxisomalen Zählung diente PEX14, das mit einem Primärantikörper in der Immunfluoreszenzfärbung markiert wurde. Darüber hinaus wurden die verschiedenen Zyklusstadien der Maus und die Veränderungen des peroxisomalen Kompartimentes der Follikel während der vier Zyklusphasen berücksichtigt. Diese wurden mit Hilfe eines Vaginalabstriches und des histologischen Bildes der Vagina definiert.

Nebenbefundlich imponierten im Rahmen dieser Dissertation in Immunfluoreszenzfärbungen die PEX14-markierten Membranen in degenerierenden Oozyten als peroxisomale Netzwerke. Diese lassen auf eine Apoptose der Oozyte schließen. Um dies zu verifizieren, wurde die Apoptose der Oozyten mit der TUNEL-Methode nachgewiesen. In welcher Beziehung die netzwerkartigen Strukturen zum Vorgang der Apoptose stehen, muss durch zukünftige Studien abgeklärt werden.

5.2 Murine Zyklusstadien

5.2.1 Vaginale Histologie und Zytologie

Veränderungen an Ovarien, Uterus, Vagina und Vulva im Verlauf des murinen Zyklus wurden erstmals 1922 von Edgar Allen beschrieben (Allen, 1922). Mit Hilfe der Studien von Zondek und Aschheim (Zondek und Aschheim, 1926) kann der oestrische Zyklus in vier Phasen (Dioestrus, Prooestrus, Oestrus und Metroestrus) unterteilt werden. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte der Nachweis der einzelnen Stadien mit Hilfe der vaginalen Zytologie und Histologie. Als optimale Methode der zytologischen Beurteilung zeigte sich der Vaginalabstrich mit Hilfe eines Mandrins, der anschließend mit 96% Ethanol fixiert und nach *Papanicolaou* gefärbt wurde. Diese Färbung war zwar aufwendiger und zeitintensiver im Vergleich zur Färbung nach *Giemsa*, jedoch erbrachte sie hervorragende Ergebnisse. Die basalen Zellen des verhornten Plattenepithels färbten sich blau an, während die superfizialen Zellen rosa imponierten. Prominent waren die kernlosen Schollen im Oestrus zu sehen, die aufgrund ihres Keratingehaltes eine orange-rosa Farbe annahmen. Die korrespondierende Histologie der Vagina wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenso nach *Papanicolaou* gefärbt. Zur Darstellung der schleimbildenden Zellen im Prooestrus wurde noch die PAS-Färbung angewendet, mit deren Hilfe kohlenhydrathaltige Verbindungen (z.B. Glykoproteine, Muzine) dargestellt werden konnten. Die Ergebnisse konnten mit den Studien von Zondek und Aschheim (Tabelle 1.2) verglichen werden, die eine eindeutige Zuordnung der Tiere zu einem Zyklusstadium zuließen.

Zunächst zeigte sich bei Gewinnung des Vaginalsekrets oft das zytologische Bild eines „Zwischenstadiums“, zwischen zwei Zyklusstadien. Bereits Clauberg stellte 1931 fest, dass die Epithelveränderungen der Vagina nicht an allen Stellen gleichzeitig ablaufen, sondern vom Vestibulum beginnend bis zum Scheidendach. Des Weiteren beschrieb er, dass die Zellen der schnell wechselnden Zyklusphasen in den Schleimhautfalten der Vagina zurück bleiben und so das zytologische Bild verfälschen können (Clauberg, 1931).

Aus diesem Grund wurde alle 24 Stunden eine Vaginalabstrich durchgeführt und darauf geachtet, dass die Abstrichtiefe mit Hilfe des Mandrins immer gleich gewählt wurde, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Ebenso wurde darauf geachtet, dass beim Abstreichen der Scheide der Bereich der Vulva ausgespart wurde. Bereits Zondek und Aschheim stellten fest, dass sich dort Epithelgewebe befindet, dass unabhängig vom Oestruszyklus verhornt, abgestoßen wird und somit das zytologische Bild verfälschen könnte (Zondek und Aschheim, 1926). Die

verschiedenen Zyklusphasen unterscheiden sich in ihrer Dauer. Allen beschreibt 1922, dass die Phase des Dioestrus meist ein bis drei Tage andauert. Im Vergleich hierzu lässt sich der Oestrus ein bis zwei Tage und der Metroestrus einen Tag nachweisen. Die kürzeste Phase nimmt der Prooestrus mit weniger als einen Tag ein (Allen, 1922). Dies konnten wir bei unseren Untersuchungen bestätigen. Es war schwierig, ein eindeutiges zytologisches Bild des Prooestrus nachzuweisen, da oft noch Zellen des vorangegangenen Dioestrus oder Schollen des folgenden Oestrus im Vaginalabstrich zu sehen waren. Um ein eindeutiges Prooestrusstadium zu erhalten, haben wir einen Vaginalabstrich nachts durchgeführt, der das gewünschte zytologische Bild erbrachte. Dies ist auch der Grund dafür, dass im Rahmen dieser Dissertation nur eine Maus im Prooestrusstadium untersucht werden konnte.

5.2.2 FSH-Bestimmung

Neben der vaginalen Zytologie und Histologie wurde mit Hilfe der FSH-Konzentration versucht, die Mäuse einem bestimmten Zyklusstadium zuzuordnen.

Das Follikelstimulierende Hormon (FSH) wird von den gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens sezerniert und bindet an den FSH-Rezeptoren der Granulosazellen. In früheren experimentellen Studien wurde die höchste Konzentration von FSH im Prooestrus gemessen (Demeestere et al., 2012, Fox et al., 2007). Auch in dieser Dissertation wurde versucht, einen ELISA zur Bestimmung der FSH-Konzentration im Serum der Mäuse zur Abgrenzung unterschiedlicher Zyklusphasen zu verwenden. Die Durchführung des ELISAs erforderte die genaue Einhaltung der vorgeschriebenen Inkubationszeiten und das sorgfältige Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper bzw. des nicht gebundenen Konjugats. Ein Indikator für das exakte Arbeiten waren die mitgeführten Standardproben, mit deren Hilfe die Errechnung der Standardkurve möglich war. Die Standardergebnisse ergaben eine lineare Gerade, die das saubere und exakte Arbeiten bewies. Wie bereits unter Material und Methoden beschrieben, konnte bei manchen Tieren keine 100 µl Blut aus dem linken Ventrikel vor der Perfusion aspiriert werden. Um den Einfluss der unterschiedlichen Volumina auf die FSH-Konzentration zu ermitteln, wurde eine Standardreihe mit verschiedenen Volumina (Volumenreihe) durchgeführt und für jedes Volumen ein entsprechender Faktor ermittelt. Die Volumenunterschiede der Proben wurden anschließend mit dem zum Ausgangsvolumen korrespondierenden Faktor ausgeglichen. Dennoch zeigten die unterschiedlichen Volumina und die Einfachbestimmung einen hohen Einfluss auf das Ergebnis. Jedoch zeigten selbst auch die Tiere, die auf-



grund vaginaler Zytologie und Histologie einem bestimmten Stadium zugeordnet werden konnten, in ihrer FSH-Konzentration sehr unterschiedliche Werte.

Aus diesem Grund konnten die in dieser Dissertation bestimmten Hormonkonzentrationen nicht zur Bestimmung des Zyklusstadiums herangezogen werden.

5.3 Methodische Aspekte zum Nachweis peroxisomaler Proteine in den Ovarien

5.3.1 Antigenwiederherstellung

Die entnommenen Ovarien und Vaginae wurden nach der Fixierung mit Formaldehyd entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Formalinfixierung reduziert die Antigenaffinität im Gewebe und mindert somit dessen Antigenizität. Der Grund für diese Minderung liegt in Aldehyd-Verbindungen, die zu veränderten Tertiär- und Quartärstrukturen der Epitope führen (Boenisch 2006, Grabenbauer et al. 2001, Karnati et al. 2008). Zur Demaskierung der Epitope ist eine Vorbehandlung der Paraffingewebeschnitte nötig, wobei meist verschiedene Proteasen, z.B. Trypsin oder Pepsin, zur Anwendung kommen. Durch die enzymatische Verdauung der Eiweißverbindungen werden die Epitope wieder freigelegt und die Antigenaffinität gesteigert. Die Dauer der enzymatischen Vorbehandlung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine große Rolle spielt hierbei die Art und Anwendungsdauer der Fixierungslösung, das Einbettmedium, die gewählten Parameter der Pufferlösung (pH, Molarität), das Gewebe und der Antikörper.

Zur Optimierung der Ergebnisse kann das enzymatische Verfahren mit einer Hitzeanwendung kombiniert werden, um die Rückfaltung der Proteine zu verbessern. Hierbei kommen meist Behandlungen mit Hilfe der Mikrowelle, des Autoklaven oder Kochprozesse zum Einsatz (Boenisch 2006, Grabenbauer 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die enzymatische Vorbehandlung mit Trypsin in Kombination mit Hitzebehandlung in Citratpuffer (pH 6,) mit Hilfe der Mikrowelle ausgewählt. Auf Erfahrungen unseres Labors basierend (Ahlemeyer et al., 2007, Nenicu et al., 2007, Karnati und Baumgart-Vogt, 2008) und auf Grund von eigenen Voruntersuchungen im Rahmen dieser Dissertation zeigten sich optimale Ergebnisse bei einer Einwirkdauer von 9 Minuten mit 0,01% Trypsin. Das Überschreiten dieser Zeit führte zu einer übermäßigen Verdauung und somit zur Zerstörung der Proteinstruktur. Im mikroskopischen Bild zeigte sich dann keine typische Markierung der Peroxisomen, sondern eine diffuse Färbung des Zytoplasmas.

5.3.2 Spezifität und Sensitivität der Antikörper

Um optimale Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zu erzielen, wurden die Antikörperkonzentrationen mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind der Tabelle 4.9 zu entnehmen.



Bei höheren Antikörperverdünnungen ergab sich neben der Detektion der peroxisomalen Proteine eine unspezifische Hintergrundfärbung, die besonders stark in den Corpora lutea ausgeprägt war und die die spezifische Markierung der Peroxisomen überlagerte. Bei einer optimalen Antikörperverdünnung und einer Gewebeschnittdicke von 1µm konnten die besten Ergebnisse mit schwacher Hintergrundfärbung erzielt werden.

Ein sensibler Schritt der Immunfluoreszenzfärbung war die Trypsinierung des Gewebes. Hierbei wurde auch besonders darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten. Die Proteasezeit durfte nicht zu lange gewählt werden, da sonst unspezifische Färbungen durch Austreten der DNA aus den Zellkernen und nachfolgender unspezifischer Bindung von Antikörpern auftraten. Diese wurden durch mitgeführte Negativkontrollen ausgeschlossen. Hierbei wurde der Primärantikörper durch die äquivalente Menge an PBS-Puffer ersetzt. Es wurde auch darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte voneinander getrennt gewaschen wurden, um bei diesem Vorgang eine Bindung des Primärantikörpers an die Gewebeschnitte der Negativkontrolle zu unterbinden. Die Spezifität und Sensitivität der Antikörper wurden bereits in verschiedenen anderen Studien belegt (Nenicu et al. 2007, Ahlenmeyer et al. 2007, Karnati and Baumgart-Vogt 2008).

5.4 Nachweis der peroxisomalen Proteine im Ovar

5.4.1 Quantifizierung der Peroxisomen in den verschiedenen Follikelstadien und Zyklusstadien mit Hilfe der PEX14-Markierung

Die Markierung für PEX14 erbrachte ein prominentes, punktförmiges Muster der peroxisomalen Proteine und war im Vergleich mit anderen Immunfluoreszenzfärbungen als bestes Markerprotein geeignet.

PEX14 ist Teil eines membranständigen Rezeptorkomplexes, der als Dockingstation für den PTS1 bindenden Importrezeptor PEX5p dient. Nach Bindung und Freisetzung der PTS1-haltigen Proteine in die peroxisomale Matrix, kann PEX5p nach ATP-abhängiger Ubiquitinierung wieder in das Zytosol diffundieren (Platta and Erdmann 2007).

Peroxisomen konnten mit Hilfe der PEX14-Markierung in allen Follikelstadien in Oozyten und umgebenden somatischen Zellen des Ovars dargestellt werden.

Besonders prominent war das Vorkommen der Peroxisomen in den Zellen der Corpora lutea und den Zellen der Theka externa. Ein wichtiger Befund der Arbeit ist, dass die Peroxisomenanzahl mit der Größe der Oozyten zunimmt. Im Gegenteil hierzu unterscheiden sich das Verteilungsmuster und die Intensität der Fluoreszenz der PEX14-Markierung in allen Stadien der Oozytenreifung nicht.

Mit der in Material und Methode beschriebenen Technik und Schnittdickenkorrektur konnten exakte Werte zu der relativen Flächendichte der Peroxisomen in Oozyten gemacht werden.

Neben dem Vergleich der Peroxisomen in den verschiedenen Follikelstadien, wurde auch das Peroxisomenvorkommen in den verschiedenen Zyklusphasen untersucht. Mikroskopisch war zwischen den Zellen des Ovars der verschiedenen Zyklusphasen kein Unterschied festzustellen. Das Verteilungsmuster, die Form und die Intensität der PEX14-markierten Proteine imponiert in Oozyte, Granulosazellen, Zellen der Theka interna und externa und Zellen der Corpora lutea im Vergleich in allen Zyklusphasen gleich.

Es wurde der Effekt des Zyklusstadiums auf die Dichte der Peroxisomen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet, wobei keine signifikanten Mittelwertsunterschiede gefunden werden konnten ($F_{3, 225}=0,005$; $p=1.0$). Signifikante Unterschiede zwischen den Follikelreifungsstadien wurden ebenfalls mittels einfaktorieller ANOVA untersucht, wobei sich ein signifikanter Haupteffekt des Follikelreifungsstadiums zeigte ($F_{3, 225}=7,03$; $p<0.001$). Im anschließenden post-hoc Test, der mit dem Bonferroni-Verfahren durchgeführt wurden, zeigte sich, dass dieser Effekt auf einen signifikanten Anstieg

der Peroxisomenflächendichte in den Tertiärfollikeln gegenüber den Primordial- und Sekundärfollikeln zurückging (jeweils $p < 0.001$).

Man kann konstatieren, dass die Zunahme der Peroxisomendichte der einzelnen Follikelstadien fast mit dem chronologischen Ablauf des Oestruszykluses verläuft. Die Ausnahme bilden hierbei die beiden kleinsten Follikel. Während die Dichte der Peroxisomen im Primordialfollikel bereits im Oestrus zu steigen beginnt, nimmt die Dichte der Peroxisomen im Primärfollikel bereits im vorangegangenen Prooetrus zu. Anschließend beginnt die Proliferation der Follikelstadien mit Chronologie der Zyklusstadien. Der Anstieg in den Sekundärfollikeln ist im Metroestrus zu sehen, während die Peroxisomen der Tertiärfollikel im anschließenden Metroestrus zu proliferieren beginnen.

Yoshida und Kollegen untersuchten 2008 die Anzahl von Follikeln in den einzelnen Zyklusstadien. Die höchste Anzahl an großen Follikeln konnte im Oestrus beschrieben werden, da in dieser Phase die Follikel ovulieren und das Tier brünstig ist. Die kleinen und mittleren Follikel konnten zum größten Anteil im Dioestrus nachgewiesen werden (Yoshida et al., 2009). Im Vergleich hierzu ist die höchste Peroxisomenflächendichte in den kleinen Follikeln (Primordial- und Primärfollikel) im Oestrus und Metroestrus zu sehen. Die Sekundärfollikel besitzen die größte Dichte an Peroxisomen im Dioestrus und die Tertiärfollikel im Prooestrus, so dass die Peroxisomenflächendichte nicht mit der von Yoshida und Kollegen beschriebenen Anzahl der jeweiligen Follikel korreliert.

5.4.2 Rolle der Peroxisomen in Entgiftungsprozessen der Zellen des Ovars

Unter physiologischen Bedingungen besteht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen antioxidativen Enzymen, Antioxidantien und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Ein Ungleichgewicht zugunsten der ROS ist meist in der Zunahme der ROS-Produktion oder in der Abnahme der antioxidativen Schutzmechanismen begründet. Oxidativer Stress führt zu einer Schädigung von DNA, Proteinen, Lipiden und gesteigerter Apoptose (Boveris et al., 1972, Khatun et al., 2013). Peroxisomen beherbergen sowohl ROS-produzierende und ROS-abbauende Enzyme.

Zu den peroxisomalen Oxdasen zählen Acyl-CoA-Oxidase, Urat-Oxidase, Xanthin-Oxidase und D-Aminosäure-Oxidase (Schrader und Fahimi, 2006), die zur Entstehung von Wasserstoffperoxid und anderen Radikalen führen.

Zu den antioxidativen Enzymen zählen die peroxisomale Katalase, die Glutathion Peroxidase, die Cu/Zn Superoxid Dismutase 1 und die Epoxid Hydrolase, die neben Wasser-

stoffperoxid auch Reaktive Stickstoffverbindungen z.B. Nitritoxid abbauen (Schrader und Fahimi, 2006). Hierbei ist zu erwähnen, dass die peroxisomale Katalase das schnellste Enzym zum Abbau von H_2O_2 darstellt und in einem großen Überschuss in Peroxisomen vorkommt, weshalb unter physiologischen Bedingungen die Zellen nicht durch peroxisomal-generierte ROS geschädigt werden.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von Enzymen mit antioxidativen Eigenschaften der α -Glutathion-S-transferase (α GST: GSTA1/2 und GSTA3/5) in den Ovarien des Prooestrus signifikant höher waren, als im Dioestrus (Lee et al., 2012). Ebenso wurde beschrieben, dass die Estradiolkonzentration im Prooestrus einen Peak erreicht, der im Dioestrus nicht zu finden ist (Smith et al., 1975).

Interessanterweise zeigten Singh und Pandey 1998, dass die Katalaseaktivität in den Ovarien die höchste Ausprägung im Metroestrus besitzt und die niedrigste Aktivität im Dioestrus zu finden war (Singh und Pandey, 1998).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Katalaseprotein als Vertreter der antioxidativen Enzyme nachgewiesen. Nach Markierung der Katalase zeigten sich im mikroskopischen Bild feine, runde Strukturen, die als Peroxisomen mittels Doppelmarkierung identifiziert werden konnten. Katalase war nur schwach in den Oozyten nachweisbar, dafür wurde eine starke Fluoreszenz in den Granulosazellen und Zellen der Corpora lutea gefunden. Qualitativ konnten keine Unterschiede zwischen der Intensität der Katalasefärbung und dem Peroxisomenvorkommen zwischen den einzelnen Zyklusphasen gefunden werden. Die von Singh und Pandey gemessene erhöhte Katalaseaktivität im Metroestrus wurde morphologisch in dieser Dissertation auf Grund des unveränderten peroxisomalen Katalaseproteinvorkommens nicht verifiziert. Singh und Pandey hatten gleichzeitig auch das Vorkommen der manganabhängigen Superoxiddismutase in Peroxisomen beschrieben, die Superoxidanionen zu H_2O_2 überführt. Als Bestandteil der peroxisomalen Membran inaktiviert die Superoxiddismutase die Superoxidanionen und stabilisiert das Redoxpotential der Membran (Singh et al., 1999). Besonders auffällig zeigte sich die SOD2-Markierung in den Granulosazellen. Die Peroxisomen imponierten nicht rund, wie in der PEX14-Markierung, sondern plump und stäbchenhaft. Es war eine diskrete Zunahme der Peroxisomenanzahl in Richtung zur Oocyte zu sehen. Ebenso stark war die Fluoreszenz in den Luteinzellen und Zellen der Theka externa zu sehen. Die Peroxisomen in den Oozyten imponierten weniger fluoreszierend, grob granulär und vereinzelt stäbchenhaft. Die Lokalisation und Form der Organellen sowie alle anderen Faktoren dieser Färbung widersprechen den biochemischen Befunden des Vorkommens von SOD2 in Peroxisomen von Singh und Kollegen. In der Tat konnten auch Karnati und Kollegen nachweisen,

dass SOD2 nicht in Peroxisomen vorkommt und vermuteten, dass die durch Singh und Pandey beschriebene Lokalisation auf eine biochemische Kontamination bei der Isolierung der Peroxisomenfraktionen zurückzuführen war (Karnati et al., 2013).

5.4.3 Peroxisomale β -Oxidation im Ovargewebe

Der Abbau der Fettsäuren erfolgt im Rahmen der β -Oxidation in den Mitochondrien und den Peroxisomen. Dabei unterscheidet sich der katabole Prozess der beiden Organellen in den Substraten. Während die Nahrungsfette (Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure) in den Mitochondrien abgebaut werden, katabolisieren Peroxisomen schwer lösliche, toxische und bioaktive Lipide, sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA), 2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure und Di- und Trihydroxycholestansäure (DHCA und THCA), sowie Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene) (Wanders, 2004). Fettsäuren werden nach Aktivierung durch die Acyl-CoA-Synthetase mit Hilfe eines membranständigen Transporters zur β -Oxidation in die peroxisomale Matrix importiert (Wanders and Waterham, 2006). Zu den am häufigsten in Peroxisomen vorkommenden Membrantransportern zählen die ABC-Transporter der (ATP-binding cassette)-Transportsysteme der D-Subfamilie. Diese Transporter katalysieren vermutlich ATP-abhängig den Transmembrantransport von peroxisomalen Lipid-Substraten. Mitglieder von anderen Subgruppen der großen Transporterfamilie sind in der Plasmamembran zu finden, ebenso in Membranen anderer intrazellulärer Organellen (z.B. Mitochondrien, Lysosomen, Endoplasmatisches Retikulum). Diese sind u.a. involviert in den Transport von Aminosäuren, Polysacchariden, Peptiden und Toxinen. ABC-Transporter lassen sich in Importer und Exporter unterteilen (Morita and Imanaka, 2012). Als ABC-Transporter der Subfamilie D konnten in Peroxisomen das Adrenoleukodystrophieprotein (ALDP/ABCD1), das ALDP-abhängige Protein (ALDPR/ABCD2) und das peroxisomale Membranprotein (PMP70/ABCD3) nachgewiesen werden (Holzinger et al., 1997, Kamijo et al., 1992, Lombard-Platet et al., 1996). Prominent in der peroxisomalen Membran liegt der ABCD3-Transporter, der sich verantwortlich für den Transport unterschiedlicher Fettsäuren zeigt. Zu diesen Fettsäuren zählen die Trihydroxycholestansäure, Dihydroxycholestansäure, und lang-kettige Fettsäuren (Morita and Imanaka, 2012). Dessen Überexpression stimuliert die C16:0 β -Oxidation und inhibiert die C24:0 β -Oxidation (Imanaka et al., 1999). In dieser Dissertation wurde der ABCD3-Transporter (früher PMP70 genannt) mit einem Primärantikörper markiert. Eine starke Fluoreszenz von rundlichen Strukturen in den Oozyten konnte nachgewiesen werden, deren Anzahl vom Sekundär- zum Tertiärfollikel zunahm. Eine intensive Markierung zeigte sich auch in den Zellen der Theka externa und den Luteinzellen. Die Granuloszellen und Zellen der Theka interna zeigten

eine schwächere, fein granuläre Expression von ABCD3. Auch im Hoden zeigten diese Transporter eine zellspezifische, charakteristische Verteilung. Von Nenicu und Kollegen wurde dieser Transporter bevorzugt in Sertoli-Zellen nachgewiesen. Weiterhin beschrieben Nenicu et al. 2007 zwei β -Oxidationswege in den somatischen Zellen von Hoden. Der erste β -Oxidationsweg führt die Katabolisierung der geradkettigen Acyl-CoAs und Eikosanoide durch die Enzyme Acyl-CoA-Oxidase (ACOX1), *multifunctional protein 1* (EHHADH oder MFP1) und Thiolase A durch. Beim zweiten Weg wird die Oxidation der Cholesterol-Seitenketten und des *branched-chain 2-methyl-Acyl-CoAs* mit Hilfe der Enzyme *branched-chain Acyl-CoA-Oxidase* (ACOX2 und ACOX3 in Mäusen), *multifunctional protein 2* (HSD17B4 oder MFP2) und *sterol carrier protein X* (SCPX) katalysiert (Nenicu et al., 2007). Ähnlich wie die ABCD-Transporter werden auch die β -Oxidationsenzyme in Sertoli-Zellen exprimiert.

Fan und Kollegen konnten 1996 zeigen, dass bei Mäusen homozygoter Deletion des ACOX1-Gens eine Sterilität der Mäuse in der 6.-20. Lebenswoche festgestellt wurde. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, ob die infertilen ACOX^{-/-} Mäuse mit zunehmendem Alter an Fertilität wieder gewinnen (Fan et al., 1996).

Wie bereits beschrieben unterscheiden sich die beiden peroxisomalen β -Oxidationswege durch die PPAR-Induzierbarkeit.

Im Ovar kommen alle drei Isoformen der PPAR-Familie (PPAR α , PPAR β und PPAR γ) vor. Da durch endogene Gewebshormone und Metabolite (Prostaglandine, Fettsäuren) und exogene Pharmaka (Herbizide, NSARs) Einfluss auf die Funktion der PPARs genommen werden kann und diese die Ovarfunktion mitbestimmen, kann über die Regulation der PPAR-Liganden auf die Fertilität Einfluss genommen werden (Komar, 2005). NSARs hemmen irreversibel die Cyclooxygenasen. Hierdurch werden vermindert Prostaglandine freigesetzt, die somit nicht zur Aktivierung der PPARs zur Verfügung stehen. Als Feedback-Mechanismus könnte hierbei die Induktion der peroxisomalen β -Oxidation zur Kontrolle der PPAR-Ligandenhomöostase eine wichtige Rolle spielen (Karnati und Baumgart-Vogt, 2008). Stone und Kollegen sprechen hierbei von einer „reversiblen weiblichen Infertilität“ durch Inhibition der Ovulation auf Grund der Einnahme von NSARs (Stone et al., 2002). Im Gegensatz hierzu führen die Prostaglandine (z.B. bei Entzündungsprozessen) zu einer Aktivierung der PPARs und somit zur Aktivierung der peroxisomalen Enzyme (Karnati und Baumgart-Vogt, 2008). Cui und Kollegen konnten zeigen, dass bei fehlendem PPAR γ ein Drittel der PPAR γ -Knockout-Mäuse steril bzw. zwei Drittel der Mäuse subfertil waren (Cui et al., 2002). Dies wirft die Frage auf, wie sehr der klinische Einsatz von PPAR γ -Aktivatoren (z.B. Fibrate oder Insulin-Sensitizer) die ovarielle Funktion durch den aktivierten Transkriptionsfaktor beeinflusst (Komar, 2005).

5.4.4 Gonadale Hormonproduktion

Das Enzym Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase wurde bisher in vielen verschiedenen humanen Isoformen beschrieben (Penning, 1997), wobei Typ 4 in Peroxisomen lokalisiert ist. Das N-terminale Ende dieses Enzyms besitzt Dehydrogenase-Aktivität, während der zentrale Teil als Hydratase wirkt und das C-terminale Ende für den Steroidtransport verantwortlich ist (Leenders et al., 1998). Das Enzym katalysiert in den Leydig-Zellen des Hodens die Reaktion von Androstendion zu Testosteron. In der Plazenta und den Ovarien ist das Enzym für den letzten Schritt in der Estrogenbiosynthese verantwortlich: die Reaktion von Estron zu 17 β -Estradiol (Penning, 1997). Das höchste Vorkommen des Enzyms ist in der Leber, den Nieren, den Ovarien und den Hoden zu finden (de Launoit und Adamski 1999). Die Inaktivierung der Steroidbiosynthese kann in einer Mutation des HSD17B4-Genes begründet sein. Die hierbei ansteigende Konzentration von Estrogen kann zu der Bildung eines Estrogen-abhängigen Tumors führen. Die Punktmutation G16A der Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase kann zu einem letalen peroxisomalen Syndrom führen (Leenders et al., 1998, van Grunsven et al., 1998).

In der vorliegenden Dissertation erbrachte die Antikörperfärbung gegen dieses Enzym eine starke Fluoreszenz in den Granulosa- und Luteinzellen, sowie auch die stärkste Färbung von allen peroxisomalen Matrixproteinen in Oozyten, obwohl diese auch schwächer als in Luteinzellen ausgeprägt war. Dies ist vermutlich auf die starke Steroidsynthese in diesen Zellen zurück zu führen. Im Gegensatz zu der hohen Dichte der Markierung in den Luteinzellen zeigte die Markierung in den Oozyten ein fein granuliertes Bild. Interessanterweise waren die Zellen der Theka interna kaum markiert.

Huyghe und Kollegen konnten 2006 zeigen, dass die Inaktivierung des HSD17B4-Genes zur Infertilität von männlichen Mäusen führt, die mit einer Akkumulation von lang-kettigen Fettsäuren und Atrophie der Hoden in Verbindung steht (Huyghe et al., 2006). In der Literatur werden keine Untersuchungen zur Infertilität bei weiblichen Mäusen mit einem Defekt des HSD17B4-Genes beschrieben. Die starke peroxisomale Ausstattung der Granulosa- und Luteinzellen lässt jedoch darauf schließen, dass auch die ovarielle Funktion durch einen HSD17B4-Defekt beeinflusst werden müsste. Es wurde jedoch lediglich bereits ein Zusammenhang zwischen dem Perrault-Syndrom mit Ovariendysgenese und einer Mutation des HSD17B4-Genes hergestellt (Pierce et al., 2010). In wie weit dieser sich bestätigen lässt, müssen zukünftige Studien zeigen.

5.4.5 Plasmalogensynthese der Peroxisomen in Ovarien

Essentiell für den Aufbau von Biomembranen sind Phospholipide, die zu einem großen Teil aus Plasmalogenen bestehen. Dabei werden die ersten beiden Schritte der Plasmalogen-Biosynthese in Peroxisomen vollzogen, wobei das Enzym Dihydroxyacetonphosphat-Acytransferase (GNPAT bzw. DAPAT) eine entscheidende Rolle spielt (Nagan and Zoeller, 2001).

Eine Mutation des DAPAT-Gens führt zu einer defekten Etherlipid-Synthese, die bei männlichen Mäusen zu atrophen Hoden und fehlenden Spermien in den Nebenhoden und damit zur kompletten Infertilität führt. Bei weiblichen Mäusen führt die Inaktivierung des Enzyms zu einer numerischen Reduktion der Sekundär- und Tertiärfollikel, der Corpora lutea und der Ovariengröße bei noch intakter Follikulogenese und Ovulation. Man kann im Fall der weibliche DAPAT-Knock-out-Mäusen von Subfertilität sprechen, da bei den Untersuchungen nur eine von sieben homozygoten Mäusen trächtig wurde (Rodermer et al., 2003).

5.5 Darstellung apoptotischer Zellen

Im Rahmen der Fluoreszenzfärbung von peroxisomalen Proteinen fielen immer wieder netzartige Strukturen in veränderten Oozyten auf. Diese waren in Eizellen zu finden, die durch Einziehungen und Einbuchtungen deformiert waren. Meist waren diese degenerierenden Eizellen in Sekundärfollikeln anzutreffen. Auf Grund der Oozytenformen vermuteten wir, dass es sich um apoptotische Zellen handelt und die Organisation der Apoptose hier im Zusammenhang mit den peroxisomalen Proteinenveränderungen stehen könnte.

Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der als Gegenspieler zur Mitose in der Embryologie und zur Organerhaltung im Körper dient. Nach Kondensation des Zellkerns und Fragmentierung der DNA kann typischerweise molekularbiologisch ein DNA-Leiter mit freien Hydroxygruppen am 3'-Ende nachgewiesen werden. Nach Schrumpfung der Zelle werden von diesen apoptotischen Zellen eine Vielzahl von Membran-umgebenden Vesikeln abgeschnürt, die von Makrophagen phagozytiert werden (Kerr et al. 1972).

Bereits 1999 konnten Perez und Kollegen eine Fragmentierung der DNA bei der Apoptose in Oozyten darstellen (Perez et al., 1999).

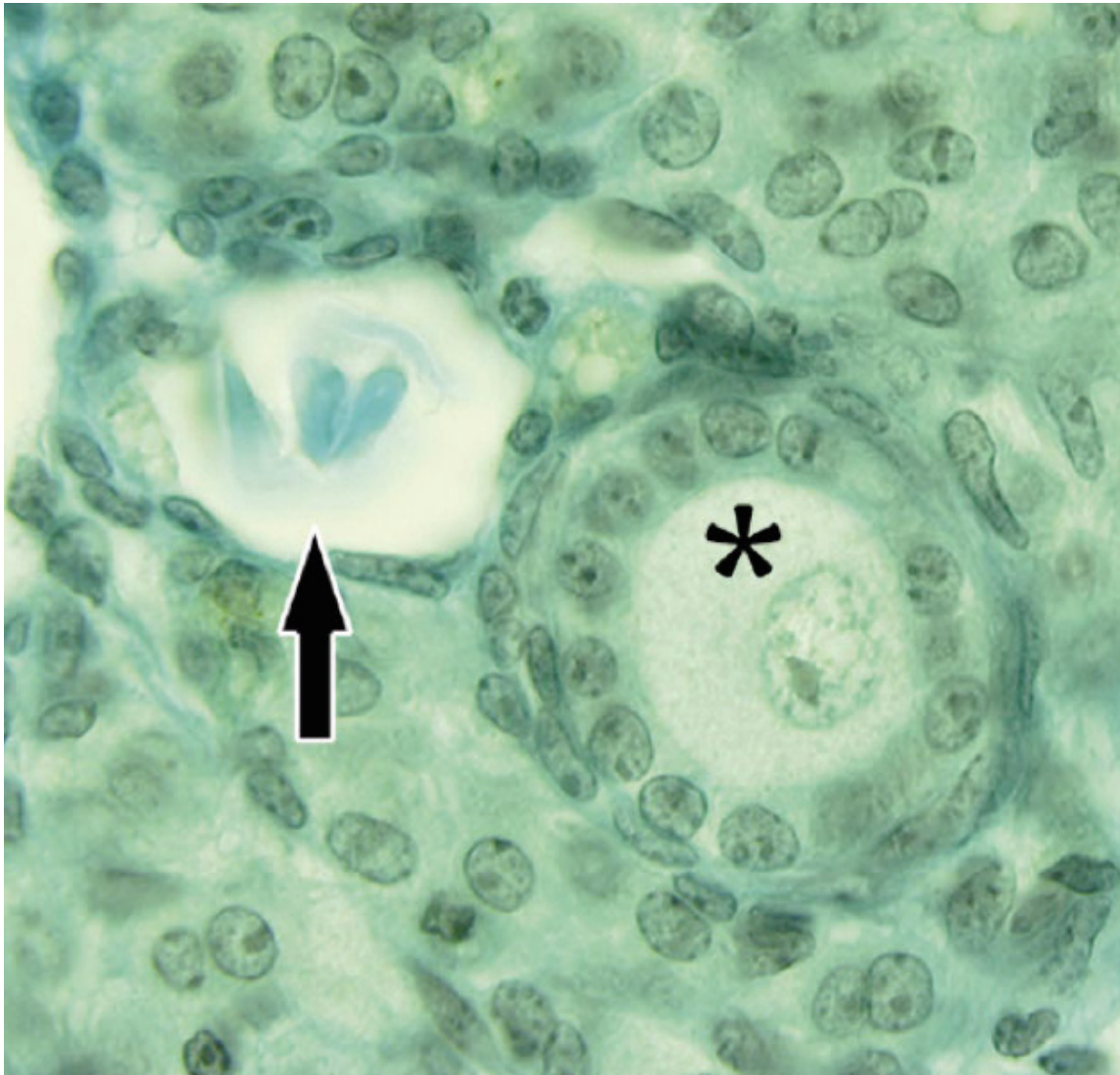


Abb. 5.1: Morphologie der murinen Oozyten in vivo postnatal; entnommen aus Perez (1999), Seite 9

Die Oozytenanzahl nimmt ab dem Zeitpunkt der Geburt durch Induktion der Apoptose in unreifen Follikeln (Primordialfollikel, Primärfollikel, präantrale Follikel) ab. Die Fragmentierung der Oozyte in verschiedene Fragmente ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. Im Vergleich hierzu ist eine intakte Oozyte mit einem Stern gekennzeichnet.

Diese Fragmentierung der DNA konnte auch in dieser Dissertation in den Oozyten, die eine netzartige Strukturierung des peroxisomalen Kompartiments auswiesen, gezeigt werden. Diese netzartige Umgestaltung des peroxisomalen Kompartiments ist in der Tat charakteristisch für apoptotische Eizellen. Um die Apoptose von Eizellen nachzuweisen, konnten Paraffingewebeschnitte von Ovarien verwendet werden, in denen die peroxisomalen Netzwerke bereits in anderen Immunfluoreszenzfärbungen aufgefunden wurden. Mit Hilfe des ApopTag® Red gelang es immer, die Apoptosen dieser Oozyten nachzuweisen.



Mittels TUNEL und Kernfärbung konnte fragmentierte DNA randständig in der deformierten Eizelle nachgewiesen werden, womit vom apoptotischen Zelltod dieser Zellen auszugehen ist. Welche Rolle und in welchem Zusammenhang die peroxisomalen Netzwerke im Rahmen der Apoptose spielen, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Ebenso werfen die Darstellungen die Frage auf, warum die Peroxisomen im Rahmen einer Apoptose die gezeigten Konfigurationen einnehmen und welche Signalwege diese Veränderung auslösen.

Interessanterweise kommen die netzartigen- und clusterartigen Veränderungen der Peroxisomen auch im Zytoplasma elongierter Spermatozoen vor (Nenicu et al., 2007). Diese Strukturen werden in Residualkörper eingeschleust, die von Sertoli-Zellen phagozytiert werden. In wie weit diese Veränderung im Zytoplasma elongierter Spermatozoen denen von apoptotischen Oozyten entsprechen, sollen in zukünftigen Studien unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt werden.

5.6 Auswirkung der Peroxisomendysfunktion in Ovarien bei AMH-cre induzierten granulosazellenspezifischen *Pex13* Knock-out Mäusen

Das dimere Glykoprotein Anti-Müller Hormon gehört zur TGF β –Familie (englisch transforming growth factor). Während der männlichen Fetalentwicklung wird das Hormon von den Sertoli-Zellen gebildet und induziert die Degeneration der Müller-Gänge. In humanen Ovarien wird das Anti-Müller Hormon (AMH) erst exprimiert, nachdem die Müller-Gänge ihre Sensitivität für das Hormon verloren haben. Das Hormon wurde so in der 36. Schwangerschaftswoche des Fetus nachgewiesen (Rajpert-De Meyts et al., 1999). Bei murinen Weibchen konnte das Hormon ab dem Tag der Geburt in den Ovarien nachgewiesen werden. Die prä-Granulosazellen von ruhenden Primordialfollikeln exprimieren kein AMH, sondern erst die Granulosazellen eines Primordialfollikels, der rekrutiert wurde und zu wachsen beginnt. Die höchste Konzentration an AMH wurde in den Granulosazellen von großen prä-antralen oder kleinen antralen Follikeln gemessen (Durlinger et al., 2002). Durlinger und Kollegen untersuchten 1999 Knock-out Mäuse für das AMH-Gen. Dabei konnten sie zeigen, dass diese Mäuse fertil waren und auch keine Unterschiede in Hinblick auf die Anzahl der Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bestanden. Interessant ist, dass jedoch bei 13 Monate alten Knock-out Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen keine Primordialfollikel mehr nachgewiesen werden konnten und es frühzeitig zu deren Depletion kam. AMH inhibiert somit die Rekrutierung von Primordialfollikeln in den Pool der wachsenden Follikel und spielt so eine wichtige Rolle bei der Regulation der ovariellen Follikelreifung. Dies führt bei AMH-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zur frühzeitigen Reduktion der Primordialfollikeln und somit zu einer vorzeitigen „Alterung“ der Ovarien (Durlinger et al., 1999, Gruijters et al., 2003). Die Qualität und Quantität des Follikelpools im Ovar, besonders die Anzahl der Primordialfollikel, determinieren die weibliche Fertilität (te Velde und Pearson, 2002). Die Aktivität des AMH-Promotors kann somit für die transgene Expression der cre-Rekombinase zum Ausschalten der peroxisomalen Biogenese in Follikelepithelzellen des Ovars durch cre/loxP-Technologie dienen. Hierzu wurden in unserer Abteilung AMH-cre Mäuse mit *Pex13-loxP* Mäusen verpaart und die heterozygoten Nachkommen mit homozygoten *Pex13-loxP* Mäusen zur Generierung eines granulosazellenspezifischen (gcs) *Pex13* Knock-out in weiblichen Nachkommen eingesetzt. Die *Pex13-loxP* Maus wurde bereits erfolgreich zur Generierung von neuronenspezifischen Peroxisomendysfunktion über Verkreuzung mit Nestin-cre Mäusen eingesetzt (Muller et al., 2011). Um den Einfluss der Peroxisomendysfunktion auf die Follikelepithelzellen zu untersuchen, habe ich orientierend im Rahmen dieser Arbeit auch eine gcs *Pex13* Knock-out Maus (EMH

14/10) untersucht, die im Vergleich zu altersgleichen Wildtypmäusen AMH-cre Mäusen im vergleichbaren Alter und Gewicht perfundiert wurde (Alter: 14 Wochen, Gewicht: 22,4 g). Zunächst konnten wir feststellen, dass bei Überprüfung des Zyklus mit Hilfe des Vaginalabstriches kein Unterschied zur Wildtyp-Maus bestand: bei der AMH-defizienten Maus konnte der Oestrus und damit das befruchtungsfähige Stadium nachgewiesen werden. Es konnten Schollen im Abstrich gesehen werden, ebenso zeigte das histologische Bild ein hoch aufgebautes, verhorntes Plattenepithel, das eine intakte Hormonregulation der Maus bewies. Auf Grund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass ähnlich zur von Durlinger und Kollegen beschriebenen Maus auch bei einer 14 Wochen alten gcs Pex13 Knock-out Maus eine normale Follikelreifung vorhanden sein sollte. Somit bestätigt unsere Beobachtung die Arbeit von Durlinger und Kollegen im Jahr 1999, die bei Knock-out Mäusen für das AMH-Gen Fertilität nachgewiesen haben (Durlinger et al., 1999). Makroskopisch auffällig im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen waren eindeutig kleinere Ovarien, dass eventuell für den vermehrten apoptotischen Untergang postnatal spricht. Die Bearbeitung der Ovarien erfolgte analog den Wildtyp-Mäusen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Orientierend haben wir in der Immunfluoreszenzfärbung das PEX14-Protein markiert. Es zeigten sich im mikroskopischen Bild keine deutlich sichtbaren Unterschiede in Form und Größe der Peroxisomen in den Oozyten, die auch nur indirekt von dem gcs Pex13 Knock-out betroffen sein sollten. Deutlich sichtbare Unterschiede waren auch nicht in der Färbung der Follikelepithelzellen nachzuweisen. Apoptosen waren in den Ovarien sehr offensichtlich. Zukünftige Studien der Arbeitsgruppe an diesen Knock-out Mäusen werden zu Klärung beitragen, in wie weit Peroxisomen in Follikelepithelzellen zu Apoptosen von Eizellen beitragen und damit zur vermehrten Alterung der Ovarien führen. Hierzu müssen jedoch die Ovarien wesentlich ältere Tiere eingesetzt werden.

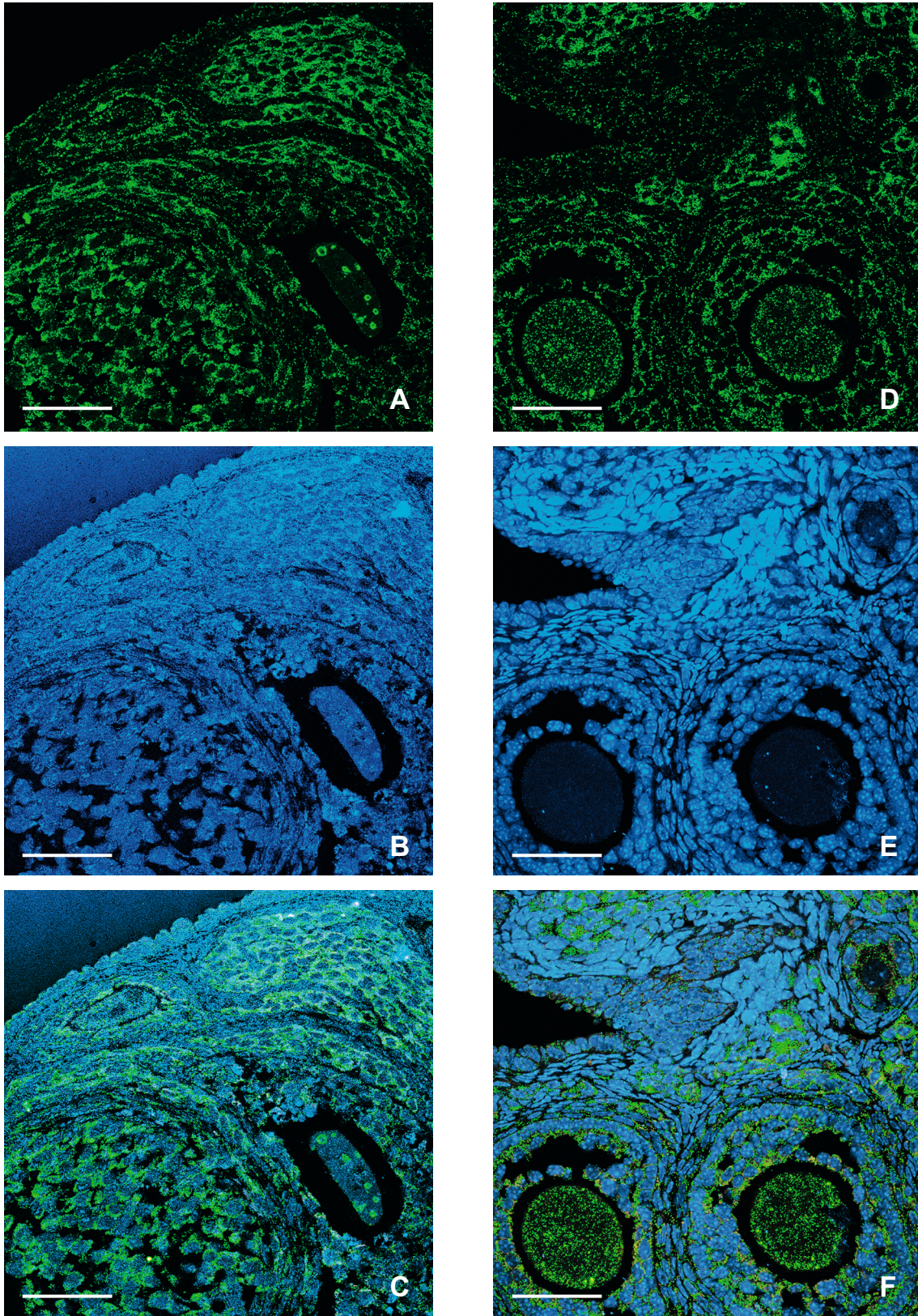


Abb. 5.2: PEX14-Markierung der AMH Knock-out Maus

In *gcs Pex13* knock-out Mäusen konnten apoptotische Oozyten nachgewiesen werden (Abbildung A-C). Deutliche Unterschiede zur Wildtyp-Maus waren nicht sichtbar.



Ausblick

Die Ergebnisse dieser Dissertation tragen dazu bei, die Funktion der Peroxisomen in Oozyten während der Follikelreifung besser zu verstehen. Die entwickelten Nachweisverfahren können zur späteren Charakterisierung dieser Knock-out Mäuse gut herangezogen werden. Es ist anzunehmen, dass durch den peroxisomalen Knock-out in Follikelepithelzellen vermehrt Lipidliganden akkumulieren, die zu einer kontinuierlichen Aktivierung von PPARs führen und Veränderung im gonadalen Hormonspiegel auslösen. Mittels dieser Knock-out Mäuse kann die peroxisomale Dysfunktion im gonadalen Steroidmetabolismus besser aufgeklärt werden. Eine selektive Induktion peroxisomaler Stoffwechselwege könnte zur verbesserten Ovarfunktion beitragen und somit einen Therapieansatz zur Steigerung bzw. Erlangung der weiblichen Fertilität führen.

6 Zusammenfassung

In allen eukaryotischen Zellen kommen Peroxisomen vor, die in vielen metabolischen Prozessen involviert sind. Die Funktion der Organellen erstreckt sich von Entgiftungsprozessen der Zelle über die Beteiligung an β -Oxidation und Plasmalogensynthese bis hin zum Metabolismus gonadaler Steroidhormone. Peroxisomen proliferieren durch Behandlung mit verschiedenen Pharmaka. Hierzu zählen insbesondere Fibrate, Insulin-Sensitizer, Prostaglandine und Leukotriene, die zur Aktivierung PPAR-abhängiger Gene, wie z.B. der Gene des ersten β -Oxidationsweges, führen. Peroxisomen im Ovar der Maus wurden bisher nur in einer Studie elektronenmikroskopisch beschrieben.

Hauptziel dieser Dissertation war deshalb eine umfangreiche Charakterisierung des peroxisomalen Kompartimentes im Ovar durchzuführen. Hierbei wurde nach Optimierung der Methode mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die enzymatische Ausstattung der Peroxisomen in den Oozyten und somatischen Zellen des Ovars nachgewiesen. Als peroxisomale Zielproteine wurden die Katalase, die Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase, der ABCD3-Transmembrantransporter, sowie PEX14 als Teil des membranständigen Rezeptorkomplexes des Biogenesekomplexes ausgewählt. Die Ovarien wurden auch weiterhin auf qualitative und quantitative Veränderungen der Peroxisomen während der Follikelentwicklung und der verschiedenen oestrischen Phasen des murinen Zyklus untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass signifikante Unterschiede in Peroxisomen zwischen den Follikelreifungsstadien vorhanden waren, wobei dieser Effekt auf einen signifikanten Anstieg der Peroxisomenflächendichte in den Tertiärfollikeln gegenüber den Primordial- und Sekundärfollikeln zurückging. Ebenso konnte ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium gefunden werden, der bei Ausschluss der Tertiärfollikel noch stärker wurde. Dies konnte durch eine lineare Zunahme der Peroxisomenflächendichte in den verschiedenen Follikelstadien zu unterschiedlichen Phasen des oestrischen Zyklus begründet werden.

In der Literatur sind erste Hinweise über die Auswirkungen von Defekten in der peroxisomalen Biogenese, die zu einer veränderten ovariellen Funktion und schließlich zur Subfertilität bzw. Infertilität führen. Der Einfluss von verschiedenen pharmakologischen Substanzen (Fibrate, Insulin-Sensitizer) und die Auswirkungen unterschiedlicher peroxisomaler Gendefekte sollen in zukünftigen Studien ausgetestet werden, um als neuer Ansatz für Therapiemöglichkeiten zur Steigerung bzw. Erlangung der weiblichen Fertilität zu dienen.

Summary

Peroxisomes, that are involved in many metabolic processes, can be found in all eukaryotic cells. The organelles' function includes detoxification processes of the cell, the participation in β -oxidation and the synthesis of plasmalogens and the metabolism of gonadal steroid hormones. Peroxisomes proliferate due to treatment with various pharmaceuticals. In this category belong particularly fibrates, insulin sensitizers, prostaglandins and leucotrienes, that lead to the activation of PPAR-dependent genes, as for example the genes of the first β -oxidation route. Until now, peroxisomes in the mouse's ovary using the electron microscope have just been described in one study. Therefore, the main goal of this dissertation was to perform an extensive characterization of the peroxisomal compartment in the ovary. After the optimization of the method through indirect immunofluorescence, the enzymatic features of the peroxisomes in the oocytes and the somatic cells of the ovary could be detected here. The catalase, hydroxysteroid-(17 β)-dehydrogenase, ABCD3-transmembrane transporter as well as PEX14, as part of the membrane-bound receptor complex of the biogenesis complex, were chosen as peroxisomal target proteins. The ovaries were still examined for quantitative and qualitative changes of the peroxisomes during the follicular development and the different oestric phases of the murine cycle. It could be noticed here, that significant differences existed in the peroxisomes between the follicular maturation stages, whereas this effect went back to a significant increase of the peroxisomal density in the tertiary follicles, compared to the primary and secondary follicles. Also, a significant interaction effect between follicular maturation and cycle stages could be observed, that even increased by excluding tertiary follicles. This could be justified on the linear increase of the peroxisomal areal density in the different follicular stages during different phases of the oestric cycle.

In the literature, one can find first indications of the effects of defects in the peroxisomal biogenesis, that lead to an altered ovarian function and finally to a sub-fertility or rather infertility. The impact of different pharmacological substances (such as fibrates, insulin sensitizers) and the effects of different peroxisomal genetic defects are to be tested in future studies, in order to serve as a fresh approach for possibilities of treatment for an increase or acquirement of female fertility.



7 Abkürzungsverzeichnis

ABCD3	peroxisomales Membranprotein
ACOX1	Acyl-Coenzym A-Oxidase 1
ACOX2	Acyl-Coenzym A-Oxidase 2
ACOX3	Acyl-Coenzym A-Oxidase 3
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ALDP	Adrenoleukodystrophie-Protein
Arg	Arginin
ATP	Adenosin 5`-triphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein (morphogenetisches Knochenprotein)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CHRS	Cerebrohepatorenales-Syndrom
CLSM	konfokale Laserscanning-Mikroskopie
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
DAB	3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPAT	Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase
DAPI	4`,6-Diamidino-2-phenylindol
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHCA	Dihydroxycholestansäure
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GDF	Growth differentiation factor (Wachstumsfaktor)
Glu	Glutaminsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
His	Histidin
Ile	Isoleucin
LDL	Low density lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)
Leu	Leucin
LH	Luteinisierendes Hormon (Luteotropin)
Lys	Lysin
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)



PBD	Peroxisome biogenesis disorder
PEX#	Gen des Peroxin# (humane Nomenklatur)
Pex#p	Peroxin# (humane Nomenklatur)
Pex#	Gen des Peroxin# (murine Nomenklatur)
PEX#p	Peroxin# (murine Nomenklatur)
PFA	Paraformaldehyd
PPAR	Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren
PTS	Peroxisomal targeting signal (peroxisomale Zielerkennungssequenz)
RCDP	rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SKL	Serin, Lysin, Leucin (C-terminales Tripeptid-peroxisomaler Matrxiproteine)
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase (Desoxyribonukleotidyltransferase)
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
THCA	Trihydroxycholestansäure
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Unit
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VLCFA	Very long chain fatty acid (sehr langkettige Fettsäuren)
VLDL	Very low density lipoprotein (Lipoprotein sehr niedriger Dichte)
ZP	Zona pellucida

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Anmerkung zu den Abbildungen

Die Abbildungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem elektronischen Bildbearbeitungsprogramm („Adobe Photoshop“) bearbeitet. Es wurde keine inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen und die Abbildungen erhalten nur die Originaldaten.

8.1 Tabellen

Tabellen in Einleitung

- Tabelle 1.1: Klassifikation entnommen aus Yoshiba et al. (2009), Seite 191
Tabelle 1.2: Zyklusveränderungen in Ovar und Vagina entnommen aus Zondek und Aschheim (1926), Seite 980
Tabelle 1.3: Follikelanzahl des Ovars entnommen aus Yoshida et al. (2009) Seite 195

Tabellen in Material und Methoden

- Tabelle 3.1: Chemikalien
Tabelle 3.2: Farblösungen
Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3.4: Primärantikörper
Tabelle 3.5: Sekundärantikörper
Tabelle 3.6: Geräte
Tabelle 3.7: Vorbereitung der Reagenzien (ELISA)
Tabelle 3.8: Pipettierschema ELISA
Tabelle 3.9: Durchführung (ELISA)
Tabelle 3.10: FSH Volumenreihe (ELISA)
Tabelle 3.11: Dosierung der Anästhesie
Tabelle 3.12: 4% Paraformaldehyd (PFA) mit 2% Saccharose
Tabelle 3.13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Tabelle 3.14: Azan-Färbung nach Heidenhain
Tabelle 3.15: Färbung nach Papanicolaou
Tabelle 3.16: PAS-Färbung
Tabelle 3.17: Durchführung Immunfluoreszenzfärbung
Tabelle 3.18: Vorbereitung der Reagenzien des ApopTag® Kit
Tabelle 3.19: Durchführung des ApopTag® Kit



Tabellen in Ergebnissen

- Tabelle 4.1: Übersicht der ausgewählten Tiere
- Tabelle 4.2: Messung der Standardkonzentration
- Tabelle 4.3: Extinktionswerte der FSH-Volumenreihe
- Tabelle 4.4: Konzentrationen der FSH-Volumenreihe
- Tabelle 4.5: Faktorenberechnung
- Tabelle 4.6: Extinktionswerte der Proben
- Tabelle 4.7: Extinktionen und Konzentrationen der Proben
- Tabelle 4.8: FSH-Konzentrationen der ausgewählten Tiere
- Tabelle 4.9: Darstellung der optimalen Antikörperkonzentrationen
- Tabelle 4.10: Statistische Auswertung
- Tabelle 4.11: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium

Tabellen im Anhang

- Tabelle 10.1: Subtraktion der Extinktionswerte
- Tabelle 10.2: Subtraktion des Leerwertes
- Tabelle 10.3: Subtraktion der Extinktionswerte
- Tabelle 10.4: Subtraktion des Leerwertes
- Tabelle 10.5: Extinktionswerte Standardvolumen 100 μ l
- Tabelle 10.6: Extinktionswerte Standardvolumen 80 μ l
- Tabelle 10.7: Extinktionswerte Standardvolumen 60 μ l
- Tabelle 10.8: Extinktionswerte Standardvolumen 40 μ l
- Tabelle 10.9: Subtraktion der Extinktionswerte
- Tabelle 10.10: Subtraktion des Leerwertes
- Tabelle 10.11: Standardisierte Residuen
- Tabelle 10.12: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium
(mit Tertiärfollikel)
- Tabelle 10.13: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium
(ohne Tertiärfollikel)

8.2 Abbildungen

Abbildungen in Einleitung

- Abb. 1.1: Humane Anatomie der Adnexe, Uterus und Cervix; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 256
- Abb. 1.2: Murine Anatomie der Ovarien, Uterus und Vagina; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 256
- Abb. 1.3: Vergleich von Ovar und Testes am 12.Tag; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 236
- Abb. 1.4: Darstellung der Keimzellwanderung; entnommen aus Kaufmann und Bard (1999), Seite 119
- Abb. 1.5: Größenverhältnis zwischen Oozyte und Follikelzelle; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 47
- Abb. 1.6: Klassifizierung der Follikel; entnommen aus Pedersen und Peters (1968), Seite 556
- Abb. 1.7: Histologie des murinen Ovars; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 260
- Abb. 1.8: Menschliches Ovar mit Oocyte und Primordialfollikeln aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 261
- Abb. 1.9: Muriner Oestruszyklus; entnommen aus Treuting und Dintzis (2012), Seite 270
- Abb. 1.10: FSH-Konzentrationen im Oestruszyklus; entnommen aus Murr et al. (1973), Seite 224
- Abb. 1.11: Biogenese der Peroxisomen
- Abb. 1.12: Matrixprotein-Import in Peroxisomen; entnommen aus Meinecke et al. (2010), Seite 277
- Abb. 1.13: Funktionen des PPARs; entnommen aus Kersten et al. (2000), Seite 422

Abbildungen in Material und Methoden

- Abb. 3.1: Durchführung des Vaginalabstriches
- Abb. 3.2: Standardverdünnungsreihe nach der Anleitung des ELISA-Kits
- Abb. 3.3: Präparation der Maus; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 193
- Abb. 3.4: Präparation der Ovarien; entnommen aus Nagy et al. (2003), Seite 195
- Abb. 3.5: Prinzip des TUNEL Assay; entnommen aus der Anleitung deApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kits, Seite

Abbildungen in Ergebnissen

- Abb. 4.1: Färbungen nach Giemsa und Papanicolaou
- Abb. 4.2: Vaginalabstriche
- Abb. 4.3: Vaginalhistologie
- Abb. 4.4: PAS-Färbung nach McManus der Vaginae
- Abb. 4.5: Histologie der Ovarien im Oestrus
- Abb. 4.6: Histologie der Ovarien im Metroestrus
- Abb. 4.7: Histologie der Ovarien im Dioestrus
- Abb. 4.8: Histologie der Ovarien im Prooestrus
- Abb. 4.9: Standardkurve (FSH)
- Abb. 4.10: Standardkurve (FSH) der Volumenreihe
- Abb. 4.11: ermittelte Unterschiede der Konzentrationen aus der Volumenreihe
- Abb. 4.12: Konzentrationen der Proben
- Abb. 4.13: FSH-Konzentrationen der ausgewählten Tiere
- Abb. 4.14: Kontrollen der Immunfluoreszenz
- Abb. 4.15: Darstellung des peroxisomalen Biogenesproteins PEX14p
- Abb. 4.16: Darstellung der peroxisomalen Katalase
- Abb. 4.17: Darstellung der Hydroxysteroid-(17 β)-Dehydrogenase 4
- Abb. 4.18: Darstellung ABCD3-Transporters (PMP70)
- Abb. 4.19: Darstellung von Mitochondrien im Vergleich zu Peroxisomen
- Abb. 4.20: Darstellung der mitochondrialen Superoxiddismutase (SOD2)
- Abb. 4.21: Primordialfollikel des Oestrus und Metroestrus
- Abb. 4.22: Primordialfollikel des Dioestrus und Prooestrus
- Abb. 4.23: Primärfollikel des Oestrus und Metroestrus
- Abb. 4.24: Primärfollikel des Dioestrus und Prooestrus
- Abb. 4.25: Sekundärfollikel des Oestrus und Metroestrus
- Abb. 4.26: Sekundärfollikel des Dioestrus und Prooestrus
- Abb. 4.27: Tertiärfollikel des Oestrus und Metroestrus
- Abb. 4.28: Tertiärfollikel des Dioestrus und Prooestrus
- Abb. 4.29: Flächenbestimmung der Peroxisomen
- Abb. 4.30: Messung der Schnitttiefe
- Abb. 4.31: Statistische Auswertung
- Abb. 4.32: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium
- Abb. 4.33: Darstellung peroxisomaler Netzwerke I
- Abb. 4.34: Darstellung peroxisomaler Netzwerke II
- Abb. 4.35: Darstellung einer apoptotischen Oozyte

Abbildungen in Diskussion

- Abb. 5.1: Morphologie der murinen Oozyten in vivo postnatal;
entnommen aus Perez (1999), Seite 9
- Abb. 5.2: PEX14-Markierung der AMH Knock-out Maus

9 Literatur

- AHLEMEYER, B., NEUBERT, I., KOVACS, W. J. & BAUMGART-VOGT, E. 2007. Differential expression of peroxisomal matrix and membrane proteins during postnatal development of mouse brain. *J Comp Neurol*, 505, 1-17.
- ALLEN, E. 1922. The oestrus cycle in the mouse. *American journal of anatomy*, 30, 297-371.
- BAKER, T. G. 1963. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 158, 417-33.
- BAUMGART, E. 1997. Application of in situ hybridization, cytochemical and immunocytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review including novel data. Robert Feulgen Prize Lecture 1997. *Histochem Cell Biol*, 108, 185-210.
- BAUMGART, E., FAHIMI, H. D., STEININGER, H. & GRABENBAUER, M. 2003. A review of morphological techniques for detection of peroxisomal (and mitochondrial) proteins and their corresponding mRNAs during ontogenesis in mice: application to the PEX5-knockout mouse with Zellweger syndrome. *Microsc Res Tech*, 61, 121-38.
- BENNINGHOFF, A. & DRENCKHAHN, D. (eds.) 2008. *Anatomie Band 1 - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, München: Elsevier, Urban&Fischer.
- BERGER, J. & MOLLER, D. E. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, 409-35.
- BIERBAUM, M., FALLER, A. & TRAEGER, J. 1989. Niels Stensen. *Anatom, Geologie und Bischof*.
- BOCK, P. 1972. [Peroxisomes in the mouse ovary]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 133, 131-40.
- BOVERIS, A., OSHINO, N. & CHANCE, B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 128, 617-30.
- BOWEN, P., LEE, C. S., ZELLWEGER, H. & LINDENBERG, R. 1964. A FAMILIAL SYNDROME OF MULTIPLE CONGENITAL DEFECTS. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 114, 402-14.
- CLAUBERG, C. 1931. Genitalcyclus und Schwangerschaft bei der weißen Maus (Anatomische Studien an Ovarium, Uterus und Scheide.) Dauer des Genitalcyclus. *Archiv für Gynäkologie*, 147, 549-596.
- CUI, Y., MIYOSHI, K., CLAUDIO, E., SIEBENLIST, U. K., GONZALEZ, F. J., FLAWS, J., WAGNER, K. U. & HENNIGHAUSEN, L. 2002. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem*, 277, 17830-5.

- DA SILVA, S. J. M., BAYNE, R. A. L., CAMBRAY, N., HARTLEY, P. S., MCNEILLY, A. S. & ANDERSON, R. A. 2004. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Developmental Biology*, 266, 334-345.
- DE DUVE, C. 1965. The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect*, 59, 49-87.
- DE DUVE, C. & BAUDHUIN, P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*, 46, 323-57.
- DE FELICI, M., SCALDAFERRI, M. L., LOBASCIO, M., IONA, S., NAZZICONE, V., KLINGER, F. G. & FARINI, D. 2004. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Hum Reprod Update*, 10, 197-206.
- DE LAUNOIT, Y. & ADAMSKI, J. 1999. Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J Mol Endocrinol*, 22, 227-40.
- DE VET, A., LAVEN, J. S., DE JONG, F. H., THEMME, A. P. & FAUSER, B. C. 2002. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*, 77, 357-62.
- DEMEESTERE, I., STREIFF, A. K., SUZUKI, J., AL-KHABOURI, S., MAHROUS, E., TAN, S. L. & CLARKE, H. J. 2012. Follicle-stimulating hormone accelerates mouse oocyte development in vivo. *Biol Reprod*, 87, 3, 1-11.
- DIEUAIDE-NOUBHANI, M., NOVIKOV, D., BAUMGART, E., VANHOOREN, J. C., FRANSEN, M., GOETHALS, M., VANDEKERCKHOVE, J., VAN VELDHOFEN, P. P. & MANNAERTS, G. P. 1996. Further characterization of the peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases from rat liver. Relationship between the different dehydrogenases and evidence that fatty acids and the C27 bile acids di- and tri-hydroxycoprostanic acids are metabolized by separate multifunctional proteins. *Eur J Biochem*, 240, 660-6.
- DONG, J., ALBERTINI, D. F., NISHIMORI, K., KUMAR, T. R., LU, N. & MATZUK, M. M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383, 531-5.
- DURLINGER, A. L., GRUIJTERS, M. J., KRAMER, P., KARELS, B., INGRAHAM, H. A., NACHTIGAL, M. W., UILENBROEK, J. T., GROOTEGOED, J. A. & THEMME, A. P. 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143, 1076-84.
- DURLINGER, A. L., KRAMER, P., KARELS, B., DE JONG, F. H., UILENBROEK, J. T., GROOTEGOED, J. A. & THEMME, A. P. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140, 5789-96.

- EPPIG, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122, 829-38.
- FAHIMI, H. D. 1968. Cytochemical localization of peroxidase activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Histochem Cytochem*, 16, 547-50.
- FAHIMI, H. D. 1969. Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol*, 43, 275-88.
- FAHIMI, H. D. & BAUMGART, E. 1999. Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review. *J Histochem Cytochem*, 47, 1219-32.
- FAN, C. Y., PAN, J., CHU, R., LEE, D., KLUCKMAN, K. D., USUDA, N., SINGH, I., YELDANDI, A. V., RAO, M. S., MAEDA, N. & REDDY, J. K. 1996. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem*, 271, 24698-710.
- FIGUEROA, C., KAWADA, M. E., VELIZ, L. P., HIDALGO, U., BARROS, C., GONZALEZ, S. & SANTOS, M. J. 2000. Peroxisomal proteins in rat gametes. *Cell Biochem Biophys*, 32 Spring, 259-68.
- FOX, J., BARTHOLD, S., DAVISSON, M., NEWCOMER, C., QUIMBY, F. & SMITH, A. (eds.) 2007. *The mouse in biomedical research*, Burlington, San Diego, London: Elsevier.
- GOLDFISCHER, S., MOORE, C. L., JOHNSON, A. B., SPIRO, A. J., VALSAMIS, M. P., WISNIEWSKI, H. K., RITCH, R. H., NORTON, W. T., RAPIN, I. & GARTNER, L. M. 1973. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science*, 182, 62-4.
- GRABENBAUER, M., FAHIMI, H. D. & BAUMGART, E. 2001. Detection of peroxisomal proteins and their mRNAs in serial sections of fetal and newborn mouse organs. *J Histochem Cytochem*, 49, 155-64.
- GRUIJTERS, M. J., VISSER, J. A., DURLINGER, A. L. & THEMME, A. P. 2003. Anti-Mullerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, 211, 85-90.
- HAWKINS, S. M. & MATZUK, M. M. 2008. The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci*, 1135, 10-8.
- HOLZINGER, A., KAMMERER, S., BERGER, J. & ROSCHER, A. A. 1997. cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 239, 261-4.
- HRUBAN, Z. & REHCIGL, M., JR. 1969. Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry, and physiology. *Int Rev Cytol*, Suppl 1:1-296.
- HUYGHE, S., SCHMALBRUCH, H., DE GENDT, K., VERHOEVEN, G., GUILLOU, F., VAN VELDHOVEN, P. P. & BAES, M. 2006. Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology*, 147, 2228-36.

- IMANAKA, T., AIHARA, K., TAKANO, T., YAMASHITA, A., SATO, R., SUZUKI, Y., YOKOTA, S. & OSUMI, T. 1999. Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J Biol Chem*, 274, 11968-76.
- ISSEMANN, I. & GREEN, S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347, 645-50.
- JAGARLAMUDI, K. & RAJKOVIC, A. 2012. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356, 31-39.
- KAMIJO, K., KAMIJO, T., UENO, I., OSUMI, T. & HASHIMOTO, T. 1992. Nucleotide sequence of the human 70 kDa peroxisomal membrane protein: a member of ATP-binding cassette transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1129, 323-7.
- KARNATI, S. & BAUMGART-VOGT, E. 2008. Peroxisomes in mouse and human lung: their involvement in pulmonary lipid metabolism. *Histochem Cell Biol*, 130, 719-40.
- KARNATI, S., LUERS, G., PFREIMER, S. & BAUMGART-VOGT, E. 2013. Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. *Histochem Cell Biol*, 140, 105-17.
- KAUFMANN, M. & BARD, J. 1999. The anatomical basis of mouse development. London: Academic Press.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KERSTEN, S., DESVERGNE, B. & WAHLI, W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405, 421-4.
- KHATUN, S., CHAUBE, S. K. & BHATTACHARYYA, C. N. 2013. Generation of hydrogen peroxide mediates hanging death-induced neuronal cell apoptosis in the dentate gyrus of the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 95, 54-60.
- KOMAR, C. M. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 41.
- KOMAR, C. M. & CURRY, T. E., JR. 2003. Inverse relationship between the expression of messenger ribonucleic acid for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and P450 side chain cleavage in the rat ovary. *Biol Reprod*, 69, 549-55.
- LAZAROW, P. B. 1977. Three hypolipidemic drugs increase hepatic palmitoyl-coenzyme A oxidation in the rat. *Science*, 197, 580-1.
- LAZAROW, P. B. & DE DUVE, C. 1976. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73, 2043-2046.
- LAZAROW, P. B. & FUJIKI, Y. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol*, 1, 489-530.

- LEE, S. Y., LEE, J.-Y., OH, S. J., KIM, H.-C. & KIM, S. K. 2012a. Expression of hepatic and ovarian antioxidant enzymes during estrous cycle in rats. *Toxicology Letters*, 212, 329-336.
- LEENDERS, F., DOLEZ, V., BEGUE, A., MOLLER, G., GLOECKNER, J. C., DE LAUNOIT, Y. & ADAMSKI, J. 1998. Structure of the gene for the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV. *Mamm Genome*, 9, 1036-41.
- LEVESQUE, S., MORIN, C., GUAY, S. P., VILLENEUVE, J., MARQUIS, P., YIK, W. Y., JIRALERSPONG, S., BOUCHARD, L., STEINBERG, S., HACIA, J. G., DEWAR, K. & BRAVERMAN, N. E. 2012. A founder mutation in the PEX6 gene is responsible for increased incidence of Zellweger syndrome in a French Canadian population. *BMC Med Genet*, 13, 72.
- LI, X. & GOULD, S. J. 2002. PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol*, 156, 643-51.
- LIANG, L., SOYAL, S. M. & DEAN, J. 1997. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*, 124, 4939-47.
- LOHRKE, B., VIERGUTZ, T., SHAHI, S. K., POHLAND, R., WOLLENHAUPT, K., GOLDAMMER, T., WALZEL, H. & KANITZ, W. 1998. Detection and functional characterisation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor gamma in lutein cells. *J Endocrinol*, 159, 429-39.
- LOMBARD-PLATET, G., SAVARY, S., SARDE, C. O., MANDEL, J. L. & CHIMINI, G. 1996. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1265-9.
- LONG, J. A. & EVANS, H. M. 1922. *The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena*, Berkeley, Calif., University of California Press.
- MCGRATH, S. A., ESQUELA, A. F. & LEE, S. J. 1995. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol*, 9, 131-6.
- MEINECKE, M., CIZMOWSKI, C., SCHLIEBS, W., KRUGER, V., BECK, S., WAGNER, R. & ERDMANN, R. 2010. The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol*, 12, 273-7.
- MOELLER, G. & ADAMSKI, J. 2006. Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 248, 47-55.
- MORITA, M. & IMANAKA, T. 2012. Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1387-96.
- MULISCH, M. & WELSCH, U. (eds.) 2012. *Romeis-Mikroskopische Technik*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- MULLER, C. C., NGUYEN, T. H., AHLEMEYER, B., MESHAM, M., SANTRAMPURWALA, N., CAO, S., SHARP, P., FIETZ, P. B., BAUMGART-VOGT, E. & CRANE, D. I. 2011. PEX13 deficiency in mouse brain as a model of Zellweger syndrome: abnormal cerebellum formation, reactive gliosis and oxidative stress. *Dis Model Mech*, 4, 104-19.

- MURR, S. M., GESCHWIND, II & BRADFORD, G. E. 1973. Plasma LH and FSH during different oestrous cycle conditions in mice. *J Reprod Fertil*, 32, 221-30.
- NAGAN, N. & ZOELLER, R. A. 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res*, 40, 199-229.
- NAGY, A., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K. & BEHRINGER, R. 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition)* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- NENICU, A., LUERS, G. H., KOVACS, W., DAVID, M., ZIMMER, A., BERGMANN, M. & BAUMGART-VOGT, E. 2007. Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod*, 77, 1060-72.
- NOVIKOFF, A. B. & GOLDFISCHER, S. 1969. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J Histochem Cytochem*, 17, 675-80.
- PARKENING, T. A., COLLINS, T. J. & SMITH, E. R. 1982. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol Aging*, 3, 31-5.
- PARKES, A. S. 1926. Observations on the Oestrous Cycle of the Albino Mouse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 100, 151-170.
- PEDERSEN, T. & PETERS, H. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*, 17, 555-7.
- PENNING, T. M. 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev*, 18, 281-305.
- PEREZ, G. I., ROBLES, R., KNUDSON, C. M., FLAWS, J. A., KORSMEYER, S. J. & TILLY, J. L. 1999. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet*, 21, 200-3.
- PIERCE, S. B., WALSH, T., CHISHOLM, K. M., LEE, M. K., THORNTON, A. M., FIUMARA, A., OPITZ, J. M., LEVY-LAHAD, E., KLEVIT, R. E. & KING, M. C. 2010. Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault Syndrome. *Am J Hum Genet*, 87, 282-8.
- PLATTA, H. W. & ERDMANN, R. 2007. Peroxisomal dynamics. *Trends in Cell Biology*, 17, 474-484.
- RAJPERT-DE MEYTS, E., JORGENSEN, N., GRAEM, N., MULLER, J., CATE, R. L. & SKAKKEBAEK, N. E. 1999. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 3836-44.
- REDDY, J. & SVOBODA, D. 1972. Microbodies (peroxisomes) identification in interstitial cells of the testis. *J Histochem Cytochem*, 20, 140-2.
- REUTER, P. 2004. *Springer Lexikon Medizin*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer.

- RHODIN, J. 1954. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Doctoral Thesis. Aktiebolaget Godvil, Stockholm: Karolinska Institutet.
- RHODIN, J. 1955. Electron microscopy of the glomerular capillary wall. *Exp Cell Res*, 8, 572-4.
- RODEMER, C., THAI, T. P., BRUGGER, B., KAERCHER, T., WERNER, H., NAVE, K. A., WIELAND, F., GORGAS, K. & JUST, W. W. 2003. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet*, 12, 1881-95.
- ROELS, F., D'HERDE, K., VAMECQ, J., KERCKAERT, I., DACREMONT, G., ESPEEL, M. (ed.) 1996. Peroxisomes in oocytes. *Histochemistry and Cytochemistry. Proceedings of the Xth International Congress*, Kyoto, Japan.
- SAHA, L., KAUR, S. & SAHA, P. K. 2012. Pharmacotherapy of polycystic ovary syndrome--an update. *Fundam Clin Pharmacol*, 26, 54-62.
- SCHOPPEE, P. D., GARMEY, J. C. & VELDHIJS, J. D. 2002. Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biol Reprod*, 66, 190-8.
- SCHRADER, M. & FAHIMI, H. D. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763, 1755-1766.
- SINGH, A. K., DOBASHI, K., GUPTA, M. P., ASAYAMA, K., SINGH, I. & ORAK, J. K. 1999. Manganese superoxide dismutase in rat liver peroxisomes: biochemical and immunochemical evidence. *Mol Cell Biochem*, 197, 7-12.
- SINGH, D. & PANDEY, R. S. 1998. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide level in rat ovary during estrous cycle and induction of catalase in rat ovary by estradiol-17 beta. *Indian J Exp Biol*, 36, 421-3.
- SMITH, M. S., FREEMAN, M. E. & NEILL, J. D. 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96, 219-26.
- STEINBERG, S. J., DODT, G., RAYMOND, G. V., BRAVERMAN, N. E., MOSER, A. B. & MOSER, H. W. 2006. Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1733-48.
- STENSEN, N. 1667. *Historia dissecti piscis ex canum genere Elementarum myologiae specimen*, 111-119.
- STONE, S., KHAMASHTA, M. A. & NELSON-PIERCY, C. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and reversible female infertility: is there a link? *Drug Saf*, 25, 545-51.
- TE VELDE, E. R. & PEARSON, P. L. 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*, 8, 141-54.
- TERLECKY, S. R., KOEPKE, J. I. & WALTON, P. A. 2006. Peroxisomes and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1749-54.

- THOMS, S. & ERDMANN, R. 2005. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS Journal*, 272, 5169-5181.
- TREUTING, P. & DINTZIS, S. (eds.) 2012. *Comparative Anatomy and Histology-a mouse and human atlas*, London, Waltham, San Diego: Elsevier, Academic Press.
- VAN GRUNSVEN, E. G., VAN BERKEL, E., IJLST, L., VREKEN, P., DE KLERK, J. B., ADAMSKI, J., LEMONDE, H., CLAYTON, P. T., CUEBAS, D. A. & WANDERS, R. J. 1998. Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2128-33.
- WANDERS, R. J. 2004. Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am J Med Genet A*, 126A, 355-75.
- WANDERS, R. J., JANSEN, G. A. & SKJELDAL, O. H. 2001. Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 1021-31.
- WANDERS, R. J. & WATERHAM, H. R. 2006. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1707-20.
- WHITTEN, W. K. 1958. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *J Endocrinol*, 17, 307-13.
- WIEH, H. (ed.) 1988. Niels Stensen. Sein Leben in Dokumenten und Bildern, Würzburg: Echter Verlag
- YOSHIDA, M., SANBUISSYO, A., HISADA, S., TAKAHASHI, M., OHNO, Y. & NISHIKAWA, A. 2009. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J Toxicol Sci*, 34 Suppl 1, SP189-97.
- ZELLWEGER, H., MAERTENS, P., SUPERNEAU, D. & WERTELECKI, W. 1988. History of the cerebrohepatorenal syndrome of Zellweger and other peroxisomal disorders. *South Med J*, 81, 357-64.
- ZETTL, U., LEHMITS, R. & MIX, E. 2005. *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: Walter De Gruyter Verlag.
- ZONDEK, B. & ASCHHEIM, S. 1926. Der Scheidenzyklus der Weissen Maus als Testobjekt zum Nachweis des Ovarialhormons. *Klinische Wochenschrift*, 5, 979-985.



10 Anhang

10.1 ELISA

10.1.1 Ermittlung der Standardkurve

Standardkonzentration	Extinktion (450nm – 570nm)
20 mlU/ml	1,057
10 mlU/ml	0,599
5 mlU/ml	0,267
2,5 mlU/ml	0,154
1,25 mlU/ml	0,078
0,625 mlU/ml	0,05
0,312 mlU/ml	0,016
0 mlU/ml (Leerwert)	0,017

Tabelle 10.1: Subtraktion der Extinktionswerte

Standardkonzentration	Extinktion
20 mlU/ml	1,04
10 mlU/ml	0,582
5 mlU/ml	0,25
2,5 mlU/ml	0,137
1,25 mlU/ml	0,061
0,625 mlU/ml	0,033
0,312 mlU/ml	-0,001

Tabelle 10.2: Subtraktion des Leerwertes



10.1.2 FSH-Volumenreihe

Standardkonzentration	Extinktion (450nm – 570nm)
20 mIU/ml	2,907
10 mIU/ml	2,119
5 mIU/ml	0,814
2,5 mIU/ml	0,321
1,25 mIU/ml	0,124
0,625 mIU/ml	0,072
0,312 mIU/ml	0,057
0 mIU/ml (Leerwert)	0,035

Tabelle 10.3: Subtraktion der Extinktionswerte

Standardkonzentration	Extinktion
20 mIU/ml	2,872
10 mIU/ml	2,084
5 mIU/ml	0,779
2,5 mIU/ml	0,286
1,25 mIU/ml	0,089
0,625 mIU/ml	0,037
0,312 mIU/ml	0,022

Tabelle 10.4: Subtraktion des Leerwertes

Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)	Extinktion (450nm-570nm)	Extinktion - Leerwert
2,302	0,145	2,157	2,122
2,118	0,066	2,052	2,017
1,87	0,077	1,793	1,758

Tabelle 10.5: Extintionswerte Standardvolumen 100µl

Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)	Extinktion (450nm-570nm)	Extinktion - Leerwert
1,779	0,067	1,712	1,677
1,509	0,08	1,429	1,394
1,348	0,059	1,289	1,254

Tabelle 10.6: Extinktionswerte Standardvolumen 80µl



Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)	Extinktion (450nm-570nm)	Extinktion - Leerwert
1,184	0,1	1,084	1,049
1	0,093	1,153	1,118
0,799	0,074	0,725	0,69

Tabelle 10.7: Extinktionswerte Standardvolumen 60µl

Extinktion (450nm)	Extinktion (570nm)	Extinktion (450nm-570nm)	Extinktion - Leerwert
0,504	0,073	0,431	0,396
0,447	0,066	0,381	0,346
0,462	0,067	0,395	0,36

Tabelle 10.8: Extinktionswerte Standardvolumen 40µl

Proben	Extinktion (450nm – 570nm)
EMH 05/09	0,024
EMH 06/09	0,01
EMH 19/09	0,015
EMH 20/09	0,151
EMH 03/10	0,02
EMH 04/10	0,014
EMH 06/10	0,021
EMH 07/10	0,008
EMH 09/10	-0,006
EMH 10/10	0,029
EMH 14/10	0,038

Tabelle 10.9: Subtraktion der Extinktionswerte

Proben	Extinktion - Leerwert
EMH 05/09	0,007
EMH 06/09	-0,007
EMH 19/09	-0,002
EMH 20/09	0,134
EMH 03/10	0,003
EMH 04/10	-0,003
EMH 06/10	0,004
EMH 07/10	-0,009
EMH 09/10	-0,023
EMH 10/10	0,012
EMH 14/10	0,021

Tabelle 10.10: Subtraktion des Leerwertes





	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
	Untergren- ze	Obergren- ze	Untergrenze	Ober- grenze	Untergrenze	Obergrenze	Unter- grenze	Ober- grenze
primordial	32	-,3409	,65937	,11656	-,5786	-,1032	-2,29	,80
primär	39	-,0753	,81037	,12976	-,3380	,1874	-1,50	2,04
sekundär	72	-,1957	,84259	,09930	-,3937	,0023	-2,20	3,82
tertiär	86	,3248	,96644	,10421	,1176	,5320	-2,15	4,07
Gesamt	229	,0000	,89834	,05936	-,1170	,1170	-2,29	4,07

Tabelle 10.11: Standardisierte Residuen

Follikel	Zyklus	Mittelwert Untergrenze	Standardfehler Obergrenze	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Primordial	Dioestrus	-,011	,256	-,515	,493
	Metoestrus	,229	,379	-,518	,976
	Oestrus	-,901	,268	-1,430	-,373
	Prooestrus	-,487	,346	-1,169	,195
Primär	Dioestrus	-,296	,268	-,825	,232
	Metoestrus	,176	,256	-,328	,679
	Oestrus	,499	,300	-,091	1,090
	Prooestrus	-,590	,268	-1,119	-,062
Sekundär	Dioestrus	-,046	,206	-,451	,359
	Metoestrus	-,395	,200	-,788	-,001
	Oestrus	-,214	,194	-,597	,169
	Prooestrus	-,119	,200	-,512	,275
Tertiär	Dioestrus	,193	,189	-,180	,567
	Metoestrus	,229	,189	-,145	,602
	Oestrus	,337	,163	,015	,658
	Prooestrus	,548	,194	,165	,931

Tabelle 10.12: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium (mit Tertiärfollikel)



Follikel	Zyklus	Mittelwert Untergrenze	Standardfehler Obergrenze	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
primordial	Dioestrus	-,011	,228	-,462	,441
	Metoestrus	,229	,339	-,440	,899
	Oestrus	-,901	,239	-1,375	-,428
	Prooestrus	-,487	,309	-1,098	,124
Primär	Dioestrus	-,296	,239	-,770	,177
	Metoestrus	,176	,228	-,276	,627
	Oestrus	,499	,268	-,030	1,029
	Prooestrus	-,590	,239	-1,064	-,117
sekundär	Dioestrus	-,046	,184	-,409	,317
	Metoestrus	-,395	,178	-,748	-,042
	Oestrus	-,214	,174	-,558	,129
	Prooestrus	-,119	,178	-,472	,234

Tabelle 10.13: Interaktionseffekt zwischen Follikelreifungs- und Zyklusstadium (ohne Tertiärfollikel)

10.2 Statistische Auswertung

Zyklus: 1=Dioestrus; 2=Metöestrus; 3= Öestrus; 4=Proöestrus
 ZRE_1=standardisierte Residuen für Fläche_pxges von Schnittdicke
 ZRE_2=stand Res für ZRE_1 von Tier
 ZRE_3=stand Res für ZRE_2 von Schnitt

Schnitt	Follikel	Count_ range	Fläche_ px	Fläche_ ges	Fläche_ pxges	Schnitt- dicke	ZRE_1	ZRE_2	ZRE_3
192	3	546	1407,787	14692	9,582	2,122	-0,81	-0,152	-0,15
194	3	371	1057,987	13182	8,026	2,816	-0,447	0,246	0,32
194	3	660	1294,133	15317	8,449	2,816	-0,639	0,035	0,2
194	3	768	1310,36	19082	6,867	2,344	-1,066	-0,433	-0,34
194	3	7152	3258,003	116900	2,787	2,344	0,598	0,621	0,35
194	1	36	13,58	475	2,858	2,344	-0,151	-1,012	-1,36
194	3	889	1362,755	24563	5,548	2,344	-0,877	-1,808	-2,29
202	1	21	8,757	231	3,791	3,126	0,688	-0,092	-0,29
202	3	836	964,164	15531	6,208	3,126	0,562	-0,23	-0,45
202	3	1494	1700,281	25653	6,628	3,126	-0,262	-1,134	-0,98
202	1	21	8,757	231	3,791	3,126	-0,117	0,216	-0,93
202	1	14	10,818	282	3,836	3,126	-0,31	0,005	-1,17
202	2	323	273,986	5483	4,997	3,126	-0,661	-0,381	-0,41
202	2	499	1270,097	14803	8,58	3,126	-1,116	-0,879	-0,61
202	0	16	14,119	298	4,738	3,126	-1,04	-0,796	-0,51
202	0	14	33,089	448	7,368	2,998	-1,088	-0,966	-1,2
210	1	11	1,908	126	1,514	3,108	-0,968	-0,835	-0,6
210	3	1109	3503,082	31384	11,162	2,856	-0,788	-0,638	-0,37
210	0	23	23,719	398	5,959	3,108	-0,934	-0,798	-0,59
210	2	304	493,309	8847	5,576	3,108	-0,439	-0,255	0,04
210	2	401	674,611	9367	7,202	3,108	-0,333	-0,138	-0,2
210	0	25	5,897	201	2,934	3,108	-0,094	-0,355	0,58
210	1	20	17,79	416	4,246	2,856	-0,908	-1,248	-0,47
210	1	17	6,348	230	2,76	2,856	-0,351	-0,636	0,59
210	2	93	55,68	1642	3,391	2,856	-0,744	-1,068	0,09
210	3	608	377,252	9217	4,093	3,108	0,532	0,402	0,8
222	2	1393	4399,337	26534	16,58	2,76	-0,743	-0,997	-0,84
223	2	727	867,685	15322	5,663	2,264	1,4	1,354	0,74
233	2	119	240,257	3813	6,301	2,648	-0,151	-0,347	0
96	2	286	198,376	5026	3,947	1,862	-1,135	-1,426	-0,22
137	2	114	96,924	2930,00	3,308	1,82	-1,208	-1,506	-0,31
137	1	24	18,713	421	4,445	1,82	-1,21	-1,508	-0,32
137	2	204	133,826	4847	2,761	1,82	-1,12	-0,492	-0,54
137	1	32	23,382	542	4,314	1,82	-0,944	-0,299	-0,32
137	3	771	2014,837	26126	7,712	1,82	-0,944	-0,299	-0,32
211	3	1252	7251,313	51134	14,181	3,238	3,238	-0,937	-0,292
211	2	176	342,109	6366	5,37400	3,238	-1,266	-0,652	-0,6
211	3	1426	6427,874	54043	11,894	3,238	-0,895	-0,245	-0,13
211	1	66	133,605	1208	11,06	3,238	-1,105	-0,475	-0,39
211	2	423	1548,606	14879	10,408	3,238	-0,926	-1,105	-0,01
211	1	72	179,596	1830	9,814	3,238	-0,945	-1,071	-0,04
211	0	53	167,747	1143	14,676	3,238	0,088	0,062	-0,3
211	3	930	17438,677	71655	24,337	3,238	-0,088	-0,131	-0,52
212	3	201	476,280	4549	10,47	2,52	-0,742	-0,848	-1,5
212	2	207	331,316	5176	6,401	2,76	1,301	0,58	0,5
212	3	1249	7303,639	50681	14,411	2,76	2,51	1,905	2,04
212	3	1402	6539,162	53069	12,322	2,76	1,677	0,992	1,5
212	3	1027	6357,338	25552	24,88	2,76	1,368	0,654	0,79
224	1	8	22,581	422	5,351	2,808	0,076	0,427	-0,68
224	3	1232	12733,868	66862	19,045	2,808	-0,709	-0,433	-0,09
224	3	1196	5890,563	42931	13,721	2,808	-1,127	-0,892	-0,19
224	2	485	4816,079	29532	16,308	2,584	-0,878	-0,619	0,13
224	2	646	3564,127	25344	14,063	2,584	-0,208	-0,001	-0,7
235	2	212	394,990	5042	7,834	2,184	0,639	0,928	0,39
236	2	244	176,822	5109	3,461	1,778	-0,769	-0,617	-1,42
128	1	212	1815,775	9103	19,947	2,534	-0,964	-0,83	-1,04
128	3	6071	36890,089	125532	29,387	2,486	-0,501	-0,323	-0,45
128	2	656	596,325	6293	9,476	2,486	-0,546	-0,372	-0,06
128	3	1191	4926,922	19474	25,3	2,486	-0,69	-0,53	-0,24
128	0	20	31,527	326	9,671	2,486	-1,026	-0,898	-0,67
128	2	3982	33754,677	88022	38,348	2,486	-1,103	-0,982	-0,95
128	0	18	12,212	270	4,523	2,486	-0,772	-0,619	-0,77
128	0	13	41,862	368	15,62	2,486	2,15	2,106	1,46
128	0	54	146,082	992	14,726	2,486	2,129	2,083	1,43
128	2	505	648,106	6260	10,354	2,486	0,512	0,31	-0,64
128	3	1871	16952,605	67323	25,181	2,534	2,192	2,152	1,51
128	2	742	840,334	12629	6,654	2,534	0,877	0,71	0,55
128	3	1707	9121,436	48796	18,693	2,534	-0,127	-0,391	0
128	1	207	787,769	2761	28,532	2,486	-0,783	-1,04	-0,7
128	3	676	4110,712	27103	15,167	2,534	1,997	2,008	0,15



128	3	743	3539,363	25531	13,863	2,534	-0,823	-1,084	0,18	218	3	346	419,386	6472	6,48	2,872	1,634	2,018	1,66
128	3	1294	7497,587	50499	14,847	2,534	-0,774	-0,112	-0,1	218	0	14	5,263	164	3,209	2,872	-0,42	-0,234	-0,97
128	3	1218	2110,938	22364	9,439	2,534	-0,268	0,442	0,55	218	3	1032	1687,063	16874	9,998	4,314	1,398	1,759	1,98
129	3	2278	5314,394	44294	11,998	2,856	-0,693	-0,024	0,13	218	2	187	237,212	4124	5,752	2,872	-0,398	-0,21	-0,32
129	3	1126	3607,191	27705	13,02	2,856	-0,464	0,227	0,43	90	2	396	374,961	7828	4,79	2,182	-0,415	-0,229	-0,34
129	2	555	857,602	8340	10,283	2,856	-1,016	-0,378	-0,28	90	1	40	17,072	594	2,874	2,182	-0,573	-0,402	-0,54
129	3	2071	19621,539	89547	21,912	2,858	0,839	1,656	0	90	1	75	63,123	1361	4,638	2,182	-0,671	-0,508	-0,67
129	3	2099	12252,647	64342	19,043	2,858	-0,729	-0,064	0	90	2	382	297,798	8808	3,381	2,182	-0,501	-0,323	-0,45
129	0	22	23,224	266	8,731	2,858	-0,617	0,059	0	91	2	333	200,324	5704	3,512	2,44	0,127	0,365	0,35
129	1	73	391,515	1742	22,475	2,858	-0,994	-0,354	0	134	2	439	706,714	9214	7,67	2,78	-0,728	-0,571	-0,29
129	2	1389	2956,988	25038	11,81	2,858	-1,087	-1,226	-0,22	135	2	599	2427,812	18118	13,4	3,16	-0,686	-0,525	-0,24
129	2	182	230,656	2760	8,356	2,858	-1,164	-1,311	-0,32	135	3	561	3145,611	22443	14,016	3,16	-0,291	-0,092	0,27
130	3	1239	5031,298	32790	15,344	2,408	-0,714	-0,818	-1,33	135	1	67	196,451	2184	8,995	3,16	-1,035	-0,908	-0,86
130	3	1468	3793,117	38595	9,828	2,408	-0,004	-0,039	-0,42	135	2	419	2950,511	13381	22,05	3,16	-0,636	-0,47	-0,35
130	3	1745	4202,356	33762	12,447	2,408	-0,597	-0,689	-1,31	135	3	606	3986,111	23620	16,876	3,16	-0,127	0,087	0,06
130	3	239	404,245	4538	8,908	2,648	0,791	0,832	0,46	135	1	77	228,135	1521	14,999	3,16	-0,95	-0,815	-0,99
130	2	1299	4122,5	27989	14,729	2,648	0,474	0,485	0,06	135	1	34	41,808	834	5,013	3,16	1,15	1,009	0,18
130	2	1000	2080	14934	13,928	2,648	-0,427	-0,503	0	135	2	186	396,221	5290	7,49	3,16	-0,703	-1,023	-2,2
130	2	1309	7893,528	32968	23,943	2,648	-1,068	-1,205	0	146	3	908	4614,901	33032	13,971	2,52	-0,824	-1,155	-0,36
130	1	103	511,566	2511	20,373	2,648	-0,178	-1,042	-1,4	146	2	961	5776,370	27989	20,638	2,52	-0,962	-1,306	-0,53
130	3	1842	16117,945	64446	25,01	2,648	3,894	3,423	3,82	146	2	212	319,640	4043	7,906	2,52	-0,887	-1,224	-0,44
12	3	331	1500,308	13193	11,372	2,218	-0,055	-0,906	-1,24	146	0	5	2,628	81	3,245	1,948	-1,008	-1,357	-0,25
12	3	639	701,752	10631	6,601	2,218	-0,574	-1,475	-1,9	146	2	97	192,551	2474	7,783	2,52	-1	-1,348	-0,24
12	3	606	2825,618	23087	12,239	2,218	-0,043	-0,894	-0,7	146	2	140	232,371	3488	6,662	2,52	-0,998	-1,346	-0,24
193	3	1669	8219,753	56532	14,54	5,312	0,172	-0,658	-0,43	146	1	39	23,975	616	3,892	2,52	-0,778	-1,105	0,05
193	2	85	122,297	1654	7,394	2,182	-0,315	-1,192	-1,05	146	2	31	54,483	912	5,974	2,52	0,175	0,01	0,53
193	3	1543	52278,265	141887	36,845	4,254	0,572	-0,219	-0,23	146	1	19	50,724	685	7,405	1,948	-0,866	-1,131	-0,99
193	0	42	68,293	689	9,192	4,254	0,459	-0,343	-0,38	146	2	242	500,336	6754	7,408	1,948	0,003	-0,178	0,12
193	0	31	37,866	520	7,828	4,254	1,872	1,206	1,43	146	2	893	2359,543	19900	11,857	1,948	0,347	0,199	-0,61
193	1	29	81,32	770	10,561	4,254	-0,49	-0,193	-1,4	146	3	882	2371,059	19703	12,034	1,948	-0,176	-0,375	-1,27
207	3	464	471,386	8518	5,534	2,728	-0,564	-0,274	-0,28	146	3	283	3801,006	20856	18,225	1,948	-0,424	-0,646	0,05
207	2	479	586,177	9822	5,968	4,39	-0,46	-0,16	-0,15	191	3	1105	3377,066	29712	11,366	2,264	-0,436	-0,659	0,67
207	0	24	21,92	415	5,282	4,39	-0,513	-0,218	-0,22	195	1	43	48,553	738	6,579	3,206	-0,509	-0,74	0
207	2	631	652,853	9731	6,709	4,39	-0,58	-0,292	0,07	195	2	112	144,813	2738	5,289	3,206	-0,184	0,534	0
207	2	187	255,921	4034	6,33	4,39	-0,682	-0,403	-0,06	195	3	390	718,186	8321	8,631	3,206	-0,364	0,337	0,43
207	3	814	5179,147	30865	16,78	2,728	-0,857	-0,595	0,16	195	3	1115	1276,381	19460	6,559	3,206	-0,304	0,402	0,51
218	0	25	2,65	127	2,087	4,314	-1,056	-0,813	-0,1	195	3	546	5046,154	27483	18,361	3,206	-0,555	0,128	0,19
218	3	1211	1992,764	25733	7,744	2,872	-1,022	-0,777	0	195	2	459	517,896	9268	5,588	3,206	-1,13	-0,503	-0,55
218	2	472	641,535	9914	6,471	2,872	-0,416	-0,23	-0,55	195	1	27	20,942	377	5,555	3,206	-0,741	-0,076	-0,05
218	1	114	157,126	2826	5,56	2,872	0,414	0,68	0,1	195	2	88	233,282	2660	8,77	2,264	-0,603	0,075	0,12





195	3	462	469,219	7156	6,557	2,264	-0,544	0,14	0,2	1176	2991,121	31790	9,409	2,424	0,501	0,775	0,21
195	0	22	10,989	277	3,967	2,264	0,081	0,824	1,12	17	9,476	219	4,327	2,424	0,904	1,218	0,73
195	1	27	10,184	286	3,561	2,264	-0,902	-0,253	-0,14	95	122,323	2689	4,549	2,248	0,458	0,728	0,78
195	0	15	12,688	242	5,243	2,264	-0,465	-0,545	0,58	870	1449,510	18265	7,936	2,414	0,152	0,393	0,39
196	3	752	1943,741	18556	10,475	2,424	0,528	0,544	0,26	81	109,652	1080	10,153	1,724	1,025	1,35	1,5
196	0	11	6,382	154	4,144	2,424	0,206	0,191	-0,15	268	183,357	4852	3,779	2,032	0,075	0,309	0
196	0	26	50,899	665	7,654	2,424	1,961	2,115	2,1	24	40,622	498	8,157	2,728	-0,256	-0,054	0,31
214	3	578	4976,936	29996	16,59200	1,992	-0,036	-0,075	-0,6	182	118,166	3323	3,556	2,728	-0,549	-0,375	-0,06
214	1	55	17,875	572	3,125	1,992	0,533	0,55	0,13	26	20,981	391	5,366	2,728	1,116	1,45	2,07
214	3	377	450,852	7488	6,021	1,992	0,239	0,227	-0,24	155	150,514	4222	3,565	2,728	-0,603	-0,434	-0,13
214	2	86	60,838	1689	3,602	1,992	2,01	2,169	2,02	297	401,649	7834	5,127	2,728	-0,041	0,182	0,55
214	3	816	935,200	14524	6,439	1,992	1,19	1,27	0,97	445	1408,59	13382	10,526	2,106	0,797	1,101	1,49
214	2	120	197,913	3156	6,271	2,398	0,439	0,446	0,01	24	26,529	509	5,212	2,44	-0,694	-0,534	-0,42
214	3	357	2035,510	12561,00	16,205	2,398	2,63	2,037	2,2	476	1519,073	12660	11,999	2,44	-0,635	-0,47	-0,35
226	1	63	79,042	1507	5,245	2,55	2,054	1,405	1,46	131	372,818	3672	10,153	2,44	0,766	1,066	1,45
226	2	273	826,325	8419	9,815	2,55	2,04	1,39	1,44	683	1405,078	18483	7,602	2,44	-0,09	0,128	0,11
226	3	701	1889,841	18754	10,077	2,55	1,124	0,387	0,27	262	2664,014	13267	20,08	2,186	-0,714	-0,556	-0,69
226	3	1091	1013,357	17926	5,65300	2,55	0,627	-0,159	-0,37	36	359,316	1436	25,02200	2,186	1,872	2,28	2,62
226	2	128	138,330	3473	3,983	2,55	0,443	-0,36	-0,6	876	15466,134	49804	31,054	2,186	-0,276	-0,076	-0,13
226	3	550	9825,175	40957	23,989	2,55	0,582	-0,208	-0,42	818	9451,292	43982	21,489	2,392	-0,202	-0,473	-2,15
226	3	578	1158,072	13220	8,76	2,55	-0,181	-1,045	-1,4	958	2838,64	12305	23,069	2,392	1,48	1,371	0,01
226	0	19	34,223	408	8,388	2,472	0,198	-0,629	-0,39	368	1987,967	12956	15,344	2,106	2,635	2,637	1,49
132	3	371	716,554	7475	9,586	1,802	0,343	-0,471	-0,21	114	74,623	1580	4,723	2,186	1,979	1,918	0,65
132	3	1362	15920,627	74015	21,51	1,802	1,597	0,905	1,4	29	74,66	517	14,441	2,662	0,317	0,096	-0,89
132	3	1530	15318,088	51583	29,696	1,802	1,192	0,461	0,88	17	11,232	208	5,4	2,662	0,233	0,004	-1
132	3	2980	21050,355	84030	25,051	1,802	0,645	-0,139	-0,14	202	592,768	5543	10,694	2,662	1,133	0,99	0,15
133	1	74	443,258	1700	26,074	2,264	-0,133	-0,992	-1,14	96	362,44	2874	12,611	3,936	0,05	-0,197	0,76
133	3	1064	5562,826	42526	13,081	2,264	0,236	-0,587	-0,66	43	105,067	1180	8,904	3,936	-0,191	-0,462	0,45
133	3	941	3016,134	24160	12,484	2,264	-0,249	-1,12	-1,29	31	163,845	816	20,079	3,936	-0,4	-0,69	0
133	2	1172	6368,562	33547	18,984	2,264	2,022	1,371	1,62	856	9035,503	40609	22,25	3,936	-0,052	-0,239	0,24
133	3	996	4914,000	26051	18,863	2,264	0,074	0,425	0,24	802	565,752	8326	6,795	3,514	-0,086	-0,275	0,2
133	1	56	328,236	1266	25,927	2,264	-0,599	-0,313	-0,63	147	253,453	3462	7,321	3,514	-0,445	-0,67	-0,27
133	1	88	256,411	1773	14,462	2,264	0,196	0,559	0,39	18	37,492	386	9,713	2,39	1,3	1,244	-0,74
133	1	95	654,528	2482	26,371	2,264	0,698	1,109	0,12	9	2,331	96	2,428	3,136	2,848	2,941	1,24
133	2	167	153,112	2554	5,995	1,894	3,784	4,492	4,07	91	38,646	832	4,645	3,136	1,511	1,475	-0,47
134	1	160	282,760	1679	16,84100	2,78	-0,721	-0,446	-0,48	231	308,85	4181	7,387	3,136	1,734	1,719	-0,18
203	2	135	173,923	3530	4,927	2,424	0,866	1,293	1,55	21	3,635	190	1,913	3,136	0,628	0,506	0,92
203	0	19	53,025	525	10,1	2,424	-0,401	-0,095	0,3	28	3,061	161	1,901	3,136	1,707	1,689	1,14
203	3	386	1417,483	12746	11,121	2,424	-0,579	-0,291	0,08	352	266,243	3848	6,919	3,004	-0,498	-0,727	-0,05
203	2	359	272,096	6892	3,948	2,424	0	0,344	0,82								





11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Eva-Maria Hesselbach

12 Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Baumgart-Vogt, die mir die Forschungsarbeit zu diesem Thema ermöglichte und mir stets hilfreich mit ihrem großen praktischen und theoretischen Wissen zu Seite stand.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung im Labor, besonders Herrn Dr. Dr. Klaus-Peter Valerius für die Hilfe bei der Perfusion der Tiere und Frau Bianca Pfeiffer, Frau Elke Rodenberg-Frank und Frau Magdalena Gottwald, die stets mit Rat und Tat bei labortechnischen Fragen zur Seite standen. Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer danke ich für die Einarbeitung am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM).

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Phillip Grant für die Hilfe zur Erarbeitung der statistischen Auswertung. Die schöne Zeit im gemeinsamen Büro wird in Erinnerung bleiben.

Herrn Domkapitular Monsignore Dr. Stefan Rambacher danke ich für die Unterstützung bei der lateinischen Übersetzung.

Von Herzen danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützt und ermutigt haben, meinen Kindheitstraum zu leben.

Vielen Dank!

Würzburg, Mariä Himmelfahrt 2013