

**Eine Untersuchung von zwei Tiermodellen  
auf ihre Eignung für Studien der Spermatogenese  
(Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus*) und der frühen  
Embryonalentwicklung (Rind, *Bos taurus*) des Menschen**

**NADINE HECHT**

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**und**

der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Steger

**Eine Untersuchung von zwei Tiermodellen auf  
ihre Eignung für Studien der Spermatogenese  
(Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus*) und der  
frühen Embryonalentwicklung (Rind, *Bos  
taurus*) des Menschen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig- Universität Gießen

Eingereicht von

**Nadine Hecht**

Tierärztin aus Erlangen

Gießen 2010

Gefördert durch Fördermittel des Universitätsklinikums Gießen und Marburg

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Bergmann

2. Prof. Dr. K. Steger

Tag der Disputation: 03.12.2010

*Meiner Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELE	1
2. LITERATURÜBERSICHT	4
2.1. Der Weißbüschelaffe ( <i>Callithrix jacchus</i> )	4

### Produktion, Reifung und Funktion des männlichen Gameten

2.2. Aufbau des Hodens und Ablauf der Spermatogenese	6
2.2.1. Das Interstitium	7
2.2.1.1. Leydig Zellen	7
2.2.2. Das Keimepithel	7
2.2.2.1. Sertoli Zellen	8
2.2.2.2. Keimzellen	8
2.2.3. Stadien der Spermatogenese	10
2.2.3.1. Zellbild der 6 Spermatogenesestadien des Menschen	12
2.2.3.2. Zellbild der 6 Spermatogenesestadien bei <i>Callithrix jacchus</i>	14
2.2.3.3. Spermatogenese bei <i>Bos taurus</i>	17
2.3. Spermatogenesestörungen	17
2.4. Regulationsmechanismen der Spermatogenese	18
2.4.1. Hormonelle Faktoren	18
2.4.2. Genetische Faktoren	20
2.4.2.1. Histon-Protamin-Austausch	20
2.4.2.2. Histone	21
2.4.2.3. Protamine	24
2.4.3. Epigenetische Regulationsmechanismen während der Spermatogenese	27
2.4.3.1. Histon-Code	27

### Produktion, Reifung und Funktion des weiblichen Gameten

2.5. Aufbau des Ovars und Ablauf der Oogenese	30
2.5.1. Oogenese und Follikulogenese	30
2.5.2. Morphologie der Oozyte	31
2.5.3. Hormonelle Regulation	32
2.5.4. Fertilisation und frühe Embryonalentwicklung	33
2.5.5. Epigenetische Regulationsmechanismen während der frühen Embryonalentwicklung	34

3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1. Material	37
3.1.1. Humane Hodenbiopsien	37
3.1.2. Humanes Ejakulat	37
3.1.3. Hoden von <i>Callithrix jacchus</i>	37
3.1.4. Ejakulat von <i>Callithrix jacchus</i> und <i>Bos taurus</i>	38
3.1.5. Eizellen, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Embryonen von <i>Callithrix jacchus</i> und <i>Bos taurus</i>	38
3.2. Methoden	39
3.2.1. Extraktion von Histonen aus Ejakulat von Mensch und <i>Callithrix jacchus</i>	39
3.2.2. Western Blot Analyse	40
3.2.3. Paraffinmaterial	49
3.2.4. Ejakulatausstriche	51
3.2.5. Immunhistochemie von Hodengewebe	52
3.2.6. Immunhistochemie von Ejakulat	56
3.2.7. Quantitative Auswertung und Statistische Analyse	57
3.2.8. <i>In-situ</i> Hybridisierung	57
3.2.9. Gesamt RNA Extraktion aus Ejakulat von <i>Callithrix jacchus</i> und Mensch	76
3.2.10. Gesamt RNA Extraktion aus Eizellen, Zygoten, 2-Zell-Stadien und 4-Zell-Stadien von <i>Callithrix jacchus</i> und <i>Bos taurus</i>	77
3.2.11. Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	78
3.2.12. Analyse des PCR-Produktes mittels Gel-Elektrophorese	83
3.2.13. Sequenzierung	83
4. ERGEBNISSE	84
4.1. Western Blot Analyse von menschlichem Ejakulat	84
4.2. Western Blot Analyse von Ejakulat von <i>Callithrix jacchus</i>	85
4.3. Sequenzierung und Analyse von Protamin-1 des <i>Callithrix jacchus</i>	86
4.4. <i>In-situ</i> Hybridisierung	89
4.5. Immunhistochemie (IHC)	91
4.5.1. Normale Spermatogenese beim Mensch	91
4.5.2. Normale Spermatogenese bei <i>Callithrix jacchus</i>	93
4.5.3. Immunhistochemische Ergebnisse von Mensch und <i>Callithrix jacchus</i> im Vergleich	95
4.5.4. Ejakulierte Spermatozoen beim Menschen	97

## INHALTSVERZEICHNIS

---

4.5.5. Ejakulierte Spermatozoen bei <i>Callithrix jacchus</i>	98
4.5.6. RT-PCR Ergebnisse	99
5. DISKUSSION	101
5.1. Spermatogenese: Histon-Protamin Austausch bei Mensch und <i>Callithrix jacchus</i>	101
5.2. Expression verschiedener Transkripte während der frühen Embryonal- Entwicklung	103
5.3. Eignung der von uns eingesetzten Tiermodelle für Studien der Spermato- genese und und frühen Embryonalentwicklung	108
6. ZUSAMMENFASSUNG	110
7. SUMMARY	112
8. LITERATURVERZEICHNIS	114
9. ANHANG	131
10. DANKSAGUNG	136
11. ERKLÄRUNG	137

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

### **Originalarbeiten**

Nadine Hecht, Rüdiger Behr, Anne Hild, Martin Bergmann, Wolfgang Weidner, Klaus Steger. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for human spermatogenesis. Human Reproduction 2009; 1: 1-10

Nadine Hecht, Márcia Oliveira Cavalcanti, Penelope Nayudu, Rüdiger Behr, Myriam Reichenbach, Wolfgang Weidner, Klaus Steger. Protamine-1 represents a sperm specific gene transcript: a study in *Callithrix jacchus* and *Bos taurus*; Andrologia 2010; 41: 1-7

### **Publizierte Abstracts**

N. Hecht, A. Paradowska, M. Bergmann, W. Weidner, K. Steger. Die Expression von spezifisch acetyliertem Histon H4 während der normalen und gestörten Spermatogenese des Menschen. 2. Kongress des Dachverbandes Reproduktionsbiologie und -medizin e.V. (DVR), Bonn/Deutschland, 28.11.-01.12.2007

K Steger\*, N. Hecht\*, A. Paradowska, M. Bergmann, W. Weidner. Expression of specifically acetylated histone H4 during normal and impaired spermatogenesis. 23. Jahreskongress der European Association of Urology (EAU), Mailand/ Italien, März 2008

### **Poster**

N. Hecht, A. Paradowska, M. Bergmann, W. Weidner, K. Steger. Die Expression von spezifisch acetyliertem Histon H4 während der normalen und gestörten Spermatogenese des Menschen. 2. Kongress des Dachverbandes Reproduktionsbiologie und -medizin e.V. (DVR), Bonn/Deutschland, 28.11.-01.12.2007

K Steger\*, N. Hecht\*, A. Paradowska, M. Bergmann, W. Weidner. Expression of specifically acetylated histone H4 during normal and impaired spermatogenesis. 23. Jahreskongress der European Association of Urology (EAU), Mailand/ Italien, März 2008

K. Steger\*, N. Hecht\*, R. Behr, M. Bergmann, W. Weidner. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for human spermatogenesis and early human embryogenesis. 15<sup>th</sup> European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Naantali/Finnland, Mai 2008

N. Hecht, A. Paradowska, M. Bergmann, W. Weidner, K. Steger. Male germ cells exhibit an aberrant histone H4 acetylation pattern between normal and impaired spermatogenesis. American Urological Association (AUA), Orlando/USA, 17.-22. Mai 2008

K. Steger\*, N. Hecht\*, R. Behr, M. Bergmann, W. Weidner. Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) als Tiermodell zur Untersuchung der Spermatogenese des Menschen. 60. Jahrestreffender Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU), Stuttgart/Deutschland, September 2008

\* Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dem Poster bei.

## 1. Einleitung und Ziele

Die im Keimepithel des Hodens ablaufende Spermatogenese ist ein streng koordinierter und kontrollierter Differenzierungsprozess, dessen Ziel die Produktion von befruchtungsfähigen Spermien ist. Es ist bekannt, dass bereits kleinste Störungen der verschiedenen Regulationsmechanismen zu Spermatogenesedefekten und männlicher Infertilität führen können.

Während die hormonellen Kontrollmechanismen der Spermatogenese bekannt sind, sind die genetischen und epigenetischen Regulationsmechanismen der Spermatogenese noch weitestgehend unklar. Studien der letzten fünfzig Jahre berichten über eine steigende Inzidenz männlicher Infertilität (CARLSEN et al., 1992; KELCE und WILSON, 1997; PAJARINEN et al., 1997; PARAZZINI et al., 1998). Desweiteren existieren Angaben der World Health Organization (WHO), dass derzeit eines von sechs Paaren ungewollt kinderlos ist. Die Ursachen liegen in 30% der Ehen beim Mann. Ohne in Anspruchnahme von Assistierte Reproduktiven Techniken (ART) könnten die Hälfte dieser Männer keine genetisch eigenen Kinder zeugen. Desweiteren ist bekannt, dass die Zahl an assistierter Reproduktion als Behandlungsmethode für Kinderwunschaare weiterhin zu nimmt. Aufgrund dieser Tatsachen ist es dringend erforderlich, unser Wissen auf diesem Gebiet zu erweitern.

Es ist bereits bekannt, dass der Histon-Protamin-Austausch in haploiden Spermatisden zu einer Kondensation des Kernchromatins führt. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine normale Differenzierung der runden Spermatisden zu reifen Spermatozoen. Der Histon-Protamin-Austausch, sowie ein korrektes Verhältnis von DNA-bindender Histone zu Protaminen und zusätzlich das Verhältnis von Protamin-1 zu Protamin-2 spielen eine zentrale Rolle für die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen und somit für die männliche Fertilität (STEGER, 1999; STEGER et al., 2003). Bei Kinderwunschaaren, die sich für eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) entscheiden, werden alle natürlichen Auslesemehanismen des Körpers umgangen. Aufgrund dessen wäre es von großer Bedeutung, den behandelnden Ärzten einen möglichen Prognosefaktor für den Erfolg einer ICSI-Behandlung an die Hand zu geben. Solch ein Prognosefaktor könnte die Integrität des Kernchromatins darstellen, die von dem Histon-Protamin-Austausch in haploiden Spermatisden abhängt.

Das Kernchromatin unterliegt während der Spermio-genese, der Umwandlung und Reifung von runden Spermatisden in reife elongierte Spermatozoen, einem mehrstufigen strukturellen Umbau (STEGER, 2001). Zuerst wird ein Teil der DNA-bindenden Histone durch Hoden-

spezifische Subtypen ersetzt, die anschließend zum Teil durch Transitionsproteine ausgetauscht werden. Schließlich werden beim Mensch ca. 85% der Histone und alle Transitionsproteine durch Protamine ersetzt. Eine Histonacetylierung ist erforderlich damit die Histone gegen Protamine ausgetauscht werden können. Dies erfolgt durch Histon-Acetyltransferasen (HATs). Eine Acetylierung von Kern-Histonen führt durch Ladungsverschiebung zu einer Lockerung der Histon-DNA-Interaktion (DAVIE, 1998). Nun können die Protamine mit der DNA interagieren. Durch die enge Protamin-DNA Interaktion kommt es zu einer Zunahme der Chromatinkondensation und schließlich zu einem Stopp der Genexpression in elongierenden Spermatischen.

Der Histon-Protamin Austausch ist beim Mensch unvollständig. Es verbleiben ca. 15% Resthistone, die acetyliert sind, was normalerweise mit einer Transkription der mit diesen Histonen assoziierten Gene verbunden ist. Da Spermatozoen transkriptional inaktive Zellen sind, wird angenommen, dass die Histonmodifikationen epigenetische Signale darstellen und die mit diesen Histonen assoziierten Gene eine Rolle bei der frühen Embryonalentwicklung spielen. Heute ist bekannt, dass das Spermium nicht nur als Überbringer des Genoms fungiert. MC GRATH und SOLTER (1984) konnten in Untersuchungen zeigen, dass sich das weibliche und männliche Genom in ihrer epigenetischen Information unterscheiden. Desweiteren ist bekannt, dass die transkriptional inaktiven Spermatozoen mRNAs enthalten. Heute wird postuliert, dass zumindest ein Teil dieser paternalen mRNAs in die Oozyte übertragen wird (OSTERMEIER et al., 2004) und bei der Befruchtung und frühen Embryonalentwicklung eine tragende Rolle spielt. Für die in der Oozyte vorhandenen mRNAs ist bereits bewiesen, dass diese für die Zygote und den frühen Embryo von entscheidender Bedeutung sind (DE LOOS et al., 1992; SCHULTZ und HEYNER, 1992; FULKA et al., 1998; SCHULTZ, 2002; DE JONG, 2006).

Da menschliche Embryonen aus ethischen Gründen nicht für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung stehen, sind Untersuchungen zur Genexpression während der frühen Embryonalentwicklung am Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) und am Rind (*Bos taurus*) in einem zweiten Teil dieser Studie durchgeführt worden. Diese fanden in Kooperation mit dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen und dem Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie Oberschleißheim statt. Der Weißbüschelaffe erscheint uns als ein besonders geeignetes Tiermodell, da er sich als Tiermodell bereits in anderen Studien (MILLAR et al., 2000; NEUBERT et al., 1990) bewährt hat und zusätzlich sowohl Protamin-1, als auch Protamin-2 exprimiert. Viele der gängigen Tiermodelle exprimieren wie das Rind nur Protamin-1.

Im Rahmen dieser Studie soll zuerst geklärt werden, ob sich der Weißbüschelaffe als geeignetes Tiermodell für die Spermatogenese des Menschen eignet. An *Callithrix jacchus* und Mensch soll der Histon-Protamin-Austausch untersucht und verglichen werden.

Es wurden folgende Ziele definiert:

- Bestimmung des Expressionsmusters der Protamine beim Weißbüschelaffen und Menschen während der normalen Spermatogenese mittels in-situ Hybridisierung
- Bestimmung des Expressionsmusters von spezifisch acetyliertem Histon H4 während der normalen Spermatogenese (Weißbüschelaffe und Mensch) mittels Immunhistochemie

Im Rahmen dieser Studie soll in einem zweiten Schritt die Genexpression während der frühen Embryonalentwicklung untersucht werden mit *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* als Tiermodell.

Diese Untersuchungen sollen Informationen liefern in Bezug auf:

- Expressionsmuster verschiedener Transkripte während der frühen Embryonalentwicklung (RT-PCR)
- Nachweis von mit Histon H4 assoziierter Gene während der frühen Embryonalentwicklung (RT-PCR)
- Nachweis spermien-spezifischer Transkripte

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*)

Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) ist ein Neuweltaffe (Platyrrhini) und gehört zu der Familie der Krallenaffen (Callithrichidae; Abb. 1). Diese bewohnen das nordöstliche Brasilien. Ihr Lebensraum sind Wälder, wobei sie in verschiedenen Waldtypen vorkommen können. Die Tiere sind mit 12 Monaten ausgewachsen und wiegen dann 250-500g und haben eine Lebenserwartung von 10-15 Jahren (CLARK, 1994; ABBOTT und HEARN, 1978). Das weibliche Tier erreicht mit 18 Monaten ihre Geschlechtsreife und die erste Trächtigkeit tritt

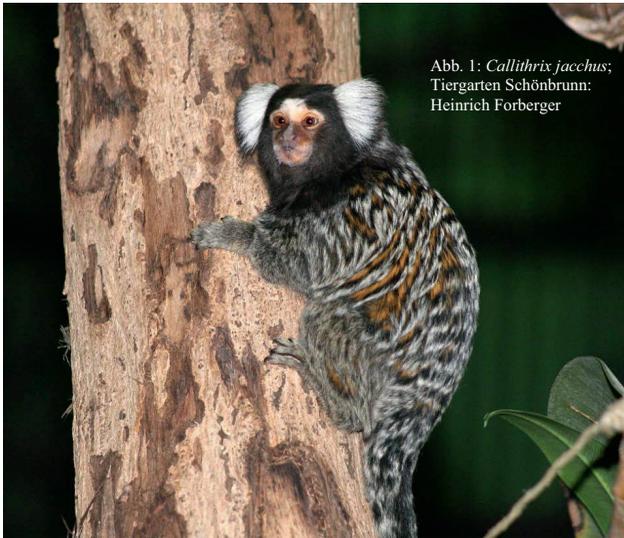


Abb. 1: *Callithrix jacchus*;  
Tiergarten Schönbrunn;  
Heinrich Forberger

mit 17-20 Monaten ein (ABBOTT und HEARN, 1978). Beim männlichen Tier wurde erstes Paarungsverhalten, jedoch ohne die Fähigkeit zu ejakulieren, bereits mit 8 Monaten beobachtet. Erste Paarungsversuche mit erfolgreicher Ejakulation wurden

erst mit 15 Monaten festgestellt (ABBOTT und HEARN, 1978). Weißbüschelaffen paaren sich in Gefangenschaft während des ganzen Jahres und zeigen keine Saisonalität (BRAND, 1980; KHOLKUTE, 1984; KHOLKUTE et al., 1987). In Freiheit leben Weißbüschelaffen in Gruppen von 8-12 Tieren. Diese Gruppen sind oft um ein fortpflanzungsfähiges Paar organisiert, das die Gruppe dominiert. Der Eisprung der untergeordneten Weibchen ist unterdrückt, so dass diese nicht fortpflanzungsfähig sind. Werden diese jedoch aus der Gruppe entfernt, setzt die Ovulation schnell wieder ein (ABBOTT et al., 1988). Rangniedere Männchen und Weibchen helfen bei der Aufzucht der Nachkommen. Das dominante Weibchen hat einen Zyklus von 28 Tagen. Mehrere Follikel springen, was in 30-70% der Trächtigkeiten zu Zwillingen und in 20-25% zu Drillingen führt (ABBOTT und HEARN, 1978; CLARK, 1994). Die Implantation der Eizelle beim Weißbüschelaffen beginnt 11-12

Tage nach der Ovulation (MOORE et al., 1985; HEARN et al., 1988). Die Trächtigkeit beträgt im Mittel 143 Tage (140-150 Tage) und das Weibchen säugt ihre Nachkommen für ca. 100-120 Tage. Während Mensch und Altweltaffen nach der Geburt eine Zeit der Amenorrhoea haben, beginnt beim Weißbüschelaffen direkt nach der Geburt die zyklische ovarielle Aktivität. Während der ersten 10-15 Tage nach der Geburt und noch vor der Entwöhnung der Nachkommen, kann das dominante Weibchen erneut ovulieren, sich paaren und tragend werden. Das durchschnittliche Intervall zwischen 2 Würfen beträgt 162 Tage, so kann ein Weibchen im Jahr 2 Würfe hervorbringen.

Der Weißbüschelaffe wurde wegen seiner Vorteile gegenüber anderen Versuchstieren in den vergangenen Jahren immer mehr als Modellsystem genutzt. MILLAR et al. (2000) fanden heraus, dass die Organisation des Keimepithels im Hoden des Weißbüschelaffen vergleichbar mit der des Menschen ist und postulierte, dass der Weißbüschelaffe ein geeignetes Model für Studien der Spermatogenese des Menschen ist. Die Tatsache, dass in den Spermatozoen des Weißbüschelaffen beide Protamine (Protamin-1 und -2) vorhanden sind (SAUNDERS et al., 1996; CORZETT et al., 2002), dass sich die Organisation des Keimepithels ähnelt und dass der Weißbüschelaffe, wie der Mensch, Spermatogenesedefekte (Schwanz- und Kopfdefekte) aufweist (CUI et al., 1991), macht ihn für unsere Studie der Spermatogenese des Menschen als Modellsystem interessant. Desweiteren setzten wir den Weißbüschelaffen, als Vertreter der Primaten, wegen seiner genetischen Ähnlichkeit zum Menschen als Tiermodel für Untersuchungen der Genexpression während der frühen Embryonalentwicklung ein. Aufgrund der stark limitierten Verfügbarkeit an Untersuchungsmaterial vom *Callithrix jacchus* wurden zusätzlich Rindereizellen und Rinderembryonen zur Etablierung unserer Versuche herangezogen.

## Produktion, Reifung und Funktion des männlichen Gameten

### 2.2. Aufbau des Hodens und Ablauf der Spermatogenese

Die Hoden (Testes) sind paarig angelegte Organe, die beim Mann bzw. bei männlichen Säugetieren im Hodensack (Skrotum) im sogenannten Scheidenhautfortsatz (Processus vaginalis) eingebettet sind. Der Processus vaginalis, der beim Menschen im Unterschied zu anderen Säugetieren wie beispielsweise *Bos taurus* und *Callithrix jacchus* bei Vollendung des Hodenabstieges obliteriert, setzt sich aus der inneren Rumpffaszie (Fascia transversalis, Fascia spermatica interna) und dem Bauchfell (Peritoneum) zusammen und wird während der Embryonalentwicklung im Zuge des Hodenabstieges (Descensus testis) ausgebildet. Er stellt eine Art Aussackung der inneren Rumpffaszie und des Bauchfells durch den Leistenkanal dar. Der Scheidenhautfortsatz gehört zu den Hodenhüllen im Inneren des Hodensacks. Der Bauchfellanteil dieser Ausstülpung wird als Scheidenhaut (Tunica vaginalis) bezeichnet und kleidet das Innere des Skrotums als sogenanntes Wandblatt (Lamina parietalis, Periorchium) aus. Dieses teilt sich dann zu einer Doppellamelle und überzieht als Eingeweideblatt (Lamina visceralis, Epiorchium) den Hoden. Der Spalt zwischen Lamina parietalis und Lamina visceralis wird als Cavum vaginale bezeichnet und gewährleistet die Verschieblichkeit des Hodens im Hodensack. Die beiden Blätter werden durch das Hodengekröse (Mesorchium) verbunden, welches die Hoden auch im Hodensack fixiert (AUMÜLLER, 1998; BUDRAS und WÜNSCHE, 2002; GILLE, 2005). Das Epiorchium ist fest mit der darunterliegenden Tunica albuginea, einer kräftigen Bindegewebskapsel, verwachsen. Von der Tunica albuginea strahlen bindegewebige Septen (Septula testis) ins Innere des Organs, die dadurch den Hoden in zahlreiche (ca. 350) Läppchen (Lobuli testis) unterteilt. Jedes Läppchen besteht aus ca. 1-4 aufgeknäulten Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), in denen sich das Keimepithel und das interstitielle Gewebe (Interstitialium) befindet. Im Keimepithel der Samenkanälchen werden die männlichen Fortpflanzungszellen, die Spermien, gebildet. Der gesamte Prozess der Keimzellentwicklung wird als Spermatogenese bezeichnet. In diesem Prozess entwickeln sich aus diploiden männlichen Stammzellen (Spermatogonien) haploide Spermien. Die Samenkanälchen münden über kurze Tubuli recti in das Rete testis, das über mehrere Ausführungsgänge (Ductuli efferentes testis) mit dem Nebenhodengang verbunden ist. Der Hoden nimmt exo- und endokrine Aufgaben wahr.

### **2.2.1. Das Interstitium**

Das Gewebe zwischen den gewundenen Samenkanälchen wird als Interstitium bezeichnet. Im Interstitium findet man lockeres Bindegewebe, das Nerven, Blut, Lymphgefäße, sowie Makrophagen enthält. Desweiteren finden sich hier die Leydig Zellen.

#### **2.2.1.1. Leydig Zellen**

Die im Interstitium liegenden Leydig Zellen (Zwischenzellen, interstitielle Zellen) stellen den Hauptbestandteil des endokrinen Systems des Hodens dar. Sie produzieren Testosteron, das Hauptprodukt der Androgenbiosynthese. Beim Menschen geschieht dies hauptsächlich über den sog.  $\Delta^5$ -Weg. Aus Cholesterin entsteht Pregnenolon, aus welchem über die Zwischenprodukte 17- $\alpha$ -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron, Androstendiol das Testosteron synthetisiert wird (PAYNE und JAFFE; 1975). Das von den Leydig Zellen durch Diffusion abgegebene Testosteron wird an ein von den Sertolizellen produziertes Trägerprotein, Androgen-Binding-Protein (ABP), gebunden. Dieses schützt das Testosteron vor der Verstoffwechslung und gelangt so von den Leydig Zwischenzellen des Hodens über Blut- und Lymphgefäße schließlich in die Samenkanälchen und den Nebenhoden. Das Testosteron ist für den kontinuierlichen Ablauf der Spermatogenese essentiell. Auch die Reifung der Spermien im Nebenhoden steht unter dem Einfluss von Dihydrotestosteron.

Im Unterschied zum Menschen findet die Testosteronsynthese beim Weißbüschelaffen über den  $\Delta^4$ -Weg statt (PRESLOCK und STEINBERGER, 1977). Auf dem  $\Delta^4$ -Weg entsteht das Testosteron ebenso aus Cholesterin, jedoch über die Syntheseprodukte, Pregnenolon, Progesteron, 17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Androstendion. Desweiteren scheint der Plasma Testosteron Spiegel beim Weißbüschelaffen wesentlich höher zu sein als beim Menschen und es wird vermutet, dass dies für den Beginn und einen kontinuierlichen Ablauf der Spermatogenese erforderlich ist (WISTUBA et al., 2004).

### **2.2.2. Das Keimepithel**

Die Samenkanälchen sind von einer Bindegewebsschicht (Lamina propria) umgeben, die insbesondere von länglichen Myofibroblasten aufgebaut wird. Das Keimepithel setzt sich aus zwei Zellpopulationen, den somatischen Sertoli- bzw. Stützzellen und den Keimzellen, zusammen.

### 2.2.2.1. Sertoli Zellen

Die Sertoli Zellen sind hohe prismatische Zellen, die der Basalmembran der Samenkanälchen aufsitzen. Sie fungieren als Stützzellen für das Keimepithel. Die Sertoli Zellen durchziehen das gesamte Keimepithel von der Basalmembran bis zum Lumen des Keimepithels. Sie besitzen einen sehr charakteristischen großen, länglichen und euchromatischen Zellkern, der eine oder zwei Einkerbungen besitzt und 1-3 Nukleoli aufweist. Die nebeneinander liegenden Sertoli Zellen sind in ihrem basalen Drittel über tight junctions (Zonulae occludens) miteinander verbunden. Hierdurch unterteilen sie das Keimepithel in ein basales (unterhalb der Zonula occludens) und ein adluminales (oberhalb der Zonula occludens) Kompartiment. Diese Schranke (Blut-Hoden-Schranke) stellt eine Diffusionsbarriere zwischen dem basalen und dem adluminalen Kompartiment dar. Das basale Kompartiment mit den hier liegenden Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten kommuniziert mit dem subepitheliale Bindegewebe und kommt mit Nährstoffen aus der Blutbahn in Kontakt. Durch die Blut-Hoden-Schranke wird der Stofftransport in das adluminale Kompartiment unterbunden und es herrscht ein abgeschlossenes Milieu, in dem die Keimzellen ausreifen. Die Sertoli Zellen übernehmen desweiteren die Ernährungsfunktion der Keimzellen. Sie besitzen außerdem Rezeptoren für FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und Testosteron und sezernieren die Peptidhormone Inhibin, Follistatin und Aktivin. FSH ist für die Ausreifung der Keimzellen von Bedeutung. Inhibin und Follistatin hemmen über negative Rückkopplung die FSH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen während Aktivin die FSH-Sekretion über eine positive Rückkopplung fördert (BEHRE und NIESCHLAG, 1998). Durch die zahlreichen Lysosomen sind die Sertoli Zellen zur Phagozytose befähigt und nehmen im Verlauf der Spermio-genese Zytoplasmaanteile der reifenden Spermatiden und abgestorbene Zellen auf.

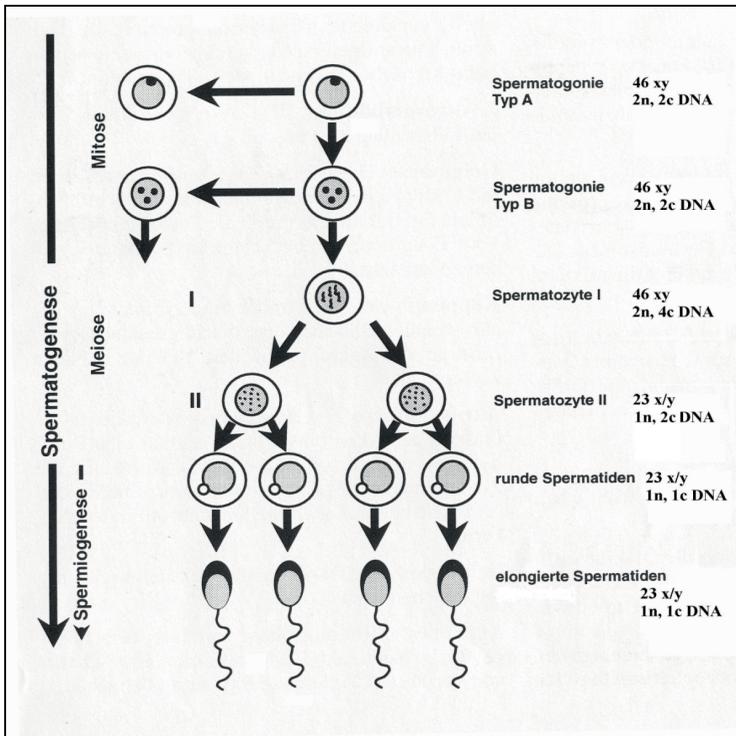
### 2.2.2.2. Keimzellen

Der gesamte Prozess der Keimzellentwicklung wird als Spermatogenese bezeichnet. Sie beginnt mit den Stammspermatogonien (46xy, 2n, 2c DNA), die der Basalmembran der Hodenkanälchen breit anliegen. Die sich mitotisch teilenden Spermatogonien, lassen sich beim Mensch in zwei Typen unterteilen: A- und B-Spermatogonien. Die A-Spermatogonien liegen in zwei verschiedenen Zellformen vor, nämlich als Ap (p=pale) und Ad (d=dark). Spermatogonien des Typs Ap besitzen einen blassen Zellkern, während der Kern der Spermatogonien des Typs Ad im Lichtmikroskop durch sein dichtes Karyoplasma eher dunkel erscheint und eine zentrale Aufhellung zeigt. Die Stammspermatogonien (Ad) teilen sich mitotisch, wobei eine Tochterzelle als A-Spermatogonie bleibt, während sich die andere über

mehrere mitotische Teilungen zu einer B-Spermatogonie entwickelt. Die B-Spermatogonien lösen sich von der Basalmembran und teilen sich weiter. Sie treten in die Meiose ein. In der Prophase der Meiose findet eine Verdopplung des DNA Gehaltes statt. So gehen aus jeder B-Spermatogonie (46xy, 2n, 2c DNA) durch meiotische Teilung tetraploide Spermatozyten I hervor (46xy, 2n, 4c DNA). Während der Meiose findet die Chromosomenpaarung und die Chromosomenrekombination statt. Nach Vollendung dieser 1. Reifeteilung (Reduktionsteilung) entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten mit haploidem Chromosomensatz (22 Autosomen mit entweder X- oder Y-Chromosom) und zweifachem DNA Gehalt (23 x/y, 1n, 2c DNA). Diese Spermatozyten II teilen sich kurze Zeit später erneut (2. Reifeteilung), wobei aus ihnen je zwei runde Spermatisden mit einfachem Chromosomensatz (23 x/y, 1n, 1c DNA) entstehen. Zwischen der 1. und 2. Reifeteilung findet im Gegensatz zur 1. Reifeteilung keine Verdopplung sondern eine Reduktion des DNA Gehaltes auf 1c statt (Abb. 2).

Alle Keimzellen, die im Laufe dieses Entwicklungsprozesses aus einer B-Spermatogonie hervorgegangen sind, sind über Zytoplasmabrücken miteinander verbunden. Diese Interzellularbrücken ermöglichen einen Stoffaustausch zwischen den Keimzellen, der für die Entwicklung eine wichtige Rolle spielt.

Der letzte Abschnitt der Spermatogenese wird als Spermiogenese bezeichnet und dient der Umwandlung und Reifung von runden Spermatisden in Spermatozoen. Es findet keine Teilung mehr statt. Die Zellen gestalten sich um und die Zytoplasmabrücken lösen sich während dieses Prozesses auf. Wesentliche Merkmale der Spermiogenese sind die Kondensation des Kernchromatins und dadurch eine Verkleinerung des Kernvolumens. Der Zellkern wandert in die Peripherie. Der Golgi-Apparat bildet das Akrosom, welches hydrolytische Enzyme enthält, die bei der Penetration der Eizelle benötigt werden. Aus dem distalen Zentriol entwickelt sich zeitgleich das Flagellum. Größere Zytoplasmareste werden phagozytiert. Die ausgereiften Spermatozoen lösen sich vom Keimepithel und wandern ins Lumen der Samenkanälchen ein. Sie gelangen schließlich über die Ductuli efferentes in den Nebenhoden (Epididymis), wo sie gespeichert werden und funktionell weiter ausreifen (WELSCH, 2003).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Spermatogenese, die in 3 Abschnitte unterteilt werden kann (BERGMANN, 1998). **1. Vermehrungsphase:** Die Spermatogonien teilen sich mehrfach mitotisch und am Ende ihrer Differenzierungsphase entstehen B-Spermatogonien, die in die Meiose I eintreten. **2. Reifungsperiode, Phase der Meiose:** Nach Durchlaufen der ersten und zweiten Reifeteilung entstehen aus den B-Spermatogonien primäre Spermatozyten und schließlich haploide runde Spermatiden. **3. Spermiogenese:** Die Spermatiden durchlaufen weitere Differenzierungsschritte und werden als Spermatozoen in das Tubuluslumen entlassen (Spermiation).

### 2.2.3. Stadien der Spermatogenese

Im histologischen Querschnitt menschlicher Keimtubuli kann man 6 verschiedene Stadien (Stadium I-VI) der Spermatogenese unterscheiden. Die genaue Klassifizierung der verschiedenen Stadien erfolgt anhand von charakteristischen Assoziationen von Keimzellen, die immer zusammen vorliegen. Die Stadien werden mit römischen Ziffern bezeichnet. Diese Einteilung erfolgt anhand der Zell- und Kernmorphologie der verschiedenen Keimzellen im H.E. (Hämatoxylin Eosin Färbung) Schnitt. Zusätzlich macht man sich die Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Methode zur genaueren Beurteilung der Kernmorphologie der Spermatiden zu

nutze, da diese die Kerne der verschiedenen Entwicklungsstufen der Spermatiden unterschiedlich anfärbt. Die Entwicklungsstufen der Spermatiden werden mit arabischen Ziffern beschrieben und kennzeichnen die Stufen der Spermiogenese.

Die Anzahl der Stadien und die Häufigkeit von ihrem Auftreten im Tubulus ist tierartspezifisch. Beim Mensch werden 6 Stadien unterschieden (CLERMONT, 1963). Beim Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) werden hingegen mehrere Systeme mit einer variierenden Anzahl von Stadien zur Klassifizierung der charakteristischen Assoziationen von Keimzellen angewandt. CLERMONT (1972) benutzte beim Weißbüschelaffen ein 12-Stadien System, während HOLT und MOORE (1984) und MILLAR et al. (2000) ein 9-Stadien System favorisierten. Beide Systeme definieren die verschiedenen Stadien anhand der Morphologie der 12 verschiedenen Stufen der Spermiogenese beim Marmoset. HOLT und MOORE (1984) machen sich zur Identifizierung der unterschiedlichen Stadien nicht nur die morphologische Struktur des Akrosoms der Spermatiden zu Nutze, sondern ziehen zusätzlich die unterschiedlichen Zelltyp-Assoziationen und deren Lage im Keimepithel zueinander in Betracht. Zusätzlich zu dem 9- und 12-Stadien System, wurde das 6-Stadien System, das für den Menschen entwickelt wurde, von WEINBAUER et al. (2001) und WISTUBA et al. (2003) zur Klassifizierung der Spermatogenese Stadien beim Marmoset und anderen Primaten erfolgreich angewandt.



(Step 2) sind im Keimepithel als oberste Schicht zu erkennen. Darunter liegen die pachytänen Spermatozyten. A- (Ap und Ad) und B- Spermatozyten grenzen der Basalmembran an (Abb. 5).

**Stadium III:** Hier ist nur eine Generation von Spermatischen (Step 3) im Keimtubulus vorhanden. Ihr Chromatin ist charakteristischer Weise sehr dunkel und homogen. Es liegen zwei Generationen von Spermatozyten aus unterschiedlichen Phasen der Meiose vor, pachytäne und präleptotäne Spermatozyten. Letztere enthalten chromophiles Chromatin, das ein eher klumpiges Aussehen aufweist. In diesem Stadium sind nur Typ A Spermatozyten (Ap und Ad) auf der Basalmembran vorhanden.

**Stadium IV:** In diesem Stadium bekommen die Spermatischen ein eher längliches bzw. eckiges und nicht mehr komplett rundes Aussehen. Sie beginnen mit der Elongationsphase, wobei sich der Zellkern an die Zellmembran annähert. Die älteren pachytänen Spermatozyten liegen vor und zusätzlich eine jüngere Generation an leptotänen Spermatozyten, die in diesem Stadium gerade in die Prophase der Meiose eintritt (Abb. 5).

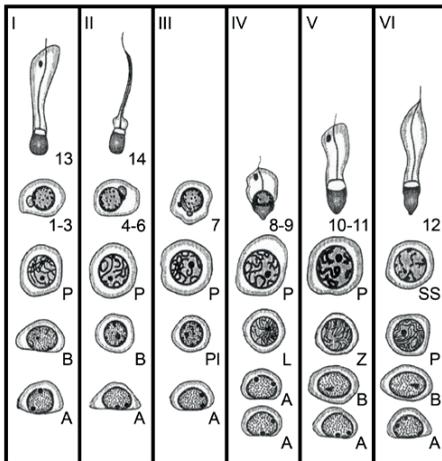
**Stadium V:** Die elongierenden Spermatischen sind in diesem Stadium in Richtung Basalmembran gedreht. Sie sind länglich und besitzen einen spitzen und sehr dunkel gefärbten Nukleus. Die pachytänen Spermatozyten haben in diesem Stadium der späten Pachytänphase der meiotischen Prophase ihre maximale Größe erreicht und enthalten in ihrem Zellkern große sichtbare Chromosomen. Die hier vorhandenen leptotänen Spermatozyten liegen etwas darunter und besitzen einen kleineren, dunkleren und durch lange chromosomale Fäden charakterisierten Zellkern. Die pachytänen Spermatozyten dieses Stadiums durchlaufen anschließend die Diakinese und die 1. Reifeteilung. A- Spermatozyten (Ap und Ad) liegen vor.

**Stadium VI:** Diese Keimzelloassoziation ist sehr selten in histologischen Schnitten anzutreffen, da die aus einer primären Spermatozyte hervorgegangenen Spermatozyten II nur eine kurze Lebensdauer haben und sich erneut teilen (2. Reifeteilung). Die sekundären Spermatozyten sind etwas größer als die Spermatischen und weisen einen hellen, heterochromatischen Zellkern auf. Die darunter liegenden primären Spermatozyten besitzen lange und dicke Chromosomen und lassen sich gut von den sekundären Spermatozyten unterscheiden. Zwischen den sich teilenden Spermatozyten befinden sich die elongierten Spermatischen (Step 6). Auch hier liegen A- Spermatozyten der Basalmembran an.

### 2.2.3.2. Zellbild der 6 Spermatogenesestadien bei *Callithrix jacchus*

CLERMONT (1972) unterteilte die Spermatogenese des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) in 12 verschiedene Stadien, während HOLT und MOORE (1984) und MILLAR et al. (2000) die Spermatogenese in 9 Stadien einteilten. Beim 12- und 9- Stadien System werden die Stadien anhand der 12-Step Entwicklung der Spermatischen definiert. WEINBAUER et al. (2001) beschrieb die typischen Keimzellassoziationen beim Weißbüschelaffen mit dem 6 Stadien System, welches auch zur Einteilung der Spermatogenese Stadien des Menschen fungiert. In unserer Studie haben wir uns auf Grund der Praktikabilität für das 6 Stadien System nach WEINBAUER et al. (2001) entschieden und haben die verschiedenen aufeinanderfolgenden Spermatogenesestadien anhand der auftretenden Zelltypen und Zellassoziationen im Keimepithel klassifiziert (Abb. 4).

Beim *Callithrix jacchus* beträgt die Dauer der Spermatogenese ca. 37 Tage und aufgrund morphologischer Merkmale lassen sich die Spermatischen während der Spermiogenese in 14 Stufen unterscheiden (BEHR und WEINBAUER, 1999).



**Abb. 4:** Stadien der Spermatogenese beim *Callithrix jacchus* (aus BEHR und WEINBAUER, 1999). **A:** Spermatozyten Typ A, **B:** Spermatozyten Typ B, **Pl:** präleptotäne Spermatozyten, **L:** leptotäne Spermatozyten, **Z:** zygotäne Spermatozyten, **P:** pachytäne Spermatozyten, **SS:** Sekundäre Spermatozyten. **1-14:** Stufen der Spermiogenese

**Stadium I:** In diesen Stadien treten runde Spermatische (Step 1 – 3) auf. Desweiteren liegen elongierte, vollständig kondensierte und dunkel gefärbte Spermatische (Step 13) vor, die in Bündeln zwischen den anderen Keimzellen im oberen Drittel des Keimepithels zu liegen kommen. Pachytäne Spermatozyten, B-Spermatozyten und A-Spermatozyten (A1 und A2) sind vorhanden. Die Kernmorphologie von Typ A1 und A2 Spermatozyten ist variabel und steht nicht in Zusammenhang mit den einzelnen Spermatogenese Stadien. Die weniger

zahlreichen Typ A1-Spermatogonien weisen im Gegensatz zu den A2-Spermatogonien einen ovoiden Kern auf. Typ A2-Spermatogonien sind deutlich größer als A1-Spermatogonien und sind durch ihr sehr fein gekörntes und hell anfärbares Kernchromatin mit ein bis zwei gut entwickelten Nukleoli zu erkennen. Die typisch runden Typ B-Spermatogonien, die ebenfalls in Größe und Kernmorphologie variieren können, sind trotzdem durch ihr grobkörniges und dunkles Kernchromatin leicht von den A-Spermatogonien zu unterscheiden (Abb. 5).

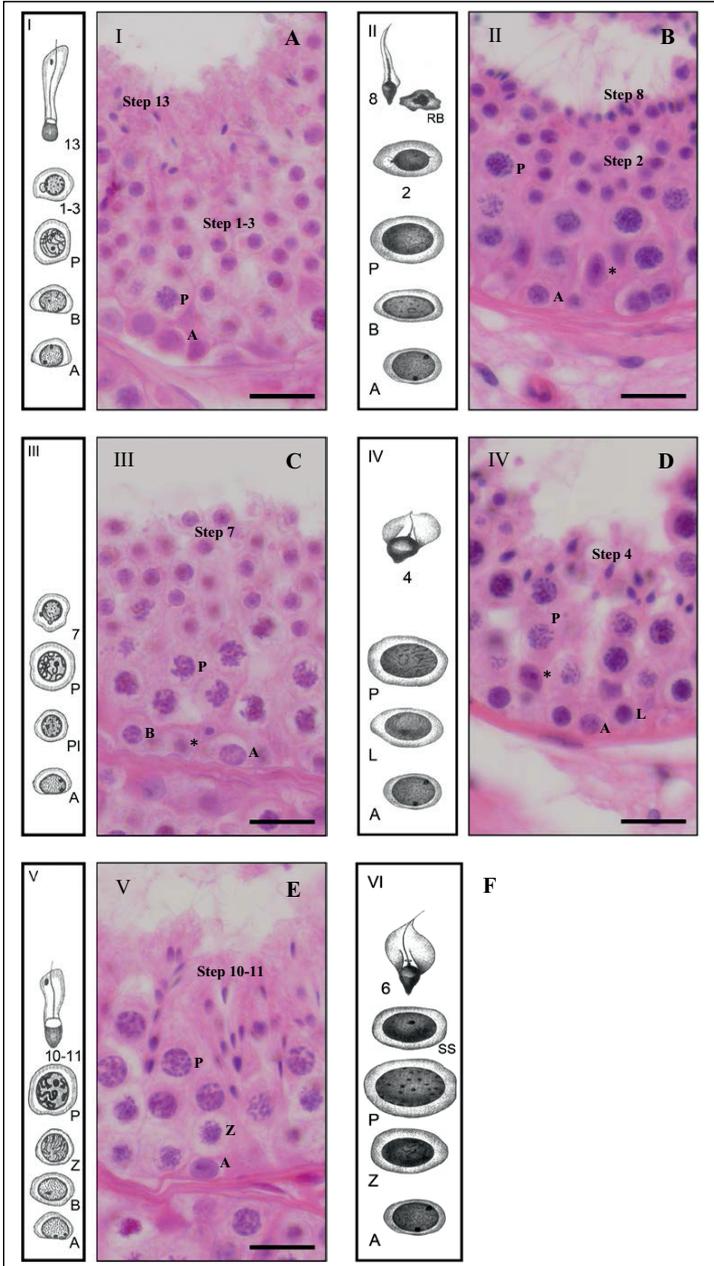
**Stadium II:** Hier findet man ebenfalls noch zwei Generationen von Spermatiden. Runde Spermatiden (Step 4 - 6) und elongierte Spermatiden (Step 14), die zu Beginn noch tief im Keimepithel liegen, später aber beginnen, sich aus ihrem Bündel zu lösen. Zum Ende dieses Stadiums liegen die elongierten Spermatiden einzeln vor und werden ins Tubuluslumen entlassen. Residualkörper sind sichtbar. Pachytäne Spermatozyten, B-Spermatogonien und A-Spermatogonien (A1 und A2) liegen vor.

**Stadium III:** Das Auftreten von präleptotänen Spermatozyten nahe der Basalmembran, mit ihren deutlich runden Zellkernen kennzeichnet dieses Stadium. Charakteristischerweise findet man in diesem Stadium im adluminalen Keimepithel Residualkörper in Abwesenheit von elongierten Spermatiden. Runde Step 3 Spermatiden können deutlich von den darunter liegenden pachytänen Spermatozyten unterschieden werden. Es liegen keine B-Spermatogonien vor (Abb. 5).

**Stadium IV:** Große, helle leptotäne Spermatozyten liegen unter den pachytänen Spermatozyten im Keimepithel. Die runden Spermatiden (Step 8 - 9) beginnen mit der Elongation. Auf der Basallamina liegen nur A1 und A2-Spermatogonien.

**Stadium V:** Die elongierenden Spermatiden (Step 10 - 11), die anfangs einzeln im Keimepithel vorliegen, beginnen sich in Gruppen zusammen zu finden. Der noch nicht vollständig kondensierte Nukleus ist noch transparent. Große pachytäne Spermatozyten mit zum Teil kondensiertem Chromatin sind zu erkennen. Große, helle zygotäne Spermatozyten und B-Spermatogonien liegen vor (Abb. 5).

**Stadium VI:** Diese Keimzelloassoziation ist wie beim Menschen sehr selten in histologischen Schnitten anzutreffen. Locker gebündelte Step 12-Spermatiden liegen im adluminalen Keimepithel. Pachytäne Spermatozyten mit großem Nukleus und sekundäre Spermatozyten, die sich schnell weiter teilen, kommen vor. A1-, A2- und B-Spermatogonien sind vorhanden.



**Abb. 5:** Hämatoxylin-Eosin gefärbte Querschnitte der 6 Stadien des Hoden-Keimepithels von Mensch (B, D, F) und *Callithrix jacchus* (A, C, E) mit entsprechender graphischer Darstellung. Stadium VI (F) ist in den histologischen Präparaten nicht enthalten. A: A-Spermatogonie; B: B-Spermatogonie; PI: präleptotäne Spermatozyte; L: leptotäne Spermatozyte; P: zygotäne Spermatozyte; Z: pachytäne Spermatozyte; \*. Sertoli Zelle; **Step 1-13:** Stufen der Spermatiden. Bar = 25 µm.

### 2.2.3.3. Spermatogenese bei *Bos taurus*

Die Spermatogenese des *Bos taurus* wurde mit Hilfe der Periodic-Acid Schiff (PAS)-Methode bereits 1967 in 12 Stadien (I-XII) unterteilt (HOCHERAU, 1967). Später nutzten auch BERNDSTON und DESJARDINS (1974) dieses System und unterschieden ebenfalls 13 Zelltypen bei der Spermatogenese des Bullen: A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, intermediäre, B1 und B2 Spermatogonien, präleptotäne, leptotäne, zygotäne und pachytäne primäre Spermatozyten, sekundäre Spermatozyten und schließlich die Spermatisden. Die Spermatisden werden wie bei *Callithrix jacchus* in Step 1-14 Spermatisden unterteilt. Bei einem Querschnitt durch den Hoden enthalten Tubuli der Stadien I-VI im histologischen Schnitt immer 5 Generationen an Keimzellen, während Tubuli der Stadien VII-XII nur 4 Generationen enthalten. Bei *Bos taurus* beträgt die Dauer der Spermatogenese ca. 13,5 Tage (HOCHERAU-DE REVIERS et al., 1987).

### 2.3. Spermatogenesestörungen

Störungen der Spermatogenese können die verschiedensten Ursachen haben. Egal ob die Ursache auf der Ebene des Hypothalamus, der Hypophyse, dem Hoden, der ableitenden Samenwege oder der akzessorischen Geschlechtsdrüsen liegt, oder aufgrund von Infektionskrankheiten bedingt ist, führen Spermatogenesestörungen immer zu einer qualitativ und /oder quantitativen verminderten Spermienproduktion bzw. zu einer Azoospermie. Die Diagnose erfolgt anhand eines Spermioграмms.

Die häufigste Diagnose lautet Oligoastheneratozoospermie (OAT-Syndrom), die laut WHO (1999) durch eine Samenzelldichte von < 20 Mio./ml (Oligozoospermie), einen Anteil an beweglichen Samenzellen von < 50% (Asthenozoospermie) und einen Anteil normal geformter Samenzellen von < 30% (Tetrazoospermie) charakterisiert ist. Bei Patienten mit Kinderwunsch, bei denen eine Azoospermie diagnostiziert wurde, wird zusätzlich eine Hodenbiopsie für eine histologische Beurteilung durchgeführt. Die häufigste histologische Diagnose bei Patienten mit OAT-Syndrom lautet „bunte Atrophie“ (SIGG, 1979). Die Histologie des Hodenschnitts zeigt verschiedene Spermatogenesestörungen in benachbarten Tubuli des Hodens, d.h. es sind Tubuli mit normaler Spermatogenese, als auch Tubuli mit Spermatogenese-arresten auf der Stufe von runden Spermatisden, Spermatozyten oder Spermatogonien zu erkennen. Zur Beurteilung der Spermatogeneseeffektivität werden verschiedene „score count“ Verfahren angewandt. In unserer Klinik werden die Hodenbiopsie anhand des heute gängigsten Verfahrens, bei dem der prozentuelle Anteil der Tubuli

seminiferi mit elongierten Spermatisden ermittelt wird, benutzt (BERGMANN und KLIESCH, 1998).

Eine weitere Spermatogenesestörung ist der monomorphe Spermatogenesearrest. Hier erfolgt die Ausreifung der Keimzellen nur bis zu einer gewissen Stufe und es entstehen keine reifen Spermatozoen. Der Arrest kann auf der Stufe der Spermatogonien, der primären Spermatozyten oder der runden Spermatisden auftreten (HOLSTEIN et al., 1988).

Das Sertoli-Cell-Only (SCO) -Syndrom, auch als Germinalzellaplasie bezeichnet, kann eine weitere Ursache einer Azoospermie sein. Das histologische Bild ist sehr charakteristisch, da in den Tubuli seminiferi nur Sertoli Zellen zu finden sind (DEL CASTILLO et al., 1947; HOLSTEIN et al., 1988).

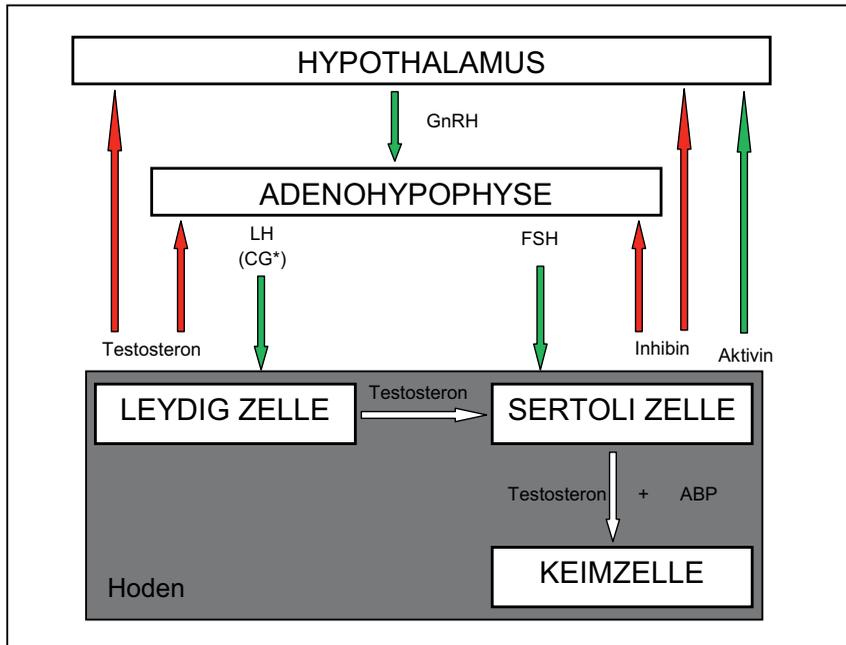
In ihrer Studie berichten MAURA und ERICKSON (2001), dass bei Bullen der Rasse Angus das SCO-Syndrom und Spermatogenesearreste auf Stufe der Spermatogonien bzw. der primären Spermatozyten vorkommen können. Das Deutsche Primatenzentrum berichtet aus eigenen Erfahrungen, dass höchstwahrscheinlich Störungen in der Spermatogenese des *Callithrix jacchus* vorkommen, publizierte Studien über dieses Thema liegen jedoch noch nicht vor.

## **2.4. Regulationsmechanismen der Spermatogenese**

### **2.4.1. Hormonelle Faktoren**

Die zwei Hauptaufgaben des Hodens sind die Testosteronproduktion in den Leydig-Zellen und die Spermienbildung in den Tubuli seminiferi. Dies setzt einen funktionsfähigen endokrinen Regelkreis (Hypothalamus-Hypophysen-Hoden Achse) voraus. Das im Hypothalamus gebildete und freigesetzte Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) bzw. LH-Releasinghormon (LH-RH) gelangt zu den Gonadotropin produzierenden Zellen der Adenohypophyse. Im Hypophysenvorderlappen entstehen die Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Folikelstimulierendes Hormon (FSH). Diese wirken auf die männlichen Keimdrüsen, die Hoden. FSH stimuliert über FSH-Rezeptoren Sertoli Zellen und initiiert damit die Spermatogenese und die Synthese von Androgen-Binding-Proteins (ABP), welches für den Transport von Testosteron nötig ist. LH wirkt über LH-Rezeptoren der Leydig-Zellen, die daraufhin Testosteron produzieren, welches für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese unabdingbar ist. Durch ein komplexes Rückkopplungssystem hemmen hohe Konzentrationen von Testosteron auf Hypothalamusebene die GnRH-Freisetzung und somit auch die Ausschüttung von FSH und LH in der Hypophyse. Der zweite Regulationsmechanismus, der die FSH-Sekretion regelt, geht von den Sertoli-Zellen aus. Diese bilden die Polypeptide

Inhibin und Aktivin. Während Inhibin die GnRH- Freisetzung aus dem Hypothalamus und die FSH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen hemmt, führt Aktivin zu einer vermehrten Freisetzung dieser beiden Hormone (Abb. 6).



**Abb.6:** Schematische Darstellung der endokrinen Regulation der Hodenfunktion. Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH); Luteinisierendes Hormon (LH); \* Chorionic Gonadotropin (CG) bei *Callithrix jacchus*; Folikelstimulierendes Hormon (FSH); Androgen-Binding-Proteins (ABP); Modifiziert nach STEGER, 2005

Während die hormonelle Regulation der Spermatogenese des Rindes der des Menschen gleicht, zeigt der Weißbüschelaffe Unterschiede im Vergleich zu Mensch und Rind. Eine der interessantesten Marmoset spezifischen Adaptionen ist, dass der Weißbüschelaffe kein Luteinisierendes Hormon in der Hirnanhangsdrüse produziert. Obwohl im Marmoset die beiden Gene LH $\beta$  und Chorionic Gonadotropin- $\beta$  (CG $\beta$ ) im Hypophysengewebe vorhanden sind, wie auch in anderen Neuweltaffen, wird ausschließlich CG in der Hypophyse des Weißbüschelaffen exprimiert (MÜLLER et al., 2004; LUETJENS et al., 2005). CG hat jedoch die gleiche Funktion und den gleichen Wirkmechanismus am LH-Rezeptor wie das LH beim Menschen. Der LH Rezeptor des *Callithrix jacchus* kann LH nicht binden, da Exon 10 nicht

exprimiert wird. Dieser hat aber eine hohe Affinität zu CG. Die Funktion und Regulation von FSH und CG und deren Feedback Mechanismus entspricht dem anderer Primaten.

## **2.4.2. Genetische Faktoren**

### **2.4.2.1. Histon-Protamin-Austausch**

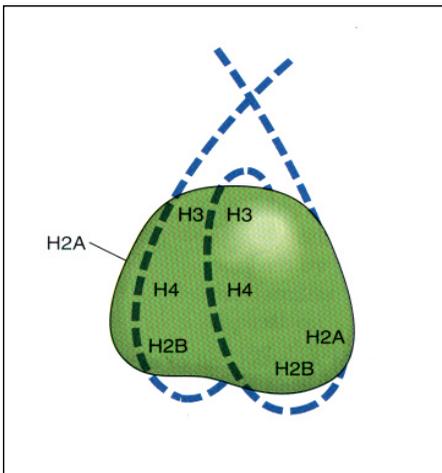
Der Histon-Protamin-Austausch in runden und elongierenden Spermatiden spielt für die männliche Fertilität eine zentrale Rolle. Die Bildung befruchtungsfähiger Spermatozoen erfolgt im Keimepithel der Tubuli seminiferi, wo sie drei Entwicklungsphasen durchlaufen: Mitose, Meiose und Spermiogenese. Die unreifen runden Spermatiden differenzieren sich durch morphologische, biochemische und physiologische Veränderungen zu reifen elongierten Spermatiden. Während dieser Entwicklung kommt es in den haploiden Keimzellen u.a. zur Kondensation des Zellkerns. Die Kondensation des Zellkerns ist eine Folge des Austausches DNA-bindender Histone gegen Protamine (TANPHAICHITR et al., 1978; GATEWOOD et al., 1987). Die Protamin-DNA-Interaktionen haben eine zeitliche Entkopplung von Transkription und Translation in runden Spermatiden und den Stopp der Genexpression in elongierenden Spermatiden zur Folge (STEGGER, 1999, 2001). Dies bedeutet, dass die Synthese der Proteine, die z.B. für die vollständige Kondensation des Chromatins bzw. für die Entwicklung des Akrosoms und des Flagellums benötigt werden, mit zeitlicher Verzögerung zur Expression der mRNAs erfolgt. Die Gene dieser Proteine werden bereits zuvor in den pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden transkribiert. Die Translation findet erst später in elongierenden und elongierten Spermatiden statt.

Zahlreiche Studien zum Histon-Protamin-Austausch im Mensch existieren bereits und brachten aufschlussreiche und detaillierte Informationen in Bezug auf stattfindende Abläufe hervor (STEGGER et al., 1998, 2000, 2001, 2002). Während SAUNDERS et al. (1996) und CORZETT et al. (2002) in ihren Studien zeigen konnten, dass *Callithrix jacchus* beide Protamine in den Spermatozoen exprimiert, fehlen genauere Untersuchungen in Bezug auf den Histon-Protamin-Austausch bei dieser Spezies. Während Protamin-1 in allen Spezies exprimiert wird, ist Protamin-2 nur in Maus (BELLVE und CARRAWAY, 1978; POGANY et al., 1981), Hamster (CORZETT et al., 1999), Hengst (AMMER und HENSCHEN, 1987; BELAICHE et al., 1987), Mensch (BALHORN et al., 1987; TANPHAICHITR et al., 1978) und *Callithrix jacchus* (SAUNDERS et al., 1996; CORZETT et al., 2002) nachgewiesen worden. In *Bos taurus* wird Protamin-2 ebenfalls nicht exprimiert (JOHNSON et al., 1988; CORZETT et al., 2002).

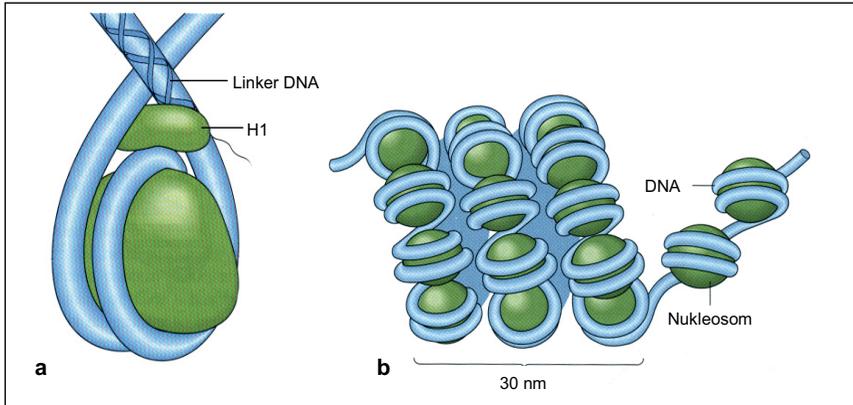
### 2.4.2.2. Histone

Im Kern einer jeden Zelle liegt die DNA, die eine spezielle Struktur besitzt, so dass diese in den sehr kleinen Zellkern überhaupt hinein passt. Der DNA-Faden ist um Proteine, sogenannte Histone, gewunden, die die DNA im Zellkern dicht verpacken. Diese Histone, die als Spulen fungieren, werden in Core-Histone und Nicht-Core-Histone unterschieden. Studien ergaben, dass diese Spulen, um die das DNA-Molekül im Zellkern gewickelt ist, Oktamere sind, die aus den vier Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut sind (LUGER et al., 1997; WOLFE, 1993).

Jeweils 2 Histone von H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Paar und formen den Kern des Nucleosoms, das Oktamer, um das ein genomischer DNA-Abschnitt aus ca. 146 Nucleotiden knapp zweimal herum gewunden ist. Dieses Gebilde bezeichnet man als Nucleosom (Abb. 7). Diese werden durch sogenannte Nicht-Core-Histone (H1) miteinander verbunden (Abb. 8a). Das einzelne Molekül (H1) bindet sich außen sowohl an die um das Oktamer gewickelte DNA und hält diese so an ihrem Platz, als auch an das freie DNA-Stück, das sich als Linker-DNA von einem Nucleosom zum nächsten erstreckt (Abb. 8b).



**Abb. 7:** Die DNA Doppelhelix (---) windet sich um oktamere Proteinkomplexe aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 und bildet mit diesen das Nucleosom. Modifiziert nach WOLFE, 1993



**Abb. 8:** Histon H1 ist mit der Linker DNA assoziiert (a) und verbindet die Nucleosomen, die zur 30 nm-Faser verdichtet vorliegen (b). Modifiziert nach WOLFE, 1993

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Klassen der Histone besteht in ihren N- und C-terminalen Enden. Hier unterscheiden sich die Core-Histone nur sehr gering durch einzelne Aminosäuren voneinander. Bei den Nicht-Core-Histonen bestehen wesentlich größere Abweichungen untereinander an den N- und C-terminalen Enden (BROWN, 2001).

In Spermatozyten und runden Spermatischen werden ebenfalls Nicht-Core-Histone (H1) und Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 unterschieden. Die somatischen Histone H1, H2A, H2B und H3 werden im Verlauf der Spermatogenese durch Hoden-spezifische Subtypen ausgetauscht (MEISTRICH et al., 1985; WITT et al., 1996). Von H4 sind keine Hoden-spezifischen Varianten bekannt.

Bis heute sind zwei Hoden-spezifische Linker-Histone bekannt: H1t und HILS1 (KHOCHBIN, 2001; DRABENT et al., 1996; IGUCHI et al., 2003). DRABENT et al. (1996) und GRIMES et al. (1990) zeigten in ihren Studien, dass das Hoden-spezifische Histon, H1t, während der Spermatogenese in Keimzellen von Maus und Ratte synthetisiert wird. Während das korrekte Histon-Protamin Verhältnis in Spermatozoen für die Fertilität von entscheidender Bedeutung ist, findet eine normale Keimzellentwicklung bei knockout Mäusen für das Hoden-spezifische Histon H1t statt. Obwohl diesen männlichen Mäusen das H1t Gen, welches als unabdingbar für eine korrekt ablaufende Spermatogenese betrachtet wurde, fehlte, brachten sie Nachkommen vom Wildtyp hervor (LIN et al., 2000). Das Hoden-spezifische Histon H1t unterscheidet sich vom somatischen H1 Subtypen dadurch, dass es eine weniger starke Bindung mit der DNA eingeht. Dadurch ist die Chromatin-Kompaktierung deutlich

schwächer ausgeprägt und die DNA ist in diesem Zustand für Chromatinmodulatoren leichter zugänglich.

HILS1 (H1-like protein in spermatids 1) ist das zweite Hoden-spezifische Linker-Histon (DRABENT et al., 1996; KHOCHBIN, 2001; IGUCHI et al., 2003), welches in Maus und Ratte nachgewiesen wurde. Linker-Histone sind für den Erhalt der Chromatinstruktur essentiell und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gentranskription in den männlichen Keimzellen.

TROSTLE-WEIGE et al. (1984) isolierten TH3, eine keimzellspezifische Variante von Histon H3 in Hodengewebe der Ratte. Sie fanden TH3 in Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden. Untersuchungen von MEISTRICH et al. (1985) in Spermatogonien und primären Spermatozyten der Ratte zeigten, dass TH3 nur in den A- und B- Spermatogonien vorhanden ist und hier synthetisiert wird. Später untersuchten WITT et al. (1996) eine weitere Variante des Histon H3 Gens und stellten fest, dass die korrespondierende mRNA nur in Hodengewebe zu detektieren war und nannten es Hoden-spezifisches Histon H3 (H3t). Die RNA dieser H3 Variante wurde ausschließlich in primären Spermatozyten isoliert.

Zusätzlich zu Hoden-spezifischen H3 Varianten kommen im Hoden auch andere Nicht-Hoden-spezifische H3 Subtypen vor, wie H3.3. Die Expression der zwei H3.3 Gene, H3.3A und H3.3B, wurden von ALBIG et al. (1995) und BRAMLAGE et al. (1997) in Maushoden nachgewiesen. In Spermatozyten findet eine auffallend hohe Expression von H3.3 statt und wird mit den intensiven Transkriptionprozessen während der Meiose in Verbindung gebracht (LEWIS et al., 2003).

Zur Gruppe der H2A Core-Histone gehören die Nicht-Hoden-spezifischen Histone H2A.X und makroH2A, die aber in den Keimzellen der Spermatogenese vorkommen und nachweislich eine wichtige Rolle spielen, da Knockout Mäuse für dieses Gen infertil sind (CELESTE et al., 2002). RAO et al. (1983) isolierten eine Hoden-spezifische Variante des H2A Histons, TH2A, und zeigten, dass das somatische Histon H2A in pachytänen Spermatozyten zu 60% gegen das TH2A während der Spermatogenese ausgetauscht wird. MEISTRICH et al. (1985) demonstrierten kurze Zeit später, dass TH2A in Spermatogonien und primären Spermatozyten exprimiert wird.

Hoden-spezifische H2B Histone wurden 1975 von SHIRES et al. (1975) entdeckt. Bei Ratte und Maus konnte demonstriert werden, dass somatisches H2B während der Spermatogenese gegen Hoden-spezifisches TH2B ausgetauscht wird (RAO et al., 1983; MEISTRICH et al., 1985; CHOI et al., 1996). In humanen Hoden wird TH2B in Spermatogonien und runden

Spermatiden exprimiert und nimmt während der Spermatogenese im Zuge des Histon-Protamin-Austausches ab (VAN ROIJEN et al., 1998).

Im Genom der Ratte fanden GRIMES et al. (1987) das H4-Gen. Später gelang es DRABENT et al. (1995), das H4 Gen von Maus und Mensch zu isolieren. Eine Hoden-spezifische Variante ist bislang unbekannt. Die höchste Expression von somatischem Hison H4 wurde in pachytänen Spermatozyten nachgewiesen (WOLFE et al., 1989; DRABENT et al., 1995).

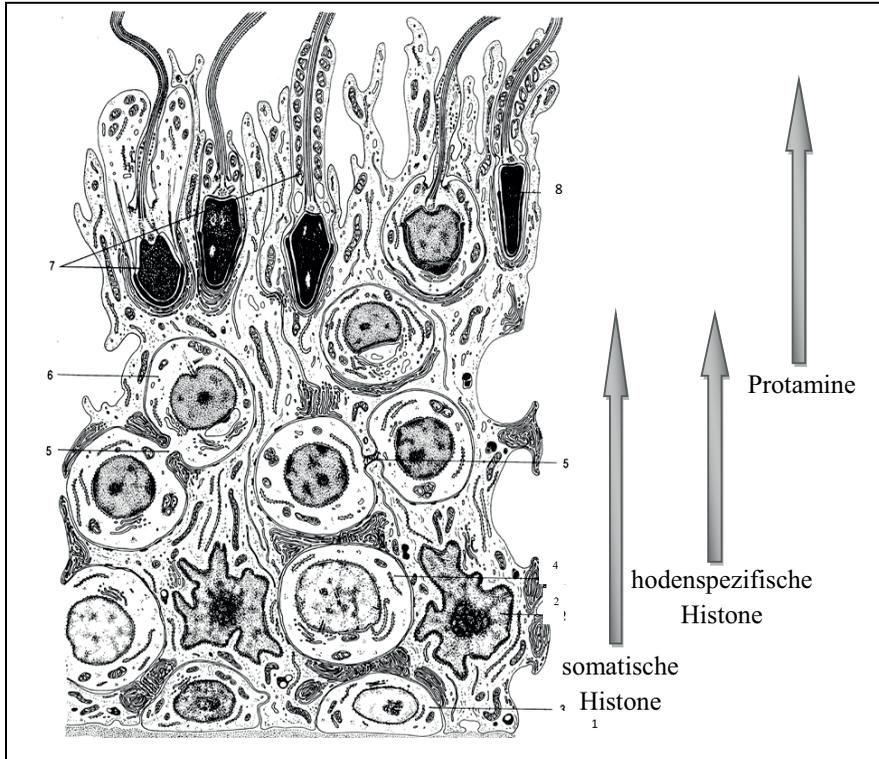
Während bei Mensch, Maus und Ratte die verschiedenen Histonvarianten in zahlreichen Studien untersucht wurden, existieren bis heute kaum Informationen, die *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* betreffen.

#### 2.4.2.3. Protamine

Die Spermiogenese stellt die letzte Phase der Spermatogenese dar. Hier findet in Spermatozyten und runden Spermatiden zuerst der Austausch von DNA-bindender somatischer Histone gegen hodenspezifische Histone statt (MEISTRICH et al., 1977; DRABENT et al., 1996), die unmittelbar danach in den elongierenden Spermatiden durch Protamine ersetzt werden (OLIVA und DIXON, 1991; DADOUNE, 1995; WOUTERS-TYROU et al., 1998; STEGER, 1999) (Abb. 9). Dies hat eine Zunahme der Chromatinkondensation, eine Minimierung des Kernvolumens und schließlich den Stopp der Transkription zur Folge. Beim Mensch sind in diesem Prozess zwei verschiedene Proteinmoleküle, Protamin-1 (*PRM 1*) und Protamin-2 (*PRM 2*), involviert (STEGER et al., 2000).

Interessanterweise ist *PRM 1* in Spermatozoen aller bisher untersuchten Spezies vorhanden, während *PRM 2* nur in wenigen Spezies gefunden werden konnte, unter anderem in Maus, Hamster, Hengst und im Weißbüschelaffen (SAUNDERS et al., 1996; CORZETT et al., 2002).

Das kleinere der beiden Proteine, PRM 1, weist einen hohen Gehalt an Cystein und Arginin auf, während PRM 2 als Vorläufer Protein synthetisiert und nach Bindung an die DNA durch Prozessierung um 40% gekürzt wird (YELICK et al., 1987; CARRÉ-EUSÈBE et al., 1991; ELSEVIER et al., 1991), einen hohen Gehalt an Histidin aufweist.



**Abb. 9:** Schema des männlichen Keimepithels mit Reifung der männlichen Keimzellen. Während der Spermio-genese findet der Histon-Protamin-Austausch in den runden und elongierenden Spermatozyten statt. 1: Basalmembran; 2: Sertoli-Zelle; 3: Spermatogonie; 4: Spermatozyte I. Ordnung; 5: Interzellularbrücke; 6: Spermatozyte der Golgi-Phase; 7: verschiedene Differenzierungsstufen auf dem Weg von der elongierten Spermatozyte zur Samenzelle (8); (Modifiziert nach SINOWATZ, 1992).

Das Massenverhältnis von Protamin zu DNA zwischen verschiedenen Spezies ist nahezu konstant (BENCH et al., 1996). Während das Verhältnis von PRM 1 zu PRM 2 zwischen verschiedenen Spezies zwar variabel ist, ist dieses aber innerhalb einer Art konstant (CORZETT et al., 2002). Desweiteren ist bekannt, dass der Anteil an PRM 2 große Variabilität von 0 bis 80% zwischen verschiedenen Spezies zeigt (CORZETT et al., 2002).

Mittels *in-situ* Hybridisierung an Hodenschnitten des Menschen wurden die Transkripte von *PRM 1* und *PRM 2* in Spermatozyten der Stufen 1 bis 4 detektiert (STEGER et al., 2000). Auf Proteinebene wurden beide Protamine von Stufe 4 bis 8 der Spermato-genese festgestellt (GATEWOOD et al., 1990; PRIGENT et al., 1996).

In Studien wurde belegt, dass das Verhältnis von PRM 1 zu PRM 2 auf mRNA und Protein Ebene von entscheidender Bedeutung für das Fertilisierungspotential der Spermatozoen ist (BALHORN et al., 1988 STEGER et al., 2000, 2001, 2003, 2008). Zusätzlich wird postuliert, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem *PRM 1* und *PRM 2* mRNA Level und der Qualität von frühen Embryonen besteht. Dies könnte darauf hindeuten, dass Protamine nicht nur eine wichtige Rolle bei der Befruchtung spielen, sondern auch einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen ausüben (DEPA-MARTINÓW et al., 2007).

BEDFORD et al. (1973) postulierten, dass ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Kondensation des Kernchromatins in Spermatozoen und einer reduzierten männlichen Fertilität bestehen könnte. 1976 beschrieben SILVESTRONI et al. (1976), dass Störungen des Histon-Protamin-Austausches während der Spermatogenese zu männlicher Infertilität führen könnte. Weitere Studien bestätigen, dass eine unvollständige Chromatinkondensation in testikulären Spermien bei nicht-obstruktiver Azoospermie zu beobachten ist (HAMMADEH et al., 1999) und mit Frühabort (EVENSON, 1999) und niedrigen Fertilitätsraten nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) zusammenhängt.

BALHORN et al. (1988), CARRELL und LIU (2001) und BELOKOPYTOVA et al. (1993) konnten zeigen, dass das *PRM 1* zu *PRM 2* Verhältnis in ejakulierten Spermatozoen von infertilen Männern deutlich verändert ist. Dies betrifft sowohl die mRNA in testikulären Spermiden (STEGER et al., 2001, 2003, 2008), als auch das Protein in ejakulierten Spermatozoen (BALHORN et al., 1987, AOKI et al., 2005). CHO et al. (2001) zeigten in ihrer Studie, dass haploinsuffiziente Mäuse für *PRM 1* beziehungsweise *PRM 2* vollkommen infertil sind. Desweiteren ergab ihre Studie, dass die Quotienten von PRM 1 zu PRM 2 auf Protein und mRNA Ebene eine wichtige Rolle für die männliche Fertilität spielen. Zusätzlich führt eine vorzeitige Expression von Protamin über eine vorzeitige Chromatinkondensation zu einem Stopp der Keimzellendifferenzierung und folglich zu Infertilität (LEE et al., 1995). Andere Studien bei infertilen Männern zeigen, dass die Infertilität auf eine inkomplette Entwicklung von PRM 2 Vorläufermolekülen zurückzuführen ist (CHEVAILLIER et al., 1987; BALHORN et al., 1988; DE YERBA und OLIVA, 1993; DE YERBA et al., 1998). Dies hat eine verminderte PRM 2 Menge in Spermatozoen und weiterhin ein gestörtes Verhältnis von PRM 1 zu PRM 2 zur Folge. Einen verminderten Protamingehalt bei infertilen Männern stellten auch andere Autoren in ihren Studien fest (LESCOAT et al., 1987; BLANCHARD et al., 1990; SAKKAS et al., 1996; ZIYYAT et al., 1999).

In einzelnen Spermiden von infertilen TESE/ICSI Patienten wurde ein verminderter Gehalt an *PRM 1* Transkripten festgestellt (STEGER et al., 2003). Eine geringere Expression von

*PRM 1* wurde von MITCHELL et al. (2005) bei Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie im Vergleich zu obstruktiver Azoospermie beobachtet. Diese Tatsache scheint sich auf die Schwangerschaftsrate nach TESE/ICSI auszuwirken. Nach Befruchtung mit Spermatozoen mit geringerem *PRM 1* Gehalt war die Schwangerschaftsrate signifikant niedriger als mit Spermatozoen mit höherem *PRM 1* Gehalt (MITCHELL et al., 2005).

Der Weißbüschelaffe exprimiert, wie der Mensch, beide Protamine (SAUNDERS et al., 1996), während *Bos taurus* nur *PRM 1* exprimiert (JOHNSON et al., 1988; CORZETT et al., 2002). Die Gensequenz ist von *PRM 2* beim Weißbüschelaffen bereits bekannt (SAUNDERS et al., 1996) und zeigt eine 80% ige Homologie zur *PRM 2* Sequenz des Menschen. Die Gensequenz von *PRM 1* beim Weißbüschelaffen war bislang noch unbekannt. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der Gensequenz für *PRM 1* und der damit verbundenen hohen Homologie zwischen verschiedenen Spezies, konnte die Gensequenz mit Hilfe der für die menschliche *PRM 1* Sequenz generierten Primer im Rahmen dieser Studie ermittelt werden.

### **2.4.3. Epigenetische Regulationsmechanismen während der Spermatogenese**

#### **2.4.3.1. Histon-Code**

Als Histon-Code werden die unterschiedlichen Modifikationen von Histonen bezeichnet. Histone besitzen verschiedene Möglichkeiten für post-translationale Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung (BRADBURY 1992). Diese Histonmodifikationen steuern die Interaktion von Chromatin und DNA und somit deren Funktion (GRUNSTEIN, 1997; JENUWEIN und ALLIS, 2001; TURNER, 2002). Diese Modifikationen befinden sich an den aus dem Nukleosom herausragenden flexiblen N-terminalen Domänen (Histon-Tails) der Histon-Proteine (FLETCHER und HANSEN, 1996; KORNBERG und LORCH, 1999). Über eine Modifikation spezifischer Histon-Aminosäureresten an den N-terminalen Domänen wird eine Verdichtung oder eine Auflockerung des Chromatins erreicht. Dadurch ergibt sich eine unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA z.B. für Transkriptionsfaktoren. Insgesamt entscheidet die Gesamtheit der Modifikationen eines Sequenzabschnittes der DNA über die Struktur des Chromatins und ist für eine gewebespezifische und zeitlich korrekte Genexpression Voraussetzung.

Eine grundlegende Voraussetzung für die Bildung von befruchtungsfähigen Spermien aus Spermatogonien ist eben diese streng koordinierte, kontrollierte und stadienspezifische Genexpression. Die Erforschung der epigenetischen Steuerung der Spermatogenese befindet sich noch in den Anfängen. Man vermutet, dass der Histon-Code in den Keimzellen als

stadienspezifische Histonmodifikation während der postmeiotischen Umstrukturierung des Genoms aktiv ist. Es gibt jedoch noch reichlich Klärungsbedarf, was die genaue Bedeutung und Funktion für die Chromatinreorganisation und den Histon-Protamin-Austausch in elongierenden Spermatiden angeht.

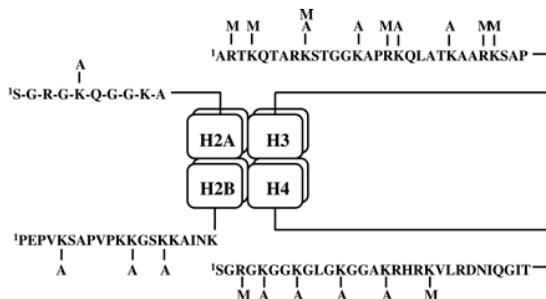
Die am besten untersuchte Histonmodifikation ist die Acetylierung, die von zwei Enzymen, den Histon-Acetyltransferasen (HATs) und den Histon-Deacetylasen (HDACs), gesteuert wird (STRUHL, 1998). HATs übertragen die aktivierte Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf die Aminogruppe konservierter Lysinreste in der N-terminalen Region der Core-Histone.

Die Acetylierung neutralisiert die unter physiologischen Bedingungen vorliegende positiv geladene Aminogruppe durch Bildung einer Amidbindung. HDACs führen im Gegensatz zu einer Hydrolyse der Amidgruppe. Abbildung 10 zeigt unter anderem einen Überblick über mögliche Lysine, die an den verschiedenen Core-Histonen acetyliert werden können.

Liegen die Lysinreste in einem acetyliertem Zustand vor, führt dies dazu, dass die positive Ladung der Histone neutralisiert und die DNA-Histon Verbindungen aufgelockert werden (DAVIE, 1998; TURNER, 1991; WORKMAN und KINGSTON, 1998; KORNBERG und LORCH, 1999).

Die Acetylierung von spezifischen Lysinresten an den N-terminalen Enden ist in mehreren Zellprozessen involviert. Während der DNA-Synthese führt eine Acetylierung der Core-Histone dazu, dass Transkriptionsfaktoren leichter an Promotorregionen binden und Transkription gewisser Gene stattfinden kann (LOIDL und GROBNER, 1987; WOLFFE und DIMITROV, 1993). Desweiteren wird durch Acetylierung und Deacetylierung des Chromatins das Ablesen der Gene an der DNA reguliert (JENUWEIN und ALLIS, 2001). GARDINER-GARDEN et al. (1998) zeigten in ihren Studien, dass Gene in männlichen Keimzellen spezifisch mit hypo- bzw. hyperacetylierten Histonen assoziiert sind. Auch soll eine Deacetylierung der Aminogruppe von Lysinresten der Core-Histone am „Gen-Silencing“ beteiligt sein (GREGORY et al., 2001; MARKS et al., 2001). Ein dritter Prozess, in dem die Acetylierung der Histone eine entscheidende Rolle spielt, ist der Austausch der Histone gegen Transitionsproteine und Protamine während der Spermiogenese. Im Menschen werden in runden Spermatiden ca. 85 % der Histone gegen Transitionsproteine ausgetauscht (TANPHAICHITR et al., 1978; GATEWOOD et al., 1987). In elongierenden Spermatiden werden diese in einem weiteren Schritt durch Protamine ersetzt. In der Maus verbleibt ca. 1% der DNA gebunden an Nukleosomen (GATEWOOD et al., 1990). Dieser Austausch führt zur Kondensation des Zellkerns (OLIVA und DIXON, 1991). Damit die Protamine an die DNA binden können, müssen die Histone entfernt werden. Hierzu ist eine Auflockerung der DNA-

Histon Verbindung nötig, die durch spezifische Acetylierung bestimmter Lysinreste der N-terminalen Domänen der Core-Histone hervorgerufen wird (TURNER, 1991; DAVIE, 1998). KENNEDY et al. (1980, 1981) konnten zeigen, dass bei Tierarten (Winterflunder und Karpfen), bei denen es während der Spermio-genese zu keinem Austausch von Histonen gegen Protamine kommt, die Histone unacetyliert vorliegen. Findet jedoch ein Histon-Protamin Austausch statt, wie beispielsweise beim Mensch, liegen die 15 % Histone, die in den Spermatozoen nicht gegen Protamine ausgetauscht werden, acetyliert vor (GATEWOOD et al., 1987). Es stellt sich die Frage, ob diese acetylierten Histone eine spezifische Rolle bei der Befruchtung und frühen Embryoentwicklung spielen. VAN DER HEIJDEN et al. (2006) demonstrierten, dass die Histonmodifikationen H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac in Spermatozoen (Maus), die aus dem Kopf des Nebenhodens isoliert wurden, vorhanden waren. Nach der Fertilisation konnten in der Zygote H4K8ac und H4K12ac noch detektiert und als Heterochromatin paternalen Herkunft identifiziert werden. Bislang ist noch weitestgehend ungeklärt, welche Prozesse innerhalb der ersten Minuten bzw. Stunden nach Vereinigung der männlichen und weiblichen Gameten von statten gehen. Mehrere Studien (OSTERMEIER et al., 2002; YAO et al., 2003; MILLER et al., 2005) lassen darauf schließen, dass das paternale Genom nicht nur Überbringer der Erbinformation ist. Es wird postuliert, dass bestimmte Histonmodifikationen paternalen Herkunft unverzichtbar für den Start der Genexpression in der Zygote sind. Da acetylierte Histone mit Transkription in Verbindung stehen, untersuchten wir in dieser Studie unter anderem die Histonmodifikationen H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac während der normalen Spermato-genese (Mensch und *Callithrix jacchus*) und frühen Embryonalentwicklung (Mensch, *Callithrix jacchus* und *Bos taurus*).



## Produktion, Reifung und Funktion des weiblichen Gameten

### 2.5. Aufbau des Ovars und Ablauf der Oogenese

Die Eierstöcke sind paarig angelegt und besitzen eine ellipsoide- bis nierenförmige Gestalt (4-6 cm lang) beim Rind, eine rundliche Form (0,5 cm Durchmesser) beim Weißbüschelaffen und beim Mensch ist es ein eher mandelförmig geformtes Organ (ca. 3 cm lang, 1,5 cm breit und 1 cm dick). In ihnen entwickeln sich die weiblichen Keimzellen und es findet die Bildung weiblicher Geschlechtshormone statt.

Ein Querschnitt durch den Eierstock eines Rindes bzw. Mensch zeigt im Inneren eine lockere, gefäßreiche Zona medullaris seu vasculosa und eine dichtere, äußere Rindenschicht (Zona parenchymatosa seu corticalis), die wiederum nach Außen von der Tunica albuginea begrenzt wird. In der Zona parenchymatosa findet man die Follikel und die Gelbkörper.

#### 2.5.1. Oogenese und Follikulogenese

Als Oogenese bezeichnet man die Entwicklung der weiblichen Keimzellen (Gameten). Diese beginnt bereits in der frühen Fetalperiode. In den Gonadenanlagen vermehren sich die Oogonien durch mitotische Teilungen, wobei sie stets über Zytoplasmabrücken verbunden bleiben. Diese Vermehrungsphase dauert bei Säugetieren bis zu ihrer Geburt an. Die Oogonien treten noch Pränatal in die Prophase der ersten meiotischen Teilung ein und werden ab diesem Zeitpunkt als primären Oozyten (44xx, 2n, 4c DNA) bezeichnet. Sie verlieren ihre Teilungsfähigkeit und somit ist die maximale Anzahl an weiblichen Keimzellen bereits vor der Geburt festgelegt (VORONINA und WESSEL, 2003). Diese primären Oozyten verharren über Jahre im Diplotän-Stadium der Prophase I. Während dieser Wachstumsphase werden die Oozyten von einer Follikelzellschicht umgeben und bilden mit dieser den Primordialfollikel. In dieser Ruhe degeneriert eine Mehrzahl der Oozyten. Die übrigen primären Oozyten nehmen um das 200-fache an Volumen zu (MOOR et al., 1990). Zusätzlich nimmt der gesamt-RNA Gehalt um das 300-fache zu. Diese Volumenzunahme stellt eine wichtige Voraussetzung für die weitere Entwicklung des Primordialfollikels und die frühe Embryonalentwicklung der Oozyte dar (STERNLICHT und SCHULTZ, 1981). Die Meiose wird fortgesetzt mit Beginn der Pubertät durch die Freisetzung von FSH und LH und die dadurch induzierte Ovation. Aus der diploiden primären Oozyte (44 XX, 2n, 4c DNA) entsteht die sekundäre Oozyte mit haploidem Chromosomensatz (22 X, 1n, 2c DNA) durch

Abschnürung des ersten Polkörperpers. Die sekundäre Oozyte beginnt direkt im Anschluss an die 1. Reifeteilung die 2. Reifeteilung und arretiert erneut im Metaphase II-Stadium. Die Ovulation erfolgt und die sekundäre Oozyte gelangt in den Eileiter. Erst durch ein penetrierendes Spermatozoon wird die Eizelle aktiviert und vollendet die 2. Reifeteilung (22X, 1n, 1c DNA) mit Abschnürung des zweiten Polkörperchens (MOORE, 1985). Die befruchtungsfähige Oocyte II mit haploidem Chromosomensatz vereinigt sich mit dem Spermium und es entsteht die diploide Zygote (44 XX oder 44XY, 2n, 2c DNA).

Zeitgleich mit der Oogenese findet die Follikulogenese statt. Es lassen sich verschiedene Differenzierungsformen der Ovarialfollikel unterscheiden: Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel und Tertiärfollikel. Diese verschiedenen Follikelformen spiegeln die Entwicklung und Ausreifung der Eizelle wider. Die primäre Oocyte wird im Primordialfollikel von einer Schicht abgeplatteter, undifferenzierter Follikel epithelzellen umgeben. Der Primordialfollikel wandelt sich zum Primärfollikel, der ein einschichtiges, hochprismatisches Follikel epithel aufweist. Durch mitotische Teilung der Follikelzellen entsteht aus dem Primärfollikel der Sekundärfollikel mit drei- bis fünfschichtigem, zum Teil prismatischem Follikel epithel. In diesem entstehen flüssigkeitsgefüllte Spalträume. Durch weitere Flüssigkeitsvermehrung entsteht die Follikelhöhle und durch Verdickung der inneren Follikelwandschicht entsteht der Tertiärfollikel, der sich in den sprungreifen Graaf-Follikel weiter entwickelt. Dieser ist beim Rind ca. 2 cm groß und überragt die Ovaroberfläche deutlich. Nach der Ovulation wandelt sich der Follikel in den Gelbkörper (Corpus luteum) um (WELSCH, 2003).

### 2.5.2. Morphologie der Oozyte

Sprungreife Oozyten sind die größten Zellen des Organismus. Der Durchmesser einer Oozyte zum Zeitpunkt der Ovulation beträgt bei *Bos taurus* 150 µm (KANITZ, 1994, BOSTEDT, 2003), beim Mensch 100-120 µm (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996) und beim *Callithrix jacchus* 90 µm (GILCHRIST et al., 1995). Oozyten sind reich an Zytoplasma und enthalten neben dem Zellkern die üblichen Zellorganellen wie Ribosomen, Mitochondrien und Golgiapparat. Der runde Zellkern ist der Ort der Ribosomen- und Proteinsynthese (FAIR et al., 2001). Die im Zytoplasma liegenden Mitochondrien sind in der reifen Oozyte zahlreich vorhanden, haben eine runde Form und enthalten mehrere Vakuolen (YANAGIMACHI, 1994). Der Golgiapparat, wie auch das Endoplasmatische Retikulum und die Ribosomen sind an der Bildung der corticalen Granula beteiligt, die unter der Plasmamembran zu liegen kommen. Diese enthält Glycosidasen und Proteinase, die bei der Befruchtung in den

perivitellinen Spalt von der Eizelle freigesetzt werden und das „Hardening“ der Zona Pellucida bewirken. Diese Zonareaktion ist die Barriere gegen Polyspermie (HOODBHOY und TALBOT, 1994; SATHANANTHAN et al., 2006). Die Plasmamembran der Eizelle besitzt Mikrovilli, die in die Zona pellucida hineinreichen. Auch die Granulosazellen besitzen Mikrovilli, die durch die Zona pellucida hindurch bis in das Zytoplasma der Eizelle reichen (SATHANANTHAN et al., 2006). Die Oozyte ist von der Zona pellucida umgeben, die aus Proteoglycanen und Glycoproteinen aufgebaut ist und einen Schutz gegen mechanische Reize bietet. Beim Rind weist sie eine Dicke von 27  $\mu\text{m}$  (SINOWATZ et al., 2001) und beim Marmoset eine Dicke von 16  $\mu\text{m}$  auf (GILCHRIST et al., 1995). Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Induktion der Akrosomenreaktion und der Verhinderung einer Polyspermie (YANAGIMACHI, 1994).

### 2.5.3. Hormonelle Regulation

Das Rind befindet sich das ganze Jahr im Polyöstrus. Der Weißbüschelaffe, der in Gefangenschaft gehalten wird, zeigt ebenfalls keine Saisonalität und paart sich das ganze Jahr (BRAND, 1980; KHOLKUTE, 1984; KHOLKUTE et al., 1987).

Im Hypothalamus wird das gonadotropin-freisetzende Hormon (GnRH, Gonadoliberin) produziert. Dieses wird zum Hypophysenvorderlappen transportiert, wo es die gonadotropen Zellen der Hypophyse zur Sekretion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) stimuliert. Beim Weißbüschelaffen wird, wie bereits erläutert (2.4.1. Hormonelle Faktoren, S. 18), anstelle des LH Chorion Gonadotropin (CG) ausgeschüttet. FSH stimuliert im Ovar die Entwicklung der Follikel. LH, bzw. CG, stimuliert die Synthese von Androstendion aus Cholesterin in der Theca interna des Follikels. Dieses wird zu Testosteron, das in den Granulosazellen des Follikels wiederum zu Östradiol-17 $\beta$  umgewandelt wird. Östradiol steigert die GnRH Freisetzung, die einen LH-Peak induziert, der für die Ovulation verantwortlich ist. Nach der Ovulation wandelt sich der Follikel unter dem Einfluss von LH in den Gelbkörper um. Dieser synthetisiert Progesteron und Oxytocin. Wird die Eizelle befruchtet, ist das Progesteron für den Erhalt der Trächtigkeit das wichtigste Hormon. Es vermindert die Freisetzung von GnRH und verhindert damit eine erneute Ovulation. Desweiteren bereitet es das Endometrium auf die Einnistung des Embryos vor und hemmt unkontrollierte Kontraktionen der Uteruswand. Bei ausbleibender oder steriler Paarung, setzt das Endometrium beim Rind etwa 16 Tage, beim Weißbüschelaffen etwa 11-12 Tage, nach der Ovulation Prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2  $\alpha$ ) frei und der Gelbkörper löst sich auf. Die Progesteronkonzentration im Blut nimmt ab und die GnRH-Freisetzung aus dem

Hypothalamus wird nicht länger gehemmt und leitet eine neue Follikelphase mit Bildung eines präovulatorischen Follikels ein (MEINECKE, 2000).

#### **2.5.4. Fertilisation und frühe Embryonalentwicklung**

Testikuläre Spermatozoen sind noch nicht befruchtungsfähig und erwerben erst im Nebenhoden in einer sogenannten Reifungsphase ihre Befruchtungskompetenz. Nach erfolgter Ejakulation und anschließend vorwiegend passivem Transport der Spermien im Uterus durch Kontraktionen der Uterusmuskulatur, gelangen nur wenige Spermien schließlich in den Eileiter (Isthmus). Im Isthmus beginnen die Spermien zu kapazitieren. Die Spermienkapazitation ist ein komplexer Prozeß und umfaßt alle physiologischen Veränderungen eines Spermatozoons, die es zur Akrosomenreaktion und den hyperaktivierten Zick-Zack-Bewegung befähigen (MEINECKE, 2000). Zum Zeitpunkt der Ovulation gelangen die Spermien in die Eileiterampulle (Ampulla tubae uterinae), den Ort der Befruchtung. Das Spermatozoon trifft auf die Zona pellucida der Eizelle, eine extrazelluläre Matrix aus Glykoproteinen. SALING (1989) und YANAGIMACHI (1994) beschrieben, dass diese primäre Bindung wahrscheinlich durch Oligosaccharide des ZP3 Proteins (Zona pellucida 3-Protein) vermittelt wird. Nach Bindung an die Zona pellucida induzieren die Glykoproteine die Akrosomenreaktion, bei der Enzyme des Akrosoms freigesetzt werden. Unter Beteiligung von G-Proteinen und einer Rezeptortyrosinkinase wird ein spannungsabhängiger Calciumkanal geöffnet und es kommt zu einem massiven Einstrom von extrazellulärem Calcium in das Spermium, welches Akrosin und Hyaluronidase aus dem Akrosom freisetzt. Durch die Auslösung der Akrosomreaktion direkt an der Zona pellucida ist gewährleistet, dass die dabei freigesetzten Enzyme wie z.B. das Akrosin, direkt an ihrer Zielstruktur, der Zona pellucida wirken können. Durch Proteolyse wird die Zona pellucida angedaut und in ihrer Struktur soweit verändert, dass das hyperaktivierte Spermium diese penetrieren (WASSARMAN, 1994) und in den perivitellinen Raum der Eizelle gelangen kann. Der Kopf des Spermatozoon lagert sich seitlich an das Oolemma der Eizelle an und wird von feinen Plasmaausläufern des Ooplasmas (Mikrovilli) schließlich umhüllt und in das Cytoplasma der Eizelle aufgenommen. Dabei werden die einzelnen Strukturen des Spermatozoon aufgelöst. Die Zellmembranen von Oozyte (Vitellinmembran) und Spermium fusionieren und es kommt zu einer Membrandepolarisation, die eine erneute Calciumausschüttung aus den unmittelbar unter der Vitellinmembran liegenden Corticalen Granula auslöst. Diese sofort einsetzende Depolarisation breitet sich über das Zytoplasma der Oozyte aus und verhindert die Fusion weiterer Spermatozoen (Polyspermieblock). Die Zunahme der Calciumkonzentration

veranlasst außerdem die Oozyte, die 2. Reifeteilung zu beenden. Am Ende der 2. Reifeteilung wird einer der beiden haploiden Chromosomensätze der Oozyte mit dem zweiten Polkörper ausgestoßen. In der Oozyte verbleiben zwei haploide Chromosomensätze, die sich im männlichen und weiblichen Vorkern (Pronucleus) befinden. In der entstandenen diploiden Zygote bewegen sich nun die beiden Vorkerne aufeinander zu und verdoppeln dabei ihre Chromosomensätze. Beim Aufeinandertreffen der beiden Vorkerne lösen sich ihre Membranen auf, das Chromatin kondensiert zu den Chromosomen, welche sich in einer gemeinsamen Mitosespindel anordnen (MEINECKE, 2000). Das Gesamtvolumen gegenüber der Zygote bleibt während der folgenden Furchungsteilung unverändert. Durch die erste Furchungsteilung entstehen zwei Tochterzellen (Blastomere). Weitere Furchungsteilungen führen zur Bildung der Morula, ein kugeliger Zellhaufen von 8 – 32 Blastomeren, die durch die Zona pellucida zu einem einheitlichen Verband zusammengehalten werden.

### **2.5.5. Epigenetische Regulationsmechanismen während der frühen Embryonalentwicklung**

Unmittelbar nach der Befruchtung zeichnet sich die Zygote durch zwei sehr unterschiedliche Arten von Chromatin aus. Im Gegensatz zum Chromatin in den Spermatozoen, deren DNA beim Menschen zu 85 % an Protamine und nur zu 15 % an Histone gebunden im Zellkern vorliegt (GATEWOOD et al., 1987; BENCH et al., 1986), ist die DNA im maternalen Genom nur mit Histonen assoziiert (ROUSSEAUX et al., 2005; KIMMINS und SASSONI-CORSI, 2005; SASAKI und MATSUI, 2008). Es stellt sich die Frage, ob die DNA-Bindung an Histone bzw. Protamine wahllos oder sequenzspezifisch erfolgt. Untersuchungen am Menschen von GATEWOOD et al. (1987) deuten auf die Existenz von sequenzspezifischen Nukleosom-Histon bzw. Nukleosom-Protamin Assoziationen im Nukleus des Spermatozoon hin. WYKES und KRAWETZ (2003) beschäftigten sich mit dem Protamin-Lokus und konnten zeigen, dass die Promotor-Region von PRM 1 in menschlichen Spermatozoen an Histone und die Kodierende-Region von PRM 1 an Protamine gebunden ist. Desweiteren wird postuliert, dass diese sequenzspezifische Verteilung essentiell ist für eine adäquate Dekondensation und Reorganisation des paternalen Genoms nach der Befruchtung (WYKES und KRAWETZ, 2003). Ergebnisse von VAN DER HEIJDEN et al. (2006) deuten darauf hin, dass die Nukleosom-Histon Komponente des Nukleus als Template für den Protamin-Histon-Austausch nach der Fertilisation dienen könnte. Weitere Studien lassen darauf schließen, dass die verbleibenden Histone im Nukleus des Spermatozoon beeinflussen, welche Gene nach der Befruchtung transkribiert werden (GATEWOOD et al., 1990; GARDINER-GARDEN et al.,

1998) und bestätigen somit andere Untersuchungen, dass die DNA-Bindung an Histone bzw. Protamine im Zellkern des Spermatozoon nicht zufällig geschieht.

In der befruchteten Eizelle (Zygote) und den darauf folgenden frühen Embryonalstadien findet eine epigenetische Reprogrammierung von väterlichem und mütterlichem Genom in ein neues männliches bzw. weibliches diploides Genom statt.

Die Spermien-DNA weist durch die enge DNA-Protamin Interaktion eine nahezu kristalline Struktur auf. Die histonverpackten Chromosomen der Eizelle sind deutlich weniger kondensiert und zusätzlich in der Metaphase der 2. Reifeteilung arretiert. Erst bei der Befruchtung vollendet die Eizelle die Meiose, durch Ausstoßung des zweiten Polkörperchens. Das Chromatin des Spermiums wird in der befruchteten Eizelle zunächst dekondensiert (PERREAULT, 1992) und die Protamine des Spermienkerns durch nukleosomale Histone ausgetauscht. Es entsteht der sogenannte väterliche Vorkern. Dadurch ähnelt das paternale Genom nun dem nukleosomal organisierten maternalen Genom. In diesem Vorkernstadium sind väterliches und mütterliches Genom durch ihre jeweils eigene Kernmembran noch voneinander getrennt. In diesem Stadium findet eine aktive Demethylierung des paternalen Genoms statt, während das maternale Genom davon nicht betroffen ist und methyliert bleibt. Später lösen sich die Vorkernmembranen auf und der paternale und maternale Vorkern verschmelzen. Ab diesem Entwicklungsstadium wird die befruchtete menschliche Eizelle als Embryo im Sinne des Embryonenschutzgesetz (BGBl. I S. 2702) bezeichnet. Eine Durchmischung der väterlichen und mütterlichen Chromosomen bleibt jedoch weiterhin aus. In der ersten Mitose liegen sich hochmethylierte maternale Chromosomen und demethylierte paternale Chromosomen getrennt gegenüber. Im Zweizellembryo kann weiterhin ein Kern väterlichen und mütterlichen Ursprungs erkannt werden (MAYER et al., 2000). Ab dem Zweizellstadium wird das maternale Genom durch einen replikationsabhängigen Mechanismus demethyliert. Mit Erreichen des Blastozyst Stadiums ist dann auch das mütterliche Genom nahezu vollständig demethyliert (MONK et al., 1987; RAZIN und SHEMER, 1995). Der Mechanismus, der für diese Demethylierung verantwortlich ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Diese Reprogrammierung des Spermien- und Eizellgenoms durch Veränderung der DNA-Methylierung löscht die meisten keimbahnspezifischen epigenetischen Modifikationen aus und ist beim Rind im 8 bis 16-Zellstadium und bei der Maus in der Morula abgeschlossen (REIK et al., 2001). Im Anschluss findet eine genomweite Remethylierung statt und ab diesem Zeitpunkt kann man von einem diploiden somatischen Genom sprechen.

Nach der Befruchtung verläuft die Transkription des Genoms der Zygote in zwei Phasen: eine erste geringe Aktivierung der Transkription findet bereits vor der ersten Zellteilung statt, und die zweite hauptsächliche Aktivierung der Transkription findet während des 2-Zell Stadiums statt (HAMATANI et al., 2004). AOKI et al. (1997) zeigten in der Maus, dass das paternale Genom ca. 1 Stunde früher als das maternale Genom transkriptionell aktiv wird und diese transkriptionelle Aktivität seitens des paternalen Genoms die erste Phase der Transkription des Embryos darstellen könnte. Diese anfängliche Transkription ist schwach und resultiert in der Synthese einer kleinen Menge an Polypeptiden, die im 2-Zell Stadium vorübergehend ansteigt (LATHAM et al., 1991). Der hauptsächliche Start der Transkription im Genom der Zygote hat eine drastische Reprogrammierung des Expressionsmusters zur Folge. Durch die aktivierte Transkription des Genoms der Zygote wird das genetische Programm, das bisher durch maternale Transkripte/Proteine dominiert wurde, durch Transkripte/Proteine des Embryos abgelöst (NOTHIAS et al., 1995; THOMPSON et al., 1998; KANKA, 2003; LATHAM und SCHULTZ, 2001; SCHULTZ, 2002).

Es ist bekannt, dass der Zeitpunkt zwischen der Befruchtung und dem Beginn der Gen Transkription in der Zygote zwischen den verschiedenen Spezies stark variiert (TELFORD et al., 1990). WELLS et al. (2005) stellten in ihren Untersuchungen an menschlichen Embryonen fest, dass die Synthese von neuer mRNA im Embryo zum Zeitpunkt oder kurz nach Erreichen des 4-Zell Stadiums beginnt, während dies in der Maus bereits im 2-Zell Stadium zu beginnen scheint. Diese Ergebnisse bekräftigen frühere Untersuchungen von BRAUDE et al. (1988), die das 2-Zell Stadium bei der Maus und das 4-Zell bis 8-Zell Stadium beim Menschen als den Zeitpunkt definierten, zu dem das Genom der Zygote erstmals aktiviert wird. Desweiteren regten sie an, dass Studien, die den Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms betreffen, an weiteren Spezies wie z.B. Rind notwendig seien, um eventuell ein Tiermodell ausfindig zu machen die dem Menschen in dieser Thematik ähnlicher ist als z.B. die Maus.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Humane Hodenbiopsien

Die menschlichen Hodenbiopsien wurden an der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen zu diagnostisch-therapeutischen Zwecken (Kinderwunsch bei Azoospermie) entnommen und zur histologischen Beurteilung an das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig Universität Gießen (Prof. Dr. M. Bergmann) weitergeleitet. Das Restgewebe wurde mit Zustimmung der Ethikkommission für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet.

Die Hodenbiopsate für diese Arbeit stammten von 19 infertilen Patienten (Alter 22–48 Jahre). Waren Spermatozoen im Biopstat vorhanden, wurde eine testikuläre Spermiextraktion (TESE) durchgeführt. 13 Patienten zeigten eine qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese mit einem Spermatogenese Score von 10 (BERGMANN und KLIESCH, 1998). Sechs Patienten wiesen eine gestörte Spermatogenese auf mit der histologischen Diagnose „bunte Atrophie,“ (Score 2-6) und Hypospermatogenese (Score 4-7).

##### 3.1.2. Humanes Ejakulat

Humanes Ejakulat wurde von nach WHO-Richtlinien (WHO, 1999) als fertil geltenden Spendern zur Verfügung gestellt. Alle Spender wiesen ein Ejakulatvolumen von  $\geq 2$  ml, eine Spermiedichte von  $\geq 20$  Millionen/ml, eine Motilität von mindestens 50 % a + b oder 25 % a (a: schnelle und lineare progressive Beweglichkeit von  $\geq 25$   $\mu\text{m/s}$  bei 37 °C; b: langsame oder träge progressive Beweglichkeit), eine Vitalität von  $\geq 50$  % und  $\geq 15$  % Normalformen auf.

##### 3.1.3. Hoden von *Callithrix jacchus*

Die Hoden (n=6) wurden von geschlechtsreifen Tieren (21-65 Monate) im Deutschen Primatenzentrum in Göttingen entnommen. Die Weißbüschelaffen wurden durch eine Überdosierung von Narkose euthanasiert (Göttinger Mischung II: 50 mg Ketamin, 10 mg Xylazin, 10 mg Atropin/ ml), die Hoden anschließend chirurgisch entnommen und sofort für weitere Analysen bearbeitet.

#### **3.1.4. Ejakulat von *Callithrix jacchus* und *Bos taurus***

Ejakulat von Weißbüschelaffen wurde durch penile Vibrostimulation im Deutschen Primatenzentrum in Göttingen gewonnen, in einem Kryoröhrchen gesammelt und sofort bei -80 °C tiefgefroren.

Ejakulat von Bullen wurde im Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilian Universität in München gewonnen und in „straws“ gefroren.

#### **3.1.5. Eizellen, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Embryonen von *Callithrix jacchus* und *Bos taurus***

Eizellen und Embryonen der beiden Spezies wurden uns ebenfalls aus Göttingen und München zur Verfügung gestellt, wo das Material gewonnen und auf Trockeneis an unser Institut versandt wurde.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Extraktion von Histonen aus Ejakulat von Mensch und *Callithrix jacchus*

Für die Extraktion der Histone wurde ein Lysis Puffer, mit Schwefliger Säure ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) verwendet. Die säurehaltige Extraktion entfernt Histone von der DNA und trennt außerdem die Core-Histone innerhalb des Nukleosoms voneinander.

#### Lysis Puffer:

- 0,605 g Tris-HCl
- 2,600 g  $\text{NaHSO}_3$
- 5,000 g Triton-X-100
- 1,020 g  $\text{MgCl}_2$
- 43,00 g Saccharose

Mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen; pH 6,5 einstellen

#### Tris-EDTA Puffer:

- 0,242 g Tris
- 0,967 g EDTA

Mit Aqua bidest. auf 70 ml auffüllen; pH 7,4 einstellen

- Vor Gebrauch 10 ml Tris-EDTA Puffer mit einer 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette (ROCHE, Grenzach-Wyhlen, Germany) ansetzen.

## 1. Tag

- 800-1000  $\mu\text{l}$  Ejakulat (Mensch) bzw. 300  $\mu\text{l}$  Ejakulat (*Callithrix jacchus*) mit 1 ml Lysis-Puffer (eiskalt) versetzen
- In 2 ml Eppendorf-Tube überführen
- Probe mit Ultra-Turrax-Gerät T8 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) auf höchster Geschwindigkeit homogenisieren
- 10 Minuten bei 4 °C mit 18 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 1 ml Lysis-Puffer auf das Pellet pipettieren
- 10 Minuten bei 4 °C mit 18 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 1 ml Lysis-Puffer auf das Pellet pipettieren
- 10 Minuten bei 4 °C mit 18 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet (Zellkerne) in 100  $\mu\text{l}$  Tris-EDTA Puffer resuspendieren
- 1,1  $\mu\text{l}$  konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugeben, vortexen

- Inkubation bei 4 °C, mindestens 48 h

## 2.Tag

- 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 18 000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und 1 ml Aceton dazu geben
- Inkubation bei Raumtemperatur mindestens 48 h

## 3. Tag

- 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 18 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 1000 µl Aceton dazu geben
- 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 18 000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Pellet bei 37 °C im Trockenschrank trocknen lassen. Weißes Pulver enthält alle Histone u.a. H4.
- 30-50 µl 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in Aqua bidest. dazu geben
- 60 Minuten bei 70 °C inkubieren (alle 10 Minuten vortexen)
- Überstand mit den darin enthaltenen Histonen abnehmen. Pellet kann bei -20 °C eingefroren werden.

### 3.2.2. Western Blot Analyse

Beim Protein-Blotting werden Proteine auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für ein Protein spezifisch ist. Die denaturierten Proteine werden dazu gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel auf die Membran (typischerweise Nitrozellulose) transferiert (Gel-Blot). Je nach Aufbau des Experimentes erhält man dabei entweder Informationen über die tatsächliche Spezifität der Nachweisreaktion oder über Eigenschaften und Menge des Proteins. In dieser Arbeit wurde der Western Blot genutzt, um die Spezifität der für diese Arbeit eingesetzten Antikörper gegenüber einem Antigen zu überprüfen. Außerdem wurde diese Methode für den Nachweis von an Lysin 5, 8, 12 und 16 acetyliertem Histon H4 in ejakulierten Spermatozoen von Mensch und *Callithrix jacchus* verwendet.

## 1. Tag

### 3.2.2.1. Vorbereitung der Proben

Bei der sogenannten diskontinuierlichen bzw. eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine in Gegenwart von 0,1% SDS aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt. Die Polypeptide werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) hitzedenaturiert. Das Kochen führt zu einer Denaturierung der Proteine, die sich infolge dessen entfalten. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), wird die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt. Das SDS umgibt die Proteine mit einer negativen Ladung. Es entstehen anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit.  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) oder Dithiothreitol (DTT) im Probenpuffer bewirken eine Reduzierung der Disulfidbrücken in den Polypeptidketten.

#### Vorbereitung

##### 1 x SDS Running Buffer:

- 50 ml 20 x NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen)
- 950 ml Aqua bidest.

##### 1 x SDS Running Buffer mit Antioxidant:

- 200 ml von 1 x SDS Running Buffer abnehmen
- 500  $\mu$ l NuPAGE Antioxidant

##### Probengemisch (Einfacher Ansatz 15 $\mu$ l):

- 10,1  $\mu$ l Probe
- 3,5  $\mu$ l NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen)
- 1,4  $\mu$ l NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)

### 3.2.2.2. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden die Proteine im Proteingemisch aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt. Diverse Hersteller (u.a. Invitrogen Life Technologies) bieten bereits fertige Minigele unterschiedlicher Formulierungen zur Vertikal-Gelelektrophorese an. Polyacrylamid Trenngele werden am häufigsten eingesetzt. Je nach Molekulargewicht des Proteins stehen unterschiedliche Puffer zur Verfügung. Da die Proben nur eindimensional in

Richtung Anode laufen, werden die Proben nebeneinander in die Geltaschen aufgetragen. Proteine werden nach Molekulargewicht aufgetrennt und bilden mehrere „Banden“ in einer Spur (Lane) unter jeder Geltasche. Als Kontrolle bzw. Molekulargewichtvergleich wird Gel mindestens in einer Spur eine Standardproteinmischung (Invitrogen Life Technologies) aufgetragen. Farbstoffmarkierte Proteinmischungen erlauben zum einen eine Laufkontrolle während der Elektrophorese, zum anderen eine einfache Identifizierung der Standardproteine nach erfolgter Gelelektrophorese.

### Protokoll

- NuPAGE Gele aus der Verpackung entfernen
- Gelkassetten (12 % Bis-Tris Gel) mit Aqua bidest. abspülen. Weißes Klebeband von der Unterseite der Kassette entfernen
- Käbme vorsichtig aus Gelkassette(n) entfernen, Geltaschen mit 1 x NuPAGE SDS Running Puffer ausspülen und in Elektrophoreseapparatur (X Cell II™ Blot Module, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) einbauen
- Innere Kammer mit ca. 200 ml 1 x SDS Running Buffer mit 500 µl NuPAGE Antioxidant befüllen
- Puffer-Spiegel soll die Geltaschen um ca. 0,5 cm überragen
- Dichtigkeit prüfen
- Äußere Kammer mit 1 x SDS Running Buffer (ohne Antioxidant) befüllen
- Die Geltaschen mit 15 µl der vorbereiteten Proben bzw. 10 µl Marker (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) mit einer Hamilton Pipette befüllen
- Elektroden der Gelkammer mit Stromgeber verbinden
- 45 Minuten bei konstanter Spannung von 200 V, 250 mA und 25 W laufen lassen.
- Nach Ablauf der Gelelektrophorese, Gerät aus schalten, Elektroden entfernen und Gele aus X Cell Sure Lock Kammer entfernen
- Mit einem Messer/Spatel die vier Seiten der Gelkassette vorsichtig aufhebeln. Die Seite mit den Geltaschen sollte nach oben zeigen.
- Obere Seite der Kassette abheben, entsorgen und Gel auf der unteren Seite der Kassette liegen lassen

### 3.2.2.3. Elektroblothing

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine sehr dünne proteinbindende Membran, um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen. Die Proteine werden durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran überführt. Membranmaterialien, die zur Bindung von Proteinen befähigt sind, sind z.B. Nitrozellulose (Zellulosenitrat, TOWBIN et al. 1979) und Polyvinylidendifluorid (PVDF). Die geladenen Proteine wandern aus dem Gel auf die proteinbindende Membran. Dieser Transfer muss senkrecht zur Trennrichtung erfolgen, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol erleichtert das Benetzen der Membranen und lockert die Bindung zwischen den Proteinen und SDS, was wiederum ihre Bindung an PVDF- oder Nitrozellulosemembranen verbessert. Dies führt zu höheren Transferraten. Der Blot-Vorgang wurde nach Protokoll des Kit-Herstellers Invitrogen ausgeführt.

#### Vorbereitung

##### 1 x NuPAGE Transfer Buffer mit 10 % Methanol

- 50 ml NuPAGE Transfer buffer (20x)
- 1 ml NuPAGE Antioxidant
- 200 ml Methanol
- 749 ml Aqua bidest.

#### Protokoll

- Blotting Pads, Membran und Filterpapier in 700 ml des vorbereiteten Transfer Puffers einweichen.
- Blotting Pads mehrmals ausdrücken, um Luftblasen zu vermeiden. Luftblasen können die Übertragung von Biomolekülen auf die Membran blockieren.
- Das Gel auf Filterpapiergröße zuschneiden (Geltaschen können abgeschnitten werden)
- Ein eingeweichtes Filterpapier auf das Gel legen, Luftblasen durch vorsichtiges „ausrollen“ mit einer Glaspipette entfernen.
- Gekassette umdrehen, so dass das Filterpapier und das Gel jetzt auf einer glatten, sauberen mit Puffer befeuchteten Oberfläche liegen

- Gel noch einmal mit Puffer befeuchten und eingeweichte Transfer-Membran (Nitrozellulose) darauf legen. Luftblasen entfernen und Membran jetzt nicht mehr verrutschen
- Ein weiteres Filterpapier auf die Membran legen. Luftblasen ausrollen
- In den unteren, tieferen Kathodenteil (-) des Blot-Modules 2 getränkte Blotting-Pads schichten
- Gel mit Filterpapier und Membran auf die Blotting Pads legen, so dass das Gel mit Transfer Membran in Richtung der Kathode zeigt.
- Weitere eingeweichte Blotting Pads auf das Sandwich legen, so dass das gesamte Sandwich 0,5 cm über den Rand des Kathodenteils des Blot Modules ragt.
- Anoden Teil (+) des Blot Modules auf das Sandwich legen
- Das Sandwich sollte fest zwischen den beiden Hälften des Blot Modules gedrückt gehalten, aufgehoben und in das Sure-Lock Mini Cell eingebracht werden
- Mit weißen Klammer fixieren
- Blot Module mit 1 x NuPAGE Transfer-Puffer füllen, bis Sandwich bedeckt ist. Kammer nicht vollständig befüllen, da sonst zusätzliche Hitze und Leitfähigkeit entstehen kann.
- Äußere Kammer mit ca. 650 ml Aqua bidest. auffüllen
- Deckel schließen, Elektrokabel an den Power Supply anschließen
- 60 Minuten bei 30 V und 250 mA blotten

#### **3.2.2.4. Coomassie Staining**

Coomassie, auch unter dem Namen Brilliant Blue, Brilliant Blue G, Acid Blue 90, C.I. 42655 oder Brilliant Blue G 250 bekannt, ist ein blauer Farbstoff, der oft in Verbindung mit Natrium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) benutzt wird. Das Gel wird nach dem Blotten in dem Farbstoff inkubiert und darauffolgend für mindestens 30 Minuten in einer Entfärbelösung gewaschen. Diese Behandlung sorgt dafür, dass Banden auf dem Gel sichtbar gemacht werden können. Anhand eines mitgelaufenen Markers, der Banden definierter Molekulargewichte anzeigt, kann dann das Molekulargewicht/Größe der verschiedenen Banden der Probe genau definiert werden.

Färbelösung:

- 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
- 455 ml Methanol
- 455 ml Aqua bidest.
- 90 ml Eisessig

Entfärbelösung

- 455 ml Methanol
- 455 ml Aqua bidest.
- 90 ml Eisessig
- Nach dem Blotten wird das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in der Coomassie-Färbelösung auf einem Rüttler inkubiert.
- Färbelösung abschütten
- Entfärbelösung dazugeben, so dass das Gel bedeckt ist und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubieren
- Gel sollte wieder klar sein

**3.2.2.5. Blocken**

Vor Beginn der Nachweisreaktion müssen Protein-Blots abgesättigt werden. Dieses „Blocken“ dient dazu, überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran zu saturieren, um unspezifische Bindungen der Nachweisreagenzien zu verhindern. Als Reagenzien zum Absättigen der Membran sind amphipatische Substanzen geeignet, die nicht mit der Nachweisreaktion interferieren. In der Praxis haben sich verdünnte Lösungen von nichtionischen Detergenzien (z.B. Tween 20), von nicht relevanten Proteinen (z.B. Rinderserumalbumin), von Proteinmischungen (z.B. entfettete Trockenmilch), sowie Kombinationen von Detergenz und Protein zum Blocken von Western-Blots durchgesetzt. Eine sehr gute Blocklösung, die praktisch keinen unspezifischen Hintergrund erlaubt, ist das ECL™ Western – Blotting Analysis System (GE Healthcare Amersham, UK).

Blocking Agent:

- 1,5 g Blocking Agent (GE Healthcare Amersham ECL™)
- 25 ml PBS ohne Tween

Membran über Nacht in Blocking Agent inkubieren

## 2. Tag

### 3.2.2.6. Nachweisreaktion: Bindung der Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörpers und APAAP-Antikörperkomplex

Ist die Membran abgesättigt, folgt die eigentliche Nachweisreaktion, die Bindung des Primärantikörpers an eines der transferierten Proteine. Der entstandene Immunkomplex ist für den Experimentator nicht sichtbar und die Visualisierung des Signals erfordert die Bindung eines Zweitantikörpers an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper stammt aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper. Er ist gegen konstante Bereiche des Primärantikörpers gerichtet und ist an Enzyme, Radionuklide, Fluoreszenzfarbstoffe o.ä. konjugiert über welche die Bindung dann sichtbar gemacht werden kann. Desweiteren verstärkt die Bindung des Sekundärantikörpers das Signal, da mehr als ein Sekundärantikörpermolekül an ein Primärantikörpermolekül binden kann. Es kann noch mit einem Tertiärantikörper gearbeitet werden, so dass sich der Verstärkungsfaktor potenziert.

Um die an das geblottete Protein gebundenen Reagenzien sichtbar zu machen, trägt das zuletzt aufgebrachte Nachweisreagenz (Dritt-Antikörper) entweder eine Radionuclid- oder Fluorophor-Markierung zur direkten Visualisierung oder eine Enzym-Markierung zur indirekten Visualisierung. Als Enzym-Markierung haben sich hier die Markierung mit Meerrettichperoxidase (HRP) oder mit alkalischer Phosphatase (AP) durchgesetzt. Bei Zugabe eines entsprechenden Substrates liefert das Enzym dann entweder ein gefärbtes (Farbreaktion) oder in Licht emittierendes Produkt (Chemilumineszenz), welches am Ort seiner Entstehung ausfällt bzw. Licht ausstrahlt und so die Position der Nachweisreagenzien sichtbar macht. Visualisierungssysteme bei HRP-Konjugaten sind z.B. das Farbreagenz 3,3'-Diaminobenzidin/ $\text{Ni}^{2+}$  (DAB/Metall) und bei AP-Konjugaten das Farbreagenz 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitro-Blue-Tetrazolim (BCIP/NBT).

#### PBS-Waschpuffer ohne Tween:

- 200 ml Aqua bidest.
- 1 Tablette PBS
- 2 g BSA

PBS-Waschpuffer mit Tween:

- 200 ml Aqua bidest.
- 1 Tablette PBS
- 2 g BSA
- 200 µl Tween 20

Tris-Stammlösung (1M):

- 60,57 g Trizma
- 500 ml Aqua bidest.

Tris-Waschpuffer:

- 50 ml Tris-Stammlösung
- 4,25 g NaCl
- 0,5 ml Triton X-100
- 500 ml Aqua bidest.

5 x NTB Puffer:

- 30,2 g Trizma
- 14,6 g NaCl
- 500 ml Aqua bidest.

1 x NTB Puffer:

- 40 ml 5 x NTB-Puffer
- 160 ml Aqua bidest.

**Protokoll:**

- Nach dem Blocken, 1 x kurz und 3 x 5 Minuten in PBS-Waschpuffer ohne Tween waschen
- Primärantikörperlösung herstellen:
  - Antikörper: Rabbit monoklonal to Histone H4 (acetyl K5), Verdünnung 1:20000 mit PBS-Waschpuffer mit Tween; (abcam, Cambridge, UK)
  - Antikörper: Rabbit polyklonal to Histone H4 (acetyl K8), Verdünnung 1:500 mit PBS-Waschpuffer mit Tween; (abcam, Cambridge, UK)

- Antikörper: Rabbit polyklonal to Histone H4 (acetyl K12), Verdünnung 1:200 mit PBS-Waschpuffer mit Tween; (abcam, Cambridge, UK)
- Antikörper: Rabbit polyklonal to Histone H4 (acetyl K16), Verdünnung 1:500 mit PBS-Waschpuffer mit Tween; (abcam, Cambridge, UK)
- IgG-Antikörper: Verdünnung 1:8000 mit PBS-Waschpuffer mit Tween; (abcam, Cambridge, UK)
- Membranen in getrennten Gefäßen in der verdünnten Primäantikörperlösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren (Schüttler); Gefäße mit Parafilm verschließen.

### 3. Tag

#### Protokoll:

- Primäantikörperlösung vorsichtig abkippen
- Membranen 1 x kurz und 3 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS-Waschpuffer mit Tween waschen (Schüttler)
- Membranen in der verdünnten Sekundäantikörperlösung („Brücken-Antikörper;“ (Mouse-anti-rabbit; Verdünnung 1:1000; Dako, Hamburg, Germany) bei Raumtemperatur für 45 Minuten auf Schüttler inkubieren
- Membranen 1 x kurz und 3 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS-Waschpuffer mit Tween waschen (Schüttler)
- Membranen in der verdünnten Dritt-Antikörperlösung (Rabbit-anti-mouse; Verdünnung 1:250; Dako, Hamburg, Germany) bei Raumtemperatur für 45 Minuten auf Schüttler inkubieren
- Membranen 1 x kurz und 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Tris-Waschpuffer mit Tween waschen (Schüttler)
- Inkubation mit APAAP-Antikörperkomplex in Tris-Waschpuffer (Verdünnung 1:500; Dako, Hamburg, Germany) bei Raumtemperatur für 45 Minuten
- Membranen 1 x kurz und 3 x 5 Minuten in 1 x NTB Waschpuffer waschen (Schüttler)
- Nitril-Handschuhe benutzen und Membranen in NBT/BCIP unter Lichtausschluss entwickeln
- Membranen 2 x 5 Minuten in Aqua bidest waschen
- Membranen im Trockenschrank bei 37 °C trocknen

Die Dokumentation der Signale der Farbreaktion erfolgt mit Hilfe eines Scanners.

### 3.2.3. Paraffinmaterial

#### Fixierung der Proben

Nach Entnahme der humanen Hodenbiopate und der Hoden von *Callithrix jacchus* wurden diese in Bouin'scher Lösung fixiert. Diese Lösung setzt sich zusammen aus gesättigter, wässriger Pikrinsäure, 35 %igem Formalin und Eisessig.

#### Ansatz der Bouin'schen Lösung:

- 15 ml Pikrinsäurelösung
- 5 ml Formalin
- 1 ml Eisessig (kurz vor Gebrauch zusetzen)

Die Proben wurden 24 h in dieser Lösung fixiert. Das Gewebe wurde anschließend 7 Tage in Folge mit frischem 70 %igem Ethanol gespült, bis zur vollständigen Entfernung der gelben Farbe. Danach wurden die Proben in Plastik-Biopsiekörbchen verbracht und mit dem Entwässerungsgerät (Leica TP 1050 Tissue Processor, GMI Inc, Minnesota, USA) entwässert.

#### Entwässerung der Proben

Nach Fixierung in Bouin'scher Lösung wurden die Proben 24 h lang über eine Alkoholreihe von aufsteigender Konzentration entwässert, mit Xylol fixiert und anschließend mit Paraffin durchtränkt. Die Proben durchliefen das Programm mit folgenden Stationen:

- 80 %iger Ethanol für 2h
- 96 %iger Ethanol für 2h
- Abs. (absolutes) Ethanol für 3h
- Abs. Ethanol für 3h
- Abs. Ethanol für 3h
- Xylol für 1h
- Xylol für 45 Minuten
- Xylol für 45 Minuten
- Paraffin 59 °C für 40 Minuten
- Paraffin 59 °C für 40 Minuten
- Paraffin 59 °C für 40 Minuten

### **Einbettung der Proben**

Das Einbetten der Proben erfolgte in einem Einbettgerät (Leica EG 1160, Leica, Wetzlar, Germany), in welchem die Proben in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Stahlförmchen verbracht und mit 60 °C heißen Paraffin übergossen wurden. Danach wurden sie zur Härtung auf die Kühlplatte des Geräts gelegt.

### **Beschichtung der Objektträger (OT)**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden zum vorwiegenden Teil SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) verwendet. Standen diese bereits fertig beschichteten Objektträger nicht zur Verfügung, wurden die Glas-OT zum Erreichen einer besseren Haftung der Schnitte mit APTEX nach folgendem Protokoll beschichtet:

- OT in Küvettenhalter einsortieren
- 1x in Aqua Bidest. spülen, trocken lassen
- 1x in Aceton spülen, abdampfen lassen
- OT für 5 Minuten in 2 %iges 3-Aminopropyl-Triethoxysilane (APTEX, Sigma) stellen (4 ml APTEX auf 196 ml Aceton)
- OT für 2 Minuten in frisches Leitungswasser stellen
- OT für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- OT für 2 Minuten in Aqua bidest. stellen
- OT über Nacht bei 37 °C in Trockenschrank stellen

### **Mikrotomie**

Von den in Paraffin eingebetteten Proben wurden mit dem Schlittenmikrotom (Leica SM 2000 R, Leica, Wetzlar, Germany) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und in einem 37 °C warmen, mit Aqua bidest. gefülltem Wasserbad gestreckt. Anschließend wurden jeweils zwei Schnitte auf einen OT gezogen und über Nacht in einen Trockenschrank bei 37 °C gestellt.

### Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Zur Beurteilung der Gewebeproben wurden HE-Präparate angefertigt. Die Zellkerne wurden von basischem Hämalan blau angefärbt, alle anderen Strukturen erschienen in verschiedenen Farbabstufungen durch Eosin rot.

OT in Küvettenhalter einsortieren und nach folgendem Protokoll bearbeiten:

- 3 x 10 Minuten Xylol
- 2 x 5 Minuten Abs. Ethanol
- 1 x 5 Minuten 96 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 80 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 50 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten Aqua Bidest.
- 7 Minuten Hämatoxylin nach Mayer
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen
- 7 Minuten in 1 %iges Eosin
- 1 x kurz in Leitungswasser spülen
- kurz in 70 %iges Ethanol
- kurz in 80 %iges Ethanol
- 1 x 2 Minuten 80 %iges Ethanol
- 1 x 2 Minuten 96 %iges Ethanol
- 3 x 2 Minuten Abs. Ethanol
- 3 x 10 Minuten Xylol

Eindecken der Schnitte mit Glycerin-Gelatine

#### 3.2.4. Ejakulatausstriche

Humanes Ejakulat und Ejakulat vom *Callithrix jacchus*, das für eine Immunhistochemie auf Objektträger aufgebracht werden soll, muss zuvor mit Ultraschall behandelt und einer Akrosomen-Reaktion unterzogen werden, um die sehr robuste äußere Spermienmembran für die Antikörper permeabel zu machen.

### Akrosomreaktion:

#### Sperm-Prep Medium

- 9 ml F-10 HAM (Sigma, Deisenhofen, Germany) + 1 ml Humanes Serum Albumin 20% (HSA, Behring, Marburg, Germany)
- 500 µl humanes Ejakulat (30 µl von *Callithrix jacchus*) mit 3 ml der hergestellten Lösung aus Humanem Serum Albumin (HSA) und Nutrient Mixture F-10 HAM (Sigma, Deisenhofen, Germany) versetzen.
- 10 min bei 15 000 rpm zentrifugieren
- In 500 µl der Lösung resuspendieren
- Bei 4 °C über Nacht inkubieren
- Proben zum Kapazitieren für 3 h bei 37 °C inkubieren
- 1 min bei 18 000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 500 µl Lösung (100 µl bei Ejakulat von *Callithrix jacchus*) resuspendieren

#### Ultraschall:

- Ejakulat in PBS für 8 min, 50 kHz und 144 W behandeln (Sonorex TK30, Bandelin electronic, Berlin, Germany)

Nach der Ultraschall-Behandlung können je 10 µl Ejakulat in PBS-Puffer auf einen beschichteten oder SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Teningen, Germany) ausgestrichen werden. Ausstriche bei Raumtemperatur über Nacht trocknen lassen.

### **3.2.5. Immunhistochemie von Hodengewebe**

Für den immunhistochemischen Nachweis von spezifisch an Lysin 5, 8, 12 und 16 acetyliertem Histon H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und K4K16ac) wurde die ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode angewandt. Diese Färbemethode basiert auf der hohen Affinität von Avidin für Biotin. Bei der ABC-Methode reagiert der Avidin-Biotin-Enzymkomplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper.

Lösungen ansetzen:Waschpuffer: 10 x Tris-HCl-Puffer-Stammlösung

- 121,1 g Tris-HCl
- 58,4 g NaCl
- in 800 ml Aqua bidest. lösen
- mit konz. HCl auf pH 7,6 einstellen
- mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

1 x Tris-HCl-Puffer

- 100 ml 10 x Tris-HCl-Puffer (pH 7,6)
- 1 ml Tween 20 mischen
- mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen und lösen

BSA-Blockpuffer:

- 5%iges BSA (5g BSA in 100 ml 1 x Tris-HCl-Puffer lösen) + 3%iges Ziegen Serum

Citratpuffer:

Stammlösung A: 21,01 g  $C_6H_8O_7 \times H_2O$ , Merck, in 1 Liter Aqua bidest.

Stammlösung B: 29,41 g  $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ , Merck, in 1 Liter Aqua bidest.

Citratpuffer: 18 ml Stammlösung A + 82 ml Stammlösung B, auf 1 l Aqua bidest. auffüllen;  
pH 6,0 einstellen

Vorbereitung am Vortag:

Paraffinschnitte in Küvettenhalter einsortieren und in Trockenschrank (60 °C) stellen

Xylol in Trockenschrank (60 °C) stellen

**Tag 1:****Gewebevorbehandlung - Entparaffinieren und Rehydrieren in Alkoholreihe**

- 1 x 5 Minuten Xylol (60 °C)
- 2 x 5 Minuten Xylol (RT)
- 2 x 5 Minuten 96 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 80 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten Aqua bidest.
- OT in Standküvette übertragen
- 1 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler; IKA Werke GmbH Co KG, Staufen, Germany) waschen

**Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen durch Kochen in Citratpuffer**

- Schnitte in Objektträger-Schlitten einsortieren
- Becherglas mit Citratpuffer bei 98 °C vorkochen
- Wenn Temperatur erreicht, Objektträger-Schlitten in Citratpuffer hineinstellen
- 20 Minuten bei 98 °C kochen
- Danach in Eiswasser kurz abkühlen
- Objektträger in Küvette mit kaltem 1 x Tris-HCl-Puffer überführen und die Reaktion abstoppen
- 2 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen

**Blockierung endogener Peroxidase**

Puffer Methanol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frisch ansetzen: 45 ml Methanol + 5 ml 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- 30 Minuten in Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Puffer bei Raumtemperatur (RT) (Schüttler) inkubieren
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen

**Blockierung unspezifischer Bindungsstellen**

- Über Nacht mit BSA-Blockpuffer in feuchter Kammer bei RT inkubieren

**Tag 2****Inkubation mit primärem Antikörper**

Für alle Antikörper wurden immunchemische Färbungen getrennt durchgeführt (Einzelfärbung).

Primärantikörperlösung herstellen:

- Antikörper: Rabbit monoclonal to Histone H4 (acetyl K5), Verdünnung 1:1000 mit Blockpuffer
- Antikörper: Rabbit polyclonal to Histone H4 (acetyl K8), Verdünnung 1:500 mit Blockpuffer
- Antikörper: Rabbit polyclonal to Histone H4 (acetyl K12), Verdünnung 1:1000 mit Blockpuffer
- Antikörper: Rabbit polyklonal to Histone H4 (acetyl K16), Verdünnung 1:200 mit Blockpuffer
  - über Nacht bei 4 °C in feuchter Kammer inkubieren

Auf den jeweils mitgeführten Kontrollschnitten wurde der Primärantikörper durch Blockpuffer ersetzt.

**Tag 3:****Inkubation mit sekundärem Antikörper**

Sekundärantikörperlösung herstellen: biotinyliert Ziege-anti-Kaninchen Immunglobuline Verdünnung 1:1000 mit Waschpuffer

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 45 Minuten in feuchter Kammer bei RT inkubieren

**Inkubation mit Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard (ABC-Kit)**ABC-Lösung ansetzen:

- Lt. Hersteller Angaben (Vector Laboratories LTD, UK)
- (30 Minuten vor Gebrauch) 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 2.5 ml Waschpuffer lösen
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 30 Minuten mit ABC-Lösung in feuchter Kammer bei RT inkubieren

**Farbreaktion**

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 3 Minuten mit Stable-DAB (1 Tropfen auf 2 ml) in feuchter Kammer bei RT entwickeln
- mit kaltem Waschpuffer die Reaktion abstoppen

**Eindecken**

- die Schnitte mit Glycerin-Gelatine eindecken

**3.2.6. Immunhistochemie von Ejakulat**

Die angefertigten Ejakulat-Ausstriche (s.o. 3.2.4) müssen zusätzlich in einem Decondensing-Mix (van der HEIJDEN et al., 2006) inkubiert werden. Eine Behandlung mit Paraformaldehyd anstelle des Kochens in Citratpuffer ist ebenfalls sinnvoll. Diese zusätzliche Behandlung mit Decondensing Mix ist notwendig, um die sehr dicht gepackte DNA im Spermienkopf aufzulockern, so dass diese für die Antikörper zugänglich sind.

Lösungen ansetzen:Decondensing-Mix:

- 25 mM DTT
- 0,2 % Triton X-100
- 200 IU Heparin/ml
- 100 ml PBS

Paraformaldehyd:

- 4 g Paraformaldehyd
- 96 ml PBS; pH 7

6mM EDTA- Lösung:

- 223,2 mg EDTA
- 100ml Aqua bidest.

5% SDS-EDTA-Lösung:

- 0,5 g SDS
- 10 ml 6 mM EDTA-Lösung

**Probenvorbereitung**

- Objektträger mit Ejakulat-Ausstrichen in eine Standkuvette einsortieren
- Objektträger für 20 min in dem frisch hergestellten Decondensing-Mix inkubieren
- 15 min in 4 % Paraformaldehyd inkubieren
- Objektträger 2 x 5 min in Waschpuffer (Schüttler)
- Bereiche des Objektträgers mit ausreichender Spermatozoen-Dichte mit PAP-Pen umkreisen
- 10 min mit 5 % SDS-EDTA inkubieren
- 3 x 5 min in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 30 Minuten in Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Puffer inkubieren

Weiteres Vorgehen der Immunhistochemie wie oben beschrieben für Hodengewebe.

**3.2.7. Quantitative Auswertung und Statische Analyse**

Für die quantitative Analyse der immunhistochemisch positiven A-Spermatogonien wurden für jeden Antikörper die A-Spermatogonien in jeweils zehn Tubuli bei Mensch und Weißbüschelaffe gezählt, um den prozentuellen Anteil der positiven A-Spermatogonien ermitteln zu können.

Ejakulat-Ausstriche für jeden der vier Antikörper wurden von Mensch und Weißbüschelaffe ausgezählt. Beim Mensch wurden auf jedem Objektträger fünf Bereiche mit 200 Spermatozoen, beim Weißbüschelaffen drei Bereiche mit 100 Spermatozoen ausgezählt, um den Anteil an Spermatozoen mit positiven Signalen zu ermitteln.

Die Daten wurden mittels arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dargestellt.

**3.2.8. *In situ* Hybridisierung**

Diese Methode verwendet Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden, die an die komplementäre mRNA in der Zelle bindet. Der entstandene Komplex wird mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert. Durch dieses Verfahren

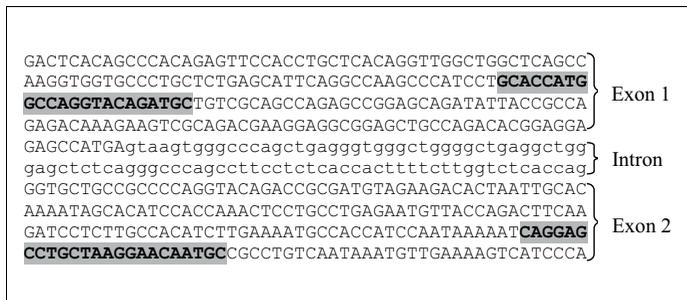
können spezifische mRNA einer Spezies in situ nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden die zu *Callithrix jacchus* *-PRM 1* und *-PRM 2* mRNA komplementären „antisense“-Sonden hergestellt, die *PRM 1* und *PRM 2* mRNA in der Zelle detektieren. Die „sense“-Sonden haben eine zu *Callithrix jacchus* *-PRM 1* und *-PRM 2* mRNA identische Sequenz und dienen als Negativkontrolle.

Für die Sondenherstellung wurde mRNA verwendet, die aus Hodengewebe von *Callithrix jacchus* mit normaler Spermatogenese gewonnen wurde. Die mRNA wurde mit TRIzol® Reagent extrahiert und mit DNase behandelt. Ein 156 bp-langes *PRM 1* und 293 bp-langes *PRM 2* mRNA-Fragment wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Für diese Verfahren wurden folgende Primer verwendet:

*Homo sapiens* Protamin-1 (Abb. 11): UCSC Human Gene Sorter (uc002dar.1)

forward primer: 5'-GCACCATGGCCAGGTACAGATGC-3', (Exon 1)

reverse primer: 5'-GCATTGTTCTTAGCAGGCTCCTG-3' (Exon 2)



**Abb. 11:** Genomische DNA Sequenz von PRM 1 des Menschen (UCSC Human Gene Sorter; uc002dar.1). Basierend auf Sequenzanalysen bei Maus, Ratte, Bulle und Mensch wurden die Primer für Protamin 1 intronüberspannend generiert. Der forward Primer liegt in Exon 1 und der reverse Primer liegt in Exon 2. Intron ist 89 bp (Buchstaben klein gedruckt).

*Homo sapiens* Protamin-2: SAUNDERS et al., 1996

Die PCR-Fragmente wurden durch eine 2 %ige Agarose-Gelelektrophorese separiert, unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mit einem DNA-Purifikationssystem aufgereinigt.

Die gewonnenen *PRM 1*- und *PRM 2*-Fragmente wurden kloniert: erst in ein Plasmid (pGEM-T Vektor) inseriert und anschließend in einem Bakterium (*Escherichia coli*, Eco XL-1 Blue, Stratagene, Heidelberg, Germany) vervielfältigt.

Nach der Klonierung folgte die Separierung der Plasmide aus dem Bakterium mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits (Qiagen, Hilden, Germany) nach Anleitung des Herstellers. Um zu überprüfen, ob die Klonierung erfolgreich und spezifisch war, wurde das *PRM 1* und *PRM 2*-Insert von dem Plasmid mit zwei Restriktionsenzymen (Not-I, Nco-I) ausgeschnitten. Die *PRM 1*- und *PRM 2*-Inserts wurden durch eine 2%ige Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht nachgewiesen.

Der nächste Schritt beinhaltete die Linearisierung der Plasmide mit Not-I und Nco-I. Es entstehen zwei „lineare“ Plasmide mit endständigen Inserts. Jedes Insert wird dann durch Hinzufügen von je einer RNA-Polymerasen (T7 und SP-6) transkribiert in eine „antisense“- bzw. „sense“-Richtung. Im Falle von *PRM 1* und *PRM 2* bei *Callithrix jacchus* und Mensch ergab die T7 RNA- Polymerase Anti-Sense und die SP-6 RNA-Polymerase Sense.

Die Identität der *PRM 1*- und *PRM 2*-Inserts wurde durch Sequenzierung geprüft und bestätigt (Qiagen Sequenzierservice, Hilden, Germany).

Die einzelnen Arbeitsschritte der Sondenherstellung, sowie der *in-situ* Hybridisierung sind chronologisch aufgeführt.

### 3.2.8.1. Herstellung der Sonden

#### RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagenz:

##### Lösungen ansetzen:

##### DEPC Wasser:

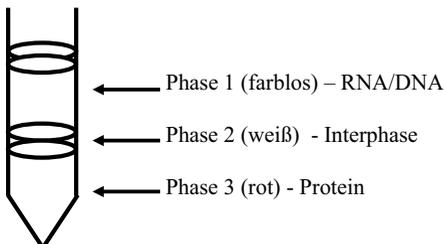
- 2 l Aqua bidest.
- 2 ml Diethylpyrocarbonat

kräftig schütteln; für 1h bei 37°C in den Brutschrank stellen, autoklavieren

##### 0,2 N HCl:

- 5,2 ml 25%ige HCl
- 200 ml DEPC Wasser
  
- 100 mg Gewebe abwiegen
- Gefriermaterial mit 1ml TRIzol® Reagent homogenisieren
- 5 Minuten bei RT stehen lassen
- 200 µl Chloroform zugeben, gut mischen
- 5 Minuten bei RT stehen lassen
- 15 Minuten bei 4 °C mit 12 000 rpm zentrifugieren

Nach Zentrifugation sind drei Phasen zu erkennen: die obere wässrige ist farblos (RNA/DNA), die mittlere Phase ist weiß (Interphase) und die untere Phase ist rot, enthält Proteine (Abb. 12).



**Abb. 12:** Phasentrennung nach Zentrifugation.

- Phase 1 vorsichtig abpipettieren und in neues Eppendorf-Tube überführen (Verunreinigung durch Interphase vermeiden!)
- Phasen 2 + 3 bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank lagern
- ca. 500 µl Isopropanol (-20 °C) zu Phase 1 pipettieren und mischen
- 30 Minuten bei -20 °C stehen lassen und anschließend mischen
- 10 Minuten bei 4 °C mit 12 000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser (-20 °C) lösen
- 10 Minuten auf Eis stellen und anschließend mischen
- Vorherigen Schritt 1x wiederholen
- 10 Minuten bei 4 °C mit 12 000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet ca. 20-30 Minuten in Brutschrank bei 37 °C trocknen
- Pellet in Wasserbad bei 70 °C in 50 µl DEPC-Wasser resuspendieren

Lagerung der RNA in Flüssigstickstoff

### **Konzentrationsbestimmung der RNA**

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration werden UVette® Einmalküvetten verwendet. Für jede Probenwertmessung wurde der Leerwert bestimmt.

Leerwertbestimmung: 69 µl sterilen 0,1 M Tris-HCL-Puffer in UVette® pipettieren und messen

Probenwertbestimmung: 1 µl RNA in gleiche UVette® pipettieren und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut mischen und messen

### **DNase Behandlung der RNA-Extrakte**

20 µl Ansatz:

x µl RNA (ca. 15 µg)

3 µl DNase I

2 µl 10x DNase I Puffer

x µl DEPC-Wasser (Differenz zu 20 µl)

- 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubieren
- 10 Minuten im Wasserbad bei 72 °C inaktivieren

**Erste-Strang-Synthese (RT, reverse transcription )**20 µl Ansatz:

x µl DEPC-Wasser (Differenz zu 12 µl)

1 µl Oligo dT-15 Primer

x µl RNA (ca. 8 µg)

- 10 Minuten im Wasserbad bei 70 °C inkubieren
- 3 Minuten im Eiswasser inkubieren

4 µl 5 x „first strand buffer“

2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT)

1 µl 10 mM dNTP

- 1 Minute im Wasserbad bei 37 °C inkubieren

1 µl Superscript II Reverse Transkriptase; (als Kontrolle Reverse Transkriptase durch DEPC-Wasser ersetzen)

- 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubieren

Lagerung bei -20 °C

**Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR)**50 µl Ansatz:

38,5 µl DEPC-Wasser

5 µl 10x PCR-Puffer

2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung

1 µl 10 mM dNTP

1 µl 5' Forward-Primer (10 pmol)

1 µl 3' Reverse-Primer (10 pmol)

1 µl cDNA

0,5 µl Taq DNA-Polymerase

Im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) wurde folgendes Programm erstellt:

Einstellung der Deckelheizung auf 104 °C

1. Schritt: 94 °C, 2 Minuten, Denaturierung
  2. Schritt: 94 °C, 1 Minute, Denaturierung
  3. Schritt: 62 °C, 1 Minute, Annealing (primerspezifisch)
  4. Schritt: 72°C, 1 Minute, Amplifikation
  5. Schritt: 72 °C, 8 Minuten, Verlängerung der Amplifikation
- Schritte (2-4) 40 x wiederholen

### **Agarose Gelelektrophorese**

Laufpuffer herstellen:

- 10 x TAE: 48,4 g Tris-base, 11,4 ml Essigsäure, 20 ml 0,5 M EDTA mischen, pH 8,4 einstellen und auf 1l mit Aqua bidest. auffüllen

- 1 x TAE: 50 ml 10 x TAE + 450 ml Aqua bidest. mischen, pH 8,4 einstellen

2%iges DNA-Agarosegel herstellen:

- 1 g 1%ige Agarose in einem Becherglas in 50 ml 1 x TAE suspendieren
- ca. 1 Minute in Mikrowelle erhitzen (bis die Lösung kocht)
- 10 µl SYBR<sup>®</sup>Green dazu geben (nach Abkühlung), sorgfältig mischen
- in ein 6,5 x 10,0 x 1.5 cm UV-transparentes Geltablett gießen
- einen Kamm (Taschenschablone) mit 12 Zähnen einsetzen
- ca. 20 Minuten polymerisieren lassen

Probenvorbereitung:

- 20 µl PCR-Produkt mit 4 µl Auftragspuffer mischen

Zur Bestimmung der Fragmentgröße der zu untersuchenden DNA-Proben DNA-Größenstandard (100 bp DNA-Ladder) verwenden:

- 2 µl DNA-Ladder mit 18 µl Aqua bidest. und 4 µl Ladepuffer mischen
- alle Proben und DNA-Ladder in Geltaschen pipettieren

Elektrophorese

- Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1 x TAE) füllen (bis die Oberfläche des Gels ca. 0,5 cm mit Puffer überschichtet ist)
- Elektrophoresekammer mit Stromquelle verbinden

Elektrophorese so lange durchführen, bis Farbstoffmarker etwa  $\frac{3}{4}$  der Trennstrecke zurückgelegt hat

Nachweis der gelelektrophoretisch getrennten DNA-Proben unter UV-Licht

### **Aufreinigung des PCR-Fragmentes**

- Nach Hersteller Angaben (QIAEX II Kit, Qiagen, Hilden, Germany)
- gewünschte Bande unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell ausschneiden
- Gelstück in einem 1.5 ml Eppendorf Tube wiegen
- 3 x Volumen Puffer QX1 zu 1 x Gewicht des Gelstückes dazu geben
- QIAEX II-Lösung resuspendieren (30 Sekunden vortexen)
- 30 – 60 µl QIAEX II-Lösung zupipettieren, mischen
- 10 Minuten im Wasserbad bei 50 °C inkubieren (während der Inkubation alle 2 Minuten kurz vortexen)
- 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 500 µl Puffer QX1 dazu geben, vortexen
- 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 500 µl Puffer PE dazu geben, vortexen
- 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- vorherigen Schritt 1 x wiederholen
- Pellet 10 – 15 Minuten bei 37 °C trocken lassen
- 20 µl Aqua bidest. zupipettieren, mischen
- 5 Minuten bei RT stehen lassen
- 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugieren → DNA im Überstand

### **Klonierung**

#### Lösungen ansetzen:

#### LB-Medium:

- 25 Kapseln LB-Medium
- 1 l Aqua bidest.

autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren

LB-Agar-Medium:

- 40 Kapseln LB-Agar-Medium
- 1 l Aqua bidest.

autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren

Herstellung kompetenter Zellen (ECO XL1-Blue)

- 2 ml LB-Medium in steriles Reagenzglas geben
- ECO XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg, Germany) Bakterien mit einer Öse animpfen
- über Nacht bei 37 °C auf Schüttler inkubieren

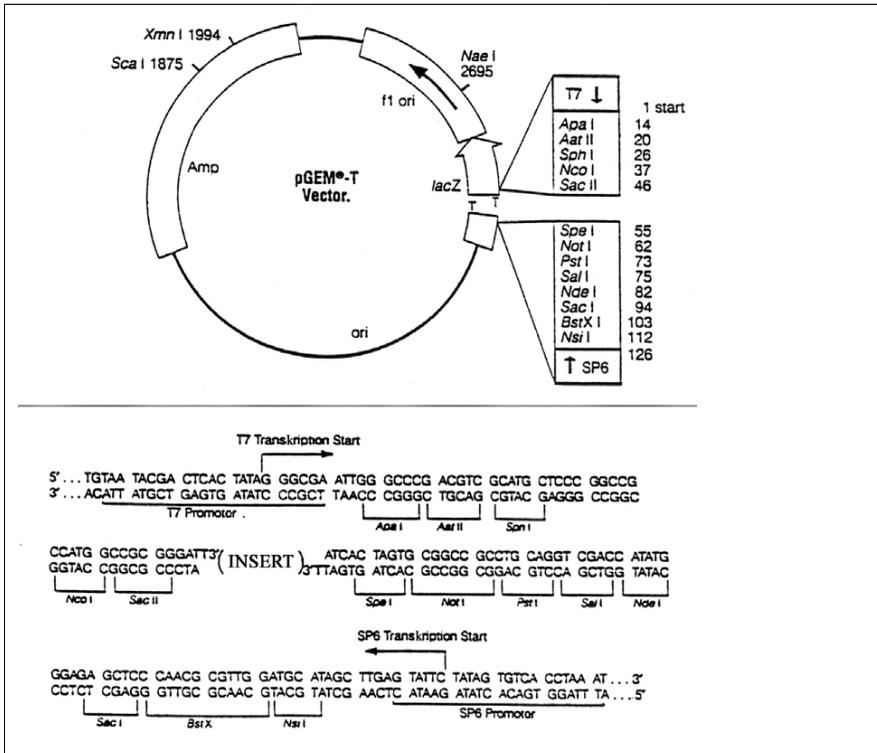
Am nächsten Tag:

- 19,5 ml LB-Medium bei 37 °C vorwärmen
- 0,5 ml Bakterien (über Nacht inkubieren) dazu geben
- 1-2 h bei 37 °C auf Schüttler inkubieren
- 30 Minuten auf Eiswasser stellen
- 5 Minuten bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 20 ml CaCl<sub>2</sub> 50mM mischen
- 30-60 Minuten auf Eis stellen und häufig mischen
- Zentrifugieren 5 Minuten bei 4 °C und 8000 rpm
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2-3 ml CaCl<sub>2</sub> resuspendieren → 20 ml kompetente Zellen

Ligation von pGEM-T Vektor (Promega, Mannheim, Germany) und Insert (PCR-Produkt)

Ansatz:

- 5 µl 2 x Ligase-Puffer
- 1 µl pGEM-T Vektor (Abb. 13)
- 3 µl Insert
- 1 µl T4 DNA-Ligase
  
- bei 4 °C über Nacht in Wasserbad inkubieren → 10 µl Ligationsprodukt



**Abb. 13:** pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (Promega, Mannheim, Germany). Das PCR-Produkt (Insert) wird in einen pGEM<sup>®</sup>-T Vektor eingebaut (Ligation). Dieser wird in kompetente Zellen (ECO XL1-Blue) eingeschleust (Transformation). Der pGEM<sup>®</sup>-T Vektor enthält Basensequenzen häufiger Restriktionsendonukleasen, ein Ampicillin-Resistenz-Gen und das für  $\beta$ -Galactosidase kodierende lacZ-Gen. Bakterien, die dieses Plasmid enthalten, exprimieren das Enzym  $\beta$ -Galactosidase, welches galactosidische Bindungen spaltet und einen blauen Farbstoff bildet. Das lacZ-Gen wird nur exprimiert, wenn kein DNA-Insert dieses Gen unterbricht. Durch Insertion des Plasmids verlieren die Kolonien ihre blaue Farbe und die weißen Kolonien enthalten daher das gewünschte Klonierungsprodukt.

Transformation des Plasmids (mit Insert)

- Ligationsprodukt (10 µl) mit 200 µl kompetenten Zellen mischen
- 30 Minuten auf Eis stehen lassen
- 2 Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubieren
- 2 Minuten im Eiswasser inkubieren
- 300 µl LB-Medium zugeben
- 30 Minuten bei 37 °C inkubieren

Während der Inkubation → Vorbereitung der Platten:

- LB-Agar-Medium in Schnellkochtopf 10 Minuten kochen
- 1-2 Stunden bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- 30 µg/ml Tetracyclin und 100 mg/ml Ampicillin zugeben und lösen
- 30 ml pro Platte gießen und lassen das Medium fest wird
- Platten 15 – 30 Minuten bei 37 °C inkubieren
- 40 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) pro Platte auftragen und einziehen lassen
- 40 µl von Isopropylthiogalactosid (IPTG): (200 mg/ml in Aqua bidest.) pro Platte auftragen und einziehen lassen

Auftragen von transformierten ECO XL-1 Blue auf LB-Agar-Tet-Amp-XGal-IPTG Platten

- ca. 150 µl transformierte ECO XL-1 Blue mit Trigalski-Spatel auf Platten verteilen
- bei 37 °C über Nacht inkubieren (Deckel nach unten, damit kein Kondenswasser auf den Agar tropft)

Auswertung der Platten

- weiße Kolonien (durch Insertion des Plasmids verlieren die Kolonien ihre blaue Farbe) ernten
- in steriles Reagenzglas mit 5 ml LB Medium + 500 µl Ampicillin geben
- bei 37 °C über Nacht auf Schüttler inkubieren

**Plasmid-Extraktion (QIAprep Spin Plasmid Kit; Qiagen, Hilden, Germany)**

- 5 ml über Nacht - Kultur 2 Minuten bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren (mischen)
- 250 µl Puffer 2 zugeben, 3-6 x kippen

- 350 µl N3-Puffer zugeben, 3-6 x kippen
- 10 Minuten bei 4 °C und 18000 rpm zentrifugieren → Plasmid ist im Überstand
- Überstand in Spin Columns geben
- 1 Minute bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 750 µl PE-Puffer auf Sieb geben
- 1 Minute bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 1 Minute bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugieren
- Spin Columns auf neue 1,5 ml Tubes setzen
- 50 µl EB-Puffer (oder Aqua bidest., pH 7,0 – 8,5) auf Sieb geben
- 1 Minute bei RT stehen lassen
- 1 Minute bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugieren → Plasmid in Durchfluss

### **Trennung der *PRM 1* und *PRM 2* -Inserte von dem Plasmid mit Hilfe von Not-I und Nco-I**

#### Doppelverdau

Ansatz:

- 9 µl Aqua bidest.
- 1 µl 100 x BSA-Lösung
- 2 µl Restriktionspuffer für Not-I und Nco-I (Puffer 3)
- 5 µl Plasmid
- 0,5 µl Not-I
- 0,5 µl Nco-I

Protokoll:

- bei 37 °C über Nacht im Wasserbad inkubieren
- 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)

Nachweis des Transkriptes mittels einer 2 %igen Agarose-Gel-Elektrophorese

#### Einzelverdau

Ansatz mit Not-I:

- 10,5 µl Aqua bidest.

- 2 µl 100 x BSA-Lösung
- 5 µl Plasmid
- 2 µl Restriktionspuffer für Not-I (Puffer 3)
- 0,5 µl Not-I

Ansatz mit Nco-I

- 12,5 µl Aqua bidest.
- 5 µl Plasmid
- 2 µl Restriktionspuffer für Nco-I (Puffer 4)
- 0,5 µl Nco-I

Protokoll:

- bei 37 °C über Nacht im Wasserbad inkubieren (beide Ansätze)
- 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)

#### Transkription in vitro-Herstellung der „sense“ und „anti-sense“ Sonden

Ansatz:

- 8 µl DEPC-Wasser
- 4 µl 5 x Transkriptionspuffer
- 2 µl 10 x Digoxigenin RNA-Labeling-Mix
- 2 µl 100 x DTT
- 2 µl linearisiertes Plasmid
- 2 µl RNA-Polymerase (T7 für das Not-I-geschnittene Plasmid, SP-6 für das Nco-I geschnittene Plasmid)

Protokoll:

- 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- 0,5 µl 0,5 M EDTA-Lösung zugeben
- 1,2 µl 8 M Lithium-Chlorid-Lösung zugeben
- 70,7 µl kaltes (-20 °C) 100 %iges Ethanol zugeben
- 1 h bei -80 °C im Gefrierschrank ausfallen lassen
- 20 Minuten bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen

- 200 µl gekühltes 70 %iges Ethanol zugeben
- 15 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet bei 37 °C trocknen
- 50 µl DEPC-Wasser zugeben,
- 10 Minuten bei 70 °C im Wasserbad resuspendieren

Beide Sonden bei -20 °C lagern

### 3.2.8.2. *In-situ* Hybridisierungs Protokoll

#### Lösungen ansetzen:

##### 0,2 N HCl:

- 5,2 ml 25 %ige HCl
- 200 ml DEPC Wasser

##### 20 x SSC Stammlösung:

- 88,23 g Natriumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ )
- 175,29 g NaCl
- mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
- pH 7,0 einstellen
- 1 ml DEPC zugeben

bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubieren und autoklavieren

##### 1 M MgCl<sub>2</sub>- Lösung:

- 81,4 g MgCl<sub>2</sub>
- in 400 ml DEPC Wasser lösen

##### PBSM-Puffer:

- 1 Tablette PBS
- 200 ml DEPC-Wasser
- 1 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

0,2 %ige Glycin-Lösung:

- 200 mg Glycin
- in 100 ml PBSM-Puffer lösen

4 %ige Paraformaldehydlösung:

- 25 g Paraformaldehyd
- 500 ml 1 x PBSM-Puffer (unter dem Abzug, auf einem Magnetrührer bei 70 °C)
- 4 N NaOH zugeben (bis die Lösung klar wird)
- mit konzentriertem HCl auf pH 7,0 einstellen

aliquotieren, bei -20 °C aufbewahren

50 %iges Dextransulfat:

- 5 g Dextransulfat
- 10 ml DEPC-Wasser (einige Tage im Kühlschrank stehen lassen)

aliquotieren, bei -20 °C lagern

3 %iger BSA in 1 x TMNT:

- 3 g BSA
- 100 ml TMNT Puffer

aliquotieren, bei -20 °C lagern

Denhardt-Reagenz (BFP):

- 200 mg BSA
- 200 mg Ficoll 400
- 200 mg Polyvinylpyrrolidon
- 10 ml DEPC-Wasser

aliquotieren, bei -20 °C lagern

10 x TMNT-Puffer:

- 121,1 g Tris-HCl
- 58,4 g NaCl
- 4,17 g MgCl<sub>2</sub>
- 1 l Aqua bidest.

5 x NTB Puffer:

- 60,5 g Tris-HCl
- 29,2 g NaCl
- 1 l Aqua bidest.
- pH 9,6 einstellen
- 1 ml DEPC zugeben

bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubieren und autoklavieren

1 M Levamisol:

- 2,4 g Levamisol
- 10 ml 1 x NTB-Puffer

aliquotieren, -20 °C lagern

TBS-Puffer:

- 121,1 g Tris-HCl
- 58,4 g NaCl
- 1 l Aqua bidest.
- pH 7,4 einstellen

Vorbereitung am Vortag

Die Schnitte und einen Xylolbehälter getrennt voneinander bei 60 °C in Brutschrank über Nacht stehen lassen

**1. Tag****Vorbereitung der Schnitte**Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte in Alkoholreihe

- 5 Minuten Xylol 60 °C
- 2 x 5 Minuten Xylol RT
- 2 x 5 Minuten abs. Ethanol
- 1 x 5 Minuten 96 %iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70 %iges Ethanol

Im weiteren Verlauf wurden ausschließlich sterile Behälter, steriles Besteck und sterile Lösungen verwendet, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden. Die Sterilisation der

Instrumente erfolgte bei 180 °C für 4 Stunden in einem Sterilisator. Die Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

- Schnitte 1 x in DEPC-Wasser waschen
- 20 Minuten in 0,2 N HCl inkubieren
- 15 Minuten bei 70 °C in 2 x SSC inkubieren
- 1 x 5 Minuten in PBSM-Puffer waschen

#### **Demaskierung der Bindungsstellen mit Proteinase K**

- 25 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer (befeuchtet mit DEPC Wasser) mit Proteinase K (20 µg/ml) inkubieren
- 1 x 5 Minuten in 0,2 %igem Glycin abstoppen

#### **Blockierung endogener Phosphatase**

- 15 Sekunden in 20 %iger Essigsäure in DEPC inkubieren
- 1 x 5 Minuten in PBSM-Puffer waschen

#### **Nachfixierung**

- 10 Minuten in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung inkubieren
- 1 x 5 Minuten in PBSM-Puffer waschen
- 1 h in 20 %igem Glycerol in DEPC prähybridisieren

#### **Vorbereitung der Sonden**

##### Sondenmischung herstellen:

Die Konzentration der Sonden für *PRM 1* und *PRM 2* beträgt 1:100

- 4 µl DEPC-Wasser
- 4 µl Salmon-sperm-DNA (1mg/ml)
- 8 µl Yeast-t-RNA (1mg/ml)
- 4 µl DIG-cRNA Sonde

##### Hybridisierungspuffer herstellen:

- 52 µl DEPC-Wasser
- 40 µl 20 x SSC
- 80 µl 50 %iges Dextransulfat
- 8 µl Denhardt-Reagenz

- 200 µl deionisiertes Formamid
- Sonden-Gemisch und Hybridisierungspuffer zusammenmischen
- Sonden (getrennt Not-1/ Nco-1 bzw. Sense/Antisense) auf die Schnitte geben
- 10 Minuten bei 70 °C denaturieren (Heizplatte)
- OT sofort auf einer Eisplatte abkühlen
- bei 37 °C über Nacht in einer feuchtem Kammer (DEPC-Wasser) inkubieren

Auf mitgeführten Kontrollschnitt wurde die Sonde durch Hybridisierungspuffer ersetzt.

## 2. Tag

### Posthybridisierung

In diesem Schritt erfolgt eine stringente Waschung, um nicht spezifisch gebundene Sonden vom Schnitt zu lösen und somit eine unspezifische Hintergrundreaktion zu vermeiden.

#### RNase A/ RNaseT1- Lösung:

- 1,35 ml 4 x SSC
- 150 µl 10 x RNaseA7 RNaseT1 Stammlösung
- 3 x 10 Minuten in 4 x SSC bei RT waschen
- 30 Minuten mit RNase A/ RNaseT1 bei 42 °C inkubieren
- 4 x 5 Minuten in 4 x SSC bei 42 °C waschen
- 1 x 15 Minuten in 2 x SSC bei 60 °C waschen
- 1 x 15 Minuten in 0.2 x SSC bei 42 °C waschen
- 1 x 5 Minuten in 0,1 x SSC bei RT waschen
- 1 x 5 Minuten in 2 x SSC bei RT waschen

## Immunhistochemie

### Lösungen ansetzen:

#### 1 x TNMT:

- 100 ml 10 x TNMT
- 900 ml Aqua bidest.

#### anti-DIG-Antikörper: Konzentration 1:500 mit TNMT-Puffer

- 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer bei RT waschen
- 1 h bei RT in 3 %igem BSA in 1 x TNMT-Puffer inkubieren
- mit anti-DIG-Antikörper in feuchter Kammer über Nacht bei 4 °C inkubieren

## 3. Tag

### Farbreaktion

#### Lösungen ansetzen:

#### 1 x NTB:

- 20 ml 5 x NTB
- 5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>
- 75 ml Aqua bidest.

#### 1 x TNMT:

- 100 ml 10 x TNMT
- 900 ml Aqua bidest.

#### Entwicklung mit NBT-BCIP

- 2 x 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer waschen
- 5 Minuten in 1 x NTB-Puffer waschen
- 5 Minuten in 50 ml 1 x NTB mit 250 µl 1 M Levamisol
- mit NBT-BCIP in einer feuchten Kammer im Dunkeln entwickeln
- mit 1 x NBT die Reaktion abstoppen

**Eindecken**

- Schnitte mit Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Germany) eindecken

**3.2.9. Gesamt RNA Extraktion aus Ejakulat von *Callithrix jacchus* und Mensch**Lösungen ansetzen:0,1 M DTT-Lösung:

- 0,01543 g DTT
- 1 ml Aqua bidest.

10 x Proteinase K Puffer:

- 2,42 g Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,0058 g NaCl
- 1,48 g EDTA (pH 8,0)

Natriumacetat Puffer

- 680 µl Natriumacetat
- 0,372 µl EDTA (pH 8,0)
- 100 ml Aqua bidest.
- Lösung mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen

**mRNA-Extraktion**

- Ejakulat mit 4000 rpm zentrifugieren um Seminalplasma zu entfernen und ein Pellet mit 10 Mio. Spermien zu erhalten.
- Pellet in 80 µl Proteinase K Puffer resuspendieren.
- 3 µl 10 %iges SDS und 2 µl DTT (0,1 M) dazu pipettieren
- 1 h bei 65 °C inkubieren
- 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) dazugeben und für 1 h bei 55 °C inkubieren (Schüttler)
- 1 ml TRIzol® (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) dazu pipettieren, 30 Sekunden vortexen und über Nacht bei 4 °C inkubieren.
- 10 Minuten mit 18000 rpm bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Tube überführen

- 0,2 Volumenanteil Chloroform dazugeben und vortexen
- 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- 15 Minuten mit 18000 rpm bei 4 °C zentrifugieren
- Wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Tube überführen
- 1 µl Glycogen und 0,1 Volumenanteil Natriumacetat Puffer (mit 20 µl SDS/100 µl Puffer) dazugeben
- 1 Volumenanteil Isopropanol (-20 °C) dazugeben und vorsichtig schwenken
- 60 Minuten bei -20 °C inkubieren
- 30 Minuten mit 18000 rpm bei 4 °C zentrifugieren
- Pellet mit 75 %igem Ethanol waschen
- 5 Minuten mit 18000 rpm bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand verwerfen; Pellet unter dem Abzug trocknen (ca. 5 Minuten)
- Pellet in 16 µl DEPC-Wasser bei 55 °C für 3 Minuten lösen
- Anschließend erfolgt ein DNase Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany)

### **3.2.10. Gesamt RNA Extraktion aus Eizellen, Zygoten, 2-Zell-Stadien und 4-Zell-Stadien von *Callithrix jacchus* und *Bos taurus***

- Zellen von *Callithrix jacchus*, die in RNAlater® (Ambion, USA), bzw. Zellen von *Bos taurus*, die in carrier RNA stock solution (Qiagen, Hilden, Germany), RLT Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) und β-Mercaptoethanol bei -20°C eingefroren sind, auftauen und auf Eis stellen
- RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany): 75 µl- 350 µl RLT Puffer mit β-Mercaptoethanol (β-ME) (1 ml RLT-Puffer + 10 µl β-ME) in das Tube mit der Zelle in RNAlater® geben
- Probe für 1 Minute vortexen
- 1 Volumenanteil (75 µl – 350 µl) 70 % Ethanol zu dem homogenisierten Lysat geben und durch mehrmaliges aufziehen mit der Pipette mischen. Nicht Zentrifugieren!
- Probe in ein RNeasy MinElute Spin Column in einem 2 ml Collection Tube überführen und für 15 Sekunden mit 10000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen
- 350 µl RW1 Puffer auf die Säule geben. 15 Sekunden mit 10000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.

- Durchfluss verwerfen
- 10 µl DNase I stock solution und 70 µl RDD Puffer in ein Tube geben. Tube kurz schwenken.
- DNase-Verdau: DNase I Inkubations Lösung (80 µl) direkt auf die Silica-Gel Membran pipettieren und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
- 350 µl RW1 Puffer auf Säule pipettieren und 15 Sekunden mit 10000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- RNeasy MinElute Spin Column in ein neues 2 ml Collection Tube überführen
- 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben und 15 Sekunden mit 10000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 500 µl 80 %iges Ethanol auf die Säule geben und 2 Minuten mit 10000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Silica-Gel Membran zu trocknen.
- Durchfluss und Collection Tube verwerfen
- Säule in ein neues 2 ml Collection Tube überführen. Deckel der Säule öffnen und für 5 Minuten mit 18000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren, um Silica-Gel Membran zu trocknen.
- Eluieren: Säule in ein neues 1,5 ml Collection Tube überführen. 14 µl RNase freies Wasser direkt auf die Silica-Gel Membran pipettieren und 1 Minute mit 18000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.

### 3.2.11. Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Methode der Molekularbiologie, die sich die Reverse Transkriptase und die Polymerase-Kettenreaktion zu nutzen macht, um einen definierten DNA-Abschnitt zu amplifizieren. Um die Transkription eines Gens nachzuweisen, muss in einem ersten Schritt, der sogenannten „first strand reaction,“ die messenger RNA mit Hilfe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in ihre komplementäre DNA umgeschrieben werden (Sensiscript™ RT Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Nach erfolgter DNA Aufreinigung (QIAquick® PCR Purification Kit 250, Qiagen, Hilden, Germany) kann diese DNA mithilfe der Polymerase Kettenreaktion amplifiziert werden. Die Polymerase Kettenreaktion an sich ist der eigentliche Prozess, in dem mit Hilfe

eines Enzyms (DNA-Polymerase) spezifische Abschnitte eines DNA Moleküls amplifiziert werden.

Die oben beschriebenen Komponenten (dNTPs, DNA-Polymerase) werden mit einem DNA-Primer (Oligo dT Primer, Promega, Salzburg, Austria) und einem reverse Transkriptase Puffer zusammen mit der mRNA für eine Stunde bei 37° inkubiert. Nachdem die Reverse Transkriptase Reaktion beendet ist und eine komplementäre DNA von der original Einzelstrang mRNA generiert wurde, kann die Polymerase Kettenreaktion, die sogenannte „second strand reaction,“ initiiert werden (BARTLETT und STIRLING, 2003).

Hierzu werden zu der cDNA eine thermostabile DNA-Polymerase und die „upstream“ und „downstream“ DNA Primer hinzugefügt. Die Reaktion wird auf Temperaturen größer 37°C gebracht, um Sequenz spezifische Bindung der DNA-Primer zu der cDNA zu unterstützen. Weitere Erhöhung der Temperatur ermöglicht es der thermostabilen DNA-Polymerase (Transkriptase) einen DNA-Doppelstrang aus der Primer-gebundenen cDNA zu synthetisieren. Die Reaktion wird auf ca. 95°C erhitzt, wodurch die DNA durch thermische Denaturierung in einzelsträngige DNA überführt wird. An diese hybridisieren im folgenden Schritt, der wiederum bei einer geringeren Temperatur stattfindet, die Oligonucleotid-Primer (Annealing). Davon ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase im letzten Schritt die komplementären Stränge. Durch mehrfache (30-40) Wiederholung dieses aus drei Schritten bestehenden Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation der DNA-Sequenz von Interesse.

### **3.2.11.1. Erste Strangsynthese**

Nach der mRNA Extraktion wurde die genomische DNA mit Hilfe des RNase-free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Germany) eliminiert. Anschließend wurde die mRNA mit dem Sensiscript™ RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in cDNA umgeschrieben, da aufgrund von mRNA Messungen mit dem Nanodrop Photometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) ein mRNA Gehalt kleiner 50 ng vorlag. Als Negativkontrolle diente der gleiche Ansatz ohne das RT-Enzym, das durch DEPC-Wasser substituiert wurde. Nach erfolgter Umschreibung wurde die cDNA aufgereinigt (QIAquick Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany) und mit dem Nanodrop Photometer gemessen.

Erste Strangsynthese 20 µl Ansatz:

- 3 µl 10 x RT Puffer
- 2 µl dNTP-Mix
- 2 µl Oligo dT (Promega, Salzburg, Germany)
- 1 µl Sensi RT
- 4 µl DEPC-Wasser
- 8 µl mRNA

Inkubation bei 37°C für 1 h

Aufreinigung der cDNA:

- Probenvolumen vom Puffer PB zur Probe geben und mischen
- Das Gemisch auf die QIAquick 2 ml Säule geben
- 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Mit 750 µl PE Puffer waschen (1 min bei 13000 rpm), Durchfluss verwerfen
- 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugieren
- Die Säule in ein sauberes 1,5 ml Tube überführen und 20 µl DEPC-Wasser zum eluieren dazugeben
- 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchfluss nochmals auf die Säule geben und zentrifugieren

**3.2.11.2. PCR**RT-PCR Master Mix (25 µl Ansatz):

- Nach Hersteller Angaben: Taq PCR Core-Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- X µl DEPC-Wasser (variiert je nach cDNA Menge)
- 0,75 µl MgCl<sub>2</sub>
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer
- 0,50 µl 10 mM dNTP-Mix
- 0,2 µl Taq DNA Polymerase
- 0,5 µl 5' Primer (10 pmol)
- 0,5 µl 3' Primer (10 pmol)
- 50-60 ng cDNA

Um die Reinheit des PCR-Mastermix zu kontrollieren, wurde DEPC-Wasser anstelle von Templet als Negativkontrolle eingesetzt.

Anschließend wurde eine RT-PCR durchgeführt mit den durch Homologievergleich zwischen Mensch, Maus und Ratte generierten Primern (Tabelle 1) unter folgenden Konditionen:

- 1 x 94 °C für 3 Minuten
- 40 x [ 1 x 94 °C für 1 Minute, 60-64,5 °C (je nach Annealing Temperatur des jeweiligen Primer; Tabelle 3) für 1 Minute, 1 x 72 °C für 1 Minute]
- 1 x 72 °C für 10 Minuten

Transkript	Primer	Sequenz	Produktgröße (bp)	Annealing temp. (°C)	Accession Nummer
<i>PRM 1</i> ( <i>Bos taurus</i> )	for	5' CTA CAT CTC GGT CTG TAC CTG GG 3'	95	64	NM 002761.2
	rev	5' CGG AGC TGC CAG ACA CGG A 3'			NM 013637.4 BC 126070
<i>PRM 1</i> ( <i>Call. jacchus</i> )	for	5' AAG ACG AAG AGG TCG CAG ACG AA 3'	95	61	**
	rev	5' ATC TTC TAC ATG GCA GCT TGT ACC 3'			
<i>PRM 2</i> ( <i>Bos taurus</i> )	for	5' TGG TCC GAT ACC GTG TGA GGA G 3'	95	60	NM 002762.2
	rev	5' TCT TGG CCA TTA CGT CCT TGC TC 3'			NM 008933.1 NM 012873.1
<i>PRM 2</i> ( <i>Call. jacchus</i> )	for	5' TGG TCC GAT ACC GTG TGA GGA G 3'	95	64	Saunders et al., 1996
	rev	5' TCT TGG CCA TTA CGT CCT TGC TC 3'			
<i>H1</i>	for	5' GCT GGC TAC GAC GTA GAG AAG AA 3'	95	62	NM 005323.3
	rev	*5' CCR GTR CCC YTG GTY TGC ACC A 3'			NM 010377.2 NM 012579.1
<i>H3</i>	for	*5' ACT AAR CAG ACM GCT CGR AAR TCC 3'	76	63	NM 003537.3
	rev	*5' TCT TGC GRG CRG CCT TGG TRG CC 3'			NM 178206.2 XM 001071856.1
<i>H4</i>	for	5' TTC CTG GAG AAC GTG ATC CGT GA 3'	98	64.5	NM 003537.3
	rev	*5' TGG CGY TTS AGC GCG TAS ACC A 3'			NM 153173.2 XM 001061844.1
<i>CREM</i>	for	5' GGG ACT GCA GGC ATT AAC A 3'	117	62	Kempisty et al., 2008
	rev	5' TGG CTG CCT GGG ACA AAG A 3'			
<i>DNMT1</i>	for	5' CTT CCT CAG CTA CTG CGA CTA CTA 3'	74	63	NM 001379.1
	rev	*5' TGW AGG ASA CRA AGT TCC TGA CRT T 3'			NM 010066.3 NM 053354.3
<i>TBP</i>	for	5' TAA TCT ACA GAA TGA TCA AAC CCA GA 3'	75	64	NM 003194.3
	rev	5' TAG CAC CTG TTA ATA CAA CTT TTC CA 3'			NM 013684.2 NM 001004198.4

**Tabelle 1:** Oligonukleotid Sequenzen der generierten Primer. Die Accession Nummern der drei Spezies (*Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*) für den Homologievergleich sind in entsprechender Reihenfolge aufgeführt. PRM1, Protamin-1; PRM2, Protamin-2; H1, Humanes Histon H1; H3, Histon H3; H4, Histon H4; CREM, cAMP-responsive element modulator; DNMT1, DNA Methyltransferase 1; TBP, TATA Box-Bindendes Protein; \*\*PRM1 Primer für *Callithrix jacchus* sind Oligonukleotid Sequenzen aus der von uns neu ermittelten *Callithrix jacchus* PRM1 Gensequenz. PRM2 Primer für *Callithrix jacchus* wurde entsprechend SAUNDERS et al. (1996) generiert. CREM Primer entsprachen KEMPISTY et al. (2008). \*Primersequenzen enthalten Wobble Basen: W(AT), S(GC), R(AG), Y(CT), M(AC).

### 3.2.12. Analyse des PCR-Produktes mittels Gel-Elektrophorese

Agarose-Gelsysteme sind die Standardmethode unter anderem für die Trennung und Identifizierung von linearen DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nukleinsäurefragmenten müssen bei der elektrophoretischen Trennung stets Größenstandards (HyperLadder<sup>TM</sup> IV, Bionline, Luckenwalde, Germany) mit aufgetrennt werden. Die Auftrennung der negativ geladenen DNA erfolgt in einem 2 % igen Agarose Gel (Bionline, Luckenwalde, Germany), das mit 30 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) hergestellt wird. Der Fluoreszenzfarbstoff GelRed Nucleic Acid stain (10.000x in Wasser) (Biotrend, Köln, Germany) wird während des Abkühlens zu der Agarose-Suspension dazu gegeben. Das Gel wird in die Gelkammer verbracht und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Marker und DNA-Proben, die mit 1/5 ihres Volumens an Probenauftragspuffer (Crystal 5x DNA Loadingbuffer Blue, Bionline) versetzt sind, werden in die Gel-Taschen pipetiert. Die Apparatur wird mit dem Stromgeber (Power Pac Basic, BioRad, München, Germany) verbunden und die Elektrophorese wird bei 120 Volt, 400 mA und 25 Minuten durchgeführt. Dabei wandert die DNA in Richtung Anode. Kürzere Moleküle laufen schneller durch die Gel-Matrix als Größere (SAMBROOK und RUSSEL, 2001). Anschließend wird das Gel unter einer UV Lampe analysiert und dokumentiert (BioDoc Analyze, Biometra, Goettingen, Germany).

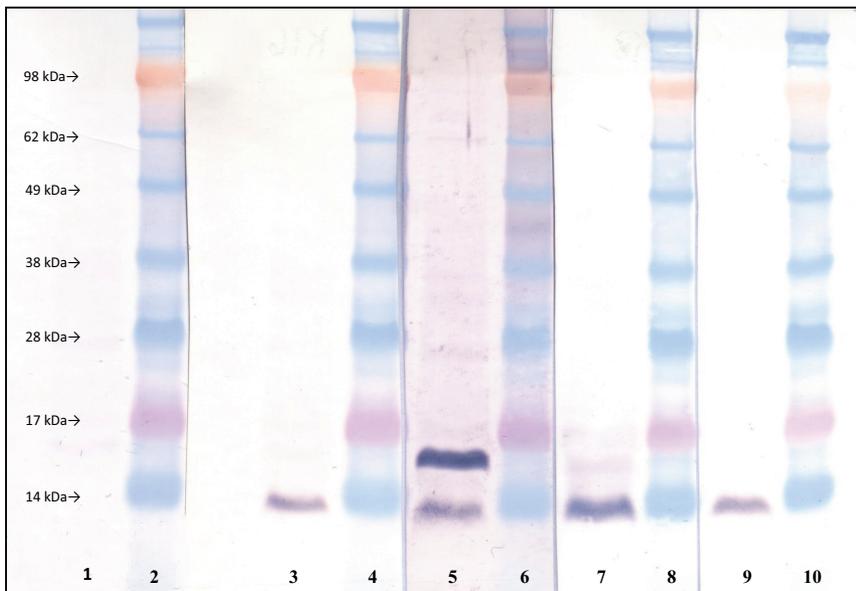
### 3.2.13. Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden bei Qiagen Sequencing Services (Qiagen, Hilden, Germany) sequenziert, um zu bestätigen, dass die richtigen Fragmente amplifiziert wurden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Western Blot Analyse von menschlichem Ejakulat

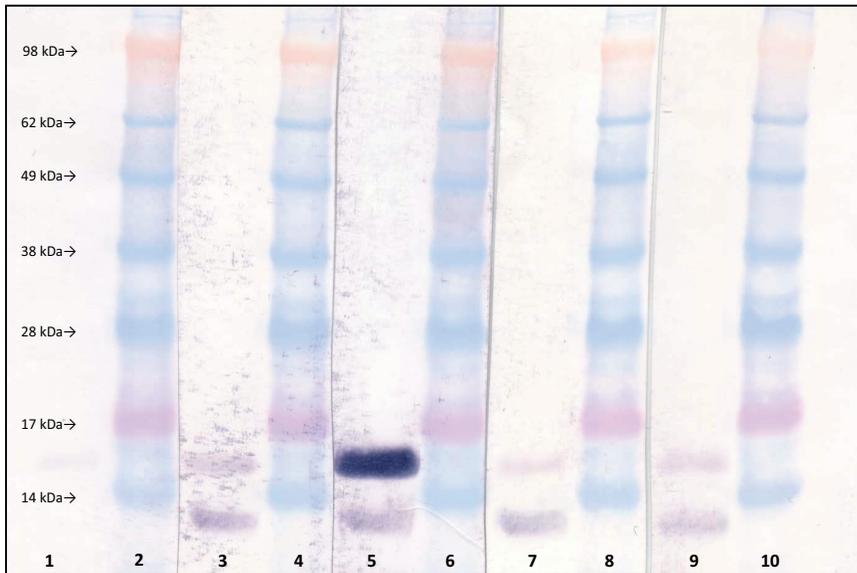
Mit den 4 Antikörpern gegen spezifisch an Lysin 5, 8, 12 und 16 acetyliertem Histon H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac) konnten im menschlichen Ejakulat in der Western Blot Analyse (WB) deutliche und spezifische Banden bei 11 kD (H4K5ac), 12 kD (H4K8ac) und 13 kD (H4K12ac und H4K16ac) detektiert werden. Im Fall von H4K12ac ist eine zusätzliche starke Bande, bei H4K5ac, H4K8ac und H4K16ac sehr schwache Banden mit ca. 16kD zu sehen. Diese beruhen möglicherweise auf post-translationalen Modifizierungen. Für H4K8ac ist laut Datasheet von abcam eine Kreuzreaktion (ohne genauere Spezifizierung) mit einer zusätzlichen Bande bei 18kD bekannt. Die Negativkontrolle zeigt keine Banden (Abb. 14).



**Abb. 14:** Western Blot Analyse von humanem homogenisiertem Ejakulat. Pro Lane wurden 20µg/µl der Probe auf das Gel (10% Tris-Bis-Gel, Invitrogen) aufgetragen. Als Marker diente SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen) (Lane 2, 4, 6, 8, 10). Der Proteinextrakt zeigte für H4K16ac (Lane 3) eine deutliche Bande bei 13kD, für H4K8ac (Lane 7) bei 12kD und für H4K5ac (Lane 9) bei 11kD. Zusätzlich sind sehr schwache Banden der Größe 16kD sichtbar. H4K12ac (Lane 5) zeigte bei 13kD die zu erwartende Bande und die zusätzliche Bande in Höhe von ca. 16kD, die hier jedoch wesentlich deutlicher erscheint. Die Negativkontrolle (Lane 1) (mit dem Primärantikörper IgG) zeigte keine Bande.

#### 4.2. Western Blot Analyse von Ejakulat von *Callithrix jacchus*

Die oben genannten Antikörper zeigten im Western Blot von Ejakulat von *Callithrix jacchus* ein vergleichbares Ergebnis. Wie beim Western Blot beim Mensch, zeigte sich bei *Callithrix jacchus* das identische Expressionsmuster mit den spezifischen Banden und der zusätzlichen sehr deutlichen Bande bei H4K12ac mit 16 kDa. Bei den drei übrigen Antikörpern ist diese zusätzliche Bande, die auf eine Kreuzreaktion hinweist nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 15).



**Abb. 15:** Western Blot Analyse von homogenisiertem Ejakulat des *Callithrix jacchus*. Pro Lane wurden  $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$  der Probe auf das Gel (10% Tris-Bis-Gel, Invitrogen) aufgetragen. Als Marker diente in Lane 2, 4, 6, 8, 10 SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Der Proteinextrakt zeigte für H4K16ac (Lane 3) eine deutliche Bande bei 13kD, für H4K8ac (Lane 7) bei 12kD und für H4K5ac (Lane 9) bei 11kD. Zusätzlich sind sehr schwache Banden der Größe 16kD sichtbar. H4K12ac (Lane 5) zeigte bei 13kD die zu erwartende Bande und die zusätzliche Bande in Höhe von ca. 16kD, die hier wesentlich deutlicher erscheint, als beim Mensch. Die Negativkontrolle (Lane 1), mit dem Primärantikörper IgG, zeigte keine Bande.



Der ORF des Protamin-1 des Marmoset besteht aus 150 bp (Abb. 16). Im Vergleich zu Protamin-1 des Menschen fällt auf, dass sich die Marmoset-cDNA-Sequenz durch 14 Nukleotide von der des Menschen unterscheidet. Bei der Aminosäuren-Sequenz resultiert dies darin, dass sich die beiden Sequenzen durch 11 Aminosäuren unterscheiden. Zusätzlich ist zu beobachten, dass Codon 35 des Menschen, welches Arginin codiert, beim Marmoset fehlt (Abb. 17, A). Auf Nukleotid Ebene bedeutet dies, dass die Protamin-1 Gene von Mensch und Marmoset, wenn man das fehlende Codon nicht in Betracht zieht, zu 91 % übereinstimmen. Auf Protein Ebene besteht eine 78,4 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren, wenn jede Aminosäure im Marmoset Protein mit der Aminosäure, welche von dem entsprechenden Codon kodiert wird, im Menschen verglichen wird (Abb. 17, A). Wenn man jedoch die 3 Arginin-Reste der Position 32-34 auf die Position 33-35 verschiebt, und die Lücke von Position 35 in Position 31 einfügt, ist die Anordnung der Marmoset Sequenz, der des Menschen ähnlicher und resultiert in einer 80,4 %igen Übereinstimmung auf Protein Ebene (Abb. 17, B).

Desweiteren ist festzustellen, dass die 30 Aminosäuren des N-terminalen Endes deutlich besser konserviert sind, als die 21 Aminosäuren des C-terminalen Endes des Protamin-1 Proteins. Dies ist ebenfalls beim Vergleich der Nukleotid Sequenzen von Protamin-1 bei Maus, Ratte, Bulle und Mensch festzustellen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die 3'-untranslated-region (UTR) nach dem TAA-Stoppocodon ist interessanterweise bei Mensch und Marmoset hoch konserviert (Abb. 16). Bis auf eine Lücke von 10 Nukleotiden in der menschlichen Sequenz, kurz nach dem Stoppcodon, ist die Homologie zwischen Mensch und Marmoset deutlich zu erkennen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass diesem hoch konservierten Abschnitt der mRNA eine wichtige funktionale Bedeutung zukommt, da er dem Evolutionsdruck standgehalten hat.

**A)**

Aminosäuresequenz Kodon für Kodon: 78.4%

```
Human      MARYRCCRSQSRSRYYRQQRQSRRRRRRSCQTRRRAMRCCRPYRPRCRRH 51
Marmoset   MARYRCCRSQSRSRCYRQRRRGRRRRRRSCRRRR-ASRCCRRYKLPERRY 50
          *****.*.*****:;* * **** *:  **:
```

**B)**

Aminosäuresequenz mit Verlagerung der Lücke von Position 35 auf Position 31: 80.4%

```
Human      MARYRCCRSQSRSRYYRQQRQSRRRRRRSCQTRRRAMRCCRPYRPRCRRH 51
Marmoset   MARYRCCRSQSRSRCYRQRRRGRRRRRRSC-RRRRASRCCRRYKLPERRY 50
          *****.*.*****:*****:**** **** *:  **:
```

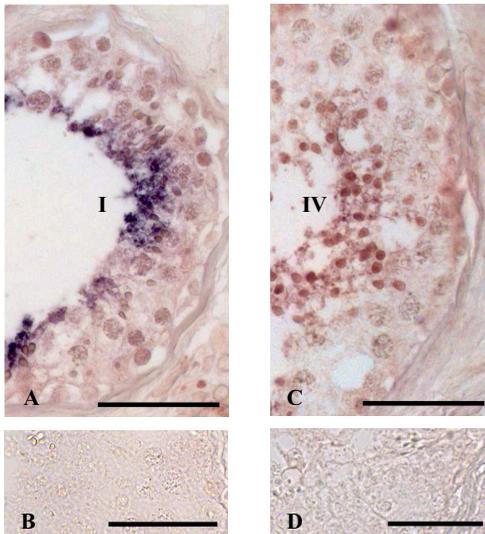
**Abb. 17:** (A) Marmoset Protamin-1 Aminosäuresequenz im Vergleich zu der Protamin-1 Sequenz des Menschen. Während das N-terminale-Ende des Protamins hoch konserviert ist, zeigt das C-terminale Ende (fett) deutliche Abweichungen zwischen Mensch und Marmoset. (B) Eine Verlagerung der Lücke in der Aminosäuresequenz von Position 35 auf 31 resultiert in einer höheren Sequenzhomologie zwischen Mensch und Marmoset (80,4% im Vergleich zu 78,4%).

#### 4.4. *In-situ* Hybridisierung

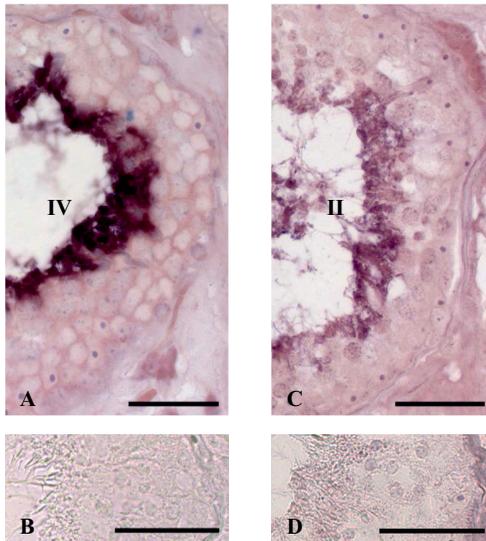
Die *in-situ* Hybridisierung (ISH) für Protamin-1 und Protamin-2 zeigt beim Mensch mit normaler Spermatogenese (Score 9-10) positive Signale in runden und elongierenden Spermatisden der Stadien I-IV. (Abb. 18).

Bei *Callithrix jacchus* mit normaler Spermatogenese konnte Protamin-1 und Protamin-2 mRNA in runden und elongierenden Spermatisden der Stadien I-V detektiert werden (Abb. 19).

Das Expressionsmuster für Protamin-1 als auch für Protamin-2 war bei Mensch und Affe identisch. Protamin-2 zeigt in der *in-situ* Hybridisierung sowohl bei Mensch, als auch bei *Callithrix jacchus* ein schwächeres Signal als Protamin-1. Diese unterschiedliche Signalintensität konnte in früheren Untersuchungen (STEGGER et al., 2000) bereits beobachtet werden. Die Negativkontrollen waren für beide Protamine deutlich negativ.



**Abb. 18:** *In-situ* Hybridisierung, die die Detektion von Protamin-1 mRNA im Stadium I (A) und Protamin-2 mRNA im Stadium IV (C) in runden und elongierenden Spermatisden bei normaler Spermatogenese von Mensch zeigt. Beide Protamine zeigten ein ähnliches Expressionsmuster, wobei die Sonde gegen Protamin-1 mRNA deutlich stärkere Signale zeigte. Die Negativkontrollen (Sense) waren negativ für Protamin-1 (B) und Protamin-2 (D). Verdünnung 1:100. Bar= 50  $\mu$ m.



**Abb. 19:** *In-situ* Hybridisierung, die die Detektion von Protamin-1 mRNA im Stadium IV (A) und Protamin-2 mRNA im Stadium II (C) in runden und elongierenden Spermatiden bei normaler Spermatogenese von *Callithrix jacchus* zeigt. Die Negativkontrollen (Sense) waren deutlich negativ für Protamin-1 (B) und Protamin-2 (D). Verdünnung 1:100. Bar = 50 $\mu$ m.

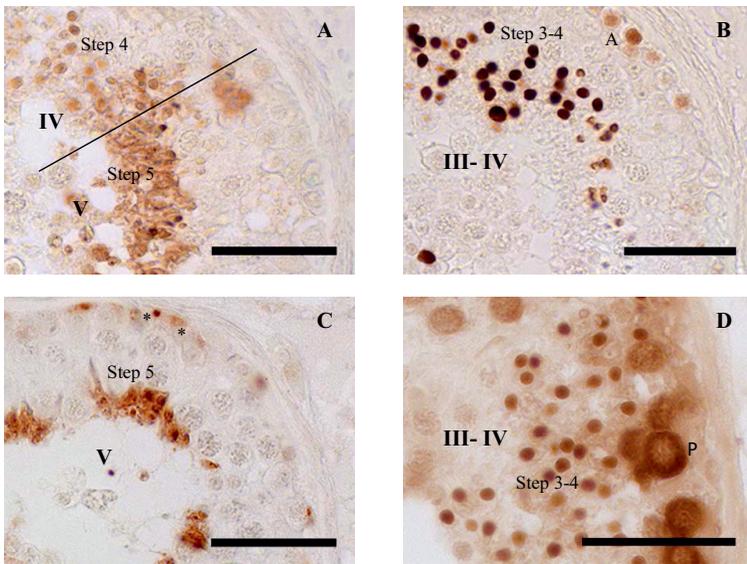
## 4.5. Immunhistochemie (IHC)

### 4.5.1. Normale Spermatogenese beim Mensch

Männer mit einer normalen Spermatogenese (Score 10) zeigten im histologischen Hodenschnitt für H4K5ac positive Signale in Spermatischen der Stadien III-V (Abb. 20, A). Der Antikörper H4K8ac färbte Spermatozoen (42,9 ± 3,53%; Tabelle 2) und Spermatischen der Stadien III-V (Abb. 20, B). Die Immunhistochemie mit dem Antikörper H4K12ac zeigte ein identisches Expressionsmuster zu H4K5ac (Abb. 20, C). Bei H4K12ac fallen zusätzliche unspezifische immunhistochemische Reaktionen nahe der Basalmembran auf (Abb. 20, C), die im WB bestätigt werden. Keimepithel, das mit dem Antikörper H4K16ac inkubiert wurde, zeigte positive Signale in den pachytänen Spermatozoen ab Stadium III der Spermatogenese. Zusätzlich erkennt man positive Signale bereits in runden Spermatischen der Stadien I-III. Elongierende Spermatischen der Stadien IV-V sind auch hier positiv (Abb. 20, D). Desweiteren ist in ca. 2,0 ± 0,71% (Tabelle 2) der Typ-A Spermatozoen ein positives Signal zu erkennen.

↓Tubuli	H4K8ac	H4K16ac
1	16,56	2,86
2	50,76	5,33
3	32,81	0
4	52,12	0,78
5	41,66	1,96
6	45,33	0
7	48,07	0,89
8	50,00	6,44
9	52,00	0
10	39,47	2,17
$\bar{x}$	<b>42,88</b>	<b>2,04</b>
STABW	11,16	2,27
SEM	<b>3,53</b>	<b>0,71</b>

**Tabelle 2:** Dargestellt ist der prozentuelle Anteil an positiven Spermatozoen für H4K8ac und H4K16ac je ausgezähltem Tubulus (1-10). Der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (STABW) und der Standardfehler (SEM) wurde jeweils für H4K8ac und H4K16ac ermittelt.



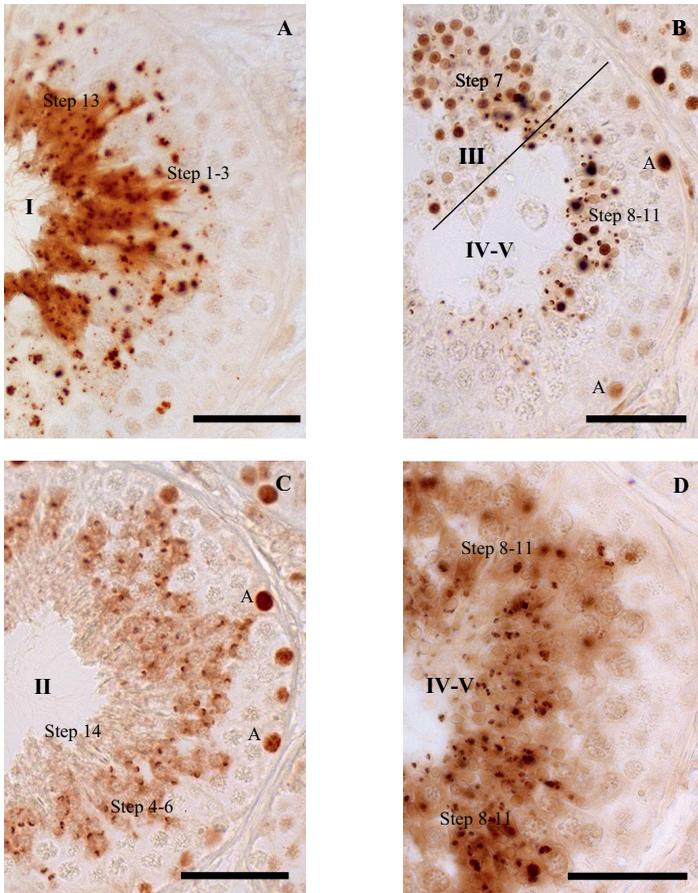
**Abb. 20:** Immunhistochemie gegen spezifisch an Lysin 5, 8, 12 und 16 acetyliertes Histon H4 bei normaler Spermatogenese beim Mensch. **A:** Zeigt Stadium IV und V von IHC gegen H4K5ac mit positive Signale in runden Step 4 und 5 Spermatiden. **B:** Der Antikörper gegen H4K8ac zeigte zusätzlich zu den runden und elongierenden Spermatiden der Stadien III-V positive Signale in ca.  $42,9 \pm 3,53\%$  der A-Spermatogonien (A). **C:** H4K12ac mit positiven Signalen in Step 5 Spermatiden in Stadium V. Zusätzliche unspezifische Signale (\*) sind vorhanden. **D:** H4K16ac zeigte positive Signale in pachytänen Spermatozyten (P) ab Stadium III und in runden Spermatiden Step III-IV. Antikörper Verdünnung: H4K5ac 1:1000, H4K8ac 1:500, H4K12ac 1:1000, H4K16ac 1:200. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.2. Normale Spermatogenese bei *Callithrix jacchus*

Während der normalen Spermatogenese bei *Callithrix jacchus* zeigte der Antikörper H4K5ac schwach positive Signale in runden Spermatiden der Stadien I-III und stark positive Signale in elongierenden Spermatiden der Stadien IV-V (Abb. 21, A). H4K8ac färbte ca.  $32,5 \pm 3,01\%$  (Tabelle 3) der Typ-A Spermatogonien der Stadien I-V, wie auch runde Spermatiden der Stadien I-III und elongierende Spermatiden der Stadien IV-V (Abb. 21, B). In  $41,8 \pm 2,86\%$  der Typ-A Spermatogonien der Stadien I-V zeigten sich deutlich positive Signale für H4K12ac (Tabelle 3). Zusätzlich sind positive Reaktionen in runden Spermatiden der Stadien I-III und in elongierenden Spermatiden der Stadien IV-V zu erkennen (Abb. 21, C). Die Immunhistochemie für H4K16ac zeigte ein identisches Expressionsmuster wie H4K5ac (Abb. 21, D).

↓Tubuli	H4K8ac	H4K12ac
1	29,62	44,64
2	25,00	40,86
3	28,98	66,03
4	28,20	37,20
5	19,14	40,35
6	36,96	34,48
7	31,63	40,00
8	55,00	40,20
9	35,55	40,00
10	35,18	33,90
$\bar{x}$	<b>32,53</b>	<b>41,77</b>
STABW	9,53	9,09
<b>SEM</b>	<b>3,01</b>	<b>2,86</b>

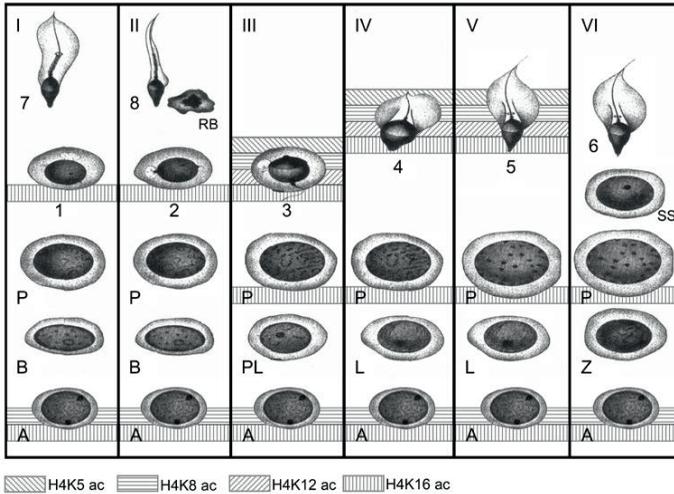
**Tabelle 3:** Dargestellt ist der prozentuelle Anteil an positiven Spermatogonien für H4K8ac und H4K12ac je ausgezähltem Tubulus (1-10). Der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (STABW) und der Standardfehler (SEM) wurde jeweils für H4K8ac und H4K16ac ermittelt



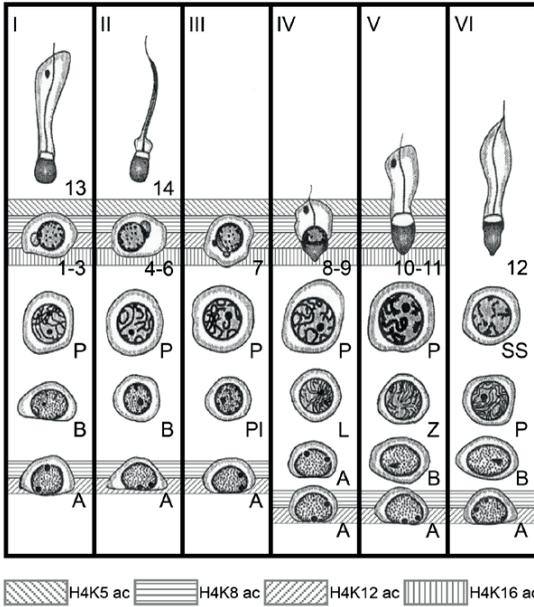
**Abb. 21:** Immunhistochemie von normaler Spermatogenese bei *Callithrix jacchus*. **A:** H4K5ac zeigt in Stadium I positive Signale in runden Spermatiden Step 1-3 und in elongierenden Spermatiden Step 13. **B:** Zeigt Stadium III und IV-V für H4K8ac mit positiven Signalen in elongierenden Spermatiden Step 7-11. In Stadium IV-V sind zusätzlich positive A-Spermatogonien (A) vorhanden. **C:** Stadium II mit deutlich positiven A-Spermatogonien (A) und positiven Spermatiden Step 4-6 und Step 14 bei H4K12ac. **D:** Übergang Stadium IV-V für H4K16ac mit positiven Step 8-11 Spermatiden. Antikörper Verdünnung: H4K5ac 1:1000, H4K8ac 1:500, H4K12ac 1:1000, H4K16ac 1:200. Bar = 50  $\mu$ m.

### 4.5.3. Immunhistochemische Ergebnisse von Mensch und *Callithrix jacchus* im Vergleich

Die Expressionsmuster in histologischen Hodenschnitten der vier von uns eingesetzten Antikörper gegen spezifisch an Lysin acetyliertes H4 ist in Abbildung 22 für die normale Spermatogenese bei Mensch und in Abbildung 23 für die normale Spermatogenese bei *Callithrix jacchus* noch einmal zur besseren Übersicht vergleichend zusammengefasst.



**Abb. 22:** Das Expressionsmuster der vier Antikörper H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac beim Menschen im Vergleich. Modifiziert nach CLERMONT (1963).



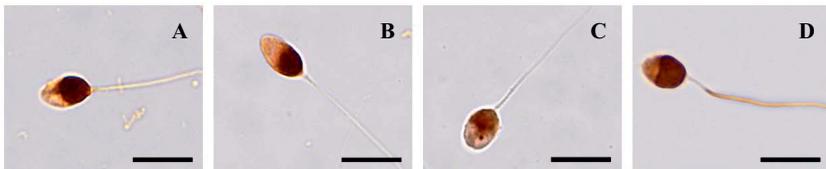
**Abb. 23:** Das Expressionsmuster der vier Antikörper H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac bei *Callithrix jacchus* im Vergleich. Modifiziert nach BEHR und WEINBAUER (1999)

#### 4.5.4. Ejakulierte Spermatozoen beim Menschen

Es wurden Ejakulatausstriche von gesunden Spendern, die nach WHO Kriterien ausgesucht wurden, angefertigt (wie in Material und Methoden beschrieben) und für eine Immunhistochemie eingesetzt. In diesen Ausstrichen der ejakulierten Spermatozoen waren für alle vier Antikörper positive Signale zu erkennen (Abb. 24). Der prozentuale Anteil an positiven Spermatozoen variierte deutlich zwischen den vier eingesetzten Antikörpern. Für H4K5ac zeigten  $17,4 \pm 1,5\%$ , für H4K8ac  $14,4 \pm 1,0\%$ , für H4K12ac  $23,6 \pm 5,0\%$  und für H4K16ac  $92,0 \pm 7,5\%$  der Spermatozoen eine positive Reaktion (Tabelle 4).

Feld á 200 Spermatozoen	H4K5ac	H4K8ac	H4K12ac	H4K16ac
1	23	14	42	99
2	15	18	23	99
3	16	13	18	100
4	18	15	12	100
5	15	12	23	62
$\bar{x}$	<b>17,4</b>	<b>14,4</b>	<b>23,6</b>	<b>92</b>
STABW	3,36	2,30	11,24	16,78
<b>SEM</b>	<b>1,50</b>	<b>1,03</b>	<b>5,03</b>	<b>7,5</b>

**Tabelle 4:** Der prozentuelle Anteil an Spermatozoen mit positiven Signalen in Ejakulatausstrichen für H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac wurde ermittelt, indem auf jedem Objektträger fünf Felder (1-5) á 200 Spermatozoen ausgezählt wurden. Die Daten wurden mittels arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (SEM) dargestellt. STABW: Standardabweichung.



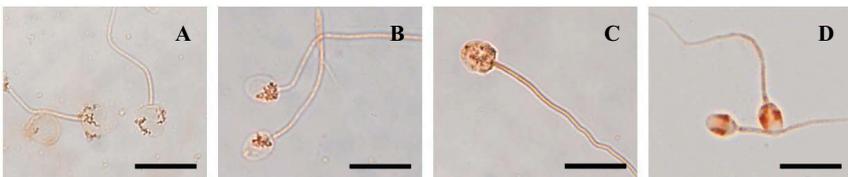
**Abb. 24:** Immunhistochemie von ejakulierten Spermatozoen des Menschen. **A:** H4K5ac; **B:** H4K8ac; **C:** H4K12ac; **D:** H4K16ac; Antikörper-Verdünnung 1:250; Bar = 10  $\mu\text{m}$ ; Vergrößerung x 1000.

#### 4.5.5. Ejakulierte Spermatozoen bei *Callithrix jacchus*

Ejakulierte Spermatozoen vom *Callithrix jacchus* zeigten ebenfalls bei allen vier Antikörpern positive Signale. Ejakulate wurden mittels peniler Vibrostimulation gewonnen und weisen eine höhere Spermiedichte ( $600 \times 10^6/\text{ml}$ ), höhere Gesamtspermienzahl ( $12 \times 10^6$ ), höheren Anteil an lebenden (75%) und beweglichen (55%) Spermatozoen auf, im Vergleich zu Ejakulat, das mit rektaler Elektrostimulation gewonnen wurde (KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS et al., 2004). Obwohl die Spermienqualität sehr gut ist, ist das Ejakulatvolumen sehr klein, ca. 30  $\mu\text{l}$  pro Ejakulation. Aufgrund der Tatsache, dass für die Versuche das Ejakulatvolumen der limitierende Faktor war, konnten nur wenige Ausstriche angefertigt und folglich nur 300 Spermatozoen pro Antikörper ausgezählt werden (Tabelle 5). Bei dem Antikörper H4K5ac zeigten  $27,0 \pm 10,7\%$ , bei H4K8ac  $59,3 \pm 12,8\%$ , bei H4K12ac  $86,3 \pm 0,6\%$  und bei H4K16ac  $43,6 \pm 1,8\%$  eine positive immunhistochemische Reaktion (Abb. 25).

Feld á 100 Spermatozoen	H4K5ac	H4K8ac	H4K12ac	H4K16ac
1	48	80	86	47
2	20	36	86	43
3	13	62	87	41
$\bar{x}$	<b>27</b>	<b>59,3</b>	<b>86,3</b>	<b>43,6</b>
STABW	18,52	22,12	0,33	3,06
SEM	<b>10,69</b>	<b>12,77</b>	<b>0,58</b>	<b>1,76</b>

**Tabelle 5:** Der prozentuelle Anteil an Spermatozoen mit positiven Signalen in Ejakulat-Ausstrichen für H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac wurde ermittelt, indem auf jedem Objektträger drei Felder á 100 Spermatozoen ausgezählt wurden. Die Daten wurden mittels arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (SEM) dargestellt. STABW: Standardabweichung.



**Abb. 25:** Immunhistochemie von ejakulierten Spermatozoen bei *Callithrix jacchus*. **A:** H4K5ac; **B:** H4K8ac; **C:** H4K12ac; **D:** H4K16ac; Verdünnung 1:250; Bar = 10  $\mu\text{m}$ ; Vergrößerung  $\times 1000$ .

#### 4.5.6. RT-PCR Ergebnisse

Mit RT-PCR wurde die Anwesenheit von den Transkripten *PRM 1*, *PRM 2*, *H1*, *H3*, *H4*, *CREM*, *DNMT1*, und *TBP* in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Embryonen von *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* untersucht.

In *Callithrix jacchus* Spermatozoen waren alle Transkripte vorhanden, während in *Bos taurus* *PRM 2* fehlte. Abbildung 26 zeigt die PCR Ergebnisse von *PRM 1* (*Bos taurus*, A) und *TBP* (*Callithrix jacchus*, B).

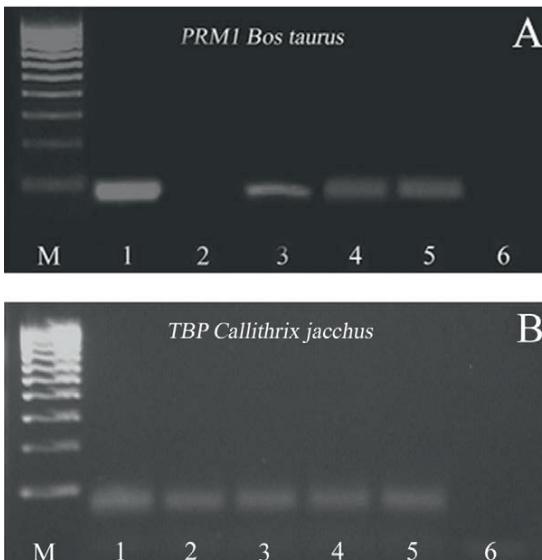
In Oozyten vom Marmoset können die Transkripte *H1*, *H3*, *H4* und *TBP* detektiert werden. Im Rind kann in den Oozyten *H1*, *H3*, *H4*, *CREM*, *DNMT1* und *TBP* mRNA nachgewiesen werden.

In Zygoten kann *H1*, *H4* und *TBP* (Marmoset) und *PRM 1*, *H1*, *H3*, *H4*, *CREM*, *DNMT1* und *TBP* (Rind) amplifiziert werden.

2-Zell Embryonen zeigten PCR Produkte für *H1*, *H3* und *TBP* im Marmoset. Im Rind können alle Transkripte, bis auf *PRM 2* nachgewiesen werden.

In 4-Zell Embryonen sind in dieser Studie PCR Signale in *Callithrix jacchus* für *PRM 1*, *H1*, *H3*, *H4* und *TBP* vorhanden. In *Bos taurus* können alle Transkripte außer *PRM 2* detektiert werden.

RT-PCR Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.



**Abb. 26:** RT-PCR Ergebnisse auf einem 2%igen Agarose Gel für *PRM 1* bei *Bos taurus* (A) und *TBP* bei *Callithrix jacchus* (B); M, Marker (HyperLadder<sup>TM</sup>IV, Bioline, Luckenwald, Germany); Bande 1, Spermatozoen; 2, Oozyte; 3, Zygote; 4, 2-Zell Embryo; 5, 4-Zell Embro; 6: neg. Ko.

Spezies	Transkript	Spermatozoen	Oocyte	Zygote	2-cell Embryo	4-cell Embryo
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>PRM 1</b>	+	-	NA	NA	+
<i>Bos taurus</i>		+	-	+	+	+
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>PRM 2</b>	+	-	-	-	-
<i>Bos taurus</i>		-	-	-	-	-
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>H1</b>	+	+	+	+	+
<i>Bos taurus</i>		+	+	+	+	+
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>H3</b>	+	+	NA	+	+
<i>Bos taurus</i>		+	+	+	+	+
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>H4</b>	+	+	+	NA	+
<i>Bos taurus</i>		+	+	+	+	+
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>CREM</b>	+	NA	NA	NA	NA
<i>Bos taurus</i>		+	+	+	+	+
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>DNMT1</b>	+	-	-	-	-
<i>Bos taurus</i>		+	+	+	+	+
<i>Callithrix jacchus</i>	<b>TBP</b>	+	+	+	+	+
<i>Bos taurus</i>		+	+	+	+	+

**Tabelle 6:** Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von spezifischen Transkripten wurde mit RT-PCR untersucht. NA: Technischer Fehler in der PCR-Detektion. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Materials bei *Callithrix jacchus* konnte die RT-PCR nicht wiederholt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Spermatogenese: Histon-Protamin Austausch bei Mensch und *Callithrix jacchus*

Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) wurde bereits in zahlreichen Studien zur Erforschung der männlichen Keimzellentwicklung als Tiermodell eingesetzt. CLERMONT (1963), MILLAR et al. (2000), WEINBAUER et al. (2001) und WISTUBA et al. (2003) zeigten, dass die Organisation des Keimepithels des Hodens mit der des Menschen vergleichbar ist. Des Weiteren ist bekannt, dass alle bislang untersuchten Spezies Protamin-1, aber nur wenige davon auch Protamin-2 exprimieren. Der Weißbüschelaffe exprimiert, wie der Mensch, beide Protamine (SAUNDERS et al., 1996). Die genannten Gründe veranlassten uns dazu, den Weißbüschelaffen als potentiell geeignetes Modellsystem für Untersuchungen der Histon und Protamin Expression des Menschen einzusetzen.

Die Gensequenz von Protamin-2 ist beim Weißbüschelaffen bekannt (SAUNDERS et al., 1996) und zeigt eine 80 %ige Homologie zur Protamin-2 Sequenz des Menschen (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST). Trotz der großen Homologie zwischen den beiden Spezies konnte in eigenen Untersuchungen kein spezifisches Signal für Protamin-1 mit der Antisense Sonde gegen Protamin-1 des Menschen in der *in-situ* Hybridisierung an Hodenschnitten beim Weißbüschelaffen erzielt werden. Da die Gensequenz für Protamin-1 beim Weißbüschelaffen bislang nicht bekannt war, musste diese erst eruiert werden. Durch multiple Homologievergleiche von Maus, Ratte, Rind und Mensch wurden Primer generiert, um den „open reading frame“ (ORF) von Protamin-1 cDNA aus Hodengewebe vom Weißbüschelaffen zu amplifizieren. Nach erfolgreicher PCR, *in-situ* Hybridisierung und anschließender Sequenzierung gelang es uns, eine spezifische Sonde gegen Protamin-1 des Weißbüschelaffen herzustellen. Die Sequenzanalyse zeigte, dass dem Weißbüschelaffen im Vergleich zum Mensch das Codon 35, welches die Aminosäure Arginin codiert, fehlt. Anschließende Homologievergleiche der Protamin-1 cDNA Sequenz ergaben, dass die Abwesenheit der Aminosäure Arginin für den Weißbüschelaffen spezifisch ist, da das entsprechende Codon bei Mensch, Gorilla, Bulle, Ratte und Maus vorhanden ist (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Ob das Fehlen dieser Aminosäure eine funktionelle Konsequenz bei der Differenzierung von Keimzellen hat, ist bislang nicht bekannt. Interessant ist jedoch, dass der Konservierungsgrad der Protamin-1 cDNA im Bereich dieses fehlenden Codons im Marmoset Protamin-1 Gen zwischen den zuvor genannten Spezies sehr gering ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass der entsprechende Proteinabschnitt von geringer Bedeutung für die Funktion von Protamin-1 ist. Diese Mutation stellt ein evolutionäres

Ereignis dar, welches sich nach der Abspaltung der Linie der Neuwelt Primaten von der Linie der Altwelt Affen vor ca. 42 Millionen Jahren ereignet haben muss (STEIPER und YOUNG, 2006). Des Weiteren ist ersichtlich, dass das 3'-UTR Ende der Protamin-1 mRNA zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert ist. Dies mag auf eine wichtige Funktion dieses Abschnitts bei der Regulation der Translation in haploiden Spermatiden zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass die 3'-UTR Bindungsstellen für Protein Repressoren enthält, deren Bindung eine verzögerte Translation zur Folge hat. Diese Entkopplung von Transkription und Translation ist von entscheidender Bedeutung für eine ordnungsgemäße Differenzierung der runden Spermatiden in fertilen Spermatozoen (STEGER et al., 2002). Erst kürzlich identifizierte HAMMOUD et al. (2007) 14 Punktmutationen („single-nucleotide polymorphisms“, SNPs) in den UTRs von Protamin-1 und Protamin-2. Einer dieser SNPs in der 3'-UTR von Protamin-2 wurde mit einer geringen Frequenz in infertilen Patienten gefunden, fehlte aber komplett in fertilen Männern.

Es ist bekannt, dass der Histon-Protamin-Austausch beim Menschen unvollständig ist. TANPHAICHITR et al. (1978) konnten in ihren Studien erstmals beweisen, dass nur ca. 80 % der Histone gegen Protamine ausgetauscht werden. Folglich kann bei der DNA im Nukleus der menschlichen Spermatozoen zwischen einer Nukleohiston- und einer Nukleoprotamin-Fraktion unterschieden werden, bei der 20 % der DNA an Histone und 80 % der DNA an Protamine gebunden vorliegt (GATEWOOD et al., 1990). Ferner wird postuliert, dass die Anordnung des Chromatins im Spermium keinesfalls zufällig erfolgt (WYKES und KRAWETZ, 2003), sondern der Erhalt der Histone zu einer stabilen DNA-Konstellation beiträgt, die eine Art transkriptionelle Kompetenz darstellt und eine Aktivierung der für die Entwicklung des Embryos erforderlichen Regulatoren ermöglicht (CARRELL und HAMMOUD, 2010). Darüber hinaus zeigten CARRELL und HAMMOUD (2010), dass die beibehaltenen Nukleosomen an spezifischen Loci angereichert sind und für die Embryoentwicklung essentiell sind, da sie Schlüsselgene für die Transkription während der Embryogenese enthalten. Während die Funktion der verbleibenden Histone weitgehend ungeklärt bleibt, ist bekannt, dass die Resthistone acetyliert sind (GATEWOOD et al., 1990). Hyperacetylierte Histone in post-meiotischen Keimzellen konnten im Hoden bei *Megaselia scalaris* (WOLF et al., 1993), Forelle (CHRISTENSEN und DIXON, 1982; CHRISTENSEN et al., 1984), Hahn (OLIVA und MEZQUITA, 1982), Ratte (GRIMES und HENDERSON, 1984a, b; MEISTRICH et al., 1992) und Mensch (SONNACK et al., 2002) nachgewiesen werden. MEISTRICH et al. (1992) zeigten hyperacetyliertes Histon H4 in Spermatiden der Stadien 9-12 bei der Ratte. In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte

hyperacetyliertes Histon H4 in mitotisch aktiven Spermatogonien und in elongierenden Spermatiden beim Mensch gezeigt werden (SONNACK et al., 2002). In dieser Arbeit konnte spezifisch acetyliertes Histon H4 an Lysin 5, 8, 12 und 16 in Spermatogonien beim Mensch (H4K8ac, H4K16ac) und Weißbüschelaffe (H4K8ac, H4K12ac) detektiert werden. Des Weiteren konnten bei Mensch und Weißbüschelaffe immunohistochemische Reaktionen in elongierenden Spermatiden (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und K4K16ac) und in ejakulierten Spermatozoen (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und K4K16ac) nachgewiesen werden. Eine Acetylierung von Kernhistonen ist dafür verantwortlich, dass die DNA-Histon Interaktion gelockert wird. Diese Lockerung der Histon-DNA Interaktion ist eine Grundvoraussetzung für den Histon-Protamin Austausch in elongierenden Spermatiden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Histon-Protamin-Austausch bei *Callithrix jacchus* wie beim Mensch unvollständig ist.

Acetylierte Histone fördern normalerweise die Expression der mit ihnen assoziierten Gene. WADE et al. (1997), IMHOF und WOLFFE (1998), KUO und ALLIS (1998), WORKMAN und KINGSTON (1998) und JENUWEIN und ALLIS (2001) konnten in ihren Studien beweisen, dass acetylierte Histone mit der Transkription assoziiert sind. Da Spermatozoen transkriptional inaktive Zellen sind (GRUNEWALD et al., 2005), wurde postuliert, dass mRNA in reifen Spermatiden ein Überbleibsel der Transkription während der Spermatogenese darstellt. Die Übertragung von mRNA durch Spermatozoen auf die Eizelle wurde beim Menschen (OSTERMEIER et al., 2002) und bei der Maus (HAYASHI et al., 2003) demonstriert. Die Tatsache, dass Transkripte, die vermutlich bei der Fertilisation und frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielen, in der Oozyte nicht vorhanden waren, im Embryo aber exprimiert wurden, ist ein Indiz dafür, dass die Spermatozoen nicht nur als Träger des Genoms fungieren. Vermutlich existieren Spermien-spezifische Gene, d.h. die Transkripte werden von Spermien auf die Eizellen übertragen. KEMPISTY et al. (2008) konnte beispielsweise beim Schwein zeigen, dass Protamin-1 und Protamin-2 (wie auch Clustrin) Spermien-spezifisch waren. Diese von den Spermatozoen zur Verfügung gestellten Transkripte könnten für die Lebensfähigkeit und Entwicklung der Zygote von entscheidender Bedeutung sein, bevor das Genom des Embryos aktiviert wird (OSTERMEIER et al., 2004; DEPA-MARTYNÓW et al., 2007). So könnten auch die verbleibenden acetylierten Histone epigenetische Markierungen darstellen, und die Gene, die mit diesen Histonen assoziiert sind, könnten eine wichtige Rolle bei der frühen Embryonalentwicklung spielen. Andere Autoren wie GATEWOOD et al. (1990) und GARDINER-GARDEN et al. (1998) postulierten bereits, dass die verbleibenden Histone beeinflussen, welche Gene nach der Fertilisation transkribiert

werden. WYKES und KRAWETZ (2003) zeigen in ihren Studien, dass das Chromatin in den Spermatozoen nicht willkürlich an Histone und Protamine gebunden wird. Diese spezielle Anordnung liefert außerdem wichtige epigenetische Informationen und fungiert als Matrize, die den unerlässlichen Austausch der Protamine durch maternale Histone im Kern des Spermiums nach der Fertilisation auslöst und ermöglicht. Die Rolle Spermien-spezifischer Histonmodifikationen für die Chromatinorganisation in der Zygote unterstrichen auch VAN DER HEIJDEN et al. (2006, 2008) in ihren Studien.

In dieser Studie analysierten wir das Expressionsmuster von spezifisch acetyliertem Histon H4 an Lysin 5, 8, 12 und 16. Während der normalen Spermatogenese zeigte die Immunhistochemie positive Signale in Spermatogonien, in runden und elongierenden Spermatiden und in ejakulierten Spermatozoen bei Mensch und *Callithrix jacchus*. Es ist bekannt, dass eine Acetylierung der Kernhistone mit der DNA-Replikation während der S-Phase des Zellzyklus assoziiert ist (BRADBURY, 1992). Die in dieser Studie auftretenden positiven Signale in den Spermatogonien sind auf eine mitotische Aktivität dieser Zellen zurückzuführen (STEGER et al., 1998).

Aufgrund der zuvor diskutierten Ergebnisse können wir feststellen, dass sich der Weißbüschelaffe als Tiermodell für Studien zur Histon und Protamin Expression während der Spermatogenese beim Menschen eignet. Während bereits bekannt war, dass Mensch und *Callithrix jacchus* eine sehr ähnliche Organisation des Keimepithels des Hodens aufweisen, konnten wir in dieser Studie zeigen, dass Mensch und Marmoset ein identisches Expressionsmuster von Protamin-1 und Protamin-2 mRNA in runden und elongierenden Spermatiden besitzen. Des Weiteren zeigt diese Studie, dass der Histon-Protamin Austausch in elongierenden Spermatiden beim Weißbüschelaffen unvollständig ist, da spezifisch acetyliertes Histon H4 in testikulären und ejakulierten Spermatozoen detektiert werden konnte. Dies ist beim Menschen bereits bekannt (TANPHAICHITR et al., 1978) und konnte nun auch für *Callithrix jacchus* nachgewiesen werden.

Acetylierte Histone in Spermatozoen werden in Zusammenhang mit Genen gebracht, die bei der Aktivierung und Regulation der Transkription während der frühen Genexpression in der Zygote beziehungsweise im Embryo involviert sind. Promotor Microarray Analysen (Nimble Gene) an Spermatozoen fertiler Spender untermauern die Hypothese, dass Histon-assoziierte Gene eine Rolle bei der frühen Embryonalentwicklung spielen könnten. So sind rund ein Fünftel der identifizierten Gene in die DNA-abhängige Transkription involviert (ARPANAHI et al., 2009). Diese Ergebnisse unterstützen Studien von VAN DER HEIJDEN et al. (2006, 2008), die belegen, dass Nukleosomen der Spermien in der Zygote fortbestehen und

epigenetische Informationen paternalen Ursprungs, die unverzichtbar für die Entwicklung des Embryos sind, auf die Oozyte übertragen. GATEWOOD et al. (1987) und GARDINER-GARDEN et al. (1998) identifizierten im Spermatozoon die histonassoziierten Gene Hemoglobin gamma 1 und 2 (*HBE1*, *HBE1/2*), die zur Familie des beta-Globin Clusters gehören und im Embryo exprimiert werden. Auch OSTERMEIER et al. (2004) identifizierten 6 Transkripte paternalen Ursprungs, die mit der Entwicklung der Zygote und des frühen Embryos in Zusammenhang gebracht werden.

## 5.2. Expression verschiedener Transkripte während der frühen Embryonalentwicklung

Da Untersuchungen an menschlichen Eizellen und Embryonen aus ethischen Gründen nicht vertretbar sind und Zellkulturen von Keimzellen bislang nicht zur Verfügung stehen, ist ein Tiermodell nötig. Die üblichen Nager, wie Maus und Ratte, sind für weiterführende Untersuchungen nicht geeignet, da sich die Zusammensetzung des Kernchromatins deutlich von der des Menschen unterscheidet. Außerdem sind wesentliche Diskrepanzen in Bezug auf den Zeitpunkt der Aktivierung des Genoms der Zygote zu berücksichtigen. Während bei der Maus das Genom der Zygote im späten 1-Zell bis frühen 2-Zell Stadium aktiviert wird, findet diese Aktivierung beim Menschen erst wesentlich später, nämlich im 4- bis 8-Zell Stadium statt (BRAUDE et al., 1988). LALANCETTE et al. (2008) betonten die Notwendigkeit weiterer Studien mit anderen Spezies wie zum Beispiel dem Rind (NOTHIAS et al., 1995) oder anderen nicht-menschlichen Primaten, die dem Menschen hinsichtlich dem Zeitpunkt der Aktivierung des Genoms der Zygote ähnlicher sind.

Aufgrund der Tatsache, dass sich *Callithrix* als geeignetes Tiermodell für die Histon und Protamin Expression während der Spermatogenese des Menschen bewährt hat, setzten wir den Weißbüschelaffen als Tiermodell für Untersuchungen der Genexpression während der frühen Embryonalentwicklung ein. Diese weiterführenden Untersuchungen hatten zum Ziel, spermien-spezifische Gene, die in die Oozyte während der Befruchtung übertragen werden, nachzuweisen. Die Fertilisierung wurde lange Zeit als die simple Verschmelzung der maternalen und paternalen Gameten angesehen. 1984 berichten Mc GARTH und SOLTER, dass das männliche und weibliche Genom nicht äquivalent sind und jedes der beiden Gameten, zusätzlich zu ihrem haploiden Genom, geschlechtsspezifische epigenetische Informationen in Form von RNA liefert, die essentiell für die frühe Embryonalentwicklung sind. Hierzu führten wir RT-PCRs für die acht ausgewählten Transkripte *PRM 1*, *PRM 2*, *H1*, *H3*, *H4*, *CREM*, *DNMT1* und *TBP* in Ejakulat, Eizellen, Zygoten (Zwei-Polar Body Stadium), 2-Zell und 4-Zell Embryonen des Weißbüschelaffen durch. Aufgrund der Tatsache, dass für

unsere Untersuchungen nur eine sehr geringe Menge an Proben vom Weißbüschelaffen zur Verfügung stand, wurden Eizellen, Embryonen und Ejakulat vom Rind, aus dem Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilian Universität München, ergänzend hinzugezogen.

Im Marmoset konnten *PRM 2* Transkripte nur in Spermatozoen detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen an Mäusen (BORGHOL et al., 2008) überein. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Protamin Expression in der Zygote und frühen Stadien von Embryonen ist die Tatsache, dass die Protamine in dieser Spezies möglicherweise direkt nach der Befruchtung gegen Histone ausgetauscht werden (MORGAN et al., 2005). Im Gegensatz zu *PRM 2*, wurden *PRM 1* Transkripte sowohl in Spermatozoen, als auch in 4-Zell Embryonen nachgewiesen. In *Bos taurus* waren positive Signale für *PRM 1* Transkripte in Spermatozoen, Zygote, 2-Zell und 4-Zell Embryonen vorhanden, nicht aber in der Oozyte. Diese Resultate stimmen mit neueren Studien von KEMPISTY et al. (2008) am Schwein überein, die zeigten, dass *PRM 1* und *PRM 2* in Spermatozoen, Zygoten und 2-Zell Embryonen exprimiert wird. Dies bekräftigt die Hypothese von OSTERMEIER et al. (2004), dass Protamintranskripte beim Menschen väterlichen Ursprungs sind und während der Befruchtung auf die Oozyte übertragen werden. Die Tatsache, dass die Protamin Expression bereits ab dem Stadium der Zygote unterdrückt wird, wie es der Fall für *PRM 2* in *Callithrix jacchus* war, stimmt mit Daten (Mäuse) von ZIYYAT und LEFÈVRE (2001) überein. Wie erwartet, fanden wir keine *PRM 2* Transkripte in *Bos taurus*, da der Bulle kein *PRM 2* exprimiert (JOHNSON et al., 1988; CORZETT et al., 2002).

Das maternale Genom ist ausschließlich mit Histonen gepackt, im Gegensatz zum paternalen Genom der Spermien, das zu 85% von Protaminen und 15% von Histonen verpackt ist. Unmittelbar nach der Befruchtung werden die Protamine durch Histone ausgetauscht. In unserer Studie detektierten wir *H1*, *H3* und *H4* Transkripte in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Embryonen von *Callithrix jacchus* und *Bos taurus*. Unsere *H1* betreffenden Ergebnisse stimmen mit denen von KEMPISTY et al. (2008) im Schwein überein.

Das *CREM* Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der an cAMP responsive element (CRE) bindet und in zahlreichen viralen und zellulären Promotoren vorhanden ist. CREM stellt eine wichtige Komponente des cAMP-mediated signaling pathway dar, welcher für den Ablauf der normalen Spermatogenese (BLENDY et al., 1996; BEHR und WEINBAUER 2001) und der frühen Embryonalentwicklung (LI et al., 1995; EPSTEIN et al., 1996; KIM und HAN 1999) von entscheidender Bedeutung ist. In unserer Studie waren *CREM* Transkripte beim

Marmoset nur in Spermatozoen zu detektieren, während beim Rind Transkripte in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Stadien vorhanden waren. Unsere Ergebnisse beim Rind stimmen mit Ergebnissen von KEMPISTY et al. (2008) überein, der in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten und 2-Zell Stadien vom Schwein ebenfalls *CREM* Transkripte nachweisen konnte.

Während der Spermatogenese und frühen Embryonalentwicklung wird das DNA-Methylierungsprofil des Genoms weitestgehend neu programmiert, wobei DNA (cytosine-5)-Methyltransferase 1 (*DNMT1*) eine entscheidende Rolle spielt (REIK, 2007; HIRASAWA et al., 2008). *DNMT1* ist für die Etablierung und Regulation der gewebespezifischen Methylierung von Zytosin-Resten verantwortlich. Abweichungen in dem Methylierungsmuster scheinen eng mit einer möglichen Tumorentstehung und Abweichungen von der normalen Entwicklung in Zusammenhang zu stehen (SHI und HAAF, 2002). In unseren Untersuchungen wurden *DNMT1* Transkripte nur in den Spermatozoen von *Callithrix jacchus* detektiert. Die Expression von *DNMT1* Transkripten in Spermatozoen bekräftigt bereits existierendes Wissen, dass die Genexpression von *DNMT1* während der Spermatogenese hoch reguliert wird (IKAWA et al., 1997; OMISANJO et al., 2007). Unsere Ergebnisse im Weißbüschelaffen stimmen mit Untersuchungen von HOWELL et al. (2001) an Mäusen und KEMPISTY et al. (2008) an Schweinen überein. Im Gegensatz dazu zeigten VASSENA et al. (2005), dass *DNMT1* mRNA in Oozyten, Zygoten und in weiteren Stadien früher Embryonen, die sich noch vor der Implantation befinden, im Rhesusaffen und der Maus vorhanden sind. Desweiteren stellten sie fest, dass die Expression von *DNMT1* nach der Oozytenreifung konstant abnimmt und bis zum 8-Zell Stadium deutlich vermindert ist. Im Rind konnten wir in dieser Studie *DNMT1* Transkripte in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten, 2-Zell Stadien und 4-Zell Stadien nachweisen. GOLDING und WESTHUSIN (2003) analysierten ebenfalls die *DNMT1* Gentranskription in verschiedenen Stadien von *in-vitro* fertilisierten Rinderembryonen (2-Zell Stadium bis Blastozystenstadium) und zeigten, dass *DNMT1* in allen Stadien exprimiert wurde.

TATA Box bindendes Protein (*TBP*) ist Teil der Transkriptionsmaschinerie und ist deshalb essentiell für die Aktivierung von Genen, die von der RNA Polymerase II transkribiert werden (WEIS und REINBERG, 1992). In *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* waren *TBP* Transkripte in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Embryonen nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von KEMPISTY et al. (2008) an Schweinen überein.

Zusammenfassend können wir mit unseren an *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* gewonnenen Daten Ergebnisse früherer Studien von OSTERMEIER et al. (2004, 2005) am Mensch und KEMPISTY et al. (2008) an Schweinen bestätigen. Unsere Ergebnisse bekräftigen Studien, die die Existenz spermien-spezifischer Transkripte und deren Funktion für die frühe Embryonalentwicklung und das „Gene Imprinting“ im Embryo postulieren (OSTERMEIER et al., 2002; YAO et al., 2003; GRUNEWALD et al., 2005; MILLER et al., 2005). In dieser Studie ist von den acht untersuchten Genen *PRMI* von besonderem Interesse, da es sowohl in *Callithrix jacchus*, als auch in *Bos taurus* in Spermatozoen vorhanden ist, in der Eizelle fehlt, später aber in der Zygote und im Embryo wieder exprimiert wurde. Dies untermauert die Hypothese, dass *PRMI* ein Transkript paternalen Herkunfts ist, das vom Spermium bei der Befruchtung auf die Oozyte übertragen wird.

Während inzwischen gezeigt werden konnte, dass mRNA in Spermatozoen bei der Fertilisation in die Oozyte übertragen wird, ist die funktionelle Bedeutung der paternalen mRNA weiterhin umstritten. HAYASHI et al. (2003) untersuchten die Präsenz verschiedener paternalen RNAs bis zum 4-Zell Embryo (Maus), die durch „round spermatid injection“ (ROSI) und Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) entstanden sind und stellten fest, dass die paternalen Transkripte zwar auf den Embryo übertragen werden, diese aber in der frühen Embryonalentwicklung bis zum 4-Zell Stadium fast vollständig verschwinden. Das Verschwinden bestimmter paternalen Transkripte wie Protamin-1 und -2, deren Funktion die Kompaktierung des Chromatins ist, die einerseits unerlässlich für die Befruchtung aber andererseits hinderlich für die weitere Embryonalentwicklung ist, wird erwartet und ist auch sicherlich erforderlich. Ein spermiumspezifisches Transkript mit nachgewiesener funktioneller Bedeutung bei der frühen Embryonalentwicklung ist PLC-zeta, eine spermiumspezifische Form der Phospholipase C (PLC) (SONE et al., 2005; SWANN et al., 2006). Dieses paternale Transkript initiiert die Entwicklung der Oozyte nach der Verschmelzung der beiden Gameten-Membranen und ist somit für die frühe Embryonalentwicklung unentbehrlich.

### **5.3. Eignung der von uns eingesetzten Tiermodelle für Studien der Spermatogenese und frühen Embryonalentwicklung**

Abschließend ist festzustellen, dass sich der Weißbüschelaffe als Tiermodell für Studien zur Histon und Protamin Expression während der Spermatogenese eignet.

Für Untersuchungen der frühen Embryonalentwicklung muss bedacht werden, dass es deutliche Unterschiede in Bezug auf Zeit und Ausmaß der epigenetischen Reprogrammierung

und Gen-Expression in der Zygote bzw. während der frühen Embryonalentwicklung zwischen den beiden untersuchten Spezies *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* gibt. Diese Tatsache ist vor allem zu berücksichtigen, wenn man Ergebnisse bezüglich der frühen Genexpression von einem Tiermodell auf den Menschen übertragen möchte. Zudem wird in dieser Studie deutlich, dass es Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies in Bezug auf Eignung und Verfügbarkeit des Materials (Embryonen) gibt, und dass dies bei der Auswahl eines Tiermodells für Untersuchungen der frühen Embryonalentwicklung in Betracht gezogen werden muss.

Während sich der Weißbüschelaffe als ein sehr gutes Tiermodell für Untersuchungen der Spermatogenese (Histon-Protamin Austausch) des Menschen erwies, ist dieser als Tiermodell im Gegensatz zum Rind, für Untersuchungen der frühen Embryonalentwicklung aufgrund der begrenzten Materialverfügbarkeit nur bedingt geeignet.

## 6. Zusammenfassung

Der Histon-Protamin-Austausch ist nicht nur für die männliche Fertilität und die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen von entscheidender Bedeutung, sondern er scheint auch einen Einfluss auf die Qualität und die Entwicklung von Embryonen zu haben. Der Histon-Protamin-Austausch wird durch eine Histonacetylierung eingeleitet und erfolgt beim Menschen nur zu etwa 85%. Man nimmt an, dass die acetylierten Resthistone in Spermatozoen als epigenetische Signale eine wichtige Rolle für die frühe Embryonalentwicklung spielen. Zahlreiche Untersuchungen zum Histon-Protamin-Austausch während der Spermatogenese beim Mensch existieren bereits und liefern wertvolle Informationen in Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen. Da menschliche Embryonen aus ethischen Gründen nicht für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung stehen, sind weiterführende Untersuchungen, die die frühe Embryonalentwicklung betreffen, am Mensch nicht möglich. Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Arbeit auf der Etablierung eines Tiermodells für die Spermatogenese und die frühe Embryonalentwicklung des Menschen. Im ersten Teil dieser Studie sollte geklärt werden, ob sich der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) als Tiermodell für die Spermatogenese des Menschen eignet. Hierzu führten wir *in-situ* Hybridisierungen gegen Protamine und immunhistochemische Untersuchungen gegen spezifisch an Lysin5 (H4K5ac) Lysin 8 (H4K8ac), Lysin 12 (H4I2ac) und Lysin 16 (H4K16ac) acetyliertem Histon H4 an Biopsiematerial des Hodens von Mensch und *Callithrix jacchus* durch und analysierten anschließend das Expressionsmuster. Da die Protamin-1 Sequenz bei *Callithrix jacchus* noch nicht bekannt war, stellten wir zuerst eine Sonde her. Protamine-1 (PRM-1) und Protamin-2 (PRM-2) waren in runden und elongierenden Spermatiden detektierbar. Alle Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 zeigten in runden und elongierenden Spermatiden positive Signale. H4K8ac und H4K16ac zeigten zusätzlich in Spermatogonien des Menschen positive Signale, während beim Marmoset H4K8ac und H4K12ac in diesen Zellen detektierbar waren. Der Antikörper gegen H4K16ac zeigte beim Menschen bereits in den pachytänen Spermatozyten beginnend in Stadium III der Spermatogenese eine positive immunhistochemische Reaktion. Zusätzlich zu Hodenbiopsien führten wir immunhistochemische Untersuchungen an Ausstrichen von ejakulierten Spermatozoen von Mensch und *Callithrix jacchus* durch. Alle Antikörper zeigten eine positive Reaktion, jedoch variierte der prozentuale Anteil an positiven Spermatozoen deutlich zwischen den vier eingesetzten Antikörpern. Western Blot Analysen von homogenisiertem Ejakulat des Menschen und *Callithrix jacchus* mit den vier Antikörpern konnten in beiden Spezies spezifische Banden feststellen. Die Präsenz von spezifisch an Lysin

5, 8, 12 und 16 acetyliertem Histon H4 in Spermatozoen beider Spezies zeigt, dass der Histon-Protamin-Austausch nicht vollständig ist. Dies war beim Menschen bereits bekannt und konnte in dieser Untersuchung auch für den Weißbüschelaffen gezeigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass der Mensch und der Weißbüschelaffe eine ähnliche Organisation des Keimepithels aufweisen, der Histon-Protamin-Austausch bei Beiden nicht vollständig ist, beide Spezies *PRM-1* und *PRM-2* exprimieren, und eine gleiche Expression von *PRM-1* und *PRM-2* mRNA in runden und elongierenden Spermatiden zeigen, eignet sich der Weißbüschelaffe als Tiermodell für den Histon-Protamin-Austausch im Menschen. Da acetylierte Histone in Spermatozoen im Verdacht stehen mit Genen assoziiert zu sein, die den Start der Transkription und die frühe Genexpression in der Zygote bedingen, also vom Spermatozoon auf die Eizelle bei der Befruchtung übertragen werden, eignet sich der Weißbüschelaffe unter Umständen auch als Tiermodell für die frühe Embryonalentwicklung des Menschen.

In einem zweiten Teil dieser Studie wurde das Expressionsmuster von acht Genen in Spermatozoen, Oozyten, Zygoten, 2-Zell und 4-Zell Embryonen von *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* mittels RT-PCR analysiert: Protamine-1 (*PRM-1*), Protamine-2 (*PRM-2*), Histon H1 (*H1*), Histon H3 (*H3*), Histon H4 (*H4*), cAMP-responsive element modulator (*CREM*), DNA Methyltransferase 1 (*DNMT1*) und TATA box-binding Protein (*TBP*). Unser Ziel war es spermien-spezifische Transkripte zu identifizieren, die vom Spermium auf die Oozyte während der Fertilisierung übertragen werden. Es ist bekannt, dass diese Gene eine wichtige Rolle während der Spermio-genese und frühen Embryonalentwicklung spielen. In *Callithrix jacchus* und *Bos taurus* zeigten unsere Ergebnisse, dass *PRM 1* Transkripte von Spermatozoen auf die Oozyte übertragen werden. Mit unseren Ergebnissen bekräftigen wir die Hypothesen anderer Studien, dass das Spermium mehr als nur Überbringer des männlichen Genoms ist, sondern auch spermien-spezifische Transkripte während der Fertilisierung auf die Oozyte überträgt, die für die frühe Embryonalentwicklung essentiell sind.

## 7. Summary

Histone to protamine exchange is not only essential for male fertility and fertilizing capacity of the spermatozoon, but is also thought to be of great importance for the quality and development of the embryo. Histone acetylation is a prerequisite for correct histone to protamine exchange, which in man is only 85% complete. Spermatozoa are transcriptionally inactive cells, but contain histones normally a characteristic of transcriptionally active cells. It is postulated that these remaining histones in spermatozoa, which are known to be highly acetylated, represent epigenetic marks that are transmitted to the oocyte and may be involved in starting gene expression in the zygote and in regulating gene expression during early embryogenesis. Many studies on histone to protamine exchange during spermiogenesis in man exist and deliver valuable information concerning fertilizing competency of spermatozoa. While mRNAs in the oocyte are known to play an important role in both the zygote and early embryo, to date, our information on the role of mRNAs in spermatozoa is only scarce. An animal model is needed to be able to further investigate in this matter. For this reason, the first main issue of this study was to establish an animal model for investigations on human spermatogenesis and later on early embryo development which, in man, are not possible due to ethical reasons.

In the first part of this study, we wanted to elucidate, if the marmoset (*Callithrix jacchus*) may represent a suitable animal model for human spermatogenesis. For this purpose, we used *in-situ* hybridization and immunohistochemistry to analyze expression of protamine 1 (*PRM-1*) and protamine 2 (*PRM-2*), and histone H4 specifically acetylated at lysine 5 (H4K5ac), 8 (H4K8ac), 12 (H4K12ac) and 16 (H4K16ac) in human and marmoset testes and ejaculates. As the DNA sequence of protamine 1 from *Callithrix jacchus* was not known, we first amplified marmoset protamine 1 from marmoset testes cDNA. *PRM-1* and *PRM-2* mRNA was present in round and elongating spermatids. All antibodies against acetylated histones revealed positive signals in these cells. Human spermatogonia showed positive signals for H4K8ac and H4K16ac, whereas marmoset-spermatogonia were positive for H4K8ac and H4K12ac. In man, H4K16ac displayed a positive immunoreaction already with pachytene spermatocytes starting at stage III of the seminiferous epithelial cycle. All antibodies showed positive immunostaining in ejaculated spermatozoa showing great variability between the four antibodies and between the two species. Western blot analyses of protein extracts from ejaculated spermatozoa of human and *Callithrix jacchus* using the four antibodies was also performed and we observed specific bands for all four antibodies in both species. The presence of histone H4 specifically acetylated at lysine 5, 8, 12 and 16 in spermatozoa of both

species shows that histone to protamine exchange is incomplete. This was already known for man, but has now been demonstrated to be also true for the marmoset. This, and the fact that human and marmoset exhibit a similar organization of the seminiferous epithelium, an identical expression pattern of *PRM-1* and *PRM-2* mRNA in round and elongating spermatids and similar expression of specifically acetylated histone H4, we come to the conclusion that the common marmoset represents a suitable animal model for studies on histone and protamine expression during human spermatogenesis. As acetylgroups are thought to represent epigenetic marks that are transmitted to the oocyte by the spermatozoon during fertilization and the fact that acetylated histones are present in spermatozoa of the common marmoset, this might also make him a suitable animal model for comparative studies on the role of spermatozoa derived mRNAs for embryonic development and early gene expression in man.

In the second part of this investigation, we performed RT-PCR in *Callithrix jacchus* and *Bos taurus* spermatozoa, oocytes, zygotes, 2-cell and 4-cell embryos to evaluate the presence of specific transcripts known to play an important role during fertilization and early embryo development, namely protamine 1 (*PRM-1*), protamine 2 (*PRM-2*), histone H1 (*H1*), histone H3 (*H3*), histone H4 (*H4*), cAMP-responsive element modulator (*CREM*), DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) and TATA box-binding protein (*TBP*). The goal of this part of the study was to identify sperm-specific transcripts. Our data suggest that, in both *Callithrix jacchus* and *Bos taurus*, *PRM-1* transcripts are delivered from the spermatozoon to the oocyte. With results from this study, we affirm the hypothesis of other studies, that sperm contribute more than just their genome to the oocyte upon fertilization and that sperm-specific transcripts exist and are essential for fertilization and early development and gene expression of the embryo.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abbott DH, Hearn. Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil 1978; 53: 155-166
- Abbott DH, Hodges JK, George LM. Social status controls LH secretion and ovulation in female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). J. Endocrinol 1988; 117: 329-339
- Albig W, Bramlage B, Gruber K, Klobeck HG, Kunz J, Doenecke D. The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B). Genomics 1995; 264-272
- Ammer H, Henschen A. The major protamine from stallion sperm: Isolation and amino acid sequence. Biol Chem Hoppe-Seyler 1987; 368: 1619-1626
- Aoki F, Worrad DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. Dev Biol 1997; 181: 296-307.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. J Androl 2005 ; 26: 741-748
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz S, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. Genome Res 2009; 19: 1338-1349
- Aumüller G. Skrotum, Hodenhüllen und Samenstrang. In: Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. 3. Auflage. Krause W, Weidner W (Hrsg.) Enke, Stuttgart, 1998, S. 25-26.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas JA, Stanker LH, Wyrobek A. High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2 and 3. Biotechnol Appl Biochem 1987; 9: 82-88
- Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. Experientia 1988; 44: 52-55
- Bartlett JMS, Stirling D. In PCR Protocols. Human Press 2003; 226: 3-21
- Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Reprod Fertil Suppl 1973; 18: 199-213
- Behr R, Weinbauer GF. Germ cell-specific cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element modulator expression in the rodent and primate testis is maintained despite gonadotropin deficiency. Endocrinology 1999; 140: 2746-2754
- Behr R, Weinbauer GF. CAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? Int J Androl 2001; 24:126-135

- Behre HM, Nieschlag E. 2.7 Endokrine Regulation der Hodenfunktion und endokrinologische Labordiagnostik. In: *Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. 3. Auflage. Krause W, Weidner W. (Hrsg.) Enke, Stuttgart, 1998, S. 101-107.
- Belaiche D, Loir M, Kruggle W, Sautiere P. Isolation and characterization of two protamines St 1 and St 2 from stallion spermatozoa, and amino acid sequence of the major protamine St 1. *Biochem Biophys Acta* 1987; 913: 145-149
- Bellve AR, Carraway R. Characterization of two basic chromosomal proteins isolated from mouse spermatozoa. *J Cell Biol* 1978; 79: 177
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 53-57
- Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* 1996; 23: 263-271
- Bergmann M. 1.2. Spermatogenese. In: *Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. 3. Auflage. Krause W, Weidner W. (Hrsg.) Enke, Stuttgart, 1998, S. 9-14
- Bergmann M., Kliesch S. 1.2. Spermatogenese. In: *Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. 3. Auflage, Krause W. Weidner W. (Hrsg.). Enke, Stuttgart, 1998, S. 9-14
- Berndston WE, Desjardins C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 1974; 140: 167-179
- Blanchard Y, Lescoat D, LeLannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia* 1990; 22: 549-555
- Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 1996; 380: 162-165
- Borghol N, Blachère T, Lefèvre A. Transcriptional and epigenetic status of protamine 1 and 2 genes following round spermatids injection in the mouse oocytes. *Genomics* 2008; 91: 415-422
- Bostedt H. 2.4.2.2. Wirkungen der von den Eierstöcken und von der Gebärmutter gebildeten Hormone. In : *Fruchtbarkeitsmanagement beim Rind*. 4. Auflage. Bostedt H. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, 2003, S. 44-54
- Bradbury, E.M. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 1992; 14: 9-16

- Bramlage B, Kosciessa U, Doenecke D. Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* 1997; 62: 13-20
- Brand HM. Influence of season on birth distribution in marmosets and tamarins. *Lab Anim* 1980; 14: 301-302
- Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-461
- Brown DT. Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol* 2001; 2 (7): reviews 0006.1-0006.6
- Budras KD, Wünsche A. 8.8. Männliche Geschlechtsorgane. In: Atlas der Anatomie des Rindes. Lehrbuch für Tierärzte und Studierende. 1. Auflage. Budras KD (Hrsg), Wünsche A. Schlütersche GmbH & Co. KG, Hannover 2002, S. 92-94
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; 305: 609-613
- Carré-Eusèbe D, Lederer F, Lê KH, Elsevier SM. Processing of the precursor of protamine P2 in mouse. Peptide mapping and N-terminal sequence analysis of intermediates. *Biochem J* 1991; 1: 39-45.
- Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermatogenesis. *J Androl* 2001; 22: 604-610
- Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2010; 16 (1): 37-47
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollon L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; 296: 922-927
- Chevallier PH, Mauro N, Feneux D, Jouannet P, David G. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *Lancet* 1987; 8562: 806-807
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28: 82-86
- Choi YC, Gu W, Hecht NB; Feinberg AP, Chae CB. Molecular cloning of mouse somatic and testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 495-504

- Christensen ME, Dixon GH. Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. *Dev Biol* 1982; 93: 440-415
- Christensen ME, Rattner JB, Dixon GH. Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to the histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucl Acid Res* 1984; 12: 4575-4592
- Clark JM. The common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Anzccart News* 1994; 7:1-8
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112: 35-51
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52: 198-236
- Corzett M, Kramer C, Blacher R, Mazrimas J, Balhorn R.. Analysis of hamster protamines: primary sequence and species distribution. *Mol Reprod Dev* 1999; 54: 273-282
- Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R. Protamin 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 519-527
- Cui KH, Flaherty SP, Newble CD, Guerin MV, Napier AJ, Matthews CD. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Androl* 1991; 12: 214-220
- Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995; 26: 323-345
- Davie JR. Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 173-178
- Davie JR, Spencer VA. Control of histone modifications. *J Cell Biochem*, 1999; Suppl 32-33: 141-148
- Del Castillo EB, Trabuco A, de la Balze FA. Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J Clin Endocr* 1947; 7: 493-502
- De Jong J. Basic mechanisms for the control of germ cell gene expression. *Gene* 2006; 366: 39-50
- De Loos F, Van Maurik P, Van Beneden T, Kruip TA. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 208-214
- Depa-Martynów M, Kempisty B, Lianeri M, Jagodziński PP, Jedrzejczak P. Association between fertilin  $\beta$ , protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 79-85

- De Yerba L, Oliva R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 1993; 209: 201-203
- De Yerba L, Balleca JL, Vanrell J, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998; 69: 755-759
- Drabent B, Kardalidou E, Bode C, Doenecke D. Association of histone H4 genes with the mammalian testis-specific H1t histone gene. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 591-597
- Drabent B, Bode C, Bramlage B, Doenecke D. Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 1996; 106: 247-251
- Elsevier SM, Noiran J, Carre-Eusebe D. Processing of the precursor of protamine P2 in mouse. Identification of intermediates by their insolubility in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Eur J Biochem* 1991; 196: 167-175
- Epstein DJ, Marti E, Scott MP, McMahon AP. Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development* 1996; 122: 2885-2894
- Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 1-15
- Fair T, Hyttel P, Lonergan P, Boland MP. Immunolocalization of nuclear proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. *Biol Reprod* 2001; 64: 1516-1525
- Fletcher TM, Hansen JC. The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996; 6: 149-188
- Fulka J Jr, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 41-49
- Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PPL. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* 1998; 6: 3350-3356
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236: 962-964
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histone. *J Biol Chem* 1990; 265: 20665-20666

- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem* 1990; 265: 20662-20666
- Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod* 1995; 52: 1234-1243
- Gille U. 5.4. Männliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia masculina. In: *Anatomie für die Tiermedizin*. Salomon F-V, Geyer H, Gille U (Hrsg.). Enke-Verlag, Stuttgart, 2005, S. 389-394
- Golding MC, Westhusin ME. Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferases mRNA sequences and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr Pattern* 2003; 3: 551-558
- Gregory PD, Wagner J, Horz W. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* 2001; 265: 195-202
- Grimes SR, Henderson N. Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp Cell Res* 1984a; 152: 91-97
- Grimes SR, Henderson N. Acetylation of rat testis histones H2B and TH2B. *Dev Biol* 1984b; 101: 516-521
- Grimes SR, Weisz-Carrington P, Daum H 3rd, Smith J, Green L, Wright K, Stein G, Stein J. A rat histone H4 gene closely associated with the testis-specific H1t gene. *Exp Cell Res* 1987; 173: 534-545
- Grimes SR, Wolfe SA, Anderson JV, Stein GS, Stein JL. Structural and functional analysis of the rat testis-specific histone H1t gene. *J Cell Biochem* 1990; 44: 1-17
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Andereg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 2005; 37: 69-71
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352
- Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 2004; 6: 117-131
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K. Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. *Hum Reprod* 1999; 14: 363-367

- Hammoud S, Emery BR, Aoki VW, Carrell DT. Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. *Arch Androl* 2007; 53: 267-274
- Hayashi S, Yang J, Christenson L, Yanagimachi R, Hecht NB. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003; 69: 1170-1176
- Hearn JP, Gidley-Baird AA, Hodges JK, Summers PM, Webley GE. Embryonic signals during the peri-implantation period in primates. *J Reprod Fertil Suppl* 1988; 36: 49-58
- Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki H. Maternal and zygotic *Dnmt1* are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes & Dev* 2008; 22: 1607-1616
- Hocheau MT. DNA Synthesis during proliferation and regeneration of spermatogonia in the bull. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 1967; 56: 85-96
- Hocheau-de Reviere MT, Monet-Kuntz C, Courot M. Spermatogenesis and sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil Suppl* 1987; 34: 101-114
- Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C. *Illustrated Pathology of human spermatogenesis.* Grosse Verlag Berlin 1988
- Holt WV, Moore HD. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Anat* 1984; 138: 175-188
- Hoodbhoy T, Talbot P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 439-448
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chailier JR. Genomic imprinting disrupted by maternal effect and mutation in the DNMT1 gene. *Cell* 2001; 104: 829-838
- Iguchi N, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl* 2003; 26: 354-365
- Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M. The putative chaperone calmegein is required for sperm fertility. *Nature* 1997; 387: 607-611
- Imhof A, Wolffe AP. Transcription: gene control by targeted histone acetylation. *Curr Biol* 1998; 8: R422-R424
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-1080

- Johnson PA, Yelick PC, Liem H, Hecht NB. Differential distribution of the P1 and P2 protamine gene sequences in eutherian and marsupial mammals and a monotreme. *Gamete Res* 1988; 19: 169-175
- Junqueira LC, Carneiro J. 23.1.2. Follikulogenese. In: *Histologie*. 4. Auflage. Junqueira LC, Carneiro J. Springer-Verlag, Berlin, 1996, S. 581-587
- Kanitz W. Biologische Grundlagen der Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. *Züchtungskunde* 1994; 66: 413-427
- Kanka J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* 2003; 59: 3-19
- Kelce WR, Wilson EM. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J Mol Med* 1997; 75: 198-207
- Kempisty B, Antosik P, Bukowska D, Jackowska M, Lianeri M, Jaśkowski JM, Jagodziński PP. Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod Fert Dev* 2008; 20: 513-518
- Kennedy BP, Davies PL. Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* 1980; 255: 2533-2539
- Kennedy BP, Davies PL. Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* 1981; 256: 9254-9259
- Khochbin S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 2001; 271: 1-12
- Kholkute SD. Diurnal and annual variations in plasma androgen levels in the adult male marmoset (*Callithrix jacchus*). *Int J Androl* 1984; 7: 431-438
- Kholkute SD, Jayaraman S, Kumar RA, Puri CP. Continuous light environment has no effect on the circadian testosterone rhythm, spermatogenesis or fertility of the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Int J Androl* 1987; 10: 635-642
- Kim M-J, Han J-K. The involvement of cAMP signaling pathway in axis specification in *Xenopus* embryos. *Mechanisms of Development* 1999; 89: 55-64
- Kimmins S, Sassoni-Corsi P. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005; 434: 583-589
- Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999; 98: 285-294

- Kuederling I, Schneiders A, Sonksen J, Nayudu PL, Hodges JK. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. *Am J Primatol* 2000; 52: 149-154
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 1998; 20: 615-626
- Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal Contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1570-1579
- Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* 1991; 112: 921-932
- Latham KE, Schultz RM. Embryonic genome activation. *Front Biosci* 2001; 6: D748-59
- Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrest in spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Akad Sci USA* 1995; 92: 12451-12455
- Lescoat D, Collet D, Boujard D, LeLannou D. Electrophoretic characteristic of nuclear proteins from human spermatozoa. *Arch Androl* 1987; 20: 35-40
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 2003; 81: 131-140
- Li W, Ohlmeyer JT, Lane ME, Kalderon D. Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and *Drosophila* imaginal disc development. *Cell* 1995; 80: 553-562
- Lin Q, Sirotkin A, Skoultchi AI. Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2122- 2128
- Loidl P and Grobner P. Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8351-8366
- Luetjens CM, Weinbauer GF, Wistuba J. Primate spermatogenesis: new insights into cooperative testicular organisation, spermatogenic efficiency and endocrine control. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 2005; 80: 475-488
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389: 251-260
- Marks PA, Rifkin RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev* 2001; 1: 194-202
- Maura AA, Erickson BH. Testicular development, histology, and hormone profiles in three yearling angus bulls with spermatogenic arrest. *Theriogenology* 2001; 55: 1469-1488

- Mayer W, Smith A, Fundele R, Haaf T: Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol* 2000; 148: 629–634
- Mc Grath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; 37: 179-183
- Meistrich ML, Brook WA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS. Nuclear protein transition during spermatogenesis. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 1977; 37: 2522-2525
- Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA. Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol* 1985; 112: 230-340
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 170-181
- Meinecke B. 23.3. Reproduktion beim Säugetier. In: *Physiologie der Haustiere*. Von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.). Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 2000; S. 514-555
- Millar MR, Sharpe RM, Weinbauer GF, Fraser HM, Saunders PT. Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. *Int J Androl* 2000; 23: 266-277
- Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005; 11:156-163
- Mitchell V, Steger K, Marchetti C, Herbaut JC, Devos P, Rigot JM. Cellular expression of protamine 1 and 2 transcripts in testicular spermatids from azoospermic men submitted to TESE-ICSI. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 373-379
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987; 99: 371-382
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 40: 197-210
- Moore HD, Gems S, Hearn JP. Early implantation stages in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Am J Anat* 1985; 172: 265-278
- Moore KL. Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 2. Auflage. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1985.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean DI, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R47-58

- Müller T, Simoni M, Pekel E, Luetjens C, Chandolia R, Amato F, Norman RJ, Gromoll J. Chorionic gonadotrophin beta subunit mRNA but not luteinizing hormone  $\beta$  subunit mRNA is expressed in the pituitary of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Mol Endocrinol* 2004; 32: 115-128
- Neubert D, Heger W, Klug S, Merker HJ. Marmoset as a convenient primate species for studies in reproductive biology and toxicology. *Teratology* 1990; 41: 581
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem* 1995; 270: 22077-80
- Oliva R, Mezquita C. Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 8049-8059
- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1991; 40: 25-94
- Omisano OA, Biermann K, Hartmann S, Heukamp LC, Sonnack V, Hild A, Brehm R, Bergmann M, Weidner W, Steger K. DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 175-181.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002; 360: 772-777
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Delivering spermatozoan RNA to the oocytes. *Nature* 2004; 429: 154
- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel spermatozoal RNAs. *J Androl* 2005; 26: 70-74
- Pajarinen J, Laippala P, Penttilä A, Karhunen PJ. Incidence of disorders of spermatogenesis in middle aged Finnish men, 1981-91: two necropsy series. *BMJ* 1997; 314: 13-18
- Parazzini F, Bortolotti A, Colli E. Declining sperm count and fertility in males: an epidemiological controversy. *Arch Androl* 1998; 41: 27-30
- Payne AH, Jaffe RB. Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 102-107
- Perreault SD. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutat Res* 1992; 296: 43-55
- Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R. DNA and protein content of mouse sperm: Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 1981; 136: 127-136
- Preslock JP, Steinberger E. Testicular steroidogenesis in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Biol Reprod* 1977; 17: 289-293

- Prigent Y, Müller S, Dadoune JP. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 929-935
- Rao BJ, Brahmachari SK, Rao MR. Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem* 1983; 258: 13478-13485
- Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1751-1755
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-1093
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007; 447:425-432
- Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 2005; 345: 139-53
- Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 837-843
- Saling PM. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev Reprod Biol* 1989; 11: 339-388
- Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Rev Genet* 2008; 9: 129-140
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 396-407
- Saunders PTK, Gaughan J, Saxty BA, Kerr LE, Millar MR. Expression of protamine P2 in the testis of the common marmoset and man visualized using non-radioactive *in-situ* hybridization. *Int J Androl* 1996; 19: 212-219
- Schneiders A, Sonksen J, Hodges JK. Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. *J Med Primatol* 2004; 33: 98-104
- Schultz GA, Heyner S. Gene Expression in pre-implantation mammalian embryos. *Mutat Res* 1992; 296: 17-31.
- Schultz RM. The molecular foundation of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 323-31

- Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 329-334
- Shires A, Carpenter MP, Chalkley R. New histones found in mammalian testes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975, 72: 2714-2718
- Sigg C. Klassifizierung tubulärer Hodenatrophien bei Sterilitätabklärungen. Bedeutung der sogenannten bunten Atrophie. *Schweiz med Wschr* 1979; 109: 1284-1293
- Silvestroni L, Frajese G, Fabrizio M. Histones instead of protamines in terminal germ cells of infertile, oligospermic men. *Fertil Steril* 1976; 27: 1428-1437
- Sinowatz F. 14: Männliche Geschlechtsorgane. In: *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 2. Auflage. Hees H, Sinowatz F. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln, 1992; S. 285-301
- Sinowatz F, Kölle S, Topfer-Petersen E. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 2001; 168: 24-35
- Sone Y, Ito M, Shirakawa H, Shikano T, Takeuchi H, Kinoshita K, Miyazaki S. Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 690-694
- Sonnak V, Failing K, Bergmann M, Steger K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 2002; 34: 384-390
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 939-945
- Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 1999; 199: 471-487
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 219-225
- Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol* 2001; 203: 323-334
- Steger K, Failing K, Klonisch T, Behre HM, Manning M, Weidner W, Hertle L, Bergmann M, Kliesch S. Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine -1 and -2 mRNA. *Hum Reprod* 2001; 16: 709-716
- Steger K, Fink L, Klonisch T, Bohle RM, Bergmann M. Protamin-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 227-234

- Steger K, Fink L, Failing K, Bohle RM, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 331-336
- Steger K. 1 Spermatogenesis. In: Regulation of Sertoli Cell and Germ Cell Differentiation. Brehm R, Steger K. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005; 1-7
- Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008; 23:11-6
- Steiper ME, Young NM. Primate molecular divergence dates. *Molec Phylogenet Evol* 2006; 41: 384-394
- Sternlicht AL, Schultz RM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool* 1981; 215: 191-200
- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998; Mar 1; 12 (5): 599-606
- Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta (zeta): A sperm protein that triggers  $Ca^{2+}$  oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 264-273
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978; 117: 347-356
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90-100
- Thompson EM, Legouy E, Renard JP. Mouse embryos do not wait for the MBT: chromatin and RNA polymerase remodeling in genome activation at the onset of development. *Dev Genet* 1998; 22: 31-42
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry* 1979; 76: 4350-4354.
- Trostle-Weige PK, Meistrich ML, Brock WA, Nishioka K. Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J Biol Chem* 1984; 259: 8769-8776
- Turner BM. Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci* 1991; 99: 13-20

- Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell* 2002; 111: 285-291
- van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 2006; 298: 458-469
- van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derijck AAHA, van der Vlag J, Martini E, de Boer P. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 1-6
- van Roijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT. Immunoeexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod* 1998; 13: 1559-1566
- Vassena R, Dee Schramm R, Latham KE. Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2005; 72:430-436
- Voronina E, Wessel GM. The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* 2003; 58: 53-110
- Wade PA, Pruss D, Wolffe AP. Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 128-132
- Wassarman PM. Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology* 1994; 41: 31-44
- Weinbauer GF, Aslam H, Krishnamurthy H, Brinkworth MH, Einspanier A, Hodges JK. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol Reprod* 2001; 64: 120-126
- Weis L, Reinberg D. Transcription by RNA polymerase II: inhibitor-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J* 1992; 6: 3300-3309
- Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR, Cohen J. Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2005; 84: 343-355
- Welsch U. 13. Geschlechtsorgane. In: Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. 1. Auflage. Welsch U. Elsevier GmbH, München 2003; S. 427-456
- WHO Laborbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervixschleim-Interaktion. Übersetzung: Nieschlag E, Nieschlag S, Bals-Pratsch M, Behre HM, Knuth UA, Meschede D, Niemeier M, Scick A. Springer, Berlin,

- Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio 1999
- Wistuba J, Schrod A, Greve B, Hodges JK, Aslam H, Weinbauer GF, Luetjens CM. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biol Reprod* 2003; 69: 582-591
- Wistuba J, Mundry M, Luetjens CM, Schlatt S. Co-grafting of hamster (*Phodopus sungorus*) and marmoset (*Callithrix jacchus*) testicular tissues into nude mice does not overcome blockade of early spermatogenic differentiation in primate grafts. *Biol Reprod* 2004; 71: 2087-2091
- Witt O, Albig W, Doenecke D. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* 1996; 229: 301-306
- Wolf KW, Jeppesen P, Mitchell A. Spermatid nucleus of *Megaselia scalaris* Loew (Insecta, Diptera, Phoridae): a study using anti-histone antibodies, scanning electron microscopy and a centromer-specific oligonucleotide. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 272-276
- Wolfe SA, Anderson JV, Grimes SR, Stein GS, Stein JS. Comparison of the structural organization and expression of germinal and somatic rat histone H4 genes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1007: 140-150
- Wolfe SL. The nucleus and its molecular constituents. In: *Molecular and cellular biology*. Wolfe SL. Wadsworth Publishing Company, California, 1993, S.525-572
- Wolffe AP, Dimitrov S. Histone-modulated gene activity: developmental implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993; 3: 167-191
- Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 545-579
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautiere P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1998; 80: 117-128
- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003; 278: 29471-29477
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. (Eds. Knobil E, Neill JD). New York: Raven Press, Ltd., 1994; Second: 189-317
- Yao Y-Q, Xu J-S, Lee WM, Yeung SB, Lee K-F. Identification of mRNAs that are up-regulated after fertilization in the murine zygote by suppression subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 304: 60-66

- Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB. Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2173-2179
- Ziyyat A, Lassalle B, Testart J, Briot P, Amar E, Finaz C, Lefevre A. Flow cytometry isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction characterisation of human round spermatids in infertile patients. *Hum Reprod* 1999; 14: 379-387
- Ziyyat A, Lefèvre A. Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; 16: 1449-1456

## 9. Anhang

### Chemikalien, Reagenzien, Antikörper, Behandlungsmaterial, Verbrauchsmaterial und Geräte

#### Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Aceton, Merck, Darmstad, Germany

Agarose; Roth, Karlsruhe, Germany

3-Aminopropyl-Triethoxysilane, Sigma, Deisenhofen, Germany

Ampicillin (2,5mg); Stratagene, Heidelberg, Germany

Brilliant Blue G 250; Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Germany

Bovines Serumalbumin (BSA); Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz

Chloroform; Roth, Karlsruhe, Germany

Chlorwasserstoffsäure (HCl); Merck, Haar, Germany

Dextransulfat; Sigma-Aldrich, München, Germany

Diaminobenzidin (DAB); Research Genetics, Karlsruhe, Germany

Diethylpyrocarbonat (DEPC); Sigma-Aldrich, München, Germany

Dimethylformamid; Sigma-Aldrich; München, Germany

Dithiothreitol (DTT); Sigma-Aldrich, München, Germany

ECL™ Western – Blotting Analysis System, GE Healthcare, Amersham, UK.

Eisessig, Merck, Darmstadt, Germany

Ethanol, Merck, Darmstadt, Germany

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Ficoll 400; Serva, Heidelberg, Germany

Formalin 35%ig; Sigma-Aldrich, München, Germany

Formamid; Sigma-Aldrich, München, Germany

F-10 HAM; Sigma, Deisenhofen, Germany

Glycerin-Gelatine, Merck, Darmstadt Germany

Glycin; Sigma-Aldrich, München, Germany

Heparin; Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany

Humanem Serum Albumin 20% (HSA); Behring, Germany

Isopropylthiogalactosid (IPTG); Bioline; Luckenwalde, Germany

Isopropanol; Roth, Karlsruhe, Germany

Levamisol; Sigma-Aldrich, München, Germany

Luria-Bertani Medium (LB)-Agar-Medium; Quantum Appligene, Watford, UK

Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )-Lösung; Serva, Heidelberg, Germany

$\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME); Sigma-Aldrich, München, Germany

Methanol

Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ); Merck, Darmstadt, Germany

Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ); Merck, Darmstadt, Germany

Natriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ); Sigma-Aldrich, Steinhiem, Germany

Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ); Merck, Haar, Germany

$\text{Na}_2\text{SO}_3$

Nitro-Blau-Tetrazolium/Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat (NBT/BCIP); KPL, Wedel, Germany

Nitrocellulose Membrane 0,2UM; Invitrogen, Karlsruhe, Germany

NuPAGE Antioxidant; Invitrogen, Karlsruhe, Germany

NuPAGE 12 % Bis-Tris gel; Invitrogen, Karlsruhe, Germany

NuPAGE LDS Sample Buffer; Invitrogen, Karlsruhe, Germany

NuPAGE Sample Reducing Agent; Invitrogen, Karlsruhe, Germany

NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x); Invitrogen, Karlsruhe, Germany

NuPAGE Transfer Buffer (20x); Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Paraformaldehyd; Merck, Darmstadt, Germany

Phosphate buffered saline (PBS); Sigma-Aldrich, München, Germany

Pikrinsäurelösung; Riedel-deHaen, Seelze, Germany

Polyvinylpyrrolidon; Sigma, München, Germany

Protease Inhibitor Cocktail Tablette, Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany

Proteinase K; Qiagen; Hilden, Germany

Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), Merck, Darmstad, Germany

SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); Sigma-Aldrich, München, Germany

SYBR®Green; Sigma-Aldrich, München, Germany

Tetracyclin (1,5mg); Stratagene, Heidelberg, Germany

Tris-HCl; Sigma-Aldrich, München, Germany

Triton-X; Merck, Darmstadt, Germany

Trizma; Sigma-Aldrich, München, Germany

TRIzol®; Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Tween 20-R, Roth, Karlsruhe, Germany

Xylol; Roth, Karlsruhe, Germany

**Antikörper**

Rabbit monoclonal to Histone H4 (acetyl K5); abcam, Cambridge, UK  
Rabbit polyclonal to Histone H4 (acetyl K8); abcam, Cambridge, UK  
Rabbit polyclonal to Histone H4 (acetyl K12); abcam, Cambridge, UK  
Rabbit polyclonal to Histone H4 (acetyl K16); abcam, Cambridge, UK  
Immun Globulin (IgG); abcam, Cambridge, UK  
Mouse-anti-rabbit; Dako, Hamburg, Germany  
Rabbit-anti-mouse; Dako, Hamburg, Germany  
APAAP; Dako, Hamburg, Germany  
biotinyliert Ziege-anti-Kaninchen Immunglobuline; Dako, Hamburg, Germany

**Verbrauchsmaterial**

Kanülen; Braun, Melsungen, Germany  
Objektträger; R. Langenbrinck, Teningen, Germany  
Skalpelle; Feather, Osaka, Japan  
Spritzen; Braun, Melsungen, Germany

**Geräte**

BioDoc Analyze, Biometra, Goettingen, Germany  
Blotting-Apparatur (Trans-Blot® SD-Dry Transfer Cell); Bio-Rad, München, Germany  
Brutschrank; Heraeus Instruments, Hanau, Germany  
3-CCD Color Video Camera KY-F55B; JVC Friedberg, Germany  
Eppendorf Research Pipetten; Eppendorf, Hamburg, Germany  
Gelelektrophorese-Apparatur Agagel Mini®; Biometra, Göttingen, Germany  
Hamilton Pipette; Hamilton Company Europe, Bonaduz, Schweiz  
Heizplatte; MAGV, Rabenau-Londorf, Germany  
(Leica EG 1160, Leica, Wetzlar, Germany  
Leica TP 1050 Tissue Processor; GMI Inc, Minnesota, USA  
Lichtmikroskop, Leica DM LB; Leica, Wetzlar, Germany  
Mikrowelle intellowave; LG Electronics, Willich, Germany  
Mini-Protean 3® Electrophoresis Cell-Systems; Bio-Rad, München, Germany  
Nanodrop Photometer, Eppendorf, Hamburg, Germany  
pH-Meter CG 837; Schott-Geräte, Mainz, Germany  
Power Pac Basic, BioRad, München, Germany

Power Ease® 500 Supply; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA  
Scanner Perfection V200 Photo; Epson, Meerbusch, Germany  
Schlittenmikrotom, Leica SM 2000 R; Leica, Bensheim, Germany  
Schüttler, IKA-VIBRAX VXR Typ VXI; IKA Werke GmbH Co KG, Staufen, Germany  
Sonorex TK30; Bandelin electronic, Berlin, Germany  
Sterilisateur Loading-Modell 100-800; Schwabach, Germany  
iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany  
T3 Thermocycler; Biometra, Göttingen, Germany  
Trockenschrank; Memmert, Schwabach, Germany  
Ultra-Turrax-Gerät T8; IKA Labortechnik, Staufen, Germany  
Vortex Heidolph REAX 2000; Rose Scientific Ltd., Edmonton, Canada  
Wärmeplatte STÖRK TRONIC; Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Germany  
Wasserbad; Memmert, Schwabach, Germany  
Zentrifuge MIKRO 22R; Hettich, Tuttlingen, Germany

#### **Andere Materialien**

Einmalküvetten (Eppendorf UVetten®); Eppendorf, Hamburg, Germany  
Digoxigenin RNA-Labeling-Mix; Boehringer, Mannheim, Germany  
DNase I; Roche, Mannheim, Germany  
DNA-Größenstandard (100bp DNA-Ladder); New England Biolabs, Frankfurt, Germany  
HyperLadder™ IV, Bionline, Luckenwald, Germany  
dNTP; Qiagen, Hilden, Germany  
Primer Oligo dT-15; Promega, Salzburg, Austria  
PVDF-Membran (Westran® Schleicher & Schuell); Schleicher & Schuell GmbH, Dassel  
Filterpapiere; Whatman 3MM; Whatman GmbH, Rothenburg, Germany  
pGEM-T Vektor; Promega, Mannheim, Germany  
Escherichia coli, Eco XL-1 Blue; Stratagene, Heidelberg, Germany  
Restriktionsenzyme (Not-I, Nco-I); New England Biolabs, Frankfurt, Germany  
Superscript II Reverse Transkriptase; Gibco BRL, Eggenstein, Germany  
RNA-Polymerasen (T7 und SP-6); Promega, Mannheim, Germany  
Taq DNA-Polymerase; Gibco BRL, Eggenstein, Germany  
Transkriptionspuffer; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany

**Kits**

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7); Roche, Mannheim, Germany

QIAEX II Kit; Qiagen, Hilden, Germany

QIAprep Spin Plasmid Kits; Qiagen, Hilden, Germany

QIAquick® PCR Purification Kit 250, Qiagen, Hilden, Germany

RNase-Free DNase Set; Qiagen, Hilden, Germany

RNesay Micro Kit; Qiagen, Hilden, Germany

Sensiscript™ RT Kit, Qiagen, Hilden, Germany

Taq PCR Core-Kit; Qiagen, Hilden, Germany

Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standart (ABC-Kit); Vector Laboratories LTD, UK

## 10. Danksagung

Diese Dissertation wurde im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Steger erstellt.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Klaus Steger, für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Geduld und die hervorragende Betreuung dieser Dissertation und den Publikationen ganz herzlich danken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem 2. Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann, für seine immer kritische, ehrliche und hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner ersten Publikation und dieser Dissertation danken.

Danken möchte ich ebenfalls dem Rhön Klinikum, die im Rahmen der Forschungsförderung gem. § 2 Abs. 3 Kooperationsvertrag dieses Projekt unterstützt haben.

Mein Dank geht auch an die Koautoren der beiden Publikationen, die im Rahmen meines Projektes entstanden sind: Frau Dr. Mária Cristina Oliveira Cavalcanti, Frau Anne Hild, Frau Dr. Penelope Nayudu, Frau Dr. Myriam Reichenbach, Herrn Rüdiger Behr und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weidner.

Danke auch an meine lieben Kollegen und Freunde, Frau Barbara Fröhlich und Frau Angela Erkel, die mir immer mit Rat und Tat bei der Durchführung meiner Versuche zur Seite standen. Ohne euch hätte mir meine Arbeit im Labor nicht so viel Spaß gemacht. Vielen lieben Dank auch an Anne Hild, die zu jeder Tages- und Nachtzeit immer Zeit für mich hatte.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen und Marburg GmbH für die angenehme Arbeitsatmosphäre und freundliche Unterstützung.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums und während der Erstellung dieser Dissertation unterstützte. Vielen lieben Dank auch an meinen Bruder, der immer gute Nerven hatte, und mir mit seinen PC-Kenntnissen immer behilflich war. Ich danke auch meiner besten Freundin Ute, die mich immer unterstützt, mir Mut gemacht und Kraft gegeben hat.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Eine Untersuchung von zwei Tiermodellen auf ihre Eignung für Studien der Spermatogenese (Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus*) und der frühen Embryonalentwicklung (Rind, *Bos taurus*) des Menschen“ selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Desweiteren versichere ich, dass diese Dissertation nur in diesem Promotionsverfahren eingereicht ist und keine gescheiterten Promotionsverfahren diesem vorausgegangen sind.



*edition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-599888 Fax: -599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5688-9



9 783835 119568 8 9