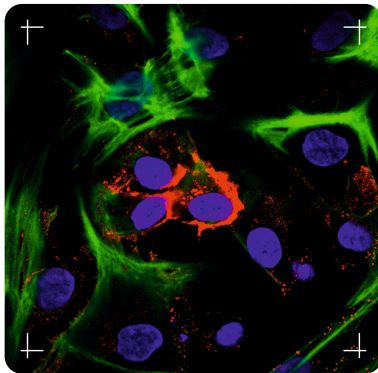


**MIRIAM KAESE**

---

Polysialylierungsstatus am weiblichen  
Reproduktionstrakt der Katze und der Maus



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

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

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

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 2018

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 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**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 Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit  
Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Axel Wehrend

und

aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. Sebastian Peter Galuska

## **Polysialylierungsstatus am weiblichen Reproduktionstrakt der Katze und der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

**Miriam Kaese**

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2017

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend  
PD Dr. Sebastian Peter Galuska

Prüferin: Prof. Dr. Sybille Mazurek

Tag der Disputation: 09. April 2018

**„Freiheit besteht vor allem darin, das zu tun,  
was man nach seinem Gewissen tun soll.“**

*Albert Schweitzer*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>4</b>
2.1	Polysialinsäuren .....	4
2.1.1	Struktureller Aufbau .....	4
2.1.2	Biosynthese.....	5
2.2	Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM.....	11
2.2.1	Struktureller Aufbau und biologische Bedeutung.....	11
2.3	PolySia-NCAM.....	13
2.3.1	Posttranslationale Polysialylierung von NCAM.....	13
2.3.2	Biologische Bedeutung von PolySia-NCAM und PolySia.....	14
2.4	Der feline und murine weibliche Reproduktionstrakt.....	18
2.4.1	Anatomischer und histologischer Aufbau von Eileiter und Eierstock .....	18
2.4.2	Follikelatresie .....	26
2.5	Zyklus der Hauskatze .....	28
2.6	Zyklus der Hausmaus.....	30
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.1	Probenmaterial .....	32
3.2	Biologische Materialien .....	32
3.2.1	Zelllinie .....	32
3.2.2	Antikörper .....	33
3.2.3	Enzyme .....	35
3.2.4	Verwendete Stimulantien der kultivierten Zellen.....	36
3.3	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze .....	36
3.3.1	Verbrauchsmaterialien .....	36
3.3.2	Chemikalien, Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur.....	36
3.4	Zykluseinteilung.....	37
3.4.1	Katze .....	37
3.4.2	Maus.....	37
3.5	Histologische Methoden .....	38
3.5.1	Aufarbeitung von Gewebeproben .....	38
3.5.2	Vorbereitung der Objektträger .....	39
3.5.3	Färbemethoden .....	40
3.5.4	Permanentes Eindeckeln von histologischen Schnitten .....	42
3.5.5	Morphologische Klassifizierung von Zelltypen und Tertiärfollikeln .....	43
3.6	Zellbiologische Methoden.....	44
3.6.1	Gewinnung und Kultivierung primärer feline Granulosazellen .....	45

3.6.2	Inkubation feliner Granulosazellen.....	47
3.6.3	Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Granulosazellen.....	47
3.7	Proteinanalytische Methoden.....	48
3.7.1	Probenvorbereitung.....	49
3.7.2	Affinitätsaufreinigung.....	50
3.7.3	Enzymatische Spaltungen.....	53
3.7.4	SDS-PAGE.....	53
3.7.5	Western Blot.....	56
3.7.6	Immunlokalisation .....	56
3.8	Nachweis der Proteinexpression.....	58
3.8.1	Aufarbeitung der mRNA und cDNA-Synthese .....	58
3.8.2	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	59
3.8.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	60
3.9	Kettenlängenbestimmung & HPLC .....	61
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
4.1	Polysialinsäuren in felinem Gewebe des weiblichen Reproduktionstraktes adulter Tiere .....	63
4.1.1	Lokalisation von PolySia in felinem Gewebe des Reproduktionstraktes.....	63
4.1.2	Nachweis von Polysialinsäuren in Gewebshomogenaten .....	66
4.1.3	Bestimmung des Grads der Polysialylierung von NCAM .....	68
4.1.4	Nachweis von Transkripten der Polysialyltransferasen .....	69
4.1.5	Identifizierung des PolySia-Trägerproteins.....	70
4.1.6	Lokalisation von NCAM in felinem ovariellen Gewebe .....	72
4.1.7	Untersuchung der biologischen Funktion von PolySia-NCAM-140 .....	74
4.2	Polysialinsäuren in murinem Gewebe des weiblichen Reproduktionstraktes adulter Tiere .....	78
4.2.1	Lokalisation von PolySia in murinem Gewebe des Reproduktionstraktes .....	78
4.2.2	Nachweis von Polysialinsäuren in murinem Gewebshomogenaten.....	79
4.3	Nachweis von PolySia in murinem und felinem Gewebe fetaler bzw. postnataler Proben des weiblichen Reproduktionstraktes.....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
5.1	Diskussion der Fragestellung.....	84
5.2	Diskussion der Methodik .....	85
5.2.1	Wahl der Modellorganismen .....	85
5.2.2	Wahl der Methoden.....	86
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	94
5.3.1	PolySia-NCAM-140 bei der Hauskatze.....	94
5.3.2	PolySia-NCAM bei der Hausmaus.....	98
5.3.3	PolySia in felinem fetalem bzw. murinem postnatalem Gewebe.....	99
5.4	Schlussbetrachtung und Ausblick .....	102

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>114</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>115</b>
<b>12</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>134</b>
12.1	Verwendete Materialien, Laborgeräte und Software.....	134
<b>13</b>	<b>Veröffentlichungen und Kongressbeiträge</b> .....	<b>138</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>140</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>141</b>

---

## 1 Einleitung

Die interzelluläre Kommunikation und Interaktion ist ein fein justiertes System, welches Ausgangspunkt für zahlreiche pathologische und physiologische Prozesse ist. Dabei können Modifikationen von Proteinen der Zellmembran zu einer Veränderung der ursprünglichen Proteinfunktion führen und so die Proteininteraktion benachbarter Zellen, die Zellproliferation, -migration und -differenzierung sowie die Apoptose modulieren. Eine bedeutende posttranslationale Modifikation von Glykoproteinen stellen Polysialinsäuren (PolySia) dar. Diese weitverzweigten Zuckermoleküle verfügen über stark anionische Ladungen und sind beispielsweise in der Lage, den interzellulären Abstand um ca. 10 nm zu vergrößern (Rutishauser *et al.* 1988). Sie können so die inter- und intrazelluläre Kommunikation und Adhäsion stark beeinflussen. Die prominenteste Bedeutung kam bisher dem polysialyliertem neuralem Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) im Zusammenhang mit der Neurogenese zu. Seit 2013 ist zudem bekannt, dass PolySia eine nicht unerhebliche Rolle sowohl während der saisonalen Spermatogenese von Rehböcken als auch bei der postnatalen Entwicklung von murinen, männlichen Gonaden einnimmt. Es kommt zudem auf der postakrosomalen Region von Spermien vor. Ausgangspunkt für die Studien dieser Dissertation war jedoch eine Erkenntnis, die mehr als 20 Jahre zurückliegt. Damals konnten Elisabeth Bock und Kollegen unterschiedlich glykosylierte Isoformen von NCAM in Ovarien von Säugetieren identifiziert. Allerdings wurden seither keine weiterführenden Untersuchungen hinsichtlich der Bestimmung der Isoform von NCAM und einer möglichen biologischen Funktion durchgeführt.

Im Fokus dieser Dissertation steht daher die Frage, ob und wo PolySia im Gewebe des weiblichen Reproduktionstrakts bei Säugetieren vorkommt, welche möglichen biologischen Bedeutungen daraus resultieren können und inwiefern zyklische Vorgänge, wie z. B. die Follikulogenese, durch eine Polysialylierung beeinflusst werden. Von zentraler Bedeutung sind weiterhin die Ermittlung des Trägerproteins und der Grad der Polymerisierung.

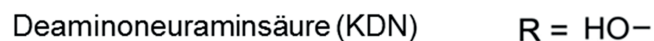
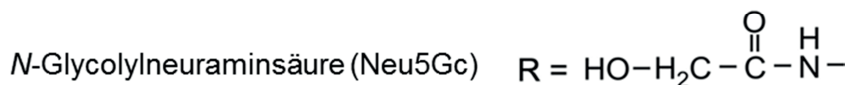
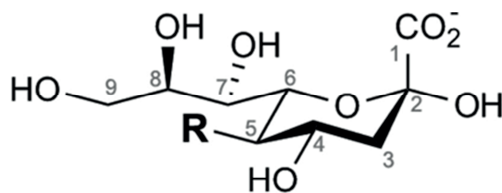
---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Polysialinsäuren

#### 2.1.1 Struktureller Aufbau

Sialinsäuren gehören zu den  $\alpha$ -Ketonsäuren und bestehen aus einem C9-Grundgerüst mit einer endständigen Carboxylgruppe an C1 sowie einer Ketongruppe an C2 (Angata *et al.* 2002; Schauer 2004). Bereits 1941 wurde die *N*-Acetylneuraminsäure von Klenk als „Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipids“ isoliert (Klenk 1941). Mittlerweile sind mehr als 50 natürlich vorkommende Sialinsäuren identifiziert. Allerdings eignen sich nur wenige von ihnen als Ausgangsprodukte für die Synthese von Polysialinsäuren (PolySia) (Kelm und Schauer 1997; Angata *et al.* 2002). Hierzu zählen die in Abbildung 1 gezeigten Sialinsäuren wie die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und die Deaminoneuraminsäure (KDN) (Mühlenhoff *et al.* 1998). Die Erstgenannte zählt hierbei zu den am häufigsten, natürlich vorkommenden Sialinsäuren (Tiralongo 2013).



**Abbildung 1:     Struktureller Aufbau und Modifikationen der Sialinsäuren  
(modifiziert nach Schnaar *et al.* 2014)**

Sialinsäuren gehören zu den  $\alpha$ -Ketonsäuren und setzen sich aus einem C9-Grundgerüst zusammen. Sie sind gekennzeichnet durch eine Carboxylgruppe an C1 und eine Ketongruppe an C2. Zu den häufigsten exprimierten Sialinsäurederivaten zählen die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure (KDN) (Mühlenhoff *et al.* 1998).

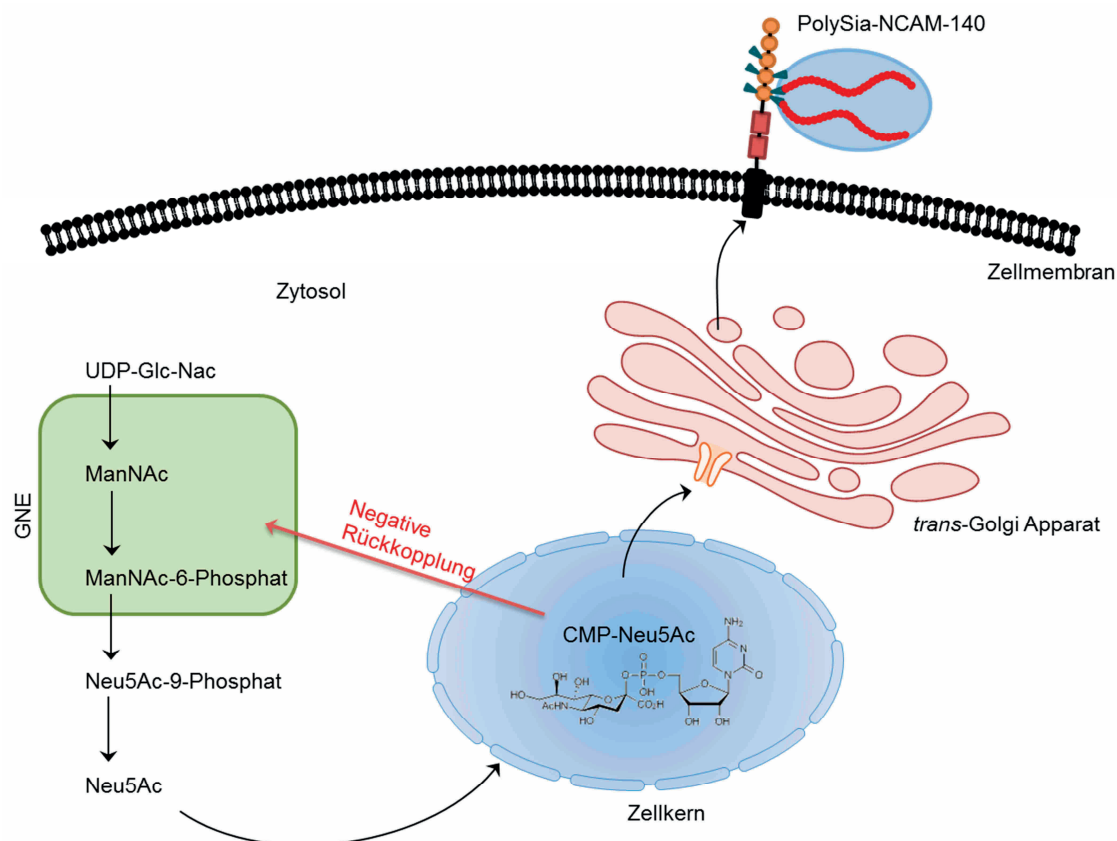
---

Diese Moleküle können entweder an den Positionen  $\alpha$ 2,4,  $\alpha$ 2,5,  $\alpha$ 2,8,  $\alpha$ 2,9 oder gemischt an  $\alpha$ 2,8/9 verknüpft sein (Sato und Kitajima 1999; Sato 2013) und weisen daher ein unterschiedliches Maß an Polymerisierung auf. Sie bestehen jedoch mindestens aus acht Untereinheiten bis hin zu über 50 bis 60 Sialinsäureresten mit starken anionischen Eigenschaften (Finne 1982; Galuska *et al.* 2006). Als mit PolySia posttranslational modifiziertes Trägerprotein im Säugetier dient am häufigsten das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM (Finne 1982; Liedtke *et al.* 2001; Ohe *et al.* 2002). Zusätzlich sind sieben weitere Trägerproteine bekannt. Hierzu zählen das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 (Galuska *et al.* 2010), Neuropilin-2 (Curreli *et al.* 2007; Werneburg *et al.* 2015) und CD36 der Muttermilch (Yabe *et al.* 2003), CCR7 der dendritischen Zellen (Kiermaier *et al.* 2016), der E-Selektinligand-1 auf Mikrogliazellen und Makrophagen (Werneburg *et al.* 2016) sowie eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals (Zuber *et al.* 1992) und die Polysialyltransferase St8Siall (Simon *et al.* 2013).

### 2.1.2 Biosynthese

Der Grundbaustein der durch CMP aktivierten Neu5Ac entsteht ursprünglich aus UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), welches neben der Sialinsäuresynthese noch an zahlreichen anderen Stoffwechselfvorgängen beteiligt ist. Die Synthese von CMP-Neu5Ac vollzieht sich in fünf Schritten, von denen die ersten vier im Zytosol und der letzte im Zellkern lokalisiert ist (Abbildung 2) (Kean 1991). In den ersten beiden Schritten kommt ein bifunktionales Enzym zum Einsatz, welches sowohl Epimerase- als auch Kinaseeigenschaften aufweist und dessen Untereinheiten jeweils unabhängig voneinander agieren können. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) katalysiert zunächst die Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) unter Abspaltung des UDP (Hinderlich *et al.* 1997; Tanner 2005; Sato 2013; Münster-Kühnel und Hinderlich 2013). ManNAc wird durch die ATP-abhängige Kinaseaktivität der GNE anschließend an C6 phosphoryliert – ManNAc-6-Phosphat entsteht. Die Entwicklung des Grundgerüsts der Neu5Ac erfolgt durch Öffnung des Ringes, dem Verbrauch von Phosphoenolpyruvat (PEP) und dem finalen Ringschluss durch die konformitätsstabilisierende Neu5Ac-Phosphat-Synthase. Nach

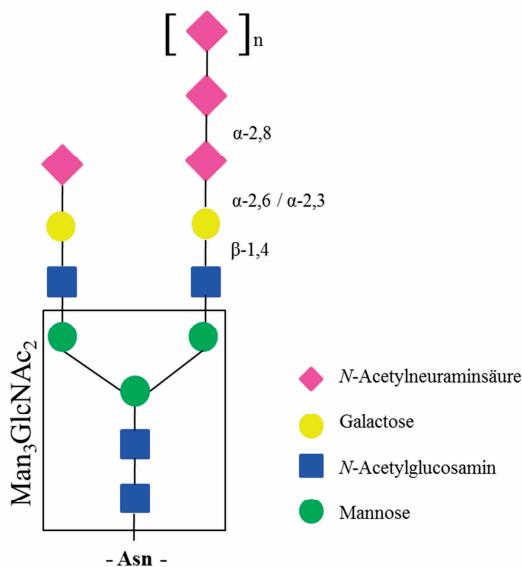
Abspaltung des Phosphats durch die Neu5Ac-Phosphat-Phosphatase entsteht Neu5Ac. Im Unterschied zu der Aktivierung aller anderen Monosacchariden erfolgt die Synthese von CMP-Neu5Ac im Zellkern (Kean *et al.* 2004). Hohe Konzentration des CMP-Neu5Ac führen zu einer Hemmung der GNE, wobei die regulatorische Domäne im Bereich der Kinasedomäne lokalisiert ist (Kornfeld *et al.* 1964). Somit gilt die GNE als Schlüsselenzym der Neu5Ac-Synthese. CMP-Neu5Ac wird über spezifisch bindende CMP-Neu5Ac-Transporter in den Golgi-Apparat transportiert und dient dort als Ausgangsstoff für posttranslationale O- und N-glykosidische Modifikationen von Proteinen, die durch verschiedene Sialyltransferasen katalysiert werden können (Harduin-Lepers *et al.* 2001).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biosynthese von Sialinsäuren und PolySia (modifiziert nach Schauer 2004)**

Beginnend mit dem Substrat UDP-Glc-Nac (UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin) für das bifunktionale Enzym GNE (UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase) und dessen Produkt Neu5Ac (N-Acetylneuraminsäure) sowie dem Transport in den Zellkern mit anschließender CMP-Aktivierung und Weitertransport über den CMP-Neu5Ac-Transporter in den Golgi-Apparat wird die Synthese der Polysialinsäuren schematisch dargestellt. Die im Golgi hergestellten PolySia-Ketten und deren N-glykosidische Verknüpfung auf die jeweiligen Proteine werden über vesikulären Transport an die Membranoberfläche übertragen.

Die *N*-Glykosylierung der Proteine erfolgt am bzw. im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) und Golgi-Apparat (Feizi und Mulloy 2003). Dabei werden an die Aminogruppen (*N*-) des C2 der Aminosäure Asparagin (Asn) von Proteinen bestimmte Zuckerabfolgen transferiert. Die *N*-Glykane unterteilt man in drei Haupttypen: mannosereich, hybrid oder komplex. Dabei ist die sogenannte Core-Struktur bei allen *N*-Glykanen stets gleich strukturiert und besteht aus fünf Molekülen: zwei verknüpfte GlcNAc und drei folgenden Mannosen (Abbildung 3). Im Gegensatz dazu lässt sich bei *O*-Glykanen kein einheitliches Core identifizieren. Dem Core schließen sich unterschiedliche Anzahlen von Antennen an (Pavelka und Roth 2005).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines polysialylierten *N*-Glykans vom komplexen Typ (modifiziert nach Angata *et al.* 2006; Schnaar *et al.* 2014)**

Die Core-Struktur stellt ein Pentasaccharid dar und besteht aus zwei Molekülen *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und drei Mannosen. Daran knüpfen drei Antennen an. Das hier schematisch dargestellte *N*-Glykan kann dem komplexen Typ zugeordnet werden.

Das Core des Glykans wird zunächst an einem Hilfsmolekül, dem Dolicholphosphat, auf der Außenseite des rER synthetisiert. Nach der Addition von fünf weiteren Mannosemolekülen wird die gesamte Struktur von der zytosolischen Seite auf die luminalen Seite transferiert. Der „*Flip-Flop*“-Mechanismus oder auch Translokation erfolgt über Translokone (Sec61-Komplexe). Translokone („*translocation canal*“) bezeichnen membranständige Proteinkomplexe, die in der Lage sind größere

Moleküle (Porengröße 40 bis 60 Å) zu translokalisieren. Unterstützend sind hierbei Translokon-assoziierte Proteine, wie u. a. das Enzym Oligosaccharyltransferase (Walter und Blobel 1981; Pavelka und Roth 2005; Stanley *et al.* 2009). Im Anschluss daran werden weitere Glykosyltransferasen aktiviert. Die Übertragung von der Core-Struktur auf das Protein erfolgt an asparaginreichen Aminosäureseitenketten mit dem Erkennungsmotiv Asn-X-Thr/Ser und wird durch das Enzym Oligosaccharyltransferase initialisiert. Das anschließende „*Caping*“ oder „*Triming*“ der Mannosen bis zu der eigentlichen Core-Struktur erfolgt zunächst im rER und danach im Golgi-Apparat. Die finale Prozessierung ist abhängig von den verschiedenen Glykosyltransferasen (Pavelka und Roth 2005), wie beispielsweise den Sialyltransferasen.

Die bekanntesten und am häufigsten vorkommenden Sialyltransferasen für NCAM sind die membranständigen St8SialI und St8SialIV des Golgi-Apparates (Angata *et al.* 2000; Harduin-Lepers *et al.* 2001). Neben diesen beiden existieren noch weitere Di- und Oligosialyltransferasen, jedoch können nur St8SialI und St8SialIV Molekülketten mit mehr als acht Sialinsäureresten synthetisieren (Tabelle 1) (Angata *et al.* 2000; Sato *et al.* 2000; Harduin-Lepers *et al.* 2001).

**Tabelle 1: Übersicht der  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen (nach Sato 2013)**

Sialyltransferase	Beispiele möglicher Trägerproteine	Produkte
St8Sial	GM3/GD3 (Ganglioside)	DiSia
St8SialI	NCAM	PolySia
St8SialIII	GM3/GD3, Oligosaccharide, NCAM, Fetuin	Di-/OligoSia
St8SialIV	NCAM	PolySia
St8SialV	GT1b/GD3 (Ganglioside)	Di-/OligoSia
St8SialVI	O-verknüpfte Glycoproteine	DiSia

Die Polysialyltransferasen St8SialI und St8SialIV zählen zur Familie der  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen und benötigen als Donormolekül die CMP-Sialinsäure, während die beiden anderen Untergruppen der Sialyltransferasen

---

( $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferasen) Galaktose, *N*-Acetylglucosamin oder *N*-Acetylgalactosamin verwenden.

Den beiden Polysialyltransferasen dient jeweils der terminale Sialinsäurerest als Donormolekül für die Übertragung der aktivierten Sialinsäure. Erst zwei Besonderheiten ermöglichen ihnen die Interaktion mit den PolySia-Ketten: Zum einen verfügen sie über eine Region, die sehr reich an basischen Aminosäuren ist. Dies ermöglicht eine erfolgreiche Bindung der sauren Moleküle. Dieser Bereich wird auch als Polysialyltransferasedomäne (PSTD) bezeichnet und besteht aus 32 Aminosäuren (Harduin-Lepers *et al.* 2008; Nakata *et al.* 2006). Zum anderen weisen die Sialyltransferasen eine zweite polybasische Region (PBR) auf, die für die Interaktion mit dem am häufigsten polysialylierten Protein NCAM verantwortlich ist (Foley *et al.* 2009; Schnaar *et al.* 2014). Ohne diese beiden Domänen können lediglich Di- (St8Sial, St8SiaV und St8SiaVI) oder Oligosialinsäuren (St8SialIII und St8SiaV) synthetisiert werden (Angata *et al.* 2000; Sato *et al.* 2000).

Sialyltransferasen gehören zur Gruppe der Typ-II-Transmembranproteine und besitzen daher eine Transmembrandomäne, welche an mehreren Stellen *N*-glykosyliert ist. Diese Domäne ist gekennzeichnet durch einen kurzen zytoplasmatischen Bereich und einen weit ins Lumen reichenden Anteil. Letzterer besteht aus einer Stammregion und einer katalytischen Domäne, die sich wiederum in drei Bereiche untergliedert: Sialylmotiv (SiaM) *long* (L), *small* (S) und *very small* (VS), wobei SiaM-L für die Bindung der Donormoleküle (aktivierte Sialinsäuren) zuständig ist und SiaM-S die Akzeptormoleküle für die katalytische Reaktion fixiert (Datta und Paulson 1995; Datta *et al.* 1998; Datta 2009; Rao *et al.* 2009). Die histidinhaltige SiaM-VS ist zwar essentiell für die katalytische Reaktion, hat jedoch keinen Einfluss auf die Proteinfaltung (Kitazume-Kawaguchi *et al.* 2001). In dem Bereich des SiaM-S ist die oben genannte PSTD zu finden.

Die polybasische Region PBR ist oberhalb des SiaM-L lokalisiert (Abbildung 3) (Harduin-Lepers 2013). Einem weiteren Sialylmotiv (III) wurde bisher noch keine Bedeutung zugeordnet (Jeanneau *et al.* 2004; Geremia *et al.* 1997), wobei eine stabilisierende Funktion diskutiert wird (Harduin-Lepers 2013).



**Abbildung 4: Primärstruktur der Transmembrandomäne der Sialyltransferasen St8SialII und St8SialIV (modifiziert nach Angata und Fukuda 2003 und nach Angaben aus Harduin-Lepers 2013)**

TM = Transmembrandomäne, PBR = polybasische Region, SiaM = Sialylierungsmotiv, M-III = Motiv III, PSTD = Polysialyltransferasedomäne, L = *large*, S = *small*, VS = *very small*, N- = N-terminales Ende, C- = C-terminales Ende

Neben der Polysialylierung von anderen Proteinen besitzen beide Polysialyltransferasen die Fähigkeit der Autopolysialylierung. Hierbei werden auf enzymeigene N-Glykanstrukturen PolySia-Ketten transferiert. Die gleichzeitige Präsenz von NCAM inhibiert jedoch diesen Effekt (Mühlenhoff *et al.* 1996; Close und Colley 1998).

Markant ist auch, dass je nach Entwicklungsstand des Individuums und dem entsprechenden Bedarf, die Expression von St8SialII und St8SialIV variiert (Angata *et al.* 1997; Ong *et al.* 1998). So wird bei der Neurogenese St8SialII während der embryonalen Entwicklung und kurze Zeit *post partum* in höherem Maß expremiert als St8SialIV. Hingegen ist die Konzentration von St8SialIV im adulten Gewebe höher als die von St8SialII. Beide Polysialyltrasferasen werden zwar verstärkt während der Embryogenese gebildet, jedoch wird die Expression von St8SialIV postnatal nicht so stark reduziert, wie die von St8SialII (Finne 1982; Rutishauser und Landmesser 1996; Angata *et al.* 1997; Ong *et al.* 1998).

Anhand von Knockout-Mouse-Modellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass beide Polysialyltransferasen unabhängig voneinander agieren können (Weinhold *et al.* 2005; Galuska *et al.* 2006). Allerdings zeigen sich dabei Abweichungen in ihrer Arbeitsweise. So ist z. B. bei St8SialIV-defizienten Mäusen (Eckhardt *et al.* 2000) die noch funktionsfähige St8SialII in der Lage, NCAM zu 90 % zu polysialylieren und dabei ein Homopolymer aus 40 Untereinheiten zu synthetisieren. Bei St8SialII-defizienten Mäusen (Angata *et al.* 2004) mit einer funktionsfähigen St8SialIV können jedoch nur 45 % des im Gewebe vorkommenden NCAM's modifiziert werden. Dafür kann eine Kettenlänge von bis zu 60 Sialinsäuren erreicht werden (Galuska *et al.* 2006; Galuska *et al.* 2008; Oltmann-Norden *et al.* 2008).

---

## 2.2 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

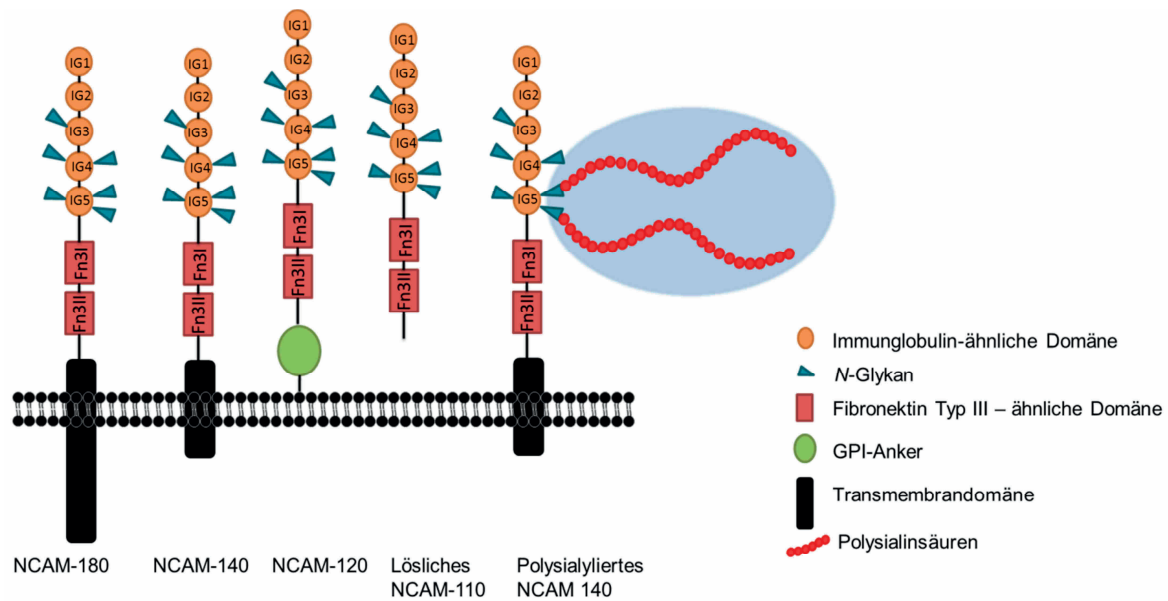
### 2.2.1 Struktureller Aufbau und biologische Bedeutung

Beginnend mit der ersten Beschreibung der Zelladhäsion und der genaueren Erforschung der Zelladhäsionsmoleküle (CAM's) zu Beginn des 20. Jahrhunderts (Wilson 1907) bis hin zu der ersten Erwähnung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM und der Zuordnung zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie in den 70'er Jahren (Jorgensen und Bock 1974; Rutishauser *et al.* 1976), ist dieses Molekül immer wieder aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften Gegenstand der Forschung.

Neben der Familie der Cadherine, Selektine und Integrine stellt die Ig-Superfamilie die größte Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle dar und umfasst mehr als 100 Mitglieder (Brummendorf und Rathjen 1995).

Die Grundstruktur der Ig-Superfamilie bildet mindestens eine Immunglobulin-ähnliche Domäne. Bei NCAM besteht das Grundgerüst aus fünf Ig-ähnlichen Domänen, die an zwei Fibronektin Typ-III-ähnlichen Domänen gebunden sind. Daran schließt sich eine Transmembrandomäne oder ein Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) an, der das Protein an die Membran bindet (Cunningham *et al.* 1987). Die vier bekannten und durch alternatives Spleißen entstandenen Isoformen unterscheiden sich anhand ihrer Verankerung in der Zellmembran und somit ihres Molekulargewichtes, welches zwischen 110 und 180 kDa variiert (Abbildung 5).

Die beiden Isoformen NCAM-180 und -140 zählen zu den *single-pass*-Transmembrandomänen. Sie sind charakterisiert durch den Anteil der Aminosäuren (AS), die den intrazellulären Anteil bilden. Bei NCAM-180 wird diese Domäne aus 385 AS gebildet und bei NCAM-140 aus 120 AS. Die dritte bekannte Form, NCAM-120, ist über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden (Hinsby *et al.* 2004). Die letzte bisher bekannte Form ist das NCAM-110. Hierbei handelt es sich um eine lösliche, nicht an eine Membran gebundene Version des Proteins (Bock *et al.* 1987; Ulm *et al.* 2013).



**Abbildung 5: Schematisch dargestellte Modifikationen von NCAM (modifiziert nach Kleene und Schachner 2004)**

Schematisch dargestellt werden die verschiedenen NCAM-Isoformen. Die beiden über ein *single-pass* Transmembrandomäne in der Membran verankerten NCAM-180 und -140 sowie NCAM-120, welches über einen GPI-Anker membrangebunden ist und das lösliche NCAM-110. Des Weiteren ist auch ein polysialyliertes NCAM-140 mit seiner schematisierten Hydrathülle gezeigt. NCAM besteht aus zwei Fibronektin-III-ähnlichen Domänen und aus fünf zusätzlichen Immunglobulin-ähnlichen Domänen mit insgesamt sechs N-Glykosylierungsstellen, wobei nur an der fünften Ig-Domäne zwei Möglichkeiten für eine Polysialylierung bestehen.

NCAM kann auf vielfältige Weise die Zellkommunikation und Zellinteraktion beeinflussen. So kann es zum einen homophile Bindungen mit weiteren NCAM-Molekülen entweder von einer benachbarten (*trans*-Konfiguration) oder derselben Zelle (*cis*-Konfiguration) beeinträchtigen (Abbildung 7) (Rao *et al.* 1992; Rao *et al.* 1993). Zum anderen bestehen zahlreiche heterophile Interaktionen (Kleene und Schachner 2004).

Im Bereich des Eierstocks wurde NCAM bereits in den 1990er Jahren sowohl auf der Eizelle (Campbell *et al.* 1995) als auch im humanen Tertiärfollikel auf den Granulosazellen (Mayerhofer *et al.* 1994) sowie im Bereich des Follikels, der Eizelle und des Rete ovarii der Maus (Møller *et al.* 1991) lokalisiert. Während der Follikulogenese und Luteinisierung wurde ein wechselndes Expressionsmuster von NCAM festgestellt. Eine genaue biologische Bedeutung und Funktion von NCAM auf Granulosazellen wurde bisher noch nicht identifiziert, jedoch wird eine Beeinflussung

---

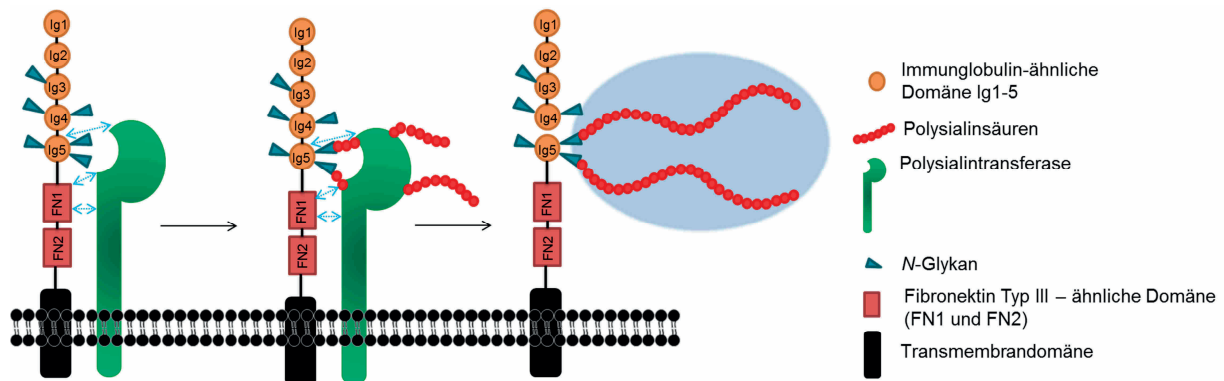
der Follikulogenese und Luteinisierung des Tertiärfollikels diskutiert (Mayerhofer *et al.* 1991; Mayerhofer *et al.* 1994).

## **2.3 PolySia-NCAM**

### **2.3.1 Posttranslationale Polysialylierung von NCAM**

Die Glykosylierung von NCAM stellt eine der wichtigsten und bekanntesten Modifikation von NCAM dar (s. a. 2.1.2 und Abbildung 3). Bekannt sind sechs potentielle *N*-Glykosylierungsstellen (Albach *et al.* 2004), wobei nur zwei Glykosylierungsstellen für die Elongation der PolySia-Ketten in Frage kommen (Nelson *et al.* 1995). Weiterhin existieren noch zwei potentielle *O*-Glykosylierungsstellen an den beiden Fibronectin-III-ähnlichen Domänen (Walsh *et al.* 1989).

Für eine erfolgreiche Bindung der Polysialyltransferasen werden zum einen die FN1-Domäne und zum anderen die Ig5-Domäne mit ihren beiden Möglichkeiten zur *N*-Glykosylierung benötigt (Abbildung 6) (Ohe *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2011). Die Fibronectin Typ-III-ähnliche Domäne FN1 ist in ihrer Aminosäuresequenz nur zu ca. 25 % identisch mit der Domäne FN2. Beide entsprechen in ihrer Grundstruktur dem  $\beta$ -Faltblatt (Mendiratta *et al.* 2005). Besonders ist jedoch, dass die FN1-Domäne im Gegensatz zu der FN2-Domäne eine zusätzliche  $\alpha$ -helikale Struktur und eine saure Oberflächenregion (*acidic surface patch*) aufweist (Mendiratta *et al.* 2006; Colley 2010). Durch die sterische Ausrichtung der FN1-Domäne zur Ig5-Domäne wird eine Polysialylierung der ASN5 (Asn449) und ASN6 (Asn478) dieser Ig-Domäne realisiert (Colley 2010; Thompson *et al.* 2013). Die polybasischen Region (PBR) der Polysialyltransferase (2.1.2) ermöglicht einen initialen Kontakt mit der FN1-Domäne (Foley *et al.* 2009; Zapater und Colley 2012). Wenn die FN1-Domäne nicht vorhanden ist, kann nachweislich keine Polysialylierung stattfinden (Angata und Fukuda 2003; Colley 2010). Das erklärt auch, warum das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül (OCAM), welches zu 45 % eine identische Domänenstruktur zu NCAM aufweist, unter physiologischen Bedingungen nicht polysialyliert werden kann (Thompson *et al.* 2013).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Polysialylierung von NCAM-140 durch Polysialyltransferasen (in Anlehnung an Colley 2010; Schnaar *et al.* 2014 und Thompson *et al.* 2013)**

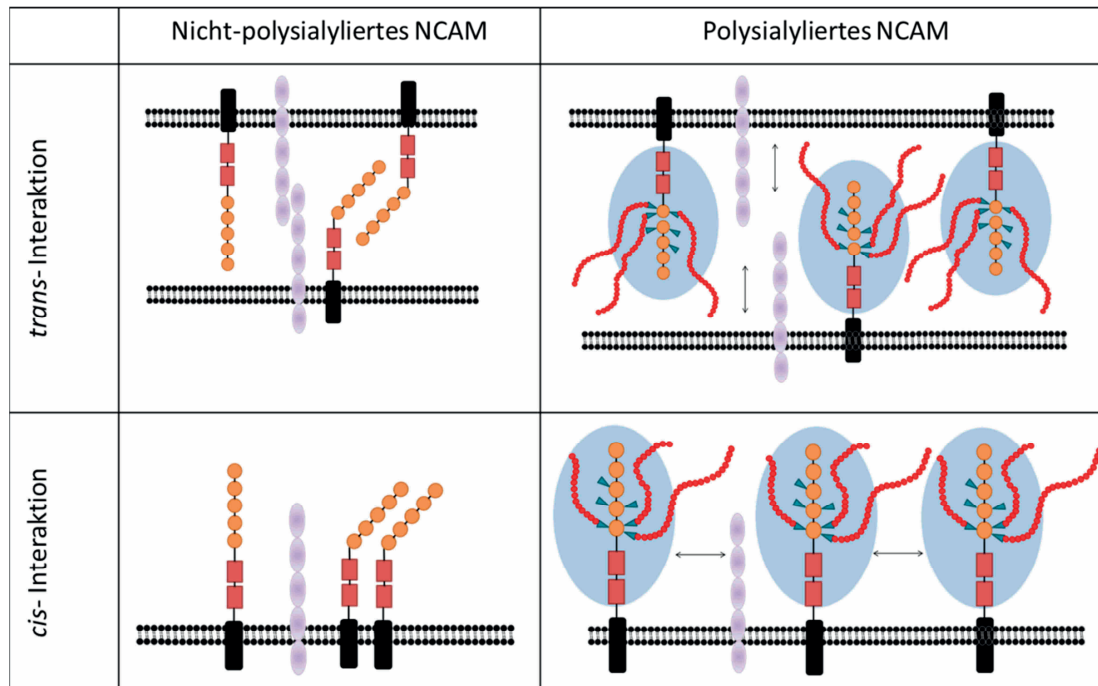
Die Abbildung zeigt die Interaktion der Polysialyltransferase mit der Fibronektin-III-ähnlichen Domäne FN1 und die dadurch begünstigte Polysialylierung an den beiden *N*-Glykosylierungsstellen ASN5 und ASN6 der Ig5-Domäne am Beispiel von NCAM -140.

Neben der Glykosylierung gibt es noch weitere Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation von NCAM. So ermöglicht die *Palmitoylierung* eine verstärkte Verankerung in der Zellmembran (Murray *et al.* 1987; Niethammer *et al.* 2002). Eine *Phosphorylierung* an einem Serin- oder Threoninrest begünstigt z. B. die Bindung an Spektrin, welches ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts ist (Sorkin *et al.* 1984; Sytnyk *et al.* 2002). Über eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von NCAM wird auch der NFκB-Signaltransduktionsweg beeinträchtigt (Little *et al.* 2001). Eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation ist die *Sulfatierung*, welche v. a. in der Zunge stattfindet und so die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Wechselwirkungen beeinflusst (Silberstein und Daniel 1982; Sorkin *et al.* 1984).

### 2.3.2 Biologische Bedeutung von PolySia-NCAM und PolySia

Aufgrund der hohen Anzahl an Carboxylgruppen und dem weit verzweigten Polymerisationsgrad, weist PolySia-NCAM polyanionische Eigenschaften auf. In diesem Zusammenhang bildet sich eine Hydrathülle um die jeweiligen Polymere (Block und Bettelheim 1970; Yang *et al.* 1994). Aus diesen Eigenschaften resultiert auch eine der wesentlichsten Funktionen von PolySia-NCAM: Die Beeinflussung der homophilen und heterophilen Zell-Zell-Interaktionen sowohl in *cis*- als auch

*trans*-Konformation einhergehend mit einem antiadhäsiven Effekt (Abbildung 7) (Gascon *et al.* 2007; Rutishauser 2008).



**Abbildung 7: Übersicht der biologischen Bedeutung von polysialyliertem NCAM (modifiziert nach Gascon *et al.* 2007; Schnaar *et al.* 2014)**

Eine *trans*-Interaktion von zwei NCAM-Molekülen ermöglicht eine Stabilisierung zwischen zwei benachbarten Zellen und die Wechselwirkung weiterer Moleküle wie z. B. Catherine (lila dargestellt). In der *cis*-Konformation besteht eine homophile Bindung zwischen NCAM-Molekülen einer Zelle. Durch den stark anionischen Effekt der Polysialinsäuren und der Ausbildung einer voluminösen Hydrathülle kommt es zu einem Verlust der NCAM-vermittelten Zelladhäsion. Dadurch werden auch verschiedene Signalkaskaden negativ beeinträchtigt.

Rein physikalisch ist polysialyliertes NCAM in der Lage, den interzellulären Abstand von benachbarten Zellen auf bis zu 10 nm zu vergrößern (Rutishauser *et al.* 1988; Johnson *et al.* 2004). Je nach Polysialylierungsgrad können so homophile Interaktionen variabel inhibiert oder komplett aufgehoben werden. Auch wird die Funktion anderer Adhäsionsmoleküle in der Zellmembran sowie verschiedener Signalkaskaden dementsprechend beeinträchtigt.

Während der embryonalen Entwicklung kommt PolySia-NCAM in vielen Geweben vor. Neben neuralen Gewebestrukturen wurde es weiterhin in Nieren und Leber, Muskulatur, Herz und Lunge nachgewiesen (Lackie *et al.* 1990, 1991, 1994), wobei derzeit noch nicht alle embryonalen Strukturen auf PolySia-NCAM untersucht

---

wurden. Die prominentesten Bedeutungen kommen der neuralen Zellmigration und -differenzierung, dem axonalen Nervenwachstum sowie der damit verbundenen synaptischen Plastizität während der embryonalen Neurogenese zu. Es lässt sich weiterhin im adulten Gewebe bei vorhandener Neurogenese und Plastizität PolySia-NCAM nachweisen (Kleene und Schachner 2004; Rutishauser 2008). Auch wird, je nach Krankheitsbild, ein erhöhtes oder verringertes Expressionsmuster von PolySia-NCAM bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Schizophrenie, bipolaren Störungen, Autismus und Epilepsie beschrieben und diskutiert (Mikkonen *et al.* 1998; Mikkonen *et al.* 1999; Vawter 2000; Brennaman und Maness 2010; Sato *et al.* 2016). PolySia-NCAM ist beispielsweise im Auge bei den retinalen Ganglienzellen an deren Orientierung und Ausrichtung beteiligt (Monnier *et al.* 2001). Nach neuesten Studien wird PolySia ein protektiver Effekt bei vaskulären Störungen im Rahmen altersbedingter Makkuladegeneration zugesprochen (Karlstetter *et al.* 2017). Diese Untersuchungen beruhen auf neuroprotektiven Eigenschaften von Siglec-11 (Wang und Neumann 2010) und antiinflammatorischen Effekten durch die Expression von PolySia auf Makrophagen (Shahraz *et al.* 2015). Siglecs (*sialic acid-binding Ig superfamily lectins*) gehören zu der Ig-Superfamilie und sind in der Lage Sialinsäurereste zu erkennen und zu binden. Eine weitere Beeinflussung des Immunsystems ist bereits seit 2013 im Bereich von Lungengewebe bekannt. Hierbei führt polysialyliertes, lösliches NCAM-110 zu einer Modulation des Immunsystems. In diesem Zusammenhang verringert wohl PolySia die zytotoxischen Eigenschaften der Histone und dem durch Granulozyten sezernierten *neutrophil extracellular traps* (NET) (Ulm *et al.* 2013).

Weiterhin wird PolySia-NCAM eine pathologische Bedeutung im Bereich der Onkogenese und Tumormetastasierung zugesprochen. So konnte bisher bei Pankreaskarzinomen (Schreiber *et al.* 2008), Neuroblastomen, Rhabdomyosarkomen (Gluer *et al.* 1998) und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Tanaka *et al.* 2000) sowie des Wilms Tumors (Roth *et al.* 1988) eine Expression von PolySia-NCAM nachgewiesen werden. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften können sich entartete Zellen durch PolySia leichter aus ihrem Primärtumor lösen. Schlussfolgernd führt dies zu einer Begünstigung der Metastasierung (Roth *et al.* 1988; Cheung *et al.* 2006; Daniel *et al.* 2001).

---

Auch kann PolySia eine Reservefunktion für verschiedene Botenstoffe übernehmen. Dabei wird mit z. B. BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (Neurotrophin-3) oder NGF (*nerve growth factor*) ein Komplex eingegangen. Bei Bedarf können die verschiedenen Transmitter pulsatil erneut freigesetzt werden (Sato und Kitajima 2011).

Im Bereich der Reproduktionsbiologie konnte in Studien unserer Arbeitsgruppe bei männlichen Individuen PolySia auf Spermien nachgewiesen werden. Aufgrund der oben beschriebenen zytoprotektiven Effekte im Bereich des Immunsystems, wurde hier ein ähnlicher Mechanismus diskutiert (Simon *et al.* 2013). Zum einen wurde bei der postnatalen Entwicklung des Nebenhodens eine Herunterregulierung der Polysialylierung der glatten Muskelzellen der Nebenhodenkanäle beobachtet (Simon *et al.* 2015). Zum anderen nimmt bei Tieren mit saisonaler Spermatogenese, wie dem Rehbock, die Polysialylierung der Sertolizellen während der Initialisierung im Frühling und zur Terminierung im Winter zu (Hänsch *et al.* 2014). Daher ist davon auszugehen, dass PolySia-NCAM stärker bei Prozessen im Reproduktionstrakt involviert ist, als bis *dato* vermutet.

Für weibliche Individuen lieferten Elisabeth Bock und Mitarbeiter (Møller *et al.* 1991) erste Hinweise auf polysialyliertes NCAM im Bereich ovariellen Gewebes. Die biologische Funktion und Bedeutung wurde seither nicht beschrieben.

---

## 2.4 Der feline und murine weibliche Reproduktionstrakt

### 2.4.1 Anatomischer und histologischer Aufbau von Eileiter und Eierstock

#### 2.4.1.1 Der Eileiter

Der Eileiter (*Salpinx*, *Tuba uterina* oder *Ovidukt*) beginnt als paariges, englumiges Organ am Eierstock (*Ovar*) und verläuft in seiner bindegewebigen Aufhängung, dem *Mesosalpinx*. Der *Mesosalpinx* bildet gemeinsam mit dem *Ligamentum ovarii proprium* und dem *Mesovarium* die *Bursa ovarica*, in der der Eierstock zum Liegen kommt. Anatomisch unterteilt wird der Eileiter in drei Abschnitte. Beginnend mit dem trichterförmigen *Infundibulum tubae uterinae*, welcher sich über das Ovar stülpt. Das Infundibulum weist deutliche Schleimhautfalten auf, die am Rande in feine fransenartige Ausläufer (*Fimbriae tubae*) münden. Diese sind teilweise mit dem Ovar verklebt. Über das *Ostium abdominale tubae uterinae*, im Zentrum des Infundibulum, gelangt die Eizelle nach erfolgtem Eisprung in den Ovidukt. Im weiteren Verlauf stellt sich die *Ampulla tubae uterinae* dar. Dieser Abschnitt ist im Vergleich zu dem darauf folgenden, enggewundenen *Isthmus tubae uterinae* leicht erweitert und markiert den Ort der Befruchtung der Eizelle. Insgesamt verbleibt die Eizelle im Eileiter der Katze 4 bis 8 Tage und bei der Maus 3 bis 4 Tage. Dabei legt sie eine Wanderstrecke von 40 bis 50 mm bei der Katze (Leiser 2004b) und von ca. 10 mm bei der Maus (Wolff 2012) zurück. Über das *Ostium uterinum tubae* erschließt sich die Verbindung zur Gebärmutter (*Uterus*) (Leiser 2004a; König *et al.* 2014).

Histologisch lässt sich die Wand des Eileiters in drei Schichten unterteilen. Luminal befindet sich die Schleimhaut (*Tunica mucosa*). Sie wird aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel bestehend aus Flimmer- und Drüsenzellen gebildet. Diese beiden Zellarten sind in ihrer Funktion stark an den Sexualzyklus gebunden. Die Kinozilien dieser Flimmerzellen dienen mit ihrer rhythmischen Bewegung dem Transport der Zygote in Richtung Uterus. Die Drüsenzellen hingegen sezernieren einen für die Eizelle und die Spermien nährstoffreichen Mukus. Je nach Lokalisation im Eileiter weist die *Tunica mucosa* eine unterschiedliche Faltung auf. Im Bereich der *Ampulla tubae uterinae* besteht daher eine starke Auffaltung zur Oberflächenvergrößerung in Form von Längs-, Sekundär- und Tertiärfalten. Diese nehmen fortlaufend im Bereich des *Isthmus tubae uterinae* ab. Proportional nimmt

---

die der *Tunica mucosa* aufliegende Muskelschicht (*Tunica muscularis*) zu. Die zirkulär angeordneten glatten Muskelfasern ermöglichen eine kontraktile Bewegung des Eileiters und fördern so den Transport der Eizelle. Eine einschichtige *Tunica serosa* überzieht peritoneal den Eileiter (Liebich 2004).

#### **2.4.1.2 Der Eierstock**

Die keimbereitenden, paarigen Organe, die Eierstöcke (*Ovarien*), bedienen bei adulten Tieren gleich zwei Funktionen. Zum einen die Bildung befruchtungsfähiger Eizellen und zum anderen die Synthese von Geschlechtshormonen. Beide Vorgänge sind an zyklische Einflüsse und strukturell sowie funktionell an den Follikel gebunden. Das Ovar unterliegt endokrin den Rückkopplungsmechanismen des Hypothalamus und der Adenohypophyse.

Topographisch liegen die Ovarien dorso-caudal der Nieren und sind oval-sphärisch geformt. Ihre Oberfläche ist feinhöckrig und ihre Länge beträgt bei der Katze ca. 8 bis 9 mm und bei der Maus ca. 1 bis 3 mm. In dem *Mesovarium* sind Nerven, Blut- und Lymphgefäße, die über den *Hilus ovarii* die Ovarien versorgen, lokalisiert. Im Querschnitt des Ovars stellt sich im Inneren eine lockere, gefäßreiche Marksubstanz, die *Medulla ovarii* (*Zona vasculosa* oder *Rete ovarii*), und eine dichter erscheinende äußere Rindensubstanz, *Cortex ovarii* (*Zona parenchymatosa*), dar. Bei der Maus ist diese Aufteilung der einzelnen Schichten nur schwach ausgeprägt. Aufgrund der kurzen Trächtigkeitsdauer und dem schnellen Eintritt der meiotischen Teilung zu Beginn der Ausbildung der Gonaden während der embryonalen Entwicklung kann kaum zwischen *Medulla* und *Cortex ovarii* unterschieden werden (Schnorr und Kressin 2006). Das *Rete ovarii* ist nicht nur sekretorisch nutritiv aktiv sondern unterhält auch Kontakt zu den wachsenden Granulosazellen (Kressin *et al.* 2011). Weiterhin bleiben feine Zytoplasmafortsätze des *Rete* als Verbindung mit den Keimzellen bestehen, so dass vermutet wird, dass das *Rete ovarii* an der Follikulogenese maßgeblich beteiligt ist (Byskov 1975; Wenzel und Odend'hal 1985).

Die derbe, ca. 100 µm dicke *Tunica albuginea* umschließt nach dem Keimdrüsenepithel das Organ von außen. Das Keimdrüsenepithel stellt *post partum*

---

ein einschichtiges, isoprismatisches Epithel dar. Es geht am *Hilus ovarii* in das *Mesovarium* über.

### **2.4.1.3 Oogenese**

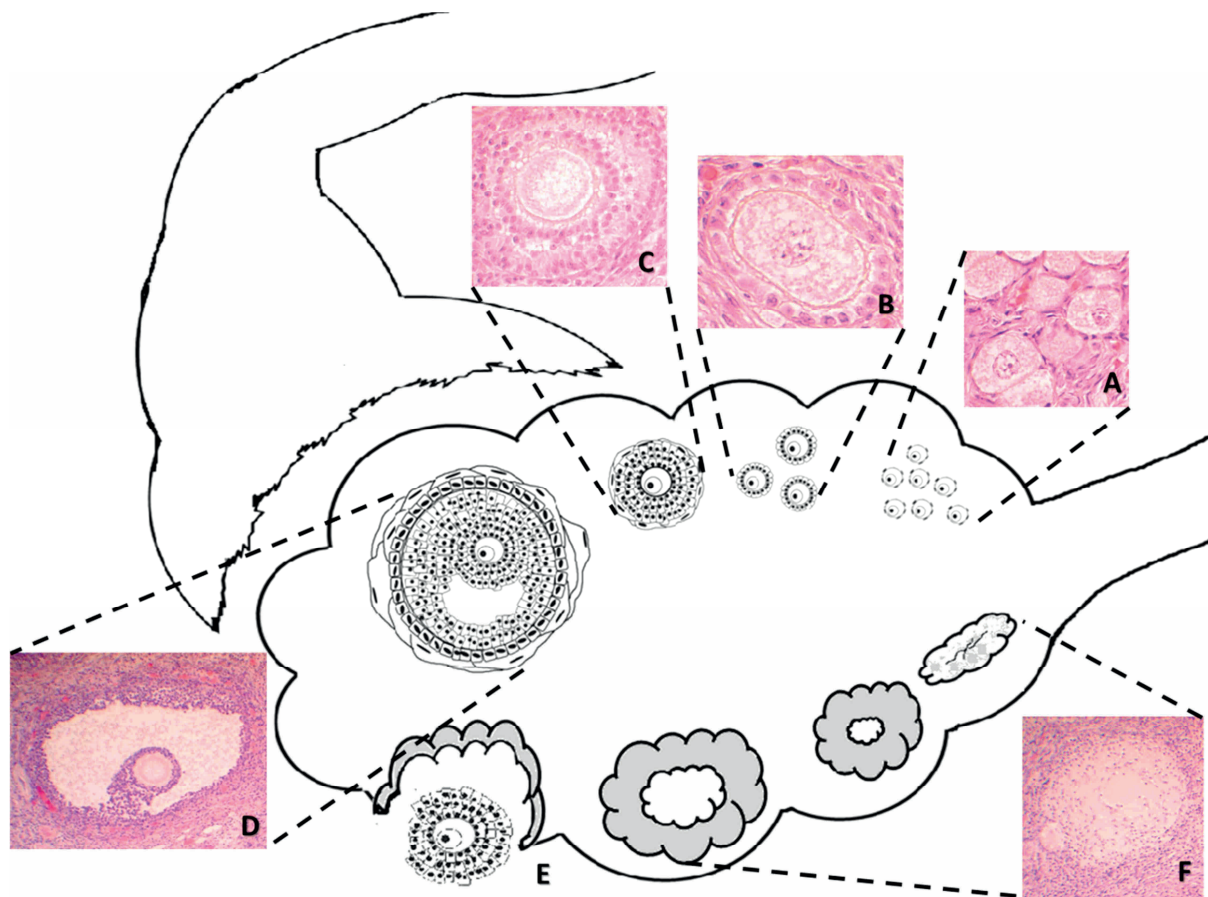
Die Eireifung (*Oogenese*) bezeichnet die Entwicklung der weiblichen Gameten – den Oozyten. Die Oozyte ist die größte eukaryotische Zelle mit 130 µm (Katze). Die in die Keimleiste eingewanderten Urkeimzellen, die primordiale Keimzellen, differenzieren zu Ovogonien und vermehren sich synchron mittels mitotischer Teilung. Eine dünne Schicht somatischer Begleitzellen umhüllt die Ovogonien. Aus diesen somatischen Zellen differenzieren später die Follikelepithelzellen. Über interzelluläre Brücken bleiben die Ovogonien miteinander in Verbindung. So kann ein Austausch von Wachstumsfaktoren und Zellorganellen stattfinden und die Synchronität der Entwicklung ist gewährleistet. Mit dem Ende der Ovogonienteilung treten die Keimzellen in die Prophase der Meiose I (1. Reifeteilung) ein. Bei der Katze beginnt die Entwicklung von Ovogonien zu Oozyten in etwa mit dem 40 bis 50. Tag der Trächtigkeit und endet ca. acht Tage *post partum*. Bei der Maus hingegen beginnt die mitotische Teilung bereits beim ersten Erkennen der Gonaden. Daher ist die Entwicklung der Oozyten frühzeitig abgeschlossen.

Im letzten Stadium der Prophase I lösen sich die Interzellularbrücken auf und die Meiose arretiert. Die Oozyten I sind umhüllt von ihren flachen Follikelzellen, ergeben so den Primordialfollikel und sind in dem *Cortex ovarii* lokalisiert.

Die Fortsetzung der Meiose (2. Reifeteilung) erfolgt erst wieder im reifen Tertiärfollikel des adulten Ovars und endet mit der Penetration des Spermiums. Sollte keine Befruchtung stattfinden, stirbt die Eizelle ab (König *et al.* 2014; Kressin *et al.* 2011).

### **2.4.1.4 Follikulogenese**

Ein Follikel besteht in der Regel aus jeweils einer Eizelle und dem dazugehörigen Follikelepithel. Die jeweiligen Follikel können einer Ruhe- und Wachstumsphase sowie der Atresie zugeordnet werden. Die Follikulogenese bezeichnet im Allgemeinen die Entwicklung des ovariellen Follikels über die Stadien des Primordial-, Primär-, Sekundär und Tertiärfollikel bzw. Graafschen Follikel (Abbildung 8) (Pedersen und Peters 1968; Bristol-Gould und Woodruff 2006).



**Abbildung 8: Schematische Übersicht des Ovars am Beispiel der Katze**

Die Abbildung zeigt den Übergang des Ovidukts zum Ovar sowie die einzelnen Stadien der Follikulogenese. (A) Darstellung der im Rindenbereich lokalisierten Primordialfollikel. (B) zeigt Primärfollikel mit ihrem einschichtigem Epithel und der zentral gelagerten Oozyte. Im weiteren Verlauf entsteht durch mitotische Teilung ein mehrschichtiges Follikelepithel und bildet so (C) den Sekundärfollikel. Im Zuge weiteren Wachstums entsteht der (D) Tertiärfollikel mit einem ausgeprägten *Antrum folliculare*, einem *Cumulus oopherus* und einer mehrschichtigen Follikelwand sowie einer *Theka follicularis interna* und *externa*. (E) markiert den frisch ovulierten Graaf'schen Follikel. (F) Nach der Ovulation entsteht über das *Corpus luteum*, welches sich durch den hormonellen Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zurückbildet das *Corpus albicans*. (H. E.-Färbung feliner paraffinierter Serienschritte, 10 × und 40 × 0,25 Objektiv, s. a. 3.5.3.1)

Die hormonelle Steuerung verläuft über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Die beiden pulsartig sezernierten gonadotropen Hormone FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) werden über das aus dem Hypothalamus stammende Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) reguliert. Gleichzeitig hemmt die zunehmende Konzentration von LH und FSH über eine negative Rückkopplung die Freisetzung von GnRH (Rüsse 2015). FSH bewirkt eine

---

Steigerung der Produktion von Östrogen in der Granulosazellschicht und LH bewirkt die Ovulation und Bildung des Gelbkörpers.

Die **Primordialfollikel** sind lokalisiert im Rindenbereich des Ovars und stellen das undifferenzierte Ruhestadium der Follikel dar. Die primären Oozyten (ca. 20 bis 30 µm Durchmesser) bleiben in diesen Follikeln über Jahrzehnte aktivierungsbereit. Sie werden umschlossen von einem ebenfalls nicht differenzierten, sehr flachen Follikelepithel. Die Primordialfollikel stehen lediglich über vereinzelte desmosomenartige Verbindungen miteinander in Kontakt (Carrizo, JR *et al.* 2010; Kressin *et al.* 2011; Rüsse und Sinowatz 2015).

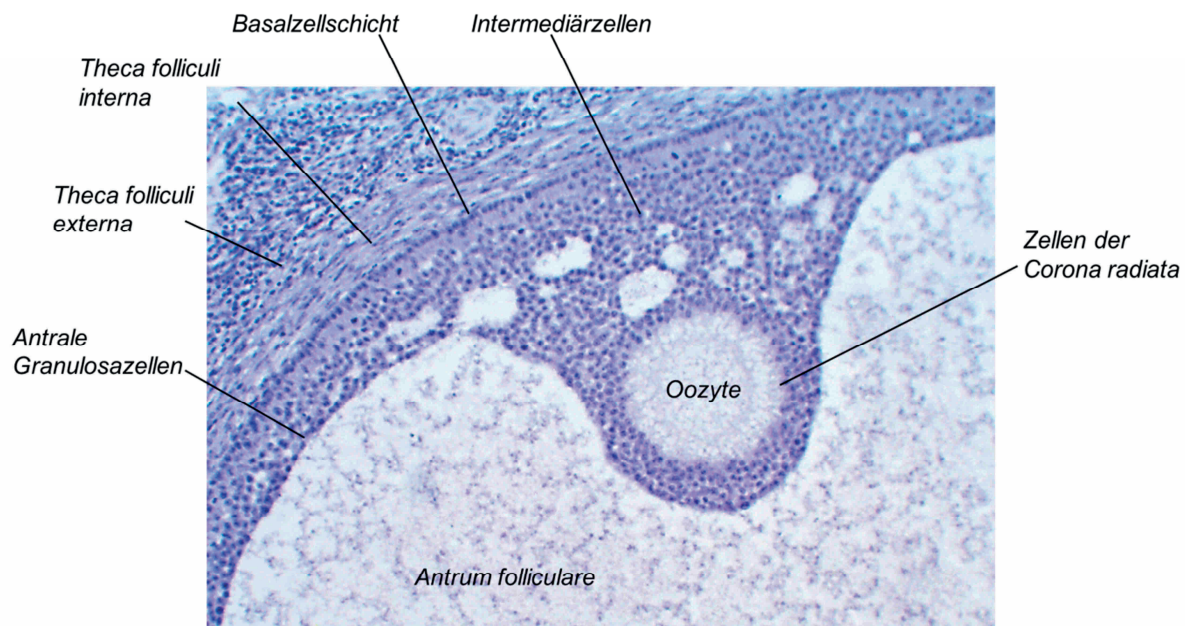
Nach der Aktivierung beginnen Follikelepithelzellen und Eizelle zu wachsen. Es entsteht der **Primärfollikel**. Die Ruhephase des Follikels ist beendet und die Wachstumsphase beginnt. Er ist durch ein einschichtiges, isoprismatisches Epithel gekennzeichnet (Rüsse und Sinowatz 2015).

Einhergehend mit der Aktivierung der Eizelle beginnt eine erhöhte mitotische Aktivität der Follikelepithelzellen. Es entsteht ein ovaler bis sphärischer **Sekundärfollikel** mit einem mehrschichtigen, isoprismatischen Epithel. Dabei nimmt die Eizelle an Größe deutlich zu. Weiterhin entsteht die *Zona pellucida* zwischen Oozyte und Follikelepithel (Rüsse und Sinowatz 2015). Diese Schicht besteht aus sauren Mucopolysacchariden, deren Zusammensetzung speziesabhängig variiert. Der Durchmesser der *Zona pellucida* ist abhängig von dem Zeitpunkt des Follikelwachstums und variiert zwischen 9 bis 14 µm. Die *Zona pellucida* ist bei der späteren Befruchtung maßgeblich für die Akrosomenreaktion verantwortlich und verhindert eine mögliche Polyspermie und das Eindringen von speziesfremden Spermien in die Oozyte (Sinowatz *et al.* 2001; Braun *et al.* 2009; Rüsse und Sinowatz 2015). In der Endphase des wachsenden Sekundärfollikels beginnt sich das mehrschichtige Follikelepithel zu differenzieren. Die Granulosazellen entstehen. Über zahlreiche Mikrovilli, die von der Oozyte ausgehen und die *Corona radiata* durchziehen, stehen die Zytoplasmen der Granulosazellen und der Oozyte stets in Kontakt.

Die Aufgaben von Granulosazellen sind je nach Zykluszeitpunkt variabel und daher recht vielschichtig. Sie übernehmen die nutritive Versorgung der Eizelle, sezernieren den *Liquor folliculare* und formen so das *Antrum folliculare*, sie bilden die

Auskleidung des wachsenden Follikels und sind Bestandteil des späteren *Cumulus oopherus*. Weiterhin sind sie in der Lage Östrogene zu bilden. Anteilig entsteht aus ihnen *post ovulationem* der Gelbkörper (Kressin *et al.* 2011; Rüsse und Sinowatz 2015).

Im weiteren Verlauf des Follikelwachstums bildet sich durch das Sezernieren des *Liquors folliculi* ein weites Lumen innerhalb des Follikels, wodurch mit zunehmendem Ausmaß die Eizelle an den Rand des Follikels gedrängt wird. Dieses Lumen stellt das *Antrum folliculare* dar. Der nun entstandene **Tertiärfollikel** (antraler Follikel, „Blässchenfollikel“) ist durch das *Antrum folliculare*, eine mehrzellige Granulosazellschicht und die Bildung eines *Cumulus oopherus* (CO), eine Basalmembran und eine strukturierte *Theca folliculi interna* und *externa* gekennzeichnet (Abbildung 9) (Leiser 2004a; Rüsse und Sinowatz 2015).



**Abbildung 9: Histologischer Aufbau des Tertiärfollikels am Beispiel der Katze**

Der Tertiärfollikel ist gekennzeichnet durch die Ausbildung des *Antrum folliculare*, die Formierung der Granulosazellen zu dem *Cumulus oopherus* und der Formierung der *Theca folliculi interna* und *externa*. Im *Stratum granulosa* lassen sich vier Zelltypen unterscheiden: Die Basalzellen, die Intermediärzellen und die Zellen der *Corona radiata* sowie die antral gelegenen Granulosazellen (Färbung mittels Hämatoxylin, feline paraffinierte Serienschnitte, 40 × 0,25 Objektiv, s. a. 3.5.3.1).

In diesem Entwicklungsstadium können vier Zelltypen des *Stratum granulosa* unterschieden werden. Antral gelegen befinden sich die Granulosazellen, die den

---

*Liquor folliculare* sezernieren. Im Bereich des *Cumulus oopherus* können hochprismatische Basalzellen, polygonale Intermediärzellen und die hochprismatischen Zellen der *Corona radiata* Zellen unterschieden werden. Letztere stehen stets über ihre Zellfortsätze und Desmosomen mit der Oozyte in Verbindung und übernehmen die nutritive Versorgung der Eizelle. Besonders bei der Katze ist die namensgebende Streifenbildung der Zellgrenzen deutlich zu erkennen (Kohata *et al.* 2007; Rüsse und Sinowatz 2015).

Die Basalzellen liegen der Basalmembran direkt an und stellen die äußerste Schicht des *Stratum granulosa* dar. Sie übernehmen die Östrogenproduktion des Follikels und können somit das Testosteron, welches aus den Zellen der *Theca interna* stammt, aromatisieren (Rüsse und Sinowatz 2015).

Die Intermediärzellen fungieren als Vermittler zwischen beiden Zellschichten und können Östrogene und Nährstoffe weitertransportieren (Rüsse und Sinowatz 2015).

Die *Theca interna folliculi* wird aus ehemaligen Zellen des Ovarstromas gebildet. Sie sind epitheloider Form, weisen viele eingelagerte Lipidtropfen auf und sind in der Lage Testosteron zu produzieren. In dieser Schicht wird auch ein feines Kapillarnetz ausgebildet, welches den Follikel umschließt und mit Nährstoffen versorgt. Die *Theca folliculi externa* besteht aus Myofibroblasten und Fibroblasten. In ihr kommen Nerven und Gefäße zum Liegen (Burden 1972; Rüsse und Sinowatz 2015).

Als **Graafscher Follikel** wird der sprungreife Tertiärfollikel bezeichnet. Der Follikel ist in diesem Stadium makroskopisch erkennbar und wölbt sich über die Ovaroberfläche hinaus. Die Eizelle ist von der Follikelwand gelöst und schwimmt mit ihrer zugehörigen *Corona radiata* und der *Zona pellucida* frei im *Antrum folliculare* (Liebich 2004; Rüsse und Sinowatz 2015).

Die Ovulation erfolgt abhängig von der Konzentration des lutenisierenden Hormons (LH) und des Follikel stimulierenden Hormons (FSH) entweder spontan, wie bei u. a. dem Menschen, der Maus und dem Rind oder wie bei z. B. Katzen, Frettchen und Kaninchen induziert. Bei der induzierten oder auch provozierten Ovulation der Katze wird ein entsprechender mechanischer Stimulus benötigt, um diese auszulösen (Shille *et al.* 1983; Tsutsui und Stabenfeldt 1993). Die Ovulation bzw. der LH-Peak erfolgt somit bei diesen Tieren reflektorisch durch den Deckakt.

---

Die hormonelle Regulation unterliegt sowohl dem Hypothalamus, als auch der Hypophyse und den hormonproduzierenden Zellen des Follikels. Bei der Ovulation greifen proteolytische Enzyme der Granulosazellen das *Stratum granulosum* und die bindegewebigen Strukturen aufgrund lokaler Anämie an (Bjersing und Cajander 1975). Weiterhin werden die Beteiligung von Myozyten (Okamura *et al.* 1972) und die gesteigerte Gefäßpermeabilität durch die Einwirkung von Plasminogenaktivatoren (Beers *et al.* 1975) diskutiert. Präovulatorisch beginnen sich die Zellfortsätze der Granulosazellen zurückzuziehen und die *gap junctions* werden zunehmend abgebaut (Okuda *et al.* 1983; Kohata *et al.* 2007).

Nach der Ruptur der Follikelwand wird die Oozyte durch das *Infundibulum tubae uterina* in den Eileiter aufgenommen (Kressin *et al.* 2011; Hees 2012).

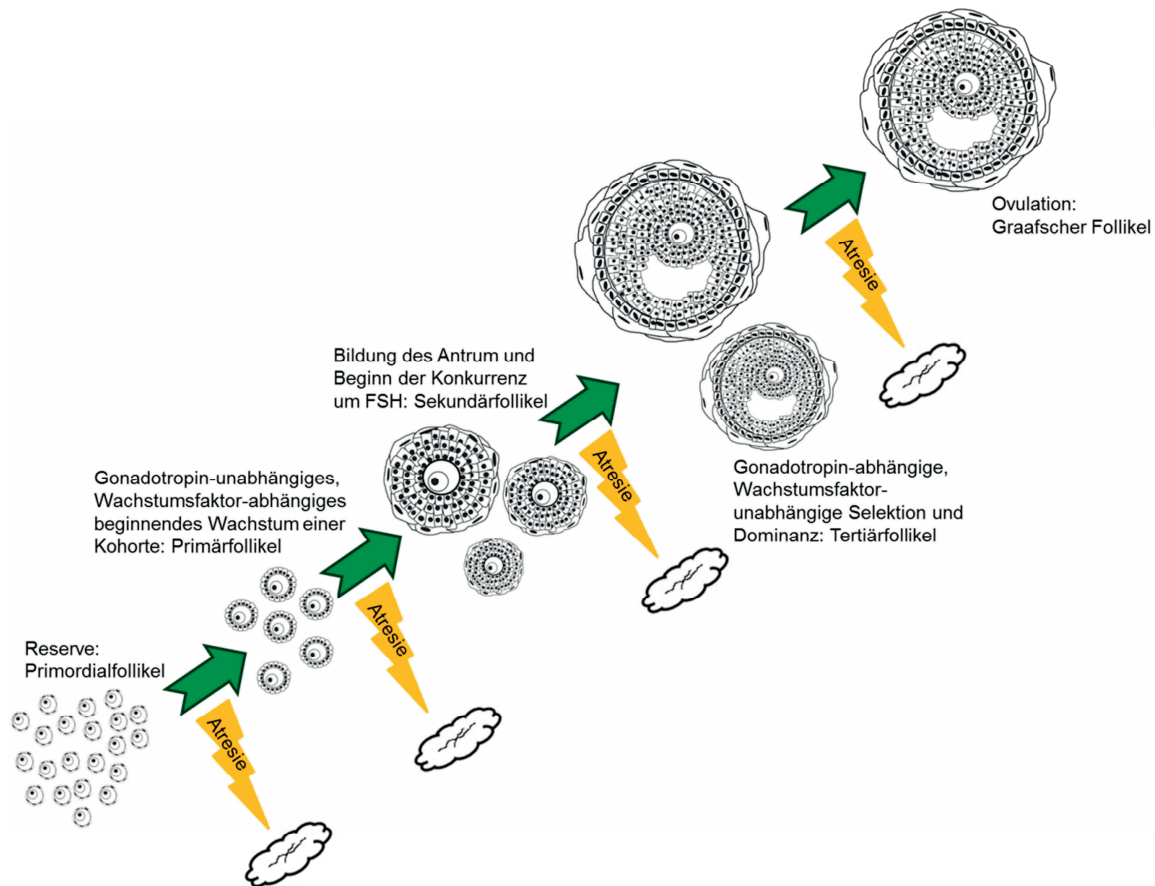
Aus den Resten des ehemaligen Follikels bildet sich nach der Ovulation nun über die Zwischenstufe des ***Corpus haemorrhagicum*** das ***Corpus luteum*** (Gelbkörper) (Leiser 2004a). Die Follikelphase geht somit in die Lutealphase über. Bei Tierarten mit einer induzierten Ovulation rupturieren gewöhnlich nicht alle Follikel simultan. Daher können auch aus noch intakten Follikeln Gelbkörper entstehen (Dawson 1941; Hees 2012). Im Unterschied zu Tierarten mit spontan ablaufenden Ovulationen treten bei Tierarten mit induzierten Ovulationen nur Gelbkörper während der Gravidität oder einem pseudogravidem Zyklus auf. Verbleibende hämorrhagische Anteile und Fibroblasten dienen als morphologische Grundlage für die Luteinzellen, die sich unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) aus verbleibenden Granulosa- und Thekazellen differenzieren (Niswender *et al.* 2000; Leiser 2004a; Jewgenow *et al.* 2012). In ihrer Funktion als steroidbildende Zellen und der damit verbundenen Einlagerung von lipoiden Stoffen erscheinen die Luteinzellen gelblich. Das *Corpus luteum* ist maßgeblich für den Erhalt der Trächtigkeit verantwortlich, indem es als inkretorische Drüse fungiert und das Hormon Progesteron sezerniert. Progesteron bereitet den Uterus auf eine erfolgreiche Implantation einer befruchteten Eizelle vor und verhindert die neue Bildung sprungreifer Follikel. Neben Progesteron werden unter Anderem geringe Mengen an Östrogen und Androgen gebildet (Niswender *et al.* 2000; Jewgenow *et al.* 2012). Bleibt eine Gravidität aus, degeneriert der Gelbkörper und verliert mit der Zeit die charakteristische

---

Gelbfärbung. Dieses narbige Stadium wird als ***Corpus albicans*** bezeichnet (Rüsse 2015).

#### **2.4.2 Follikelatresie**

Zu Beginn der Follikelreifung startet eine ganze Kohorte an Primordialfollikeln ihr weiteres Wachstum. Allerdings erliegen die meisten dieser Gruppe der Involution und erreichen nicht das Stadium des sprungreifen Tertiärfollikels (Abbildung 10). Bei der Atresie sind nicht nur einzelne Zellen oder Zellgruppen betroffen, sondern gleich der ganze Follikel (Rodgers und Irving-Rodgers 2010). Dies dient der Selektion des dominanten Follikels. Aufgrund der hormonellen Steuerung können je nach Stadium Hormone und Wachstumsfaktoren die Follikelatresie induzieren oder hemmen. Physiologisch zählen hierzu FSH, LH, verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z. B. IGF-1, TNF- $\alpha$  oder Östrogene und Androgene (Rao 1978; Kaipia und Hsueh 1997; Palmerini *et al.* 2016). Für *in vivo* Stimulationen mit Gonadotropinen hat sich die Verwendung von analytisch reinem porcinem LH oder FSH bei Wildkatzen und Hauskatzen bewährt (Pope *et al.* 1998; Crichton *et al.* 2003; Pope 2004; Pelican *et al.* 2006). Crichton *et al.* konnte zeigen, dass die Aminosäuresequenzen der porcinen Gonadotropine vermehrt Homologien zu denen von Tigern aufweisen (Crichton *et al.* 2003). Die heranwachsenden Follikel reagieren von Anfang an auf die Stimulation mit FSH. Jedoch wird eine von Gonadotropin unabhängige und abhängige Wachstumsphase unterschieden. Das Wachstum des präantralen Follikels ist weitgehend unabhängig von Gonadotropin, während der antrale Follikel eine Gonadotropin-abhängige Entwicklung aufweist.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Follikelwachstums (modifiziert nach McGee und Hsueh 2000; Webb *et al.* 2004)**

In der präantralen Reifung findet ein von Gonadotropin unabhängiges Wachstum statt. Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der TGF $\beta$ - und der IGF-Familie scheinen für die Initiation und der frühen Follikelwachstumsphase bedeutend. Eine Beeinflussung von FSH ist hierbei möglich. Hingegen sind während dem Endstadium des Follikelwachstums Gonadotropine essentiell und Wachstumsfaktoren nehmen eine unterstützende Funktion ein. Zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien einer Kohorte erliegt ein Großteil der Follikelatresie.

Die finale Selektion hängt mit einer Abnahme der FSH Rezeptoren in der Follikelwand, der gesteigerten Östrogenproduktion und einer Freisetzung von Inhibin des dominanten Follikels zusammen. Hierdurch wird die Produktion von FSH auf zwei Wege gesenkt, sodass der FSH-Spiegel gerade noch für den dominanten Follikel, nicht aber für seine Konkurrenten ausreichend ist (Webb *et al.* 2004).

Bei präantralen Follikeln beginnt die Atresie in der Oocyte. Diese beginnt zu schrumpfen und zeigt eine deutliche Vesikelbildung. Infolgedessen erscheint der Kontakt zu den Follikel epithelzellen aufgelockert. Bei antralen Follikeln hingegen beginnt die Involution durch eine gesteigerte Apoptoserate der Granulosazellen

---

sowie der Thekazellen. Dabei wird die Granulosazellschicht zunächst dünner, zeigt gehäuft Pyknose, Karyohexis und Karyolyse und es treten vermehrt Apoptosekörperchen („*apoptotic bodies*“) auf. In einem weiteren Schritt erscheint die Granulosazellschicht aufgelockert und vereinzelt sind Granulosazellen frei im *Antrum folliculare* zu erkennen. Erst im Anschluss sind Degenerationsanzeichen der Oozyte erkennbar (3.5.5) (Jolly 1997; Rodgers und Irving-Rodgers 2010). Bei der Involution der Tertiärfollikel ist die Verdickung der Basalmembran zu der sog. „Glashaut“ charakteristisch (Liebich 2004). Schlussendlich wird bei beiden Atresieprozessen der Follikelrest von Fibroblasten unterwandert. Durch Sezernierung von Kollagen bleibt ein narbiger Rückstand bestehen (Jolly 1997; Rodgers und Irving-Rodgers 2010; Rüsse 2015). Zwischenzeitlich bildet sich aus der *Theka interna* das Thekaorgan, welches mit seinen interstitiellen Zellen zur Östrogenproduktion beiträgt (Erickson *et al.* 1985).

Zusammengefasst gilt die Follikelatresie als komplexer Vorgang, welcher auf Apoptose, Resorption und Migration von Makrophagen und Fibroblasten beruht (Jolly 1997; Rodgers und Irving-Rodgers 2010; König *et al.* 2014).

## **2.5 Zyklus der Hauskatze**

Die Hauskatze (*felis catus*) wird im Durchschnitt mit 7 bis 10 Monaten geschlechtsreif, wobei einige Kurzhaarrassekatzen wie z. B. Orientalen deutlich früher (ca. 3 Monaten) geschlechtsreif werden als Langhaarrassekatzen, wie z. B. Perserkatzen (ca. 12 bis 16 Monaten) (Tsutsui und Stabenfeldt 1993; Rüsse 2015). Der genaue Zeitpunkt der Geschlechtsreife ist somit abhängig von der Rasse, dem individuellen Gewicht und der Tageslichtlänge. So treten Katzen, die erst im Herbst geboren wurden erst in dem darauf folgenden Herbst in die Pubertät ein (Rüsse 2015). Katzen verfügen über einen saisonal, polyöstrischen Sexualzyklus. Das bedeutet, dass während der Paarungszeit mehrere Zyklen hintereinander ablaufen und während der dunkleren Jahreszeit (Tageslichtlänge unter 12 bis 14 Stunden) von einer anovulatorischen Phase unterbrochen werden. Jedoch kann bei Hauskatzen, die auch in den Wintermonaten künstlichem Licht ausgesetzt sind, aufgrund der verlängerten Tageslichtlänge der Zyklus asaisonal ablaufen (Tsutsui und Stabenfeldt 1993). Die Paarungszeit beginnt ohne künstliche Beeinflussung meist im Januar oder Februar und endet im August bis September, sofern keine

---

Ovulation bzw. Befruchtung stattfindet (Shille *et al.* 1979; Rüsse 2015). Dem Frettchen ähnlich weist die Hauskatze eine induzierte Ovulation auf. Dabei wird *post copulationem* reflektorisch GnRH freigesetzt, welches zu einem Anstieg von LH und somit zu einer Ovulation führt (Brown 2006). Allerdings werden auch einige Sonderfälle beschrieben, bei denen es zu spontanen Ovulationen kommt (Lawler *et al.* 1993; Gudermuth *et al.* 1997). Hierbei ist jedoch anzunehmen, dass das Belecken der ödematisierten Vulva als vergleichbarer Stimulus gilt und die Katze die Ovulation so selbstinduziert. Auch können Nähe und Interaktion des Besitzer oder mit anderen Tieren im Haushalt als induzierende Stimuli gewertet werden.

Etwa zwei Stunden *post copulationem* hat der LH-Wert sein Maximum (LH-Peak) erreicht und sinkt binnen acht Stunden wieder auf sein Basalniveau. 24 Stunden nach der Bedeckung erfolgt die Ovulation. Die Höhe des freigesetzten GnRH und die damit verbundene Höhe des LH-Peaks hängt auch mit der Intensität und Häufigkeit des vaginal-zervikalen Reizes zusammen (Shille *et al.* 1979) und des Zeitpunkts der Kopulation während des Östrus. Somit wird indirekt auch die Anzahl der ovulierenden Follikel beeinflusst (Wildt *et al.* 1980). In manchen Fällen ist eine einmalige Bedeckung nicht genügend, um einen ausreichenden LH-Peak zu erzielen (Concannon 1980). Daher können Katzen auch von mehreren Katern trächtig sein. In anderen Studien konnte hingegen nachgewiesen werden, dass bei einer Bedeckung am dritten Tag des Östrus die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung am Größten ist (Shille *et al.* 1983; Tsutsui und Stabenfeldt 1993). Hieraus geht hervor, dass zu diesem Zeitpunkt eine einmalige Kopulation ausreichend ist, um genauso viele Ovulationen auszulösen, wie vergleichsweise bei einer viermaligen Bedeckung zu Beginn des Östrus (Wildt *et al.* 1981).

Der Zyklus untergliedert sich bei der Katze in *Proöstrus* (Vorbrunst), *Östrus* (Brunst), *Metöstrus* (Nachbrunst), *Diöstrus* (Zwischenbrunst) und *Anöstrus*.

Der *Proöstrus* dauert ein bis drei Tage an. Währenddessen wachsen zwei bis vier Tertiärfollikel heran. Die Katzen zeigen aufgrund der bevorstehenden Brunst erste Verhaltensänderungen wie z. B. vermehrtes Kopfreiben oder Rollen über den Boden sowie vermehrten Harnabsatz. Die Weibchen wirken auf Kater bereits anziehend, eine Bedeckung wird allerdings noch nicht geduldet. Der *Proöstrus* endet mit der Duldung des Katers (Brown 2011; Rüsse 2015).

---

Der *Östrus*, bei der Katze Rolligkeit genannt, dauert im Frühjahr fünf bis vierzehn Tage und gegen Ende der Saison ein bis sechs Tage an (Rüsse 2015). Diese Phase ist durch eine deutliche Verhaltensänderung markiert. Die Katzen zeigen u. a. verstärkte Lautäußerungen, auf den Rücken rollen, Herabsenken des Rückens, Schwanzheben bzw. dessen zur Seite stellen sowie häufiger Harnabsatz (Shille *et al.* 1979; Tsutsui und Stabenfeldt 1993; Rüsse 2015).

Kommt es nicht zu einer Bedeckung und somit zu keiner Ovulation schließt sich ein *anovulatorischer Zyklus* (Dauer: 14 bis 28 Tage) an. Hier wird selten zwischen *Met-* und *Diöstrus* unterschieden. Es werden keine *Corpora lutea* ausgebildet und der sprungreife Follikel bleibt bestehen. Wird durch einen Deckakt oder einen vergleichbaren Stimulus eine Ovulation ausgelöst, bei der es nicht zu einer Befruchtung der Eizelle kommt, kommt es häufig zu einer Pseudogravidität. Durch die Ausbildung von *Corpora lutea* und der einhergehenden Produktion von Progesteron kommt es zu einer Zyklusverlängerung auf 30 bis 72 Tage. Ab dem 5. bis 11. Tag *post copulationem* steigt der Progesteronspiegel im Blut an um danach wieder auf sein Basalniveau abzusinken und die Gelbkörper gehen in Regression, sodass ein neuer Zyklus beginnen kann.

In den Wintermonaten findet kein zyklisches Geschehen statt. Es wird hierbei von dem *Anöstrus* gesprochen.

## **2.6 Zyklus der Hausmaus**

Die Hausmaus (*mus musculus*) wird mit ca. sechs Wochen geschlechtsreif und weist einen asaisonalen, polyöstrischen Zyklus auf (Allen 1922; Monzavifar *et al.* 1970; Behringer *et al.* 2014). In freier Wildbahn richtet sich der Sexualzyklus nach einem circadianen Rhythmus. Aufgrund standardisierter Laborbedingungen wird jedoch ein ganzjähriges Zyklusgeschehen erreicht. In der Regel dauert der Zyklus vier bis sechs Tage an – Stress, Fütterung, soziale Bedingungen, Pheromone, individuelle genetische Voraussetzungen und andere exogene Faktoren (Lerner *et al.* 1992; Mizuhara *et al.* 1958; McKinney 1972; Jemiolo *et al.* 1986) können allerdings den Zyklus auf zwei Tage verkürzen oder auf bis zu 28 Tage verlängern (Parkes und Brambell 1928; Pritchett und Taft 2007).

---

Der Zyklus der Maus unterteilt sich in die Phasen des *Proöstrus*, *Östrus*, *Metöstrus* und *Diöstrus* (Allen 1922).

Der *Proöstrus* dauert in etwa 12 bis 24 Stunden, der *Östrus* 36 Stunden, der *Metöstrus* 48 Stunden und der *Diöstrus* ebenfalls 48 Stunden bei ausbleibender Befruchtung (Vianney 1965). Die Ovulation erfolgt bei der Maus spontan ca. 2 bis 3 Stunden nach Brunstbeginn - bzw. zwischen Mitternacht und drei Uhr. Aufgrund der täglichen Beeinflussung durch den Tag-Nacht-Rhythmus kann somit die Ovulation manipuliert werden (Snell *et al.* 1940; Whitten 1958; Pritchett und Taft 2007). Zwar verläuft die Ovulation spontan, jedoch wird für eine Trächtigkeit bzw. eine erfolgreiche Befruchtung und die Induktion von Gelbkörpern auch bei der Maus ein mechanischer Stimulus der Cervix benötigt (Kenney *et al.* 1977). Ohne einen solchen Stimulus bilden sich nur Corpora lutea mit eingeschränkter Funktion aus, die eine Gravidität nicht erhalten können (Pritchett und Taft 2007).

---

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probenmaterial**

Für alle Versuche an feline Gewebeproben wurden Ovarien im Rahmen von Kastrationen in Kooperation zum einen durch die Klinik für Geburtshilfe und Andrologie für Kleintiere der Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Axel Wehrend mithilfe von Theresa Conze und zum anderen durch die Tierarztpraxis Dr. Ahrem aus Großen-Buseck gesammelt.

Für einige immunhistochemische Versuche wurden durch die Arbeitsgruppe „Reproduktionsbiologie“ des Leibniz Instituts für Zoo- und Wildtierforschung Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Katharina Jewgenows bereits fertig aufgearbeitete und auf Objektträger (OT) aufgezogene feline Proben zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden von dem Institut für Zelluläre Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn postnatale murine Gewebeproben bereitgestellt. Diese lagen bereits fixiert vor und wurden im weiteren Verlauf immunhistologisch bearbeitet.

Weitere murine Proben (*mus musculus domesticus black 6*) des Reproduktionstraktes stammen aus Kooperationen mit der Augenklinik des Fachbereichs 11, dem ECCPS (*“excellent cluster pulmonary society“* – AG Prof. Dr. Bellusci) und dem Anatomischen Institut Fachbereich 11 (AG Prof. Dr. Kummer) der Justus-Liebig-Universität Gießen.

#### **3.2 Biologische Materialien**

##### **3.2.1 Zelllinie**

Zur Zellkultivierung wurde eine Primärkultur aus feline Granulosazellen angelegt. Die Proben wurden aus Ovarien im Rahmen von Kastrationen gewonnen (3.1 und 3.6.1).

### 3.2.2 Antikörper

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Primärantikörper**

	<b>Eigenschaften</b>	<b>Konzentration (c) Western Blot/IHC/IF</b>	<b>Referenz/Firma</b>
$\alpha$ -PolySia (735)	mAK (Maus IgG2a) es werden $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäuren ab 8 Sialinsäurereste einer Kette erkannt	1 $\mu$ g/ml 15 $\mu$ g/ml	Stammt aus der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahan, Universität Hannover; Deutschland (Frosch <i>et al.</i> 1985)
$\alpha$ -NCAM (5B8)	mAK (Maus IgG1) Bindung an zytoplasmatische Domäne von NCAM-140 und -180;  Gewinnung aus Zellüberstand der 5B8-Zelllinie (myeloma cell line mouse/ developmental studies hybridoma bank)	unverdünnte Anwendung des Zellüberstandes	(Dodd <i>et al.</i> 1988; Milev <i>et al.</i> 1994; Leshchyn'ska <i>et al.</i> 2003)
$\alpha$ -NCAM (Clone 1G4)	mAK (Maus IgG1) erkennt Epitope im Bereich der AS 20-718 von NCAM	0,25 $\mu$ g/ml 7 $\mu$ g/ml	OriGene Technologies (Rockville, USA)
$\alpha$ -NCAM (Clone 2D4)	mAK (Maus IgG1) erkennt die ganze Proteinlänge des humanen NCAM	0,25 $\mu$ g/ml 7 $\mu$ g/ml	OriGene Technologies, (Rockville, USA)
$\alpha$ -SMA	mAK (Maus IgG2a) Smooth-Muscle-Antigen; Erkennt Aktinreste der glatten Muskulatur	0,67 $\mu$ g/ml	Abcam (Cambridge, UK)
$\alpha$ -StAR	steroidogenic acute regulatory protein – pAK (rabbit, IgG); Erkennt zentral gelagerte Anteile des mitochondrialen Proteins	10 $\mu$ g/ml	GeneTex Inc. (Kalifornien, USA); (Sasson und Amsterdam 2002)

Phalloidin-FITC ( $\alpha$ -Actin)	Phalloidin konjugiert mit FITC-Phalloidin aus <i>Amanita phalloides</i> ; Das Toxin bindet an F-Aktinpolymere und stabilisiert diese in Abhängigkeit von aktinreichen Strukturen	50 $\mu\text{g/ml}$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)  (Sasson und Amsterdam 2002)
---------------------------------------	--	---------------------	---

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper**

	Konjugation	Konzentration (c) Western Blot/IHC/IF	Referenz/Firma
pAK Ziege $\alpha$ -Maus IgG	Horseradish Peroxidase (HRP)	Gebrauchslösung	Dako EnVision + System (K4000); (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)
pAK Ziege $\alpha$ -Maus IgG	HRP	0,2 $\mu\text{g/ml}$	Dako GmbH (Hamburg, Deutschland)
pAK Ziege $\alpha$ -Maus	Rhodamin-Rot	6,67 $\mu\text{g/ml}$	Dianova, Hamburg, Deutschland
pAK Ziege $\alpha$ -Maus	Fluoresceiniso-thiocyanate (FITC)	6,67 $\mu\text{g/ml}$	Dianova, Hamburg, Deutschland
pAK Ziege $\alpha$ -Kaninchen IgG	Alexa Flour 488	10 $\mu\text{g/ml}$	Life Technologies (Kalifornien, USA)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI = 1,5 $\mu\text{g/ml}$	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)

### 3.2.3 Enzyme

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Enzyme**

	<b>Eigenschaften</b>	<b>Konzentration (c) Western Blot/IHC/IF</b>	<b>Referenz/Firma</b>
Endo- neuraminidaseN (EndoN)	Stammt aus einem <i>E. coli</i> K1 Phagen; Bindung an $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäuren ab einer Kettenlänge von sechs Sialinsäureresten; spaltet in drei- (nicht-reduzierendes Ende) und fünfgliedrige (reduzierendes Ende) Sialinsäurereste	1 $\mu$ g/ml 3 $\mu$ g/ml	Stammt aus der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahan, Universität Hannover; (Hallenbeck <i>et al.</i> 1987; Stummeyer <i>et al.</i> 2005)
Peptid- <i>N</i> - GlycosidaseF (PNGaseF)	Spaltet zwischen GlcNAc und Asparagineresten von <i>N</i> -glykosidisch verknüpften Glykoproteinen	50 U/ml	New England Biolabs GmbH (Massachusetts, USA) (Liedtk <i>et al.</i> 2001; Galuska <i>et al.</i> 2010)
Aprotinin	Kompetitiver Serinproteaseinhibitor; Reaktive Proteinseitenketten werden geblockt und vernetzt; Dissoziation der Aprotinin-Protein-Komplexe bei pH >10 oder <3,2	1 mM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Leupeptin	Kompetitiver Cysteinproteaseinhibitor	1 mM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

### 3.2.4 Verwendete Stimulantien der kultivierten Zellen

Tabelle 5: Liste der verwendeten Stimulantien für die Zellkultur

	Eigenschaften	Konzentrationen Zellkultur (primäre feline Granulosa- zellen)	Referenz/Firma
porcines Luteinisierendes Hormon (pLH)	Dieses glykosylierte Polypeptid stimuliert die Follikelreifung, induziert die Ovulation und die Anbildung des <i>Corpus luteum</i> ; Es wurde verwendet um die Apoptose der Granulosazellen zu provozieren	1 IU/ml	Cederlane labs (Burlington, Kanada)  (Crichton <i>et al.</i> 2003; Pelican <i>et al.</i> 2006)
Endo- neuraminidaseN (EndoN)	s. u. Tabelle 4	0,1 µg/ml	Stammt aus der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahan, Universität Hannover; (Hallenbeck <i>et al.</i> 1987; Stummeyer <i>et al.</i> 2005; Ulm <i>et al.</i> 2013)

### 3.3 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze

#### 3.3.1 Verbrauchsmaterialien

Eine Angabe der Verbrauchsmaterialien, verwendeten Geräte und Software kann dem Anhang (12.1) entnommen werden.

#### 3.3.2 Chemikalien, Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Nährmedien und Zellkulturzusätze findet sich in Tabelle 8 und Tabelle 9 des Anhangs (12.1). Das verwendete Wasser

wurde mittels *Milli-Q ultra-pure water system* (Millipore, Eschborn) entsalzt und analytisch rein aufbereitet.

### 3.4 Zykluseinteilung

#### 3.4.1 Katze

Die Ovarien wurden makroskopisch vor der weiteren Bearbeitung nach Proöstrus, Östrus, Diöstrus und Metöstrus unterteilt. Als Grundlage hierfür galt die Klassifizierung von Freistedt *et al.* 2001.

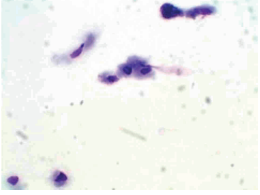

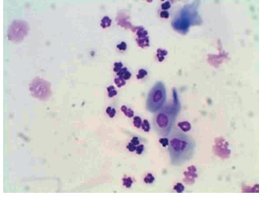
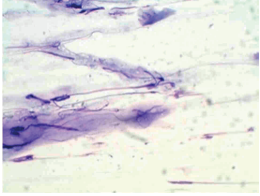
**Tabelle 6: Übersicht Zyklusstadien und Beurteilung bei der Katze (nach Freistedt *et al.* 2001)**

<u>Makroskopische Betrachtung</u>	<u>Zyklusbezeichnung</u>	<u>Follikelphase</u>
Keine Follikel sichtbar	Anöstrus/ brunstloses Stadium	inaktiv
1-2 mm große Follikel	Proöstrus/Vorbrunst	Frühe Follikelphase
> 2 mm große Follikel	Östrus/Brunst	Späte Follikelphase/Ovulation
Ein oder mehrere Corpora hämorrhagica	Metöstrus/Nachbrunst	Frisch ovuliert
Ein oder mehrere Gelbkörper	Diöstrus/Zwischenbrunst	Lutealphase

#### 3.4.2 Maus

Bei den Mäusen wurde vor der Entfernung der Reproduktionsorgane ein vaginaler Abstrich durchgeführt. Mittels exfoliativer vaginaler Zytologie wurde eine Zykluseinteilung mikroskopisch (100 × 0,25 Objektiv) durchgeführt. Für die Färbung der vaginalen Abstriche wurde eine Häma-Schnellfärbelösung (s. 12.1) verwendet.

**Tabelle 7: Übersicht Zyklusstadien und Beurteilung mittels exfoliativer Vaginalzytologie bei der Maus (nach Schutte 1967; Röttger 2010)**

<u>Zyklus- bezeichnung</u>	<u>Follikelphase</u>	<u>Exfoliative Vaginalzytologie</u> (Häma-Schnellfärbung, 100 × 0,25 Objektiv)
Proöstrus/ Vorbrunst	Frühe Follikelphase	Wenige, kleine Zellen, kein Mukus 
Östrus/Brunst	Späte Follikelphase/ Ovulation	Deutliche Schollenbildung, kein Mukus 
Metöstrus/ Nachbrunst	Frisch ovuliert	Neutrophile Granulozyten & Intermediärzellen 
Diöstrus/ Zwischen- brunst	Lutealphase	Mukus, vereinzelt neutrophile Granulozyten; einige Intermediärzellen 

### 3.5 Histologische Methoden

#### 3.5.1 Aufarbeitung von Gewebeproben

Für die Aufarbeitung zur immunhistologischen Färbung wurden die Gewebeproben von Ovar und Ovidukt in frisch angesetzter Bouin-Fixierlösung konserviert und stufenweise mit 70 % Ethanol täglich über eine Woche gewaschen um anschließend in Paraffin eingebettet zu werden. Die Einbettung erfolgte mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Middendorf/Anatomisches Institut Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

---

### Bouin-Fixierlösung:

15 ml gesättigte Pikrinsäure

5 ml Formalin 37 %

1 ml Eisessig

Von den eingebetteten Präparaten wurden 5 µm dicke Serienschnitte mit einem Rotationsmikrotom RM 2255 (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden in 37 °C warmem Wasser (Streckbad, HI1210, Leica, Wetzlar, Deutschland) gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte auf die OT aufgezogen und über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet um eine Anheftung auf dem Glas zu gewährleisten.

### **3.5.2 Vorbereitung der Objektträger**

Als Grundlage für jede Färbemethode von Paraffinschnitten wurden die OT über eine absteigende Ethanolreihe beginnend mit dem Intermedium Roti®-Clear entparaffiniert und zur Inaktivierung der endogenen Peroxidasen mit 4 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 2 min inkubiert. So kann eine spezifische Färbereaktion des Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) durch die Aktivierung der Glucose-Oxidase erreicht werden.

#### **Absteigende Ethanolreihe:**

3 × 5 min Roti®-Clear

5 min 98 % Ethanol

30 min 4 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol

5 min 98 % Ethanol

5 min 70 % Ethanol

5 min Aq. dest.

5 min PBS, pH 7,4

#### **Puffer:**

##### PBS:

137 mM NaCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O

2,7 mM KCl

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Für eine sich anschließende Immunlokalisation der verschiedenen Antigene wurden die Proben mit 2 % BSA in PBS mit pH 7,4 bei 37 °C in einer feuchten Kammer geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Bei murinen Gewebeproben wurde ein zusätzlicher Blockierungsschritt mit einer

---

*mouse-on-mouse-blocking-solution* (M.O.M.<sup>TM</sup>) durchgeführt, um Kreuzreaktionen mit in der Maus synthetisierten Antikörpern zu unterbinden.

### **3.5.3 Färbemethoden**

#### **3.5.3.1 Hämatoxylin-Eosin G Färbung (H. E.-Färbung)**

Die H. E.-Färbung ist eine der gängigsten Übersichtsfärbungen und bietet gute Möglichkeiten verschiedene Areale in einem Gewebe zu identifizieren. Erste Färbungen mit dem pflanzlichen Farbstoff Hämatoxylin wurden bereits 1863 von Waldeyer und 1865 von Böhmer angewendet. Die H. E.-Färbung besteht aus zwei Komponenten: die Färbung der sauren Komponenten durch das stark basische Hämatoxylin und der basischen Komponenten durch das rote Eosin G. Hämatoxylin färbt somit basophile Zellbestandteile, wie im Zellkern enthaltene Nukleinsäuren, saure Glykoproteine im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche, sowie Regionen mit einem hohen Anteil an rauem endoplasmatischen Retikuli (rER) an, wobei nicht das Hämatoxylin für die Färbung verantwortlich ist, sondern seine oxidierte Form – das Hämatein. Dieser Reaktionsschritt kann auch unter Lufteinfluss erzielt werden, jedoch kommen in den gängigen Färbemethoden hierbei Oxidationsmittel, die die Reaktion katalysieren zum Einsatz. Eosin G hingegen färbt azidophile Komponenten wie Kollagen, Granula und Mitochondrien ein.

Die fertigen Färbelösungen wurden nach Herstelleranweisungen der Firma Carl Roth angewendet. Die H. E.-Färbung startet typischerweise mit der Färbung der basophilen Komponenten durch die Hämalaunlösung nach Mayer (1920). Bei dieser Hämalaunlösung wird als Oxidationsmittel Natriumjodat verwendet und ist gebrauchsfertig erhältlich. Der Vorteil bei dieser Gebrauchslösung ist, dass ein Färbeergebnis schnell eintritt und gleichzeitig eine Überfärbung des Gewebes ausbleibt. Hierfür wurden die OT in einem Färbetrog mit gefilterter Hämalaunlösung für 3 bis 5 min inkubiert. Die Bildung und Konservierung dunkel violetter Chelate des Hämalauns wird durch eine Erhöhung des pH-Wertes erreicht. Hierfür wurden die Schnitte mit fließendem, lauwarmem Leitungswasser 5 bis 10 min unter mikroskopischer Kontrolle „gebläut“. Anschließend erfolgte eine Färbung der basischen Zellbestandteile durch Eosin G. Die OT wurden in einem Färbetrog mit 1 % Essigsäure in Eosin G für 1 min inkubiert. Eine leichte Überfärbung ist hierbei

---

von Vorteil, da bei der anschließenden Spülung mit Aq. dest. ein Teil der Färbung wieder ausgewaschen wird.

Unter dem Mikroskop erscheinen nach vollständiger Aushärtung des Fixiermediums (s. u.) vornehmlich die Zellkerne blau und alle übrigen Zellbestandteile rötlich.

### **3.5.3.2 Immunlokalisierung von verschiedenen Antigenen**

Die Immunlokalisierung erfolgte in der Regel nach dem Verfahren der indirekten Immunhistochemie. D.h., es wurden jeweils ein Primär- und ein Sekundärantikörper verwendet. Das Protokoll orientierte sich an bereits beschriebenen Methoden unserer Arbeitsgruppe (Ulm *et al.* 2013; Simon *et al.* 2013).

Die jeweiligen Primärantikörper wurden mit 0,2 % BSA in PBS verdünnt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für einen besseren Verbleib der Antikörper- und Enzymlösungen auf den Präparaten wurden die Schnitte zunächst mit einem Fettstift umrundet und anschließend in eine „feuchte Kammer“ zur Vermeidung von Austrocknung verbracht.

Als Negativkontrolle für den Nachweis von PolySia wurde das Enzym EndoneuraminidaseN (EndoN) verwendet. Dieses reseziert die PolySia-Ketten spezifisch ab einer Länge von sechs Sialinsäuren. Da der eingesetzte Antikörper 735 für eine Bindung eine Kettenlänge von acht Sialinsäureresten benötigt, wurde so die Spezifität der Immunlokalisierung bestätigt. Für den enzymatischen Verdau wurde eine in 0,2 % BSA in PBS gelöste Verdünnung von (3 µg/ml) eingesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung der Proben bei Raumtemperatur (R. T.) mit 0,2 % BSA in PBS für jeweils 5 min. Für die Visualisierung der Antikörper-Protein-Interaktionen wurde das EnVision®-Kit von Dako (Glostrup, Dänemark), bestehend aus einem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper, verwendet. Die Aktivität der HRP wurde durch die Zugabe von einer Glucose-Oxidase und Glucose katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht ein Peroxid, das den Farbstoff DAB zeitgleich oxidiert. Infolgedessen bildete sich ein dunkelbrauner, unlöslicher Farbniederschlag. Durch die Zugabe von Ammoniumchlorit und Nickelsulfat wurde das Signal verstärkt. Um ein optimales Ergebnis der Färbung zu

---

erzielen wurde unter mikroskopischer Kontrolle eine Färbung zwischen 3 min und 15 min durchgeführt. Die Färbung erfolgte in einem salzfreien Phosphatpuffer (PB).

Aktivierung der Peroxidase-Aktivität:

45 ml 0,1M PB; pH 7,4  
150 µl Glucose Oxidase (1,8 units)  
900 µl NiSO<sub>4</sub> (Stocklösung 0,05 M)  
900 µl Glucose (10 %)  
1000 µl DAB (Stocklösung 0,1 M)  
100 µl NH<sub>4</sub>Cl (Stocklösung 2 M)

Nach zweimaligem Waschen mit Aq. dest. wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun sauer nach Mayer durchgeführt. Hierbei wurden die Schnitte 30 sec mit der Färbereagenz inkubiert und anschließend unter kaltem Leitungswasser und mikroskopischer Sichtkontrolle 15 min gebläut.

### **3.5.4 Permanentes Eindeckeln von histologischen Schnitten**

Bei dem Eindecken von histologischen Schnitten muss unterschieden werden, ob es sich um wässriges Eindecken oder um Eindecken mit eingesetzten Intermedien wie zum Beispiel Roti®-Histol oder Xylol handelt.

Zur Konservierung der angewendeten hydrophoben Färbungen wurden die Proben mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe und dem Xylol-Ersatzlösungsmittel Roti®-Histol rehydriert und mit Eukitt® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) permanent nach Herstelleranweisungen mit einem Deckglas abgedeckt und bis zum Aushärten auf einer ebenen Fläche gelagert.

Aufsteigende Ethanolreihe

5 min Aq. dest  
5 min 70 % Ethanol  
2 × 5 min 98 % Ethanol  
3 × 5 min Roti-Histol

Eine mikroskopische Auswertung erfolgte nach vollständigem Aushärten des Eindeckmediums.

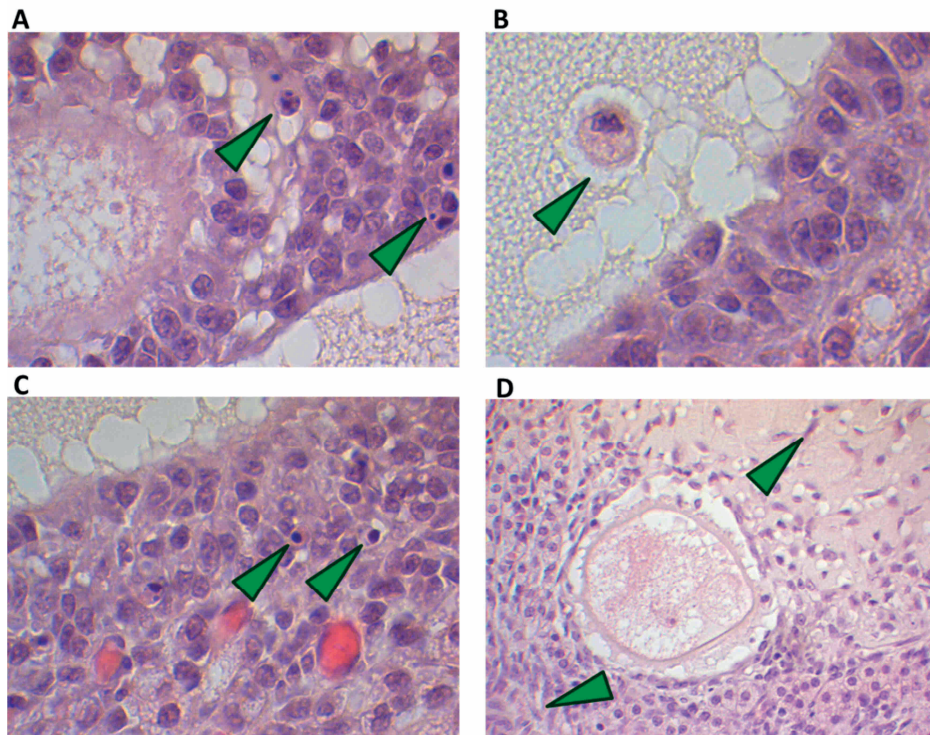
---

### 3.5.5 Morphologische Klassifizierung von Zelltypen und Tertiärfollikeln

Die Einteilung und Klassifizierung erfolgte in Anlehnung an Rodgers und Irving-Rodgers 2010 und Jolly 1997. Für die Identifizierung von intakten Follikeln wurde das Auftreten der verschiedenen Phasen der Mitose wie Telophase, Anaphase und Metaphase erfasst. Gesunde, intakte Follikel weisen eine kompakte und gut organisierte Granulosazellschicht auf, in der verschiedene Mitosestadien und nur ein sehr geringer Anteil an apoptotischen Zellen erkennbar sind. Follikel mit > 1 % mitotischen Figuren und einem maximalen Auftreten von 0,02 % bis 0,2 % apoptotischer Anzeichen wurden als „intakt“ oder dominante Follikel klassifiziert (Jolly 1997).

Frühe Atresie ist klassifiziert durch ein moderates Auftreten von apoptotischen Zellen, die in einer Rate von 0,21 % bis 2 % der Gesamtanzahl der Granulosazellen liegt. Diese sind vornehmlich antral zu finden sind. Die Granulosazellschicht ist hierbei nur partiell aufgelockert (Jolly 1997).

Nach H. E.-Färbung zeigen apoptotische Zellen ein kondensiertes Chromatin. Dieses kann entweder randständig, kondensiert in einer zentralen Masse (Pyknose) oder in angereicherten Kernfragmenten (Karyohexis) sein. Als letzte Stufe vor dem Zellzusammenbruch gilt der vollständige Verlust des Zellkerns (Karyolyse). Späte Atresie ist charakterisiert durch eine hohe Anzahl von apoptotischen Zellen und „*apoptotic bodies*“ außerhalb einer Zelle sowie dem kompletten Verlust einer intakten Granulosazellschicht. In beiden Stadien der Atresie sind kaum mitotischen Figuren erkennbar (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Morphologische Charakteristika von Atresie in Tertiärfollikeln**

Paraffinserienschnitte des feline Ovars wurden mittels H. E.-Färbung gefärbt (40 × 0,25 Objektiv). (A) zeigt Karyohexis mit charakteristisch fragmentiertem und kondensiertem Chromatin. (B) Makrophagen wandern in das zugrunde gehende *Antrum folliculare* ein. (C) Darstellung einer von der Granulosazellschicht losgelöste Zelle mit Pyknose. Diese ist charakterisiert durch einen einzelnen kondensierten Kernrest. (D) Infiltration von Fibroblasten im letzten Stadium der Follikelatresie (Rodgers und Irving-Rodgers 2010). Die Pfeile markieren den jeweiligen Zelltyp.

Alle Follikel mit einer Apoptoserate von  $> 2\%$  und einer einhergehenden aufgelockerten Granulosazellschicht wurden der späten Atresie zugeordnet. Beide Atresiestadien korrelieren mit einer geringen Mitoserate ( $< 0,5\%$ ) (Rodgers und Irving-Rodgers 2010; Jolly 1997).

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Motic Mikroskop BA410 und der Moticam Pro 252B (Motic, Deutschland) aufgenommen und mit Software Motic Advanced 3.2 bearbeitet.

### 3.6 Zellbiologische Methoden

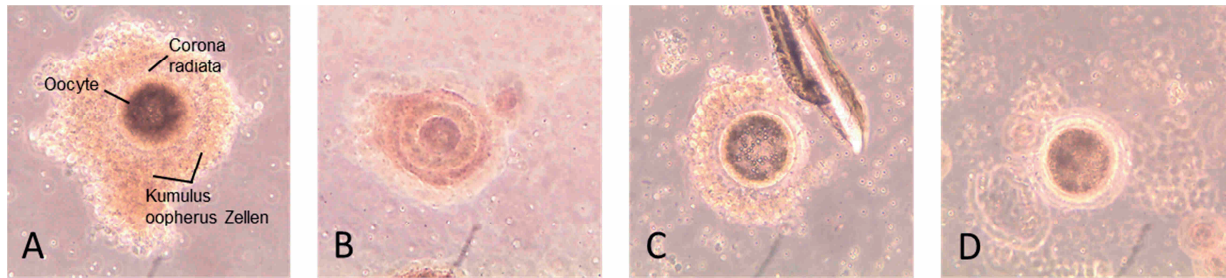
Feline Ovarien wurden direkt nach der Kastration in Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) überführt und bei 4 °C gelagert. Zur Vermeidung von mykotischer oder bakterieller Besiedelung wurde ein antibiotisches und antimykotisches Wirkkonzentrat (*ABC-Solution* (100 ×), *antibiotic antimycotic solution*, Sigma-Aldrich)

---

in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung zugesetzt. Um eine optimale Zellqualität zu erhalten, wurden die Ovarien zwischen 2 h und 24 h weiterverarbeitet. Die zellbiologischen Methoden wurden u. a. in Anlehnung an Jewgenow *et al.* 1997 entwickelt und für die dargestellten Versuchsreihen optimiert.

### **3.6.1 Gewinnung und Kultivierung primäre feline Granulosazellen**

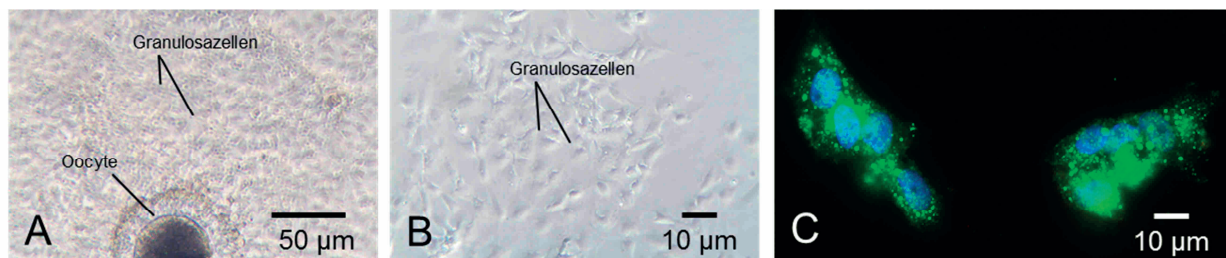
Die Ovarien wurden mit frischem PBS gewaschen. Zum Gewinnen der Granulosazellen wurde  $\alpha$ -MEM mit 5 % (v/v) fetalem bovinem Serum (FBS) und 1 % (v/v) ABC versetzt. Die Ovarien wurden nach Entfernung von Eileiterresten und Fettgewebe sowie der Suche nach eventuell vorhandenen *Corpora lutea* in dieses Medium in einer 2,5 cm Petrischale überführt. Bei festgestellten *Corpora lutea* wurden die Ovarien verworfen. Im folgenden Verlauf wurde die Oberfläche des Ovars vorsichtig mit einer Kanüle in parallelen Querlinien eingeritzt. Bei diesem sogenannten „Slicing“ werden Oozyten mit ihren umgebenden Granulosazellen, den *Cumulus-oophorus*-Komplexen (COC's), freigesetzt. Diese COC's konnten anschließend mit einem Bryopettenaufsatz und einer 1 ml Spritze unter mikroskopischer Kontrolle selektiert werden und in frisches Medium in die Vertiefungen der *x-well* Zellkulturobjektträger überführt werden. Die Eizellen wurden dabei in Klasse I-IV klassifiziert, wobei Klasse I einer sehr guten Eizellqualität entspricht und Klasse IV einer schlechten Qualität zuzuordnen ist (Abbildung 12). Bei der Klasse I ist die Oozyte homogen schwarz gefärbt, die *Corona radiata* ist intakt und sie ist von mehreren, durchgehenden Schichten Granulosazellen umgeben. Die Klasse II der Oozytenqualitäten entspricht denen der Klasse I, allerdings können hierbei die umgebenden Granulosazellschichten Lücken aufweisen. Klasse I und II werden auch für *in-vitro*-Fertilisationstechniken eingesetzt und sind nur bei frischen Gewebeproben zu finden. Bei längerer Lagerung der Ovarien nimmt die Eizellqualität zunehmend ab. Klasse III zeichnet sich durch einen Rest von Granulosazellen um die Oozyte herum aus, wobei diese zunehmend Lipideinschlüsse aufweist und das Zellinnere heterogen schwarz erscheint, was für eine fortgeschrittenen Alterung der Eizelle spricht. Klasse IV entspricht dem Begriff „nackter“ Oozyten, da umgebende Granulosazellen vollständig fehlen. Das Zellinnere erscheint entweder vollständig hell oder dunkel, wobei hierbei dieses aufgrund zunehmender Lipidansammlungen „mottenfraßartig“ aufgelockert erscheint (Wood und Wildt 1997).



**Abbildung 12: Klassifizierung der *Cumulus-oopherus*-Komplexe (COC's)**

Die COC's von kultivierten feline Granulosazellen wurden nach dem „Slicing“ nach (Wood und Wildt 1997) klassifiziert: (A) Oozytenqualität I – vollständiger COC mit einer mehrschichtigen Granulosazellschicht, einer intakten Corona radiata und einer gesunden Oozyte. Die Oozyte erscheint hierbei homogen dunkel. (B) Oozytenqualität II – vollständiger COC wie bei Qualität I, allerdings mit einer moderaten Lücke in der Granulosazellschicht. (C) Oozytenqualität III – Lipideinschlüsse sind in der Oozyte erkennbar und die Granulosazellschicht ist nicht vollständig. (D) Oozytenqualität IV – kompletter Verlust der Granulosazellschicht. Es liegt nur eine „nackte“ Oozyte vor (10 × 0,25 Objektiv).

Die Kultivierung dieser Primärkultur erfolgte über vier Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wobei am ersten Tag nach der Gewinnung die Zellen 3 × mit PBS gewaschen und mit frischem FCS-enthaltendem Medium überschichtet wurden. Bereits nach einer Kultivierung über 24 h bilden sich feine Zellausläufer aus (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Granulosazellen und Oozyte nach Kultivierung**

(A) Gut erkennbar sind eine homogen dunkel erscheinende Oozyte mit einer intakten Corona radiata umgeben von flach auslaufenden Granulosazellen. (B) Granulosazellen sind in einem dünnen Zellrasen angewachsen. Die Aufnahmen erfolgten an Tag 4 der Kultivierung. (C) Um Granulosazellen zu identifizieren, wurde mitochondriales StAr (3.2.2) mittels Immunfluoreszenz angefärbt (3.6.3)

Am vierten Tag wurden die Zellen auf serum-freies α-MEM gesetzt, um bei einer sich anschließenden Stimulierung mit verschiedenen Wirksubstanzen einen Einfluss von Wachstumsfaktoren, die in FCS enthalten sind, auszuschließen. Auch nimmt eine Luteinisierung der Granulosazellen bei längerer Inkubation zu und musste durch möglichst kurze Kultivierung vermieden werden (Sasson und Amsterdam 2002).

---

### **3.6.2 Inkubation feline Granulosazellen**

Um die biologische Funktion von PolySia *in vitro* nachzuweisen wurden die feline Granulosazellen mit Hormonen oder Enzymen stimuliert. Die Stimulantien wurden in ihrer entsprechenden Verdünnung in  $\alpha$ -MEM gelöst und anschließend für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Induktion der Apoptose wurde porcines Luteinisierendes Hormon (pLH, 1 IU/ml) verwendet (s. 3.2.4) (Sasson und Amsterdam 2002; Crichton *et al.* 2003; Pelican *et al.* 2006).

Das Enzym EndoN (0,1  $\mu$ g/ml) wurde zur Degradierung von PolySia eingesetzt (s. 3.2.3).

Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellen dem Brutschrank entnommen und mit PBS dreimal gewaschen und fixiert.

### **3.6.3 Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Granulosazellen**

Für die Fixierung der Zellen gelten die gleichen Mechanismen wie bei der Fixierung der Gewebeproben für die Immunhistologie. Da nicht jedes Fixiermittel für die Konservierung jedes Antigens geeignet ist, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

Für Methanol-unlösliche Antigene wurde eine Methanol-Fixierung durchgeführt. Für Zellbestandteile wie zum Beispiel Aktin, die durch Methanol degradiert werden, wurde eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in PBS angewendet. Durch die Fixierung wurde eine Lagerung der ungefärbten Proben von bis zu 4 Wochen bei 4 °C möglich.

#### **3.6.3.1 Methanol-Fixierung**

Die Zellen wurden auf dem OT 3  $\times$  mit kaltem PBS (4 °C) gewaschen und anschließend mit eisgekühltem Methanol bei -20 °C für 10 min fixiert. Für die weiteren Schritte wurden die Zellen erneut 3  $\times$  mit PBS bei R. T. gewaschen. Eine zusätzliche Membranpermeabilisierung bei dieser Fixiermethode ist nicht notwendig.

---

### **3.6.3.2 Paraformaldehyd-Fixierung**

Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelöst in PBS für 20 min bei R. T. Da PFA die Eigenschaft hat Antigene zu maskieren und die Membran nur unzureichend permeabilisiert folgte nach dreimaligem Waschen mit PBS eine Inkubation mit 0,5 % Triton-X 100 in PBS für 30 min bei R. T.. Eine erhöhte Membranpermeabilität und Antigendemaskierung kann so erreicht werden.

### **3.6.3.3 Immunlokalisation durch Antikörper-Kopplungen**

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden wurde nach den verschiedenen Fixiermethoden ein Blockierungsschritt mit 2 % BSA in PBS bei 37 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt um - wie bei der Färbung von Paraffinschnitten - ein Austrocknen der Proben zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die optimale Arbeitskonzentration ermittelt und der Antikörper in 0,2 % BSA in PBS gelöst. Vor der sich anschließenden Verwendung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für eine Stunde bei R. T., wurden die Zellen erneut 3 × mit 0,2 % BSA in PBS gewaschen. Ab hier wurde in einem abgedunkelten Raum lichtgeschützt gearbeitet um die Fluoreszenzeigenschaften des Sekundärantikörpers zu schonen. Zum Teil wurden weitere Inkubationen mit anderen Primär- und Sekundärantikörpern angeschlossen um eine Co-Lokalisation verschiedener Proteine zu ermöglichen. Zusätzlich zu der Lokalisation verschiedener Proteine und Antigene erfolgte eine Färbung mit 4,6-Diamidin-2-phenylindiol (DAPI), welches in dem permanenten Eindeckmedium von Vectashield Mounting medium enthalten ist. Dieser Farbstoff ist in der Lage sich an DNA anzulagern und so Zellkerne anzufärben. Um eine Austrocknung der Präparate zu vermeiden wurden die Deckgläser mit Nagellack umrundet und die fertigen OT bei 4 °C gelagert.

## **3.7 Proteinanalytische Methoden**

Als weitere Methode zur Identifizierung der PolySia und dem Trägerprotein wurde neben der Immunhistologie auch Methoden der Nasschemie angewendet. Die Protokolle orientierten sich an bereits beschriebenen Methoden unserer Arbeitsgruppe (Ulm *et al.* 2013; Simon *et al.* 2013).

---

### 3.7.1 Probenvorbereitung

Frisch entnommenes Probenmaterial wurde entweder frisch bearbeitet oder nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  im Gefrierschrank bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Für die weiteren Schritte wurden die Proben mit Lysepuffer versetzt. Ein Lysepuffer sollte im Allgemeinen Osmoseschutz und Schutz vor Proteasen bieten sowie Zellorganellen konservieren und wenig Interferenz mit analytischen Methoden gewährleisten. Somit wurde ein Puffer mit neutralem pH-Wert und verschiedenen zugefügten Proteaseinhibitoren gewählt. Der Tris/HCL-Puffer fungiert als Ammoniumpuffer und die Zugabe von NaCl ermöglichte einen Osmolaritätsausgleich. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) dient als Komplexbildner und Triton-X-100, als Mitglied der Octoxinole, löst Proteine aus der Zellmembran, ohne diese dabei zu degradieren, wie es bei Sodeum-dodecyl-sulfat (SDS) der Fall wäre. Natrium-Deoxycholat reduziert Protein-Proteininteraktionen. Die beiden Serinproteasen Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Aprotinin sowie die Cysteinprotease Leupeptin wurden aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit erst kurz vor Verwendung des Puffers zugegeben.

Hierbei wurden pro Probe (ca. 30 mg) 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer mit frisch zugefügten Proteaseinhibitoren (3.2.3) in einem 2 ml Reaktionsgefäß hinzugegeben. Für die Homogenisierung wurde eine Kugelmühle verwendet und die dafür notwendigen rostfreien und autoklavierten Stahlkügelchen (Durchmesser 2 mm) wurden beigegeben. Hierbei reichen 2-4 Kügelchen pro Probe. Die Gewebshomogenisierung erfolgte bei 30.000 rpm für 15 min bei R. T. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei  $4\text{ °C}$  auf dem Schüttler über Nacht inkubiert. Das hatte zum Vorteil, dass die starke Schaumbildung, die bei dem vorangegangenen Schritt entstand, minimiert wurde und membranständige Proteine weiterhin aus der Membran separiert wurden. Zur Entfernung von nicht benötigten Zellbestandteilen wurde das Lysat 1 h bei  $4\text{ °C}$  und 140000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen und zur weiteren Bearbeitung entweder bei  $-20\text{ °C}$  gelagert oder direkt weiterverwendet. Eine Lagerung bei  $4\text{ °C}$  reichte nicht aus, da hierbei die Proteininteraktionen und deren Stabilität stark beeinträchtigt werden.

---

Lysepuffer:

Stocklösung:

(Lagerung bis zu 3 Monaten bei 4 °C)

50 mM Tris/HCL

150 mM NaCL

5 mM EDTA

1 % Triton X-100

0,5 % Natrium-Deoxycholat

Gebrauchslösung

- Zugabe von Proteaseinhibitoren

2 mM PMSF

1 mM Aprotinin

1 mM Leupeptin

### 3.7.2 Affinitätsaufreinigung

Bei der Affinitätsaufreinigung oder auch Affinitätspräzipitation wird unter Einsatz von sphärischen, magnetischen Beads, welche mit einer inaktivierten EndoN gekoppelt sind, spezifisch polysialylierte Proteine aus dem Gewebelysate separiert und konzentriert. Die „Affinität“ gilt hierbei als Maß für die Bindungskapazität von Protein-Liganden-Wechselwirkungen. Abzugrenzen ist hierbei die Immunpräzipitation, bei der zwar auch gekoppelte Beads verwendet werden, jedoch ist hier das Agens ein spezifischer Antikörper.

#### 3.7.2.1 Kopplung von Enzymen an tosylaktivierte Beads

Es wurden magnetische tosylaktivierte Dynabeads der Firma Invitrogen (c = 30 mg/ml) eingesetzt. Diese „Beads“ haben den Vorteil, dass sie in der Lage sind verschiedenste Agentien aufgrund reaktionsfreudiger Tosylgruppen zu binden. Zudem sind sie durch ihre magnetischen Fähigkeiten leicht aus einer Lösung zu isolieren. Bei der Aktivierung der Beads reagieren primäre Aminogruppen von zu koppelnden Enzymen mit Tosylgruppen der Beads und führen zu einer kovalenten Bindung durch eine  $S_N^2$ -Reaktion unter Abspaltung des Tosylrestes und der Bildung eines sekundären Amins.

Als verwendetes Agens wurde eine inaktivierte EndoneuraminidaseN verwendet. Durch eine Punktmutation im aktiven Zentrum können zwar PolySia-Ketten noch

---

kovalent gebunden werden, aber es kommt nicht mehr zu einer Abspaltung der relevanten Strukturen (Schwarzer *et al.* 2009).

Für jeden Ansatz wurden 165 µl der gelieferten Lösung nach Resuspension entnommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch einen Magneten war es nun möglich, die Beads von der flüssigen Phase zu trennen. Der Überstand wurde entfernt und die Beads mit 500 µl Bindungspuffer A gewaschen. Die einzelnen Waschvorgänge liefen immer nach einem gleichen Schema ab. Die suspendierten Beads wurden vor den Magneten gehalten und lagerten sich an der magnetnahen Seite des Reaktionsgefäßes an. Der Überstand konnte dann leicht entfernt und verworfen werden. Für den nächsten Schritt wurden die Beads wieder mit Flüssigkeit resuspendiert. Für eine dauerhafte Verwendung ist darauf zu achten, dass die Beads nicht austrocknen. Zur Aktivierung der Beads wurden 100 µg des inaktivierten Enzyms eingesetzt und mit dem Bindungspuffer A vermischt, so dass ein Endvolumen von 150 µl vorlag. Nach der Zugabe von 100 µl Bindungspuffer B wurden die Beads für mind. 12 h jedoch max. 18 h auf dem Rüttler bei 37 °C und 950 rpm inkubiert. Darauf folgten eine Abnahme des Überstandes und eine Blockierung unspezifischer Bindungen durch Blockierungspuffer C für 1 h bei 37 °C auf dem Rüttler bei 950 rpm. Abschließend wurden die Beads 2 × mit je 500 µl Lagerungspuffer D gewaschen, anschließend in 240 µl dieses Puffers aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die finale Bead-Konzentration lag bei 20 mg/ml.

Bindungspuffer A:

0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4

Blockierungspuffer C:

137 mM NaCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

0,5 % (v/v) BSA

Bindungspuffer B:

3 M Ammoniumpuffer, pH 7,4

Lagerungspuffer D:

137 mM NaCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

0,1 % (v/v) BSA

---

### **3.7.2.2 Proteinbindung und Eluierung**

Die EndoN-Beads wurden vor jeder Verwendung gut resuspendiert und mit 2 × jeweils mit 500 µl Waschpuffer 1 und anschließend mit Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Probenlysat bei 37 °C für 2 h auf dem Rüttler bei 800 rpm. Der entstandene „PolySia-Enzym-Bead-Komplex“ wurde erneut 2 × mit Waschpuffer 1 und 2 jeweils mit 500 µl gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte die Eluierung durch einen stark basischen Eluierpuffer. Der hohe pH-Wert sorgt für eine Auflösung des Enzym-Substrat-Komplexes. Es wurden pro Probe je 50 µl Eluierpuffer eingesetzt, die maximal 2 min inkubierten. So wurde eine Degradierung der extrahierten Proteine vermieden. Das Eluat wurde im Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht durch Lyophilisieren trocken gezogen. Durch das Lyophilisieren wurde ein möglichst schonender Umgang mit den gewonnenen Polysialinsäuren und den Trägerproteinen erreicht. Die gefriergetrockneten Proben wurden bei -20 °C gelagert. Die Beads waren nach erneutem Waschen mit Waschpuffer 1 und 2 und einer Lagerung in einem BSA-haltigem Puffer bis zu 10 × wiederverwendbar.

#### Waschpuffer 1:

20 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,5 % (v/v) Triton-X-100

#### Eluierpuffer:

100 mM Triethylamin

150 mM NaCl

#### Waschpuffer 2:

20 mM Tris/HCL pH 8,0

150 mM NaCl

Durch die Verwendung von den tosylaktivierten Dynabeads mit einer konstanten Ausgangskonzentration entfällt eine vorherige Proteinbestimmung beispielsweise mittels eines BCA-Assays. Die konstante Konzentration der Beads und des eingesetzten inaktivierten Enzyms sind ausreichend um standardisierte Aussagen treffen zu können.

---

### 3.7.3 Enzymatische Spaltungen

#### 3.7.3.1 EndoneuraminidaseN – Abspaltung von PolySia

Als Negativkontrolle wurde die spezifische Endosialidase EndoN verwendet. Zur Inkubation bei 37 °C für 2 h auf dem Rüttler bei 750 rpm wurde EndoN (c = 2,2 mg/ml) 1:100 in Lysepuffer verdünnt und im Verhältnis 1:10 zu 15 µl Probe gegeben. Es wurde entweder das Direktlysat oder die gefriergetrocknete und gereinigte Probe verwendet.

#### 3.7.3.2 PNGaseF – Freisetzung von N-Glykanen

Um N-glykosylierte Proteine zu identifizieren, wurde auch ein Verdau mit N-GlycosidaseF (PNGaseF) durchgeführt. Das Reaktions-Kit der Firma NEB beinhaltet neben dem Enzym folgende ready-to-use-Puffer:

Denaturierungspuffer:

5 % SDS

400 mM DTT

NP-40-Puffer:

10 % NP-40

PNGaseF-Reaktionspuffer:

500 mM Na-Phosphat, pH 7,5

Für die enzymatische Spaltung wurden trocken gezogenen Proben mit 15 µl Denaturierungspuffer versetzt und bei 100° C 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt, mit 1,5 µl NP-40-Puffer, 2µl PNGaseF-Puffer und 5 IU PNGaseF versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.7.4 SDS-PAGE

Wie alle elektrophoretischen Trennmethoden beruht auch die Sodeum-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf dem allgemeingültigen Prinzip der Auftrennung durch Wanderung der Proteine in einem elektrischen Feld. Um eine Auftrennung der Moleküle nach Größe und nicht nach Ladung zu garantieren, wurden die Proteine mit SDS als negativ geladenes Detergenz versetzt. Eine gleichmäßige Wanderung aller Proteine in Richtung der Anode konnte so gewährleistet werden. Als Trennmateriale für die Gelelektrophorese

---

wurde ein 7,5%iges Polyacrylamid-Gel verwendet, wobei der Polyacrylamid-Anteil bei dem Sammelgel nur 3 % betrug. Durch ein enges Maschennetzwerk dieses Polymers wandern kleinere Moleküle schneller zur Anode als größere. Durch die niedrigere Konzentration des Sammelgels wird ein einheitlicher Startpunkt aller Proteine gewährleistet. Eine Separierung nach der jeweiligen Größe (kDa) erfolgt erst in dem wesentlich höher konzentrierten Trenngel.

Zur eindimensionalen Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Hierbei diente eine zehnmünütige Inkubation der Proben bei 65 °C mit einem Gemisch aus  $\beta$ -Mercaptoethanol und Laemmli-Sample-Puffer (1:20) zu einer linearen Ausrichtung der Proteine. Zu beachten ist, dass je ein  $\beta$ -Mercaptoethanol-Molekül in der Lage ist zwei Disulfidbrücken zu reduzieren und so das Protein zu entfalten. Zudem stabilisiert es die Proteinstruktur durch seine OH- und SH-Gruppen. Die Gelelektrophorese erfolgte mittels dem „Mini-Protean“ Elektrophoresesystem der Firma BioRad.

Trenngelpuffer:

1,5 mM Tris/HCl, pH 8,8

10 % (v/v) SDS

APS

10 % (v/v) Ammoniumpersulfat

TEMED

*N,N,N,N'*-Tetramethylethyldiamin

Acrylamid-Lösung:

30 % Acrylamid (Gebrauchslösung)

Elektrodenlaufpuffer:

192 mM Glycin

50 mM Tris

0,1 % (v/v) SDS-Lösung

---

Für zwei Gele des verwendeten Systems wurde folgende Rezeptur verwendet:

<b>Endkonzentration Polyacrylamid</b>	<b>7,5 %</b>
30 % Acrylamid-Gebrauchslösung	2,3 ml
Trenngelpuffer	3 ml
10 % SDS	120 µl
Aqua dest.	6,6 ml
APS	120 µl
TEMED	12 µl

Durch die Zugabe von APS und TEMED wird die Polymerisation durch Radikalbildung und elektrophile Angriffe auf Kohlenstoffdoppelbindungen des Polyacrylamids initialisiert. Binnen 15–20 min ist das Gel vollständig auspolymerisiert. Um ein Austrocknen des Gels während dieses Vorgangs zu vermeiden, wurde das gegossene Trenngel mit Aq. dest. überschichtet und vor der Zugabe der Sammelgelflüssigkeit wieder entfernt.

<b>Endkonzentration Polyacrylamid</b>	<b>3 %</b>
30 % Acrylamid-Gebrauchslösung	650 µl
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Aqua dest.	3 ml
10 % SDS	50 µl
APS	50 µl
TEMED	5 µl

Nach dem Eingießen der Sammelgellösung wurden Trennkämme eingelegt. Die fertigen Gele wurden entweder direkt weiterverwendet oder bis zu maximal einer Woche bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Nach Einbringen der Gele in die Gellaufkammer und anschließendem Beladen der Taschen mit den entsprechenden Proben, wurde für 15 min eine Spannung von 50 Volt angelegt. Für einen leichteren Größenvergleich wurde ebenfalls ein Größenstandard für Proteine

---

(ColorPlus™ *prestained protein ladder, broad range* (10-230 kDa), NEB) pipettiert. Zur Auftrennung der Proteine wurde die Spannung für 30 bis 40 min auf 140 Volt erhöht.

### **3.7.5 Western Blot**

Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Membran. Bei diesem sogenannten „Blotten“ wurde Polyvinylidenfluorid (PVDF) als Membranmaterial verwendet. Dieses Material hat gegenüber der ebenfalls geläufigen Nitrocellulose den Vorteil, eine höhere Reißfestigkeit sowie Proteinbindekapazität zu besitzen und ermöglicht ein besseres Verhältnis von Signal zu Hintergrund bei abschließender Verwendung des Chemilumineszenz-Detektionssystems. Allerdings muss die PVDF Membran vor der Verwendung kurz in Methanol geschwenkt und anschließend ca. 20 min in Transferpuffer gelagert werden, damit die Struktur des Materials entsprechend aufquellen kann und eine netzartige Struktur aufweist.

#### Transferpuffer:

39 mM Glycin

48 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

Als Blot-Verfahren wurde von den beiden etablierten Methoden (Tank Blot und Semi-dry Blot) für diese Dissertation ausschließlich die waagrechte Semi-dry Methode gewählt. Im Semi-dry Verfahren wurden folgende Bestandteile von der Anode zur Kathode luftblasenfrei aufeinander gestapelt: Fließpapier (Whatman-Filterpapier), PVDF-Membran, SDS-Gel und erneut Fließpapier. Die einzelnen Komponenten wurden zuvor auf eine passende Größe zu recht geschnitten und in Transferpuffer äquilibriert.

Der Proteintransfer erfolgte immer senkrecht zur Trennrichtung bei  $1 \text{ mA/cm}^3$  Membran für 60 min um die Muster der Auftrennung auf die Membran zu übertragen.

### **3.7.6 Immunlokalisation**

Um unspezifische Antikörper-Protein-Bindungen zu vermeiden wurde die Membran direkt nach dem Blot-Vorgang in 10 % (v/v) Roti-Block über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in einer

---

Petrischale mit ausreichend Flüssigkeit inkubiert. Daran schloss sich eine dreimalige Waschung der Membran bei R. T. mit dem Blockpuffer Roti-Block an. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte ebenfalls bei R. T. für 2 h. Hierfür wurde der entsprechende Primärantikörper (s. Tabelle unter 3.2.2) mit dem Blockpuffer verdünnt und zur besseren Benetzung der Membran wurde ein Parafilm unter der Membran platziert. Vor der einstündigen Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in einer 1:5000-Verdünnung erfolgte eine erneute dreimalige Waschung mit Roti-Block für jeweils 10 min bei R. T.. Zur Vermeidung von Hintergrundsignalen wurde die Membran 3 × mit Roti-Block für 5 min und 2 × mit PBS-T für je 10 min gewaschen.

#### PBS-T-Puffer

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

0,25 % Tween-20 (Polyoxyethylen (20)–sorbitan-monolaurat)

#### Bestandteile des Chemilumineszenz-Kits:

Super Signal West Dura Kit von Thermo Fischer

Lösung 1: Luminol (3-Aminophthalhydrazid)

Lösung 2: Peroxid-Puffer

Zur Visualisierung der Antikörper-Bindungen wurde ein Chemilumineszenz-Kit eingesetzt. Hierbei entsteht ein Leuchten durch elektromagnetische Strahlung, welches durch Elektronen, die von einem energetisch höheren in einen niedrigeren Zustand wechseln, zustande kommt. Dieser Wechsel wird durch eine chemische Reaktion ausgelöst – in diesem Fall derjenigen zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid, welches 1:1 gemischt wird. Als Resultat entsteht ein blaues Leuchten an den mittels Antikörpern und HRP gekoppelten Abschnitten.

Zu einer optimalen Signalentwicklung kommt es nach einer Inkubation von 10 min mit dem Chemilumineszenz-Reagenz. Eine Übertragung des Signals erfolgte unter Rotlicht im Fotolabor auf einen Detektions-Film. Die Belichtung des Films fand in einer Röntgenkassette statt und variierte je nach Signalstärke zwischen 2 min, 5 min

---

oder 1 h bis hin zu einer Inkubation über Nacht. Die anschließende Entwicklung des Films erfolgte mit einer Entwickler- und Fixierlösung von Agfa ebenfalls unter Lichtausschluss.

### **3.8 Nachweis der Proteinexpression**

#### **3.8.1 Aufarbeitung der mRNA und cDNA-Synthese**

Zur Isolierung der mRNA aus den kultivierten Granulosazellen wurden Aufreinigungssäulen der Firma Quiagen (QiaShredder) verwendet, die nach vorangegangener Zentrifugation (2 min bei 140000 rpm) Zelltrümmer und Reste der Zellmembran entfernen. In dem Eluat bleiben die isolierten Nukleinsäuren zurück.

Hierfür wurde zur Stabilisierung der RNA das zuvor mit Trypsin behandelte und im Anschluss abzentrifugierte Zellpellet (ca.  $10^6$  Zellen) in RLT-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und zur Zellyse zentrifugiert, um anschließend auf die Aufreinigungssäule gegeben zu werden. In dem Lysepuffer enthalten ist Guanidin-Isothiocyanat, welches für eine Denaturierung der zelleigenen DNAsen und RNAsen und somit einem Erhalt von Nukleinsäuren führt. Die Säule wurde am Ende verworfen und das Eluat entweder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Für die mRNA-Isolierung wurde das RNeasy-Kit - ebenfalls von der Firma Quiagen - eingesetzt. Durch die Extraktion der mRNA kann das Expressionsmuster der Proteine ermittelt werden. Die hierbei eingesetzten Silical-Säulen binden die RNA und sorgen für eine Entfernung restlicher Zellbestandteile. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll und bestand aus abwechselndem Waschen und Zentrifugieren des Lysats. Bei dem letzten Waschschrift wurden die Säulen jeweils vollständig durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min getrocknet. Die Eluierung der gebundenen RNA erfolgte durch  $30\text{ }\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA (gDNA) zu vermeiden, wurden die Proben für 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit DNAsen I inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 M EDTA Lösung und einer 10 min Denaturierung bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  unterbunden. Die isolierte messenger RNA (mRNA) wurde entweder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt durch den Einsatz der reversen Transkriptase in DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zur cDNA-Synthese wurde das iscript-cDNA-Synthese-Kit (Biorad) verwendet, wobei jeweils  $1\text{ }\mu\text{g}$  RNA eingesetzt und die Herstelleranweisungen befolgt wurden. Die

---

Konzentration sowie die Reinheit der Nukleinsäuren wurden mittels NanoDrop-System ermittelt. Die fertig synthetisierte cDNA wurde zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für einen Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

RNA Template	20 µl
5 × Reaktionspuffer	8 µl
Reverse Transkriptase	2 µl
<u>Gesamtvolumen:</u>	<u>40 µl</u>

<u>Cycler:</u>	5 min	25 °C
	30 min	40 °C
	5 min	85 °C
	Lagerung	4 °C

### 3.8.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation und semiquantitativen Ermittlung der mRNA-Konzentration anhand der cDNA wurde eine PCR mit jeweils spezifisch eingesetzten Primern durchgeführt. Die dafür benötigten Reagenzien wurden von NEB bezogen.

#### Primer (für feline Proben):

ST8SialI	for 5´ - AGGATTCTGGAGCAGAGGT - 3´;
ST8SialI	rev 5´ - GTGGCCAGGGTGTACATCAA - 3´;
ST8SialIV	for 5´ - GAAGCACGTGGAGTGGGTTA - 3´;
ST8SialIV	rev 5´ - CATGAGGAGACCTGTGCTGG - 3´;
GapDH	for 5´ - ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC - 3´;
GapDH	rev 5´ - TAGTTGAGGTCAATGAAGGGGTC - 3´;
RPS 13	for 5´ - TCCCATGGTGTTCACAAGT - 3´;
RPS 13	rev 5´ - TTATGCAACCAGGGCAGAGG - 3´;

---

Reaktionsansatz:

5 × Taq-Polymerase Puffer	5 µl
dNTP's	0,5 µl
RNase freies Aq. dest.	17,375 µl
Primer – Mix 10mM	1 µl
cDNA	1 µl

Gesamtvolumen: 25 µl

Initial erfolgte eine zwölfminütige Denaturierung bei 95 °C. Es schlossen sich 40 aufeinanderfolgenden Zyklen an:

Denaturierung	40 sec	95 °C
Primeranealing	40 sec	48 °C – 52 °C
Elongation	40 sec	72 °C

Im Abschluss erfolgte eine finale Elongation über 4 min bei 72 °C und eine Lagerung bei 4 °C. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert.

### **3.8.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Anhand der Gitterstruktur der Agarose und einem aufgebauten elektrischen Feld können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und so voneinander unterschieden werden. Die gewonnenen Produkte wiesen zum Teil lediglich eine Größe von 160 bp auf. Diese geringe Größe und die damit einhergehenden Schwierigkeiten bezüglich der Differenzierung erforderten die Verwendung eines 2%-igen (w/v) Agarosegels. Hierfür wurde Agarose in 1 × TBE-Puffer 2 min aufgekocht, bis alle Bestandteile gelöst waren und in eine Gel-Apparatur inkl. eines Gelkammes gegossen. Nach vollständiger Auspolymerisation des Gels wurde 1 × TBE-Puffer für die Übersichtung des Gels verwendet, sodass sich ein Spannungsgefälle aufbauen konnte. Zu 10 µl Probe wurden jeweils 2 µl eines Glycerin-haltigen Ladepuffers gegeben und anschließend in die Kammern gefüllt. Für einen besseren Größenvergleich wurde zusätzlich eine Größenstandart pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V für 1 h. Die Visualisierung der einzelnen Banden erfolgte im

---

Anschluss an die Elektrophorese durch die Inkubation in einem 0,05 % Ethidiumbromid-Bad für 30 min bei R. T.. Durch UV-Licht konnten die Fragmente detektiert und analysiert werden.

TBE-Puffer:

89 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)

89 mM EDTA

2 mM Borat (Ethyldiamintetraessigsäure)

### **3.9 Kettenlängenbestimmung & HPLC**

Als Grundlage dieser Methodik gilt das Prinzip der chromatographischen Auftrennung im Wechselspiel einer stationären Phase (Säule) und einer mobilen Phase (Lösungsmittel). Unter hohem Druck (HPLC = *high pressure liquid chromatographie*) können so unterschiedliche Trennungsgeschwindigkeiten erreicht werden. Je nach Intensität der Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase entstehen unterschiedliche Retentionszeiten, die mit einem Fluoreszenzdetektor gemessen werden können.

Für die Kettenlängenbestimmung wurden in dieser Dissertation  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren durch Markierung mit 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) und anschließender Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor und Auftrennung mittels HPLC erfasst. Hierfür wurden unter sauren Bedingungen Oligo- und PolySia-Ketten von den Trägerproteinen separiert und anschließend mit DMB inkubiert. Dies führte zu einer Markierung des jeweils reduzierenden Endes einer Sialinsäurekette. Die chromatographische Auftrennung dieser Fragmente erfolgte auf einer Anionen-Austauscher-Säule (DNA-Pac™), da Sialinsäuren ähnliche physikalische Verhaltensmuster aufweisen wie Nukleinsäuren. Die jeweilige Kettenlänge konnte anhand der Retentionszeit ermittelt werden, wobei längere Ketten eine hohe Affinität zu der stationären Phase aufweisen und somit eine längere Retentionszeit haben.

---

DMB-Puffer:

18 mM Na-Hydrogensulfat

1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol

10 mM Trifluoressigsäure

DMB-Reagenz:

1,22 mg DMB in 1 ml DMB-Puffer

Das Gewebe wurde wie in 3.7.1 und 3.7.2 beschrieben aufgearbeitet und die so extrahierten polysialylierten Proteine lyophilisiert und anschließend in frisch angesetztem DMB-Puffer zu gleichen Teilen mit Tris/HCL (50 mM) resuspendiert. Die Derivatisierung erfolgte über Nacht bei 11 °C auf dem Rüttler bei 750 rpm. Durch die Zugabe von NaOH wurde dieser Reaktionsschritt im weiteren Verlauf gestoppt. Anschließend wurde die Probe bei R. T. eine Stunde stehen gelassen und 10 min zentrifugiert (8 °C, 14440  $\times$  g). Der Überstand wurde weiterverwendet und mittels Autosampler auf die HPLC-Säule gegeben. Der Rest der Probe wurde verworfen. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte bei Anregung von 372 nm und Emission von 456 nm. Für die Eluierung wurde Milli-Q-Wasser (E1) und ein 4-N-Ammoniumacetat-Puffer (E2) bei einer Flussrate von 1 ml/min und folgendem Gradienten angewendet:

$T_{0 \text{ min}} = 0 \%$  (v/v) E2,  $T_{5 \text{ min}} = 3 \%$  (v/v) E2,  $T_{15 \text{ min}} = 8 \%$  (v/v) E2, und  $T_{60 \text{ min}} = 18 \%$  (v/v) E2. Abschließend wurde die Säule mit 100 % (v/v) E2 für 10 min gewaschen.

Als Standard diente eine mit in DMB-Tris/HCL verdünnte 10  $\mu$ g/ml Colominsäure-Lösung (1:400 (v/v)).

---

## 4 Ergebnisse

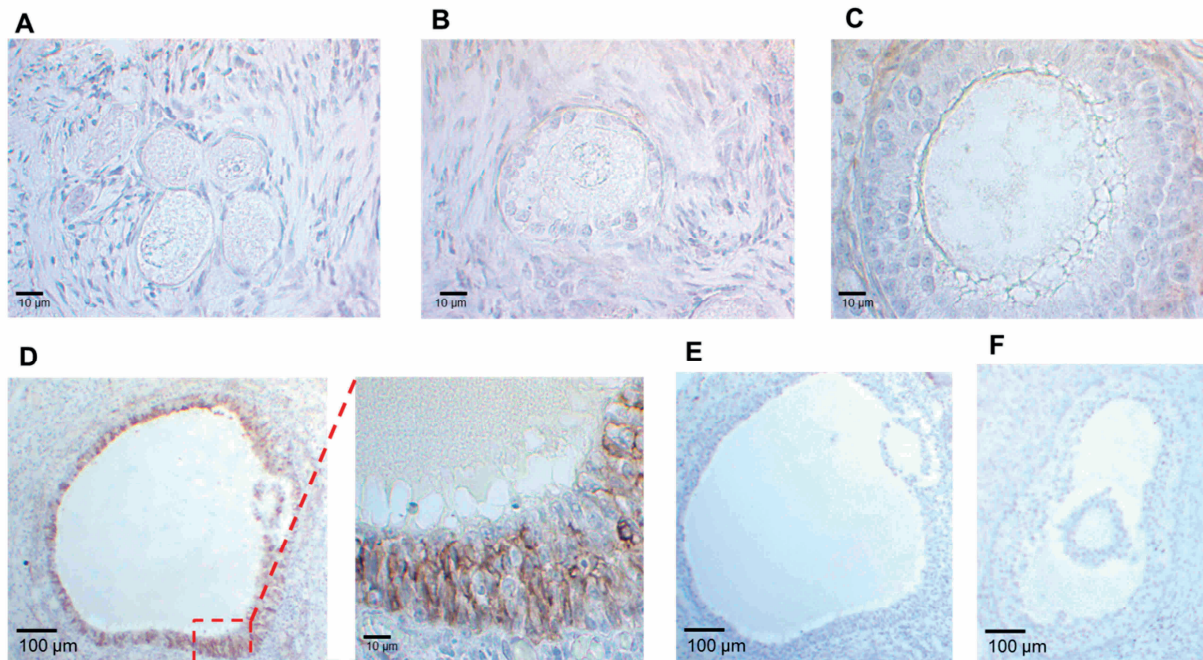
### 4.1 Polysialinsäuren in felinem Gewebe des weiblichen Reproduktionstraktes adulter Tiere

Erste Hinweise auf ein Vorkommen von NCAM in ovariellen Gewebe verschiedener Säugetiere lieferte Campbell *et al.* 1980 und Møller *et al.* 1991. Darauf begründet und in Zusammenhang bereits erfolgter Studien am Gewebe des Reproduktionstraktes diverser männlicher Tierarten (Hänsch *et al.* 2014; Simon *et al.* 2015) wurde nun der Fragestellung nachgegangen, ob auch im weiblichen Reproduktionstrakt Polysialinsäuren eine Bedeutung zukommt. Insgesamt standen Proben von 58 Katzen und 48 Mäusen für die unterschiedlichen Analysemethoden zur Verfügung.

#### 4.1.1 Lokalisation von PolySia in felinem Gewebe des Reproduktionstraktes

Zunächst wurden serielle Schnitte von felinem Ovar, Abschnitte der *Tuba uterina* sowie des Uterus zu verschiedenen Zykluszeitpunkten angefertigt. Neben nicht-trächtigen Tieren wurde auch das Gewebe von trächtigen Tieren zum Screening verwendet. Die Zuordnung zu einem bestimmten Zyklusabschnitt erfolgte makroskopisch nach Freistedt *et al.* 2001 (3.5.5). Anschließend wurde jeweils eine Übersichtsfärbung mittels H. E. und eine Färbung zur Detektion der Polysialinsäuren angefertigt. Die Immunlokalisation (3.5) mithilfe des mAK 735 (3.2.2) wurde bereits in Publikationen unserer Arbeitsgruppe (Simon *et al.* 2013; Ulm *et al.* 2013) beschrieben. Bei diesem Screening konnte nur in ovariellen und zyklisch aktivem Gewebe ein positives Signal detektiert werden. Alle restlichen Gewebeschnitte des Reproduktionstraktes waren unabhängig des Zykluszeitpunktes oder einer Trächtigkeit negativ. Im weiteren Verlauf wurde lediglich ovariellen Gewebe von nicht-trächtigen Tieren zur Untersuchung verwendet. PolySia konnte in den Ovarien zu verschiedenen Zykluszeitpunkten nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde, wie bei fast allen immunologischen Nachweisverfahren dieser Dissertation, das Enzym EndoN (3.2.3) für einen entsprechenden Verdau eingesetzt. Neben einer vereinzelt Lokalisation im Bindegewebe, konnte ein positives Signal an einigen Tertiärfollikeln, insbesondere der Granulosazellschicht, festgestellt werden (Abbildung 14).

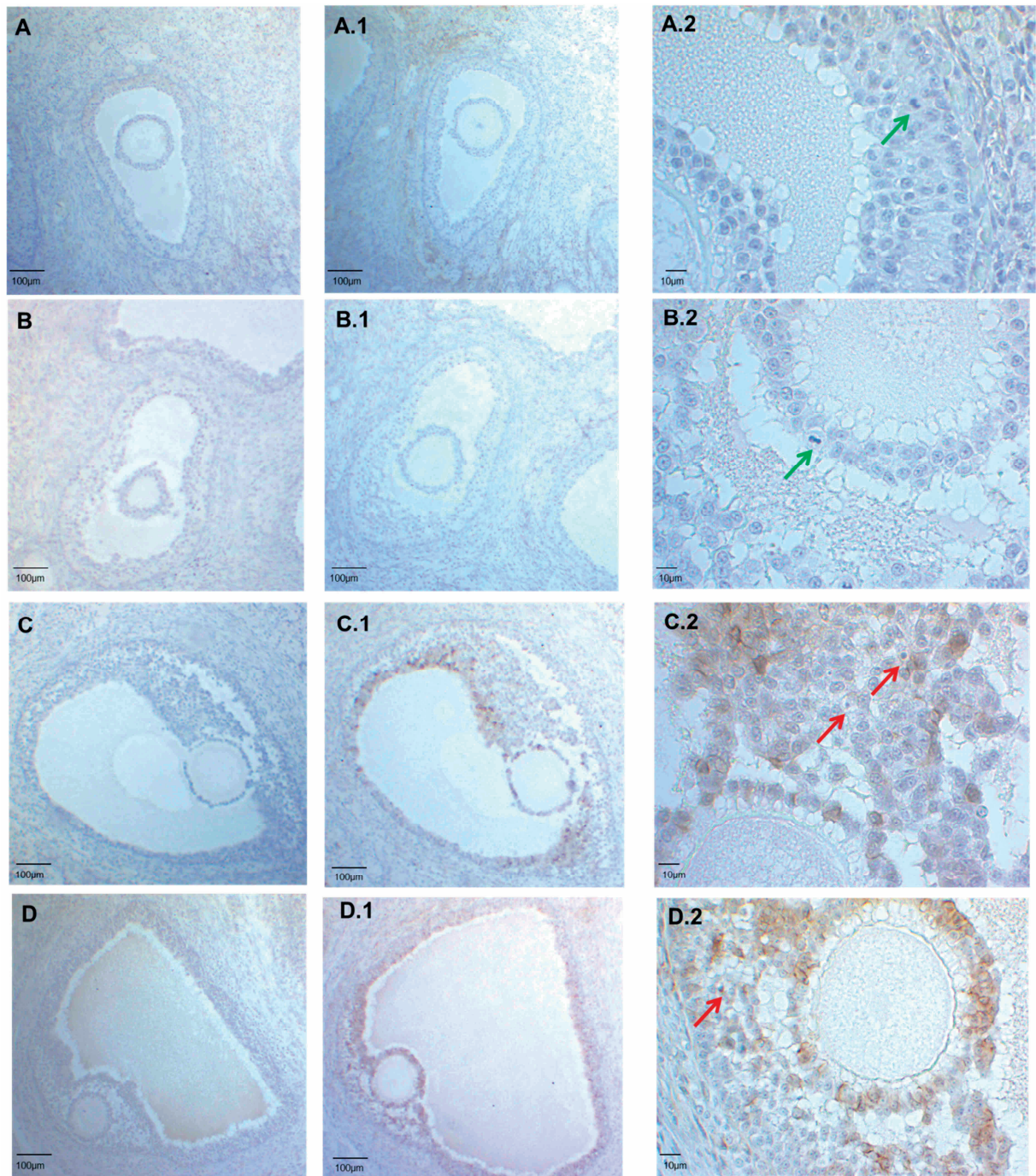
Auffallend war hierbei, dass nicht jeder Tertiärfollikel PolySia-positiv ist. Ein Nachweis von PolySia an Primordial-, Primär- oder Sekundärfollikeln konnte nicht erfolgen.



**Abbildung 14: Immunhistologische Lokalisation von PolySia in felinem Ovargewebe**

In Paraffin eingebettete Serienschritte wurden mit mAK 735 (3.2.2) gefärbt, um den Polysialylierungsstatus im (A) Primordial-, (B) Primär-, (C) Sekundär- und (D-F) Tertiärfollikel zu detektieren. (E) zeigt die Negativkontrolle mit dem bei der Vorbehandlung eingesetztem Enzym EndoN. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter pAK Ziege  $\alpha$ -Maus eingesetzt (Tabelle 3). Vergrößerungen: 10  $\times$  und 40  $\times$  0,25 Objektiv.

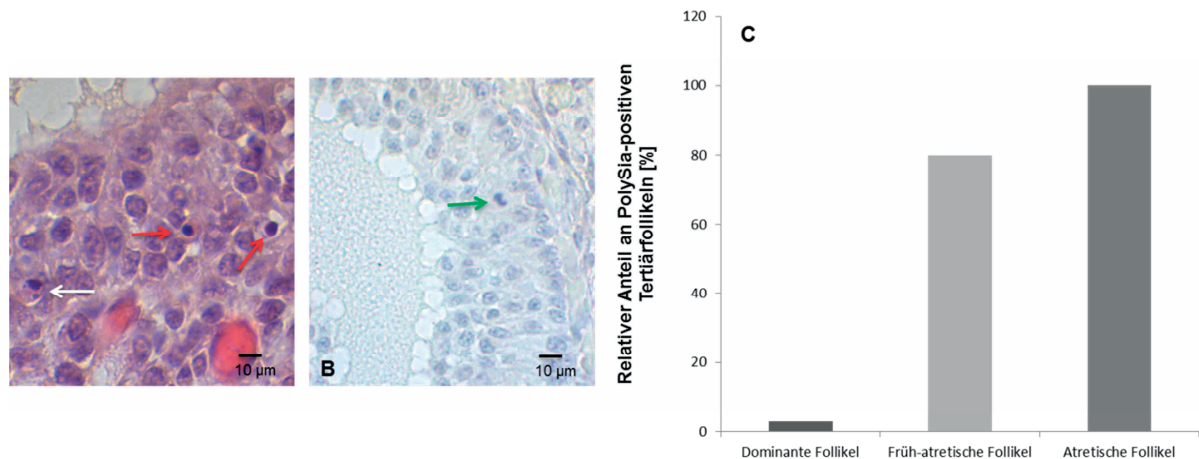
Um der Frage nachzugehen, ob der Polysialylierungsgrad der Granulosazellen mit der Follikulogenese und der folliculären Atresie zusammenhängt, wurden die Tertiärfollikel nach atretisch und intakt bzw. dominant unterschieden. Eine Zuordnung erfolgte mittels histologischer Auszählung der apoptotischen Granulosazellen eines jeden Follikels nach Jolly 1997 und Rodgers und Irving-Rodgers 2010 (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Immunlokalisation von PolySia in Tertiärfollikeln**

Paraffinierte Serienschnitte wurden mit mAK 735 (3.2.2) und folgend mit einem HRP-gekoppelten Sekundäntikörper für die Visualisierung von PolySia inkubiert. (A, B, C, D) Negativkontrolle nach Inkubation mit EndoN (3.2.2). (A.1, B.1) zeigen PolySia-negative dominante Tertiärfollikel. (A.2, B.2): Die Granulosazellschicht erscheint kompakt und es sind Mitosefiguren erkennbar. Follikel mit  $> 1\%$  Mitosefiguren wurden als dominante/intakte Follikel klassifiziert. C.1 und D.1 zeigen für PolySia positive, atretische Follikel. (C.2, D.2): In der Granulosazellschicht sind Anzeichen von Atresie erkennbar: Die Zellschicht erscheint aufgelockert, Makrophagen sind im *Antrum folliculare* erkennbar und einige Zellen zeigen Pyknose bzw. Karyohexis. Tertiärfollikel mit  $> 0,21\%$  apoptotischer Anzeichen und  $< 0,5\%$  mitotischer Zellen wurden der Follikelatresie zugeordnet (3.5.5). Rote Pfeile = apoptotische Zellen; Grüne Pfeile = mitotische Figuren. Vergrößerungen:  $10\times$  und  $40\times 0,25$  Objektiv.

Für die Auszählung (3.5.5) wurden von sechs Tieren insgesamt 68 Follikel mit mehr als 12875 Granulosazellen ausgezählt, um den apoptotischen und mitotischen Phänotyp in Zusammenhang mit einer Polysialylierung auszuwerten. In ca. 80 % der früh-atretischen Follikel und in 100 % der spät-atretischen Follikel konnte eine polysialylierte Granulosazellschicht identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte bei über 97 % der intakten bzw. dominanten Tertiärfollikeln kein PolySia nachgewiesen werden.



**Abbildung 16: Auswertung der dominanten und atretischen Follikel in Abhängigkeit von dem Polysialylierungsstatus**

Die Untersuchung von intakten und atretischen Tertiärfollikeln der Katze fand anhand in Paraffin eingebetteter Serienschritte und einer angewendeten H. E.-Färbung statt. Apoptotische Zellen wurden anhand von (A) Karyohexis (multipel, kondensiertes Chromatin, weißer Pfeil) und Pyknose (zentral kondensiertes Chromatin, rote Pfeile) ermittelt. (B) stellt ein Beispiel einer Mitosefigur proliferierender Zellen dar (grüner Pfeil). Parallel wurde eine Co-Lokalisation von PolySia angefertigt. (C) Dabei wurde die relative Anzahl der PolySia-positiven und der PolySia-negativen Follikel ermittelt und in intakt bzw. dominant ( $n = 35$ ), frühe Atresie ( $n = 4$ ) und späte Atresie ( $n = 29$ ) unterteilt.

Es ergibt sich aus der Auszählung, dass PolySia an atretischen Tertiärfollikeln, nicht aber bei dominanten Follikeln in der Granulosazellschicht zu finden ist und eine Rolle im Zusammenspiel der follikulären Atresie einnehmen könnte.

#### 4.1.2 Nachweis von Polysialinsäuren in Gewebshomogenaten

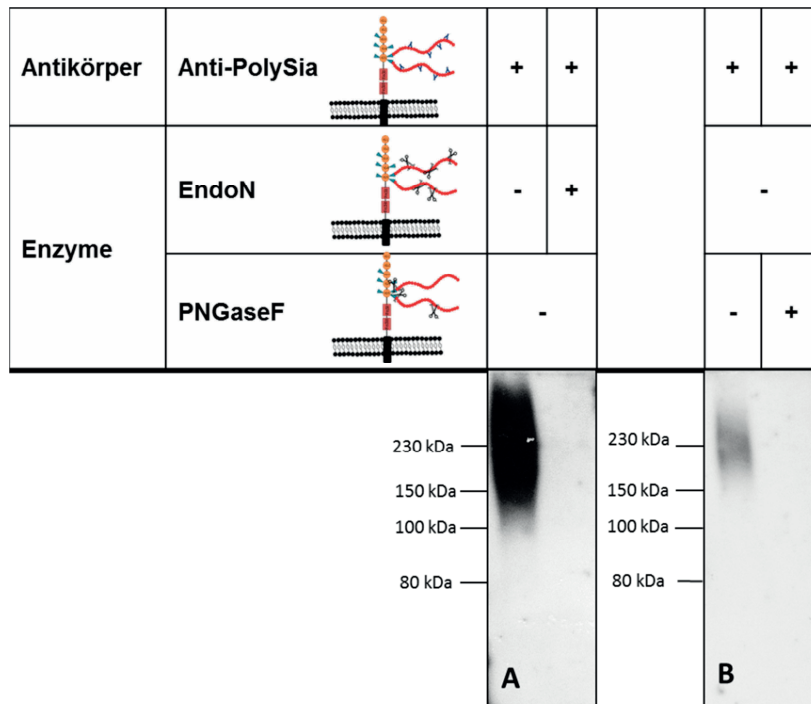
Um Polysialinsäuren in den verschiedenen Geweben nachzuweisen, wurde ovarielles Gewebe und Gewebe des Eileiters aufgearbeitet und lysiert. Mittels Affinitätspräzipitation (3.7.2) wurden die Proben gereinigt und auf eine einheitliche Konzentration anhand der eingesetzten Bead-Menge eingestellt. Zuvor wurden die Proben mehrerer Tiere gepoolt ( $n = 5$ ). Die Proben wurden im Anschluss gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot (3.7.5) analysiert ( $n = 12$ ).

---

Da in den immunhistologischen Versuchen (4.1.1) deutlich wurde, dass die gewonnenen Proben aus dem Gewebe des Eileiters kein Signal durch eine Inkubation mit dem mAK 735 ergaben, wurde im weiteren Verlauf nur mit Proben aus ovariellen Gewebe gearbeitet.

Abbildung 17 zeigt einen Western Blot nach Affinitätspräzipitation von ovariellen Gewebe der Katze. Als Negativkontrolle wurde das Enzym EndoN (3.7.3) für eine entsprechende Spaltung von PolySia verwendet. Sichtbar wurde im Bereich von ca. 100-250 kDa der deutlich erkennbare und typische „Schmier“ der Polysialinsäuren, welcher aufgrund des heterogenen Polysialylierungsgrades entsteht. Da in der Negativkontrolle nach der enzymatischen Behandlung mit EndoN kein Signal erkennbar ist, ist davon auszugehen, dass es sich um ein spezifisches Signal für PolySia handelt. In einem weiteren Schritt wurde die Probe vor der Immunfärbung mit PNGaseF behandelt, um zu überprüfen, ob die gefunden Strukturen am noch nicht bekannten Trägerprotein *N*- oder *O*-glykosylierte sind. Das genannte Enzym ist in der Lage *N*-glykosidische Bindungen zu spalten. Nach dem Verdau konnten keine Polysialinsäuren mittels Western Blot nachgewiesen werden, sodass die PolySia-Ketten mit der Freisetzung des *N*-Glykans vom Proteinrückgrat getrennt werden.

Aufgrund dieser beiden Erkenntnisse kann gesagt werden, dass PolySia in felinem Ovargewebe zu detektieren ist und dass diese Ketten über *N*-Glykane mit ihrem Trägerprotein verknüpft sind.

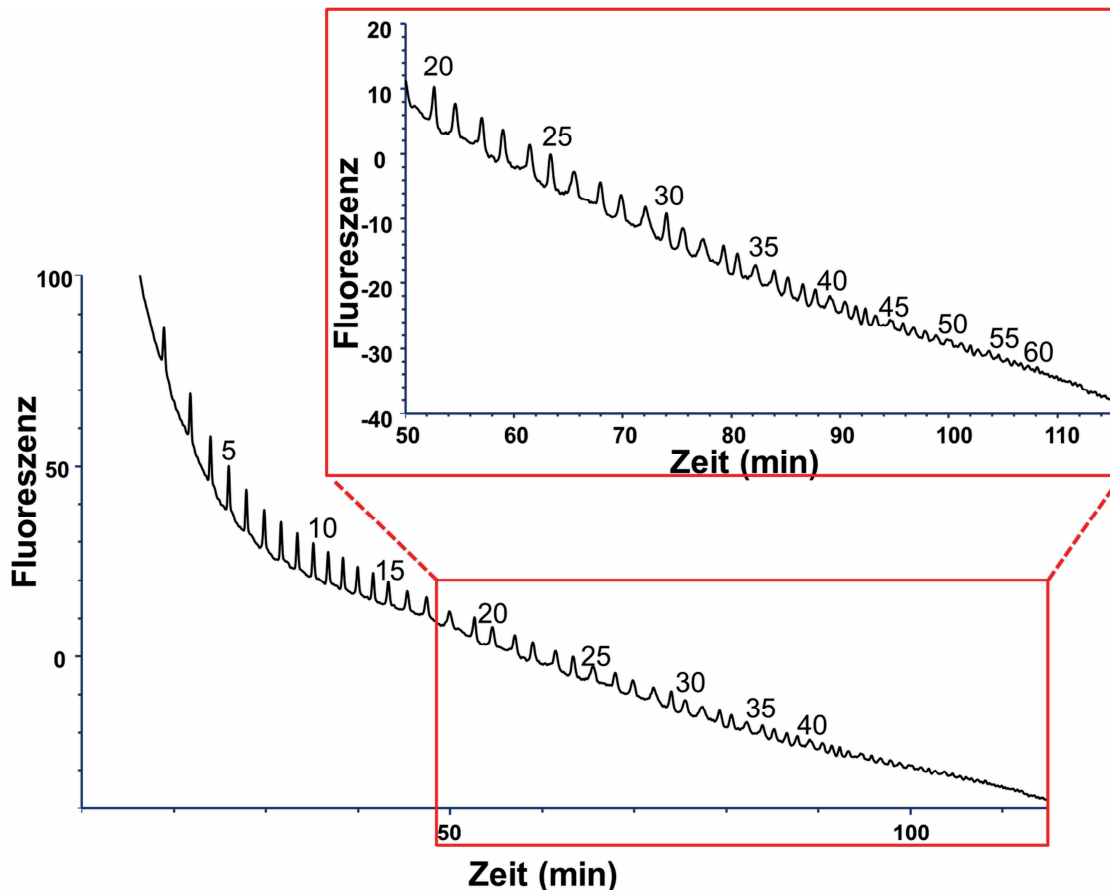


**Abbildung 17: Nachweis von PolySia in lysiertem ovariellen Gewebe anhand Western Blot-Analysen nach Affinitätspräzipitation**

Polysialylierte Proteine aus lysiertem ovariellen Gewebe wurden mittels Affinitätspräzipitation gereinigt und mit einem Western Blot unter der Verwendung des mAK 735 gegen PolySia analysiert ( $n = 12$ , je Versuch wurden Gewebe von fünf Tieren gepoolt). (A) zeigt einen Western Blot gegen PolySia nach einer enzymatischen Behandlung mit EndoN. (B) zeigt einen Western Blot nach enzymatischer Behandlung mit PNGaseF. In beiden Blots ist ein deutlich positives Signal in den jeweils unbehandelten Spuren bei ca. 230 kDa erkennbar. Visualisierte Molekularmassen wurden anhand eines Proteinstandards (kDa) verglichen.

#### 4.1.3 Bestimmung des Grads der Polysialylierung von NCAM

Da bekannt ist, dass die Länge der PolySia-Ketten bedeutenden Einfluss auf deren Funktion in einem biologischen System hat, wurde eine HPLC (3.9) zur Kettenlängenbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden Polysialinsäuren aus felinem ovariellen Gewebe an inaktive EndoN gekoppelt (3.7.2). Durch die milde saure Hydrolyse werden PolySia-Strukturen von ihrem Trägerprotein abgespalten. Das so entstandene, freie und reduzierende Ende der Kette wird mittels DMB parallel derivatisiert. Anschließend erfolgt eine chromatographisch-fluorometrische Detektion. Im Rahmen dieser sogenannten milden DMB-Derivatisierung konnten PolySia-Ketten mit bis zu 60 Sialinsäureuntereinheiten identifiziert werden (Abbildung 18;  $n = 2$ , je Versuch wurden Gewebeproben von fünf Tieren gepoolt). Somit ist dies die bisher längste direkt nachgewiesene PolySia-Kette im Säugetier.

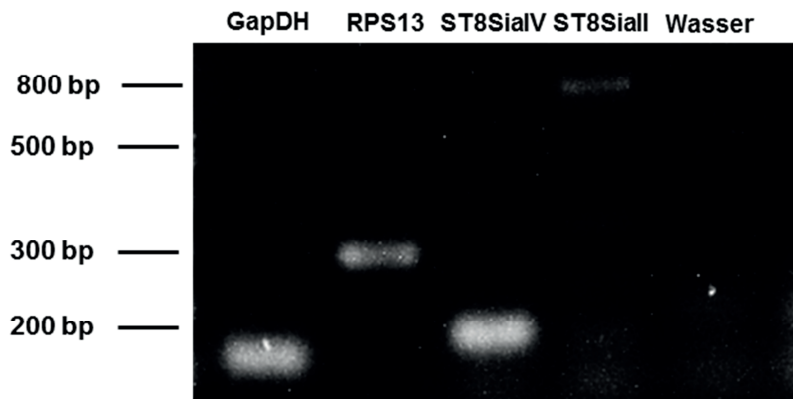


**Abbildung 18: Kettenlängenbestimmung von PolySia mittels milder DMB-HPLC nach Affinitätsaufreinigung**

Die PolySia-Ketten aus felinelem ovariellem Gewebe wurden nach Affinitätspräzipitation mit inaktiver EndoN (3.7.2) hydrolytisch gespalten und durch DMB am reduzierenden Ende derivatisiert und anschließend über eine DNA-Pac™-Säule (Anionen-Austauscher-Säule) aufgetrennt und fluorometrisch gemessen. Die Anzahl der Sialinsäure-Einheiten wird an frei definierten Peaks oberhalb des Signals angezeigt ( $n = 2$ ).

#### 4.1.4 Nachweis von Transkripten der Polysialyltransferasen

Um zu untersuchen, welche Polysialyltransferasen an der Expression von PolySia beteiligt sind, wurde eine semi-quantitative mRNA Analyse (3.8) durchgeführt ( $n = 3$ ). Mittels reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) und der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung auf einem Agarosegel konnte nachgewiesen werden, dass die Polysialyltransferase St8SialIV die dominante Rolle bei der Expression der Polysialinsäuren übernimmt (Abbildung 19). Das Signal der St8SialII war im direkten Vergleich hingegen deutlich schwächer. Als Kontrolle und internen Standard wurde die mRNA der Enzyme GapDH und RPS13 verwendet.



**Abbildung 19: Nachweis der Polysialyltransferasen St8SialI und St8SialIV mittels RT-PCR**

Gen-Transkripte der Polysialyltransferasen St8SialI und St8SialIV wurden durch RT-PCR amplifiziert. Die entstandenen Produkte wurden anschließend auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid ausgewertet. Als interner Standard wurden die Housekeeping-Gene GapDH und RPS13 verwendet. Fragmente der Molekularmassen wurde in Basenpaare (bp) angegeben.

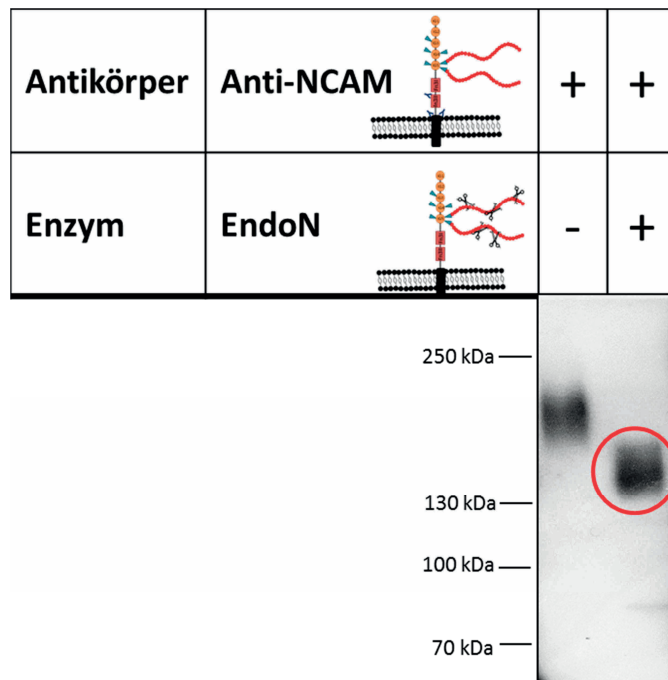
Zusammenfassend lässt sich bis hierhin sagen, dass PolySia auf der Zelloberfläche von Granulosazellen mit einer Kettenlänge von mindestens 60 Sialinsäureresten vorkommen kann und wahrscheinlich hauptsächlich durch die St8SialIV synthetisiert wird.

#### **4.1.5 Identifizierung des PolySia-Trägerproteins**

Die Identifizierung des Trägerproteins der Polysialinsäuren erfolgte zunächst mittels Western Blot (n = 5; 3.7.5).

Erste Hinweise auf das Trägerprotein lieferte bereits der oben genannte enzymatische Abbau mittels PNGaseF. Für den Nachweis mittels Western Blot wurden die Proben, wie bereits beschrieben, durch Affinitätspräzipitation und die Verwendung inaktiver EndoN (3.7.2) gereinigt. Durch dieses Verfahren wurde sichergestellt, dass nur polysialylierte Proteine in der Probe enthalten waren. Im weiteren Verlauf wurde die Probe als Kontrolle mit EndoN versetzt sowie ohne vorherige enzymatische Behandlung gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf die Membran übertragen. Die Immunlokalisation (3.7.6) erfolgte mit einem monoklonalen NCAM-Antikörper.

In Abbildung 20 ist ein deutliches Signal mit einem breiten „Schmier“ erkennbar, welcher wie bereits beschrieben (4.1.2) auf die weite Verzweigung der Polysialinsäuren zurückzuführen ist. Das Signal ist bei ca. 200 kDa lokalisiert.



**Abbildung 20: Identifizierung von polysialyliertem NCAM mittels Western Blot**

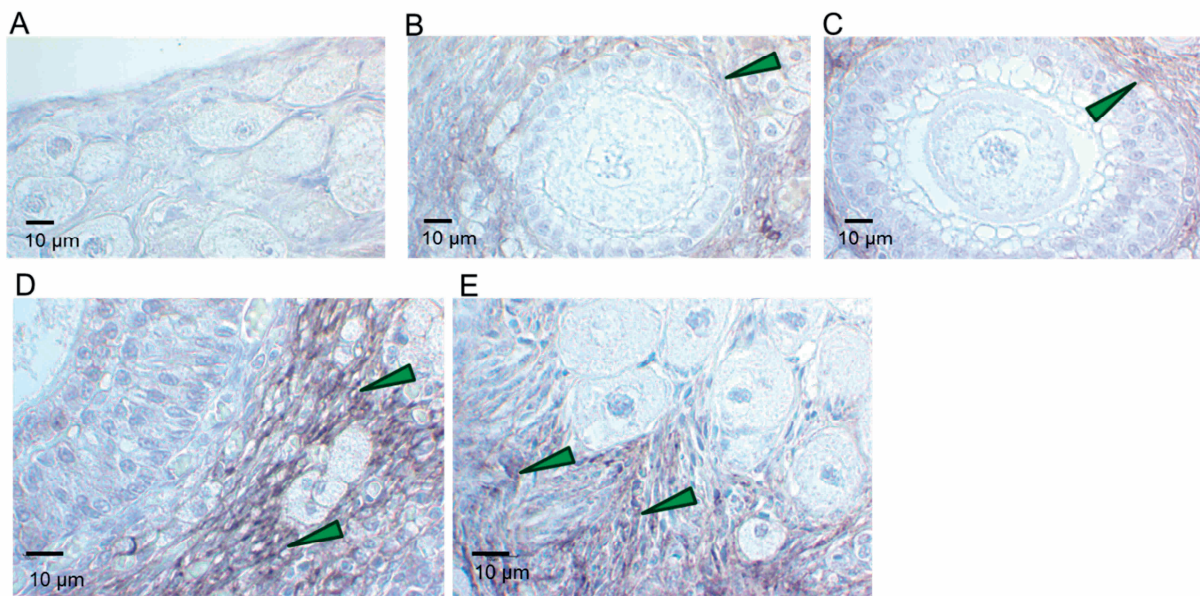
Lysiertes ovarielles Gewebe wurde nach Affinitätspräzipitation mittels Western Blot analysiert ( $n = 5$ , je Versuch wurden Gewebe von fünf Tieren gepoolt). Als Kontrolle wurde das Enzym EndoN verwendet. NCAM wurde durch vorherige Inkubation mit den Primärantikörpern 1G4, 2D4 und 5B8 (3.2.2) mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Nach dem Verdau mit EndoN ist ein Shift des Signals von ca. 200 kDa auf ca. 140 kDa (roter Kreis) zu erkennen. Die Molekularmassen wurden anhand eines Proteinstandards (kDa) verglichen.

Weiterhin wurde die Probe mit EndoN vorbehandelt. Im Vergleich der beiden Proben hat ein eindeutiger Shift des Signals auf 140 kDa stattgefunden. Somit lässt sich sagen, dass es sich bei dem identifizierten Protein um NCAM-140 handelt. Das immer noch breite Signal spricht für einen nicht vollständigen enzymatischen Abbau durch EndoN, was an einer hohen Masse an Polysialinsäuren bzw. der hohen Kettenanzahl liegen könnte. Die zunehmende Signalintensität in der mit EndoN versetzten Probe geht einher mit einer gesteigerten Antigen-Antikörper-Bindung des NCAM-Antikörpers und der Konzentration des Proteins auf eine geringere Fläche.

#### 4.1.6 Lokalisation von NCAM in felinem ovariellem Gewebe

Zur Lokalisation im Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt (3.5.3). Hierfür wurden Serienschnitte des ovariellen Gewebes hergestellt. Parallel wurden die Schnitte mit entweder Antikörpern gegen NCAM oder gegen PolySia (3.2.2) inkubiert um eine Co-Lokalisation festzustellen (n = 10).

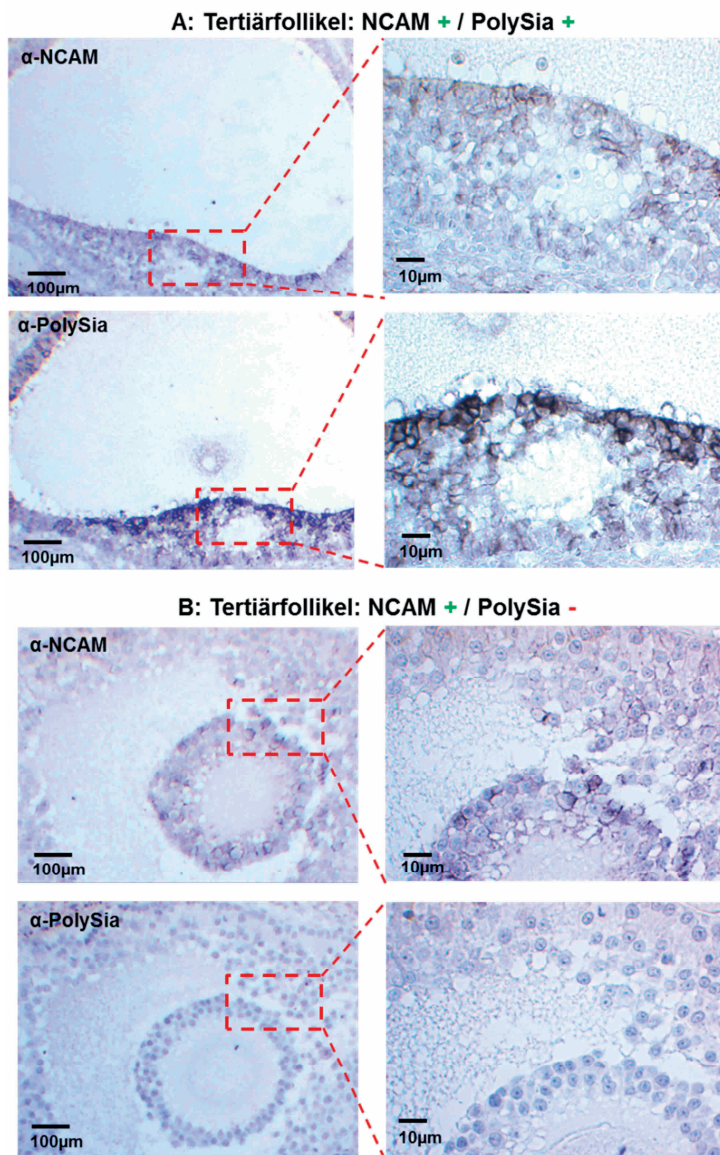
NCAM konnte neben Tertiärfollikeln auch an früheren Entwicklungsstadien der Follikel sowie im Interstitium gefunden werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Nachweis von NCAM in Primordial-, Primär- und Sekundärfollikeln des felinen Ovars**

Paraffinierte Serienschnitte wurden mittels den mAK's 1G4, 2D4 sowie dem Zellüberstand der 5B8-Zellen (3.2.2) und einem HRP-gekoppelten pAK Ziegen  $\alpha$ -Maus zur Visualisierung von NCAM behandelt (n = 10). (A) Primordial-, (B) Primär-, und (C) Sekundärfollikeln. (D und E) zeigen NCAM im Interstitium feliner Ovarien. Die grünen Pfeile markieren das bräunliche Signal für NCAM. Vergrößerung: 40  $\times$  0,25 Objektiv.

Eine Co-Lokalisation von PolySia und NCAM war an den bereits oben beschrieben atretischen Follikeln möglich (4.1.1, 4.1.2). Weiterhin konnte eine Immunlokalisierung mit mAK gegen NCAM auch an PolySia-negativen Tertiärfollikeln erfolgen. Dies ist exemplarisch in Abbildung 22 dargestellt.



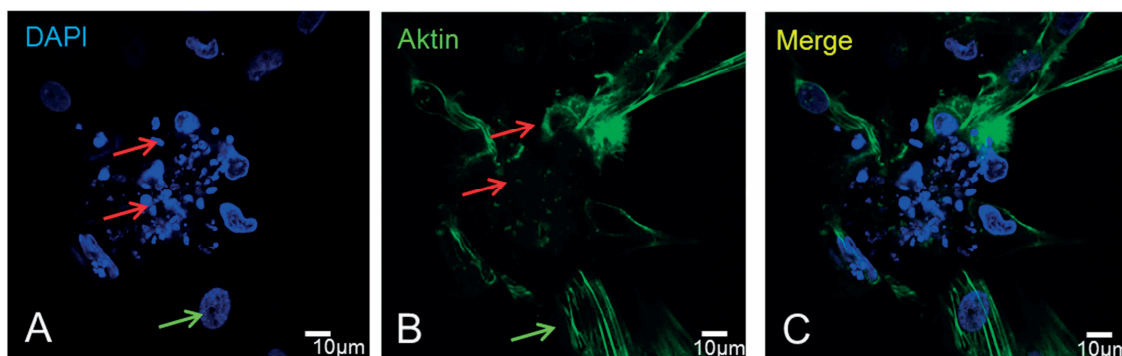
**Abbildung 22: Immunlokalisierung von NCAM in Tertiärfollikeln**

(A und B) PolySia und NCAM wurden mittels Immunhistochemie in Tertiärfollikeln feline Ovarien unter Verwendung des mAK 735 und der mAK 1G4, 2D4 und des Zellüberstandes der 5B8-Zellen (3.2.2) dargestellt. Hierfür wurden in Paraffin eingebettete Serienschnitte genutzt. (A) Co-Lokalisation von PolySia und NCAM an einem Tertiärfollikel. (B) Der Follikel zeigt für NCAM ein positives Signal, hingegen nicht für PolySia. Vergrößerungen: 10 × und 40 × 0,25 Objektiv.

Daraus lässt sich schließen, dass NCAM häufig an der Zelloberfläche von Granulosazellen zu finden ist und nur zu bestimmten Ereignissen PolySia vorkommt. Somit wird NCAM vermutlich sekundär im Zusammenhang der folliculären Atresie mit Ketten von PolySia modifiziert.

#### 4.1.7 Untersuchung der biologischen Funktion von PolySia-NCAM-140

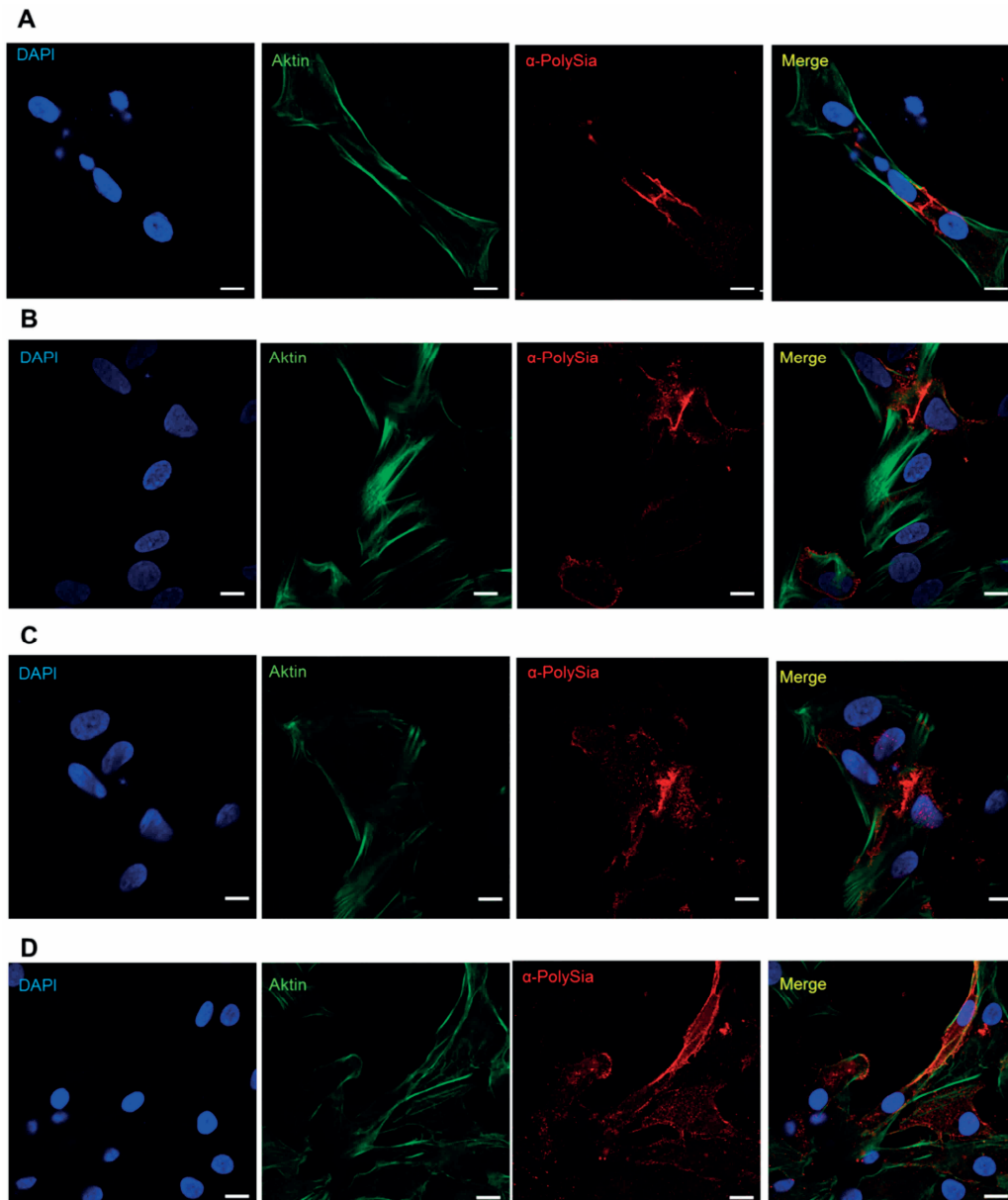
Nachdem die Granulosazellen als polysialylierte Zellen mittels Immunhistologie identifiziert wurden (4.1.1), sollte bei Versuchen mit felines primären Granulosazelllinien untersucht werden, ob durch PolySia der Einfluss Apoptose-induzierender Substanzen beeinflussbar ist. Um einen Zusammenhang zwischen PolySia und einer möglichen Funktion innerhalb der Apoptose von Granulosazellen festzustellen, wurden frisch isolierte Granulosazellen mittels Primärkultur kultiviert (3.6) und zur Induktion der Apoptose mit porcinem Luteinisierendes Hormon (pLH) stimuliert. Apoptotische Granulosazellen wurden mittels DAPI Färbung identifiziert. Apoptotische Zellkerne weisen bei dieser Färbung neben deutlich kondensiertem Chromatin eine erhöhte Anzahl von Kernfragmenten und einer verstärkten Kolorierung auf. Zusätzlich wurde zur Orientierung das Aktin-Zytoskelett durch mit FITC konjugiertes Phalloidin (3.2.2) visualisiert. Bei apoptotischen Zellen verliert dieses seine physiologische, lineare Struktur. Mit fortschreitender Apoptose ergibt sich ein diffuses Färbemuster oder sogar ein vollständiger Verlust der Aktin-Struktur (Abbildung 23). Zusätzlich wurde zur genaueren Verifizierung der Granulosazellen der Antikörper gegen das mitochondriale *steroid acute regulatory protein* (StAr) (3.2.2) verwendet. So konnte eine Abgrenzung von beispielsweise Fibroblasten erfolgen.



**Abbildung 23: Beurteilung der Vitalität von kultivierten Granulosazellen**

(A) Für die Beurteilung der Vitalität der Granulosazellen wurde einerseits eine DAPI Kernfärbung vorgenommen. Apoptotische Zellkerne erscheinen kleiner und mit heller kondensiertem Chromatin (Pyknose). Intakte Zellkerne weisen eine gleichmäßige Chromatinstruktur auf. Andererseits wurde das Aktin-Zytoskelett mittels FITC-Phalloidin visualisiert (B). Bei apoptotischen Zellen wird dieses degradiert und ist gekennzeichnet durch abgerundete Aktinfilamente oder gar den kompletten Strukturverlust. Die grünen Pfeile markieren intakte Zelle, die roten apoptotische Zellen. (C) stellt die *Merge*-Darstellung aus (A) und (B) dar. Vergrößerung: 100 × 0,25 Objektiv.

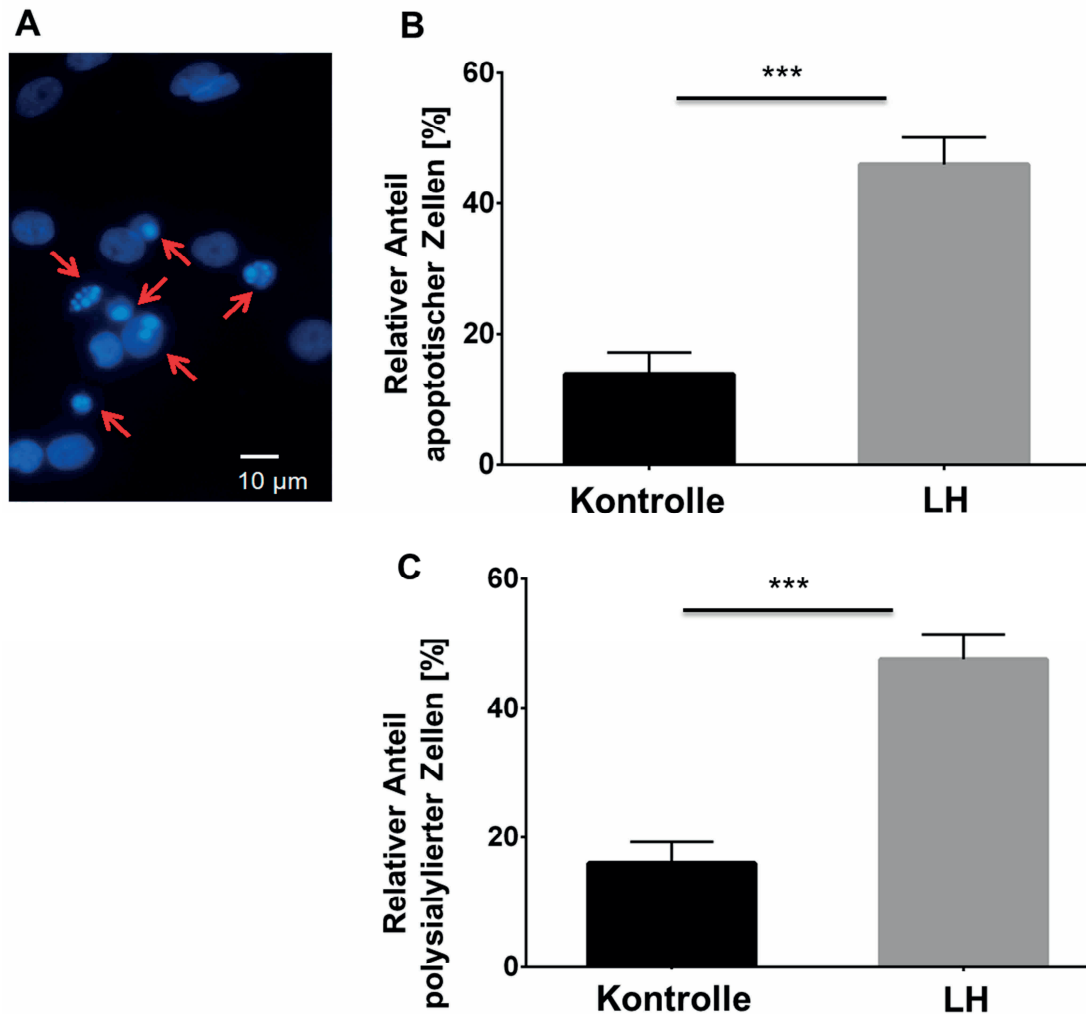
Zunächst wurde der Polysialylierungsstatus (3.6.3) der selektierten Granulosazellen ohne die Verwendung von Stimulantien evaluiert. Dabei war auffällig, dass vorrangig an den direkten Zell-Zell-Kontaktpunkten ein deutlich positives Signal für PolySia detektiert werden konnte. Membranabschnitte, an denen sich nicht unmittelbar weitere Zellen angesiedelt hatten, wiesen ein deutlich schwächeres bzw. kein Signal für PolySia auf (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung feliner Granulosazellen nach Kultivierung**

Immunfärbungen (3.6.3) wurden an formalin-fixierten Granulosazellen gegen (A-D) Aktin (FITC/grün, 3.2.2) und gegen PolySia (Rhodamin/rot, 3.2.2) durchgeführt. DAPI markierte die Zellkerne (blau, 3.2.2). Im *Merge* erfolgte die deckungsgleiche Zusammenführung der einzelnen Bilder. Die Größenbalken markieren 10  $\mu\text{m}$ ; die Aufnahmen wurden mit einem 100  $\times$  0,25 Objektiv angefertigt.

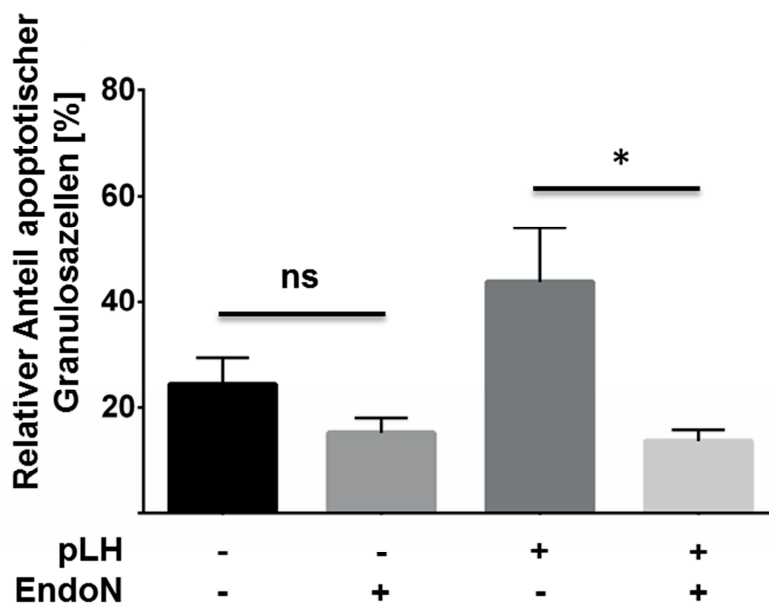
Bei der Stimulation mit pLH konnte gezeigt werden, dass sowohl die Apoptoserate als auch die Expression von PolySia nach der Behandlung deutlich gegenüber nicht-stimulierten Zellen ansteigt (Abbildung 25). Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen erhöht sich von 14 % in der Kontrolle auf 46 % nach der Stimulation mit LH. Der Grad der Polysialylierung steigt in ähnlichem Maße an.



**Abbildung 25: Verteilung apoptotischer feline Granulosazellen nach Stimulation**

(A) Die apoptotischen Granulosazellen (rote Pfeile) weisen in der DAPI-Kernfärbung helleres, kondensiertes Chromatin auf und erscheinen kleiner (Pyknose) Für die Beurteilung der Vitalität der Granulosazellen wurde einerseits eine DAPI Kernfärbung vorgenommen. Das Vorkommen von (B) apoptotischen und (C) polysialylierten Granulosazellen nach Stimulation mit pLH (3.2.4, Tabelle 5) wurde an kultivierten Zellen anhand der DAPI-Färbung nach Formalin-Fixierung ermittelt. Die Auszählung der apoptotischen und polysialylierten Zellen wurde an je 220 randomisierten Zellen in 100 × Vergrößerung einer Stimulation durchgeführt (n = 6, 5400 Zellen insgesamt). Die Werte repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) von sechs unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte durch Student's t-Test (ungleiche Varianzen, zweiseitig). \*\*\*p < 0,001.

Um die Auswirkung von PolySia während des apoptotischen Prozesses der primär kultivierten Granulosazellen zu untersuchen, wurde ein enzymatischer Verdau mit EndoN durchgeführt (Abbildung 26). Die nicht stimulierten und de-polysialylierten Zellen führen zwar zu einer leichten, aber statistisch nicht aussagekräftigen, Reduktion der apoptotischen Zellen. Gleichzeitig führte diese enzymatische Reaktion allerdings bei einer sich anschließenden Behandlung mit LH zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der apoptotischen Zellen.



**Abbildung 26: Auswirkung von PolySia auf die Apoptose der Granulosazellen**

Kultivierte und anschließend mit Formalin fixierte Granulosazellen (3.6.3) wurden entweder mit pLH, EndoN oder EndoN und pLH stimuliert (3.6.2). Anhand der DAPI-Färbung wurde der prozentuale Anteil intakter oder atretischer Zellen wurde an je 220 randomisierten Zellen in 100 × Vergrößerung einer Stimulation durchgeführt (n = 3, 3500 Zellen insgesamt). Die Werte repräsentieren den SEM von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Dunnett-Test (\*P-Wert < 0,05; ns, nicht signifikant).

Somit deuten die Ergebnisse daraufhin, dass ein Auftreten von PolySia an der Oberfläche und insbesondere an den Zell-Zell-Interaktionspunkten von Granulosazellen einen Einfluss auf das Voranschreiten der Atresie haben könnte.

---

## 4.2 Polysialinsäuren in murinem Gewebe des weiblichen Reproduktionstraktes adulter Tiere

### 4.2.1 Lokalisation von PolySia in murinen Gewebe des Reproduktionstraktes

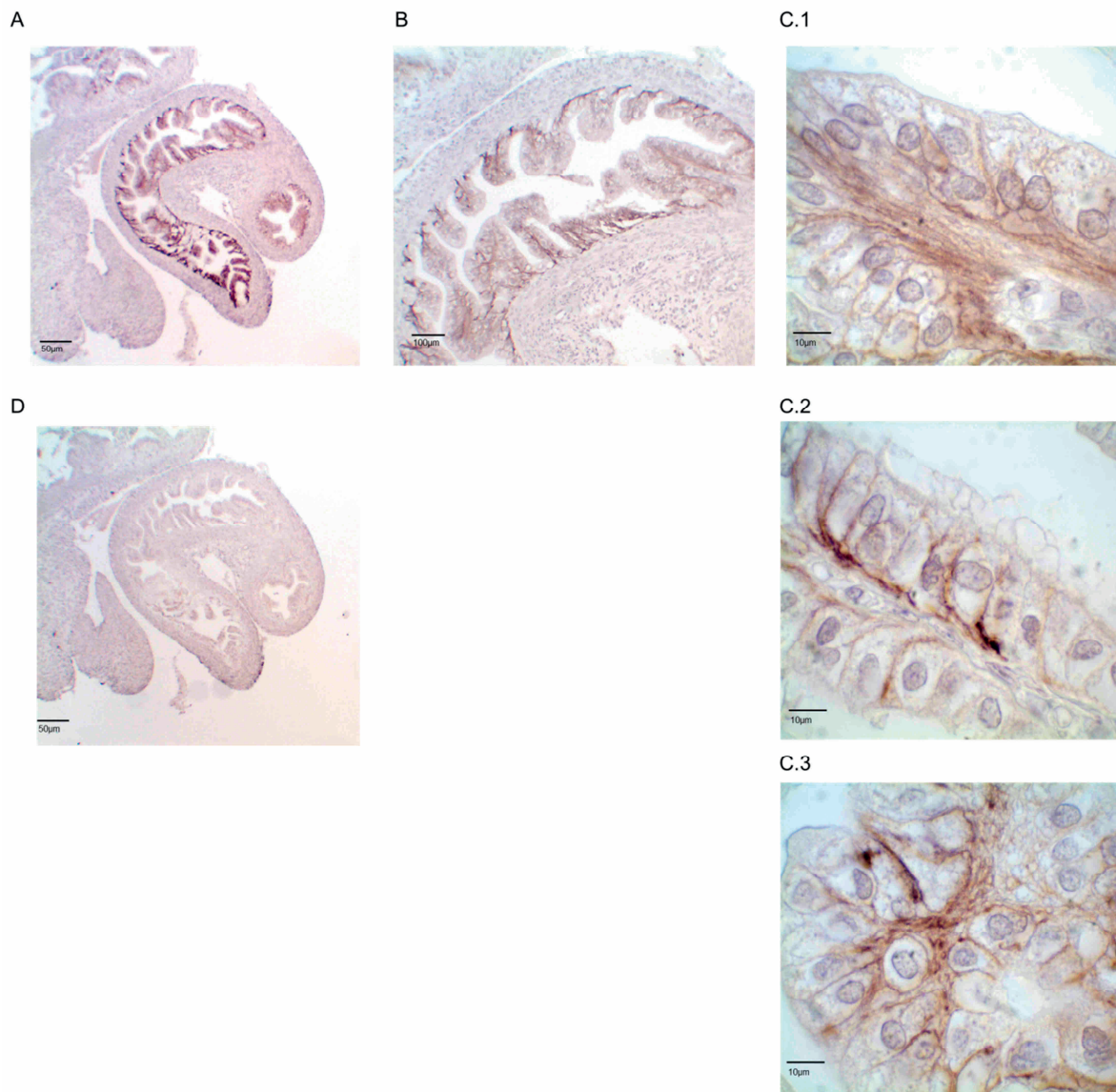
Zunächst wurden serielle Schnitte von murinem Ovar, Ovidukt sowie des Uterus zu verschiedenen Zykluszeitpunkten angefertigt. Neben Nicht-trächtigen Tieren wurde auch das Gewebe von trächtigen Tieren zum Screening verwendet. Die Zuordnung zu einem bestimmten Zyklusabschnitt erfolgte mittels Vaginalzytologie (3.4). Anschließend wurde jeweils eine Übersichtsfärbung mittels H. E. und eine Färbung zur Detektion der Polysialinsäuren (3.5.3) angefertigt (n = 22). Bei der Maus konnte im Gegensatz zu den untersuchten Katzenproben nur in Gewebe des Ovidukts ein positives Signal erzeugt werden. Besonders auffällig ist der Bereich der *Tuba uterina*. Hier erscheint ein deutliches Signal im Bereich der *Tunica mucosa*. Das ovarielle Gewebe ist hingegen PolySia-negativ (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Identifikation von PolySia in murinem Gewebe**

In Paraffin eingebettete Serienschritte wurden mit mAK 735 (3.2.2) gefärbt, um den Polysialylierungsstatus im (A) Ovar und *Tuba uterina* zu detektieren. (B, C) Die *Tunica mucosa* der *Tuba uterina* weist ein deutliches Signal für PolySia auf (weißer Pfeil, brauner Niederschlag). Vergrößerungen: 4 ×, 10 × und 40 × 0,25 Objektiv.

Bei näherer Betrachtung der positiven Anteile wird deutlich, dass PolySia scheinbar die Epithelzellen der *Tunica mucosa* umhüllt und zwischen ihnen entlang zieht (Abbildung 28). Vor Allem die stark gefalteten Anteile der *Tuba uterina* sind PolySia-positiv.



**Abbildung 28: Immunhistochemische Untersuchung der murinen *Tuba uterina* auf PolySia**

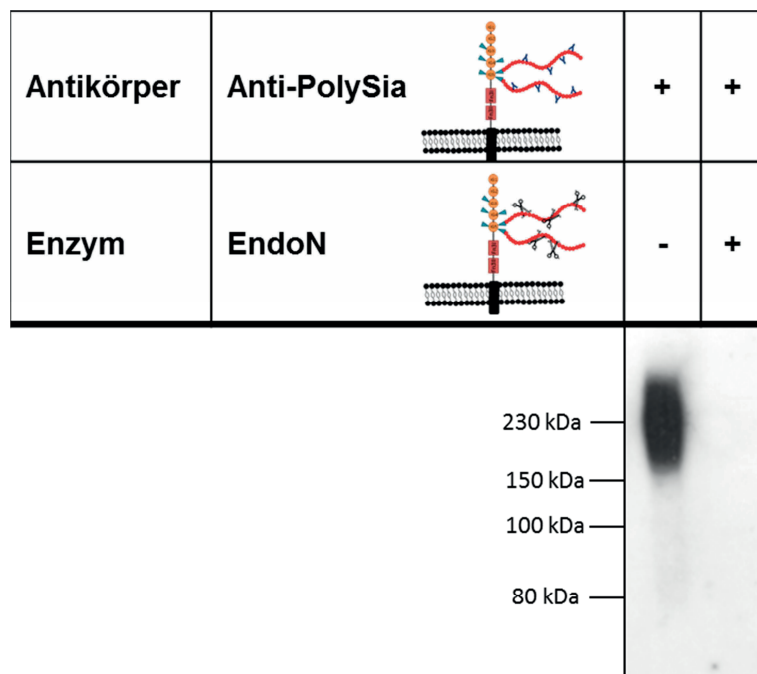
In Paraffin eingebettete Serienschnitte wurden mit mAK 735 (3.2.2) gefärbt, um den Polysialylierungsstatus in (A) der murinen *Tuba uterina* zu detektieren. (B, C1.-C.3) Zeigen die 100 × Vergrößerung der *Tunica mucosa*. (D) stellt die Negativkontrolle mit dem bei der Vorbehandlung eingesetzten Enzym EndoN dar. Vergrößerungen: 4 ×, 40 × und 100 × 0,25 Objektiv.

#### 4.2.2 Nachweis von Polysialinsäuren in murinen Gewebshomogenaten

Um Polysialinsäuren in den verschiedenen Geweben nachzuweisen, wurde Gewebe des Ovars und Ovidukts aufgearbeitet und lysiert. Mittels Affinitätspräzipitation wurden die Proben gereinigt. Zuvor wurden die Proben von fünf Tieren gepoolt. In Folge der Affinitätspräzipitation konnte eine einheitliche Konzentration der Proben

gewährleistet werden. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (n = 6).

Positive Signale konnten wie in der Immunhistologie nur in Lysaten von Gewebe des Ovidukts erzeugt werden. Abbildung 29 zeigt einen Western Blot nach Affinitätspräzipitation von Gewebe des Ovidukts der Maus. Als Negativkontrolle wurde das Enzym EndoN für eine entsprechende Abspaltung der PolySia verwendet. Sichtbar wurde der bereits beschriebene „Schmier“ der Polysialinsäuren im Bereich von ca. 140-250 kDa. Da in der Negativkontrolle nach der enzymatischen Behandlung mit EndoN kein Signal erkennbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein spezifisches Signal für PolySia handelt.



**Abbildung 29: Western Blot von lysiertem Gewebe des Ovidukts der Maus nach Affinitätspräzipitation für den Nachweis von PolySia**

Polysialylierte Proteine aus lysiertem Gewebe des Ovidukts wurden mittels Affinitätspräzipitation gereinigt und mit einem Western Blot unter der Verwendung des mAK 735 gegen PolySia (3.2.2) analysiert (n = 6, je Versuch wurden Gewebe von fünf Tieren gepoolt). Bei ca. 230 kDa ist ein deutlich positives Signal für PolySia erkennbar. Als Negativkontrolle wurde das Enzym EndoN (3.2.3) verwendet. Visualisierte Molekularmassen wurden anhand eines Proteinstandards (kDa) verglichen.

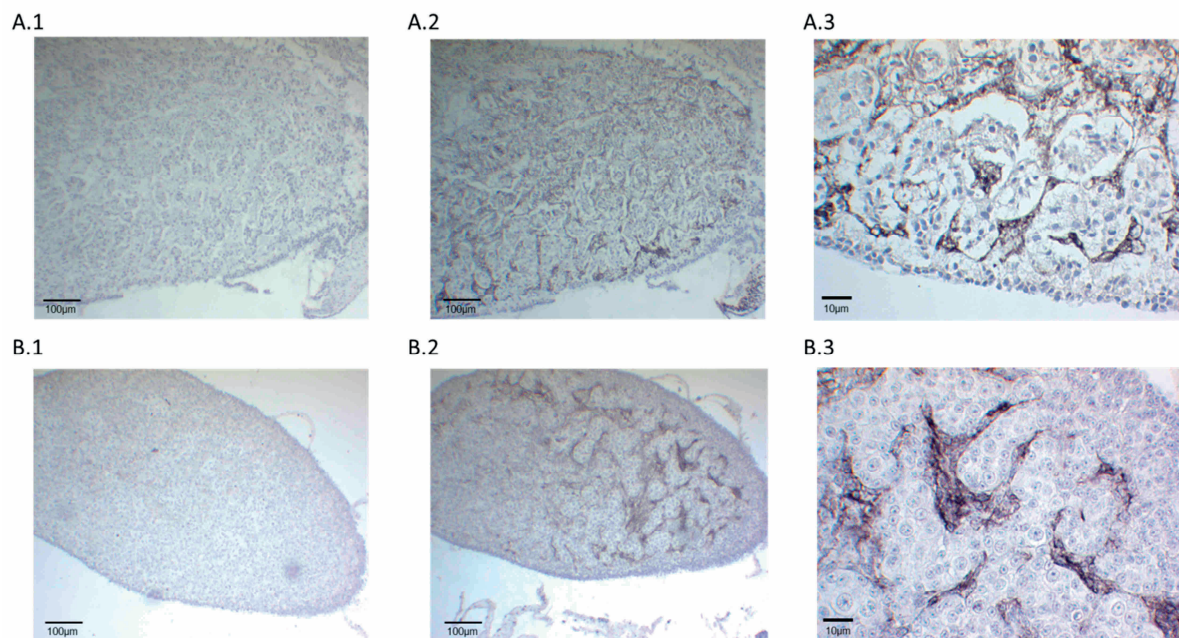
Folglich lässt sich feststellen, dass PolySia in dem Gewebe des Ovidukts der Maus vorkommt, nicht aber in dem Gewebe des Ovars. Eine Lokalisation von PolySia in der *Tunica mucosa* des Eileiters konnte durch die Immunhistologie erfolgen.

---

### 4.3 Nachweis von PolySia in murinem und felinem Gewebe fetaler bzw. postnataler Proben des weiblichen Reproduktionstraktes

Weiterhin stand felines fetales bzw. und murines postnatales Gewebe im Vergleich zu Proben adulter Tiere zur Verfügung.

Um der Frage nachzugehen, ob PolySia nicht nur in der Follikulogenese adulter Tiere sondern auch bei der Ovogenese der feline Gonaden eine Funktion zugeordnet werden kann, wurden Proben von Tag 36, Tag 48 und Tag 55 der Gravidität immunhistochemisch auf das Vorkommen von PolySia überprüft (n = 5). Zu diesen Zeitpunkten konnte PolySia septenartig zwischen den Ovogonien bzw. Oozyten festgestellt werden (Abbildung 30 und Abbildung 31).

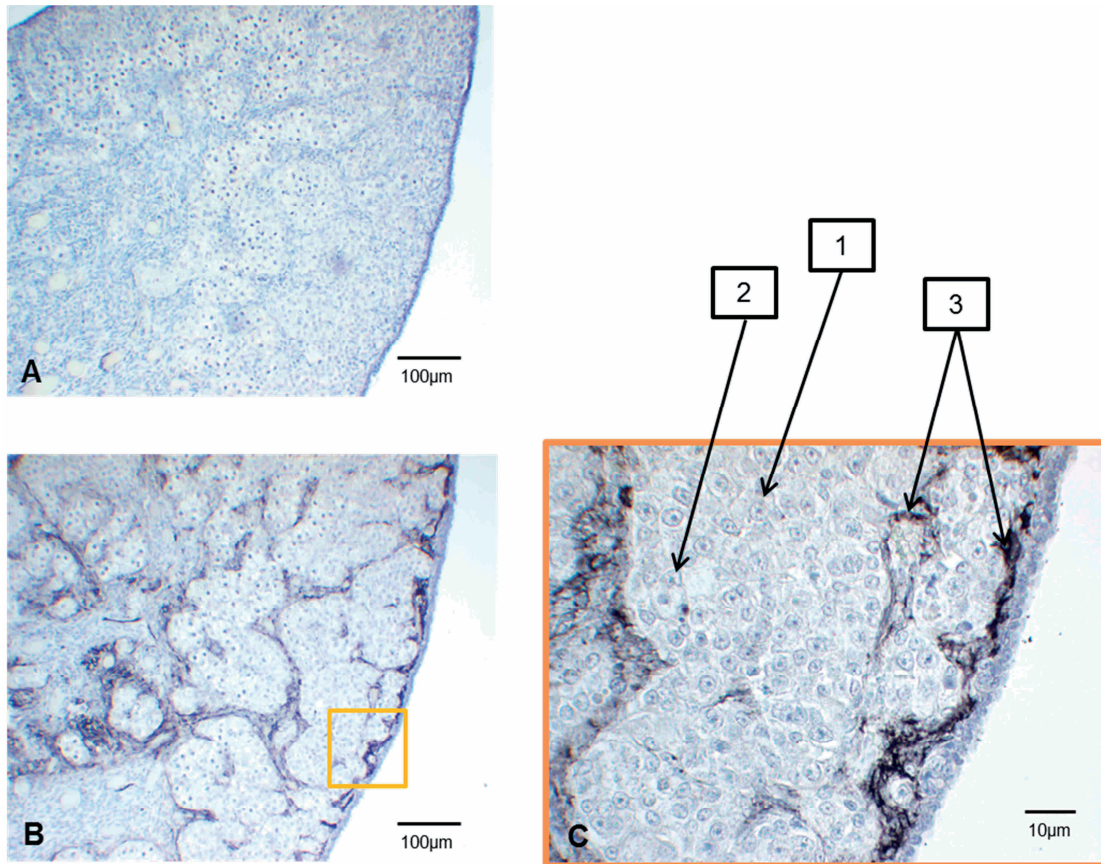


**Abbildung 30: PolySia in fetalen Gonaden der Katze (Tag 36 und Tag 48)**

In Paraffin eingebettete Serienschnitte von fetalen Gonaden der Katze wurden mit mAK 735 (3.2.2) gefärbt, um den Polysialylierungsstatus im Ovar fetaler Feliden an (A.1-3) Tag 36 und (B.1-3) Tag 48 der Trächtigkeit zu detektieren (A.1, B.1) Negativkontrolle nach enzymatischer Spaltung mit EndoN (3.2.3). (A.2-3, B.2-3) zeigen PolySia zwischen den einzelnen Ovogonien. Vergrößerungen: 4 × und 40 × 0,25 Objektiv.

Immunhistologisch lassen sich verschiedene Zelltypen dem fetalen ovariellen Gewebe zuordnen. Zum einen die primordialen Keimzellen (Urkeimzelle), die im Vergleich dazu etwas größeren und heller angefärbten Oozyten, die Begleitzellen und die Fibroblasten. Die Begleitzellen differenzieren im weiteren Verlauf zu den

Follikel­epithel­zellen. Die Fibroblasten separieren die Primordialfollikel voneinander. Histologisch lassen sich somit die PolySia-positiven Anteile den bindegewebigen Septen zuordnen (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Fetale feline Gonaden Tag 55 der Gravidität**

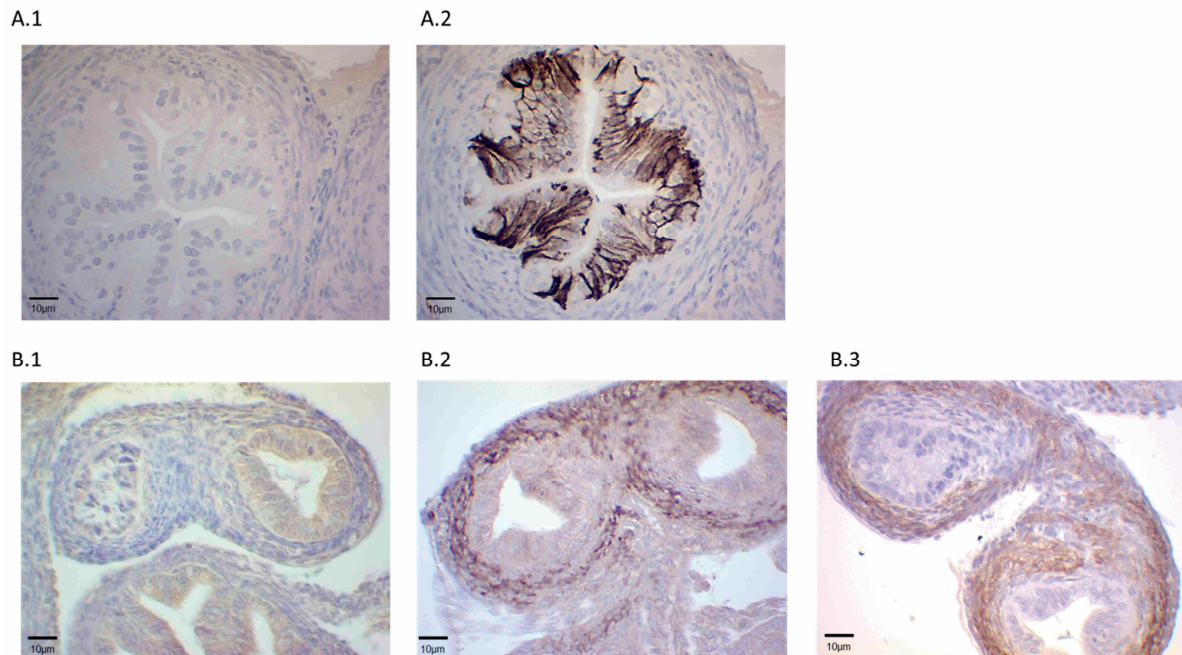
In Paraffin eingebettete Serienschritte von fetalen Gonaden der Katze wurden mit mAK 735 (3.2.2) gefärbt, um den Polysialylierungsstatus im Ovar an Tag 55 der Trächtigkeit zu detektieren. (A) Negativkontrolle nach enzymatischer Spaltung mit EndoN (3.2.3). (B) zeigt PolySia zwischen den einzelnen Oozyten in der Übersichtsaufnahme (10 ×). (C) stellt eine Vergrößerung des Bildausschnittes dar (100 ×). 1 = Oozyten; 2 = Oozyte mit sich formierenden Präfollikelzellen; 3 = für PolySia positive Zellen.

Bei den murinen Proben lag besonderes Interesse an postnatalem Gewebe bis Tag 10 *post partum*. Fetale Proben lagen nicht vor. Wie bereits in Simon *et al.* 2015 beschrieben, ist in den ersten zehn Tagen *post partum* PolySia an der Ausbildung von männlichen, murinen Gonaden beteiligt. Es galt zu klären, ob auch bei weiblichen Gonaden PolySia zu detektieren ist.

Zur Identifikation der Polysialinsäuren wurden immunhistochemische Färbemethoden angewendet. In Abbildung 32 (B.1-B.2) wird deutlich, dass das ovarielle Gewebe von

---

juvenilen Tieren negativ für PolySia ist, jedoch ein positives Signal im Eileitergewebe auftritt (n = 4). Im direkten Vergleich zu einer Färbung der *Tuba uterina* des adulten Tieres in Abbildung 32 (A.1, A.2) stellt sich ein unterschiedliches Färbemuster dar. Bei juvenilen Tieren ist die *Tunica muscularis* und bei adulten Tieren die *Tunica mucosa* der *Tuba uterina* für PolySia positiv.



**Abbildung 32: Histologischer Vergleich von adulten und postnatalen Gewebeproben hinsichtlich der Polysialylierung**

Paraffinierte Serienschritte wurden mit mAK 735 (3.2.2) gefärbt, um den Polysialylierungsstatus im Ovidukt (A.2) adulter und (B.2) juveniler (postnatal Tag 9, Black 6 Mäuse) Tiere zu detektieren. (A.1, B.1) stellen die Negativkontrolle durch Vorbehandlung mit dem Enzym EndoN (3.2.3) dar. (B.3) Visualisierung der *Tunica muscularis* der *Tuba uterina* durch Immunlokalisation von SMA (3.2.2). Vergrößerung: 40 × 0,25 Objektiv.

Zur Negativkontrolle wurde das Enzym EndoN verwendet. Um die *Tunica muscularis* histologisch genauer zu definieren, wurde parallel eine Färbung gegen *smooth muscle antigen* (SMA) angewendet.

Daraus lässt sich schließen, dass PolySia bei der felines Ovogenese beteiligt ist und dass bei Mäusen die Entwicklung der *Tunica muscularis* des Ovidukts beeinflusst wird.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Fragestellung

Seit der ersten Identifizierung von Zelladhäsionsmolekülen zu Beginn des 20. Jahrhunderts und der Beschreibung von NCAM in den 70er Jahren (Jorgensen und Bock 1974; Johnson *et al.* 2005; Rutishauser *et al.* 1976) ist auch polysialyliertes NCAM seit nur mehr als zwei Jahrzehnten Gegenstand aktueller Forschungen - insbesondere im Bereich des neuralen Systems. In den letzten Jahren konnten zahlreiche weitere Beteiligungen an biologischen Prozessen von PolySia-NCAM nachgewiesen werden. So hat die Sekretion von polysialyliertem NCAM im Zusammenhang mit immunologischen Vorgängen u. a. Auswirkungen auf Pneumonien und das Immunsystem (Ulm *et al.* 2013) oder den Vorgang der Phagozytose (Stamatos *et al.* 2014). Weiterhin scheint polysialyliertes NCAM auch an dem Mechanismus der männlichen Fertilität beteiligt zu sein (Ulm *et al.* 2013; Simon *et al.* 2013; Hänsch *et al.* 2014; Simon *et al.* 2015).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Identifikation von einer bis *dato* noch nicht näher charakterisierten Isoform von NCAM auf der Oberfläche von Granulosazellen in den 90er Jahren (Møller *et al.* 1991), ergab sich die Frage, ob PolySia auch bei Prozessen des weiblichen Sexualzyklus involviert ist. Zusätzlich lieferten Fischer und Kollegen 2013 Hinweise auf eine Beteiligung von polysialylierten Trägerproteinen im Bereich des weiblichen Reproduktionstraktes hinsichtlich der Entwicklung der humanen Plazenta. Sie konnten nachweisen, dass alle Zelltypen des Trophoplasten zu Beginn der Gravidität PolySia-positiv waren und dass eine Reduktion von PolySia auf der Zelloberfläche zu einer verringerten Migration und Invasion des Zytotrophoplasten führt (Hromatka *et al.* 2013).

Die Studien, die dieser Dissertation zu Grunde liegen, sollten der Lokalisation von PolySia im Gewebe, eine Identifikation des Trägerproteins und eine Beteiligung der Polysialyltransferasen ermöglichen. Weiterhin sollte eine denkbare biologische Funktion einer Expression von PolySia während des Sexualzyklus ermittelt werden.

---

## 5.2 Diskussion der Methodik

### 5.2.1 Wahl der Modellorganismen

Als Modellorganismen wurden die Hauskatze (*felis catus*) und die Hausmaus (*mus musculus*) gewählt. Ovarielles Gewebe der Hauskatze hat den Vorteil, dass mehrere Follikelstadien zeitgleich vorhanden sind (Bristol-Gould und Woodruff 2006). Die Maus hingegen gilt aufgrund des kurzen Generationsintervalls und bekannten zyklischen Vorgängen als etabliertes Modelltier (Caligioni 2009). Sowohl Katze als auch Maus verfügen allerdings über einige zyklische Besonderheiten, die in 2.5 und 2.6 näher beschrieben sind. Der Zyklus der Katze ist durch eine induzierte Ovulation aufgrund einer *post copulationem* ansteigenden GnRH-Konzentration (Brown 2006) und der der Maus durch eine verkürzte Lutealphase und induzierte Gelbkörperbildung (Lawn 1973; Kenney *et al.* 1977) maßgeblich gekennzeichnet. Daher ergibt sich für weiterführende Studien, dass zum einen Modellorganismen wie z. B. Pferd, Rind oder Schwein im Vergleich zu dem menschlichen Sexualzyklus mit Hinblick auf *In vitro*-Fertilisationstechniken beachtenswert sind. Sowohl Katze als auch Maus verfügen über einen kontinuierlich ansteigenden Östrogenspiegel mit anschließendem präovulatorischen LH-Peak ähnlich wie der Mensch (Lawn 1973; Rüsse 2015). Aufgrund der oben genannten zyklischen Besonderheiten liegt ein weiterführender Vergleich von saisonal und asaisonal zyklischen Spezies sowie von Tierarten mit induzierter und spontaner Ovulation nahe.

Die Individuen wurden mit zwei verschiedenen Methoden einem entsprechenden Zykluszeitpunkt zugeordnet. Bei der Katze erfolgte eine Zuordnung nach Entnahme der Ovarien durch makroskopische Adspektion des Gewebes (s. 3.4, Tabelle 6). Bei der Maus wurde vor der Entnahme der Ovarien jeweils ein Vaginalabstrich angefertigt und mit einer Häma-Schnellfärbelösung gefärbt. Durch mikroskopische Auswertung erfolgte im weiteren Verlauf eine Zykluseinteilung (exfoliative Vaginalzytologie, s. 3.4, Tabelle 7). Bei den sich anschließenden immunhistologischen Studien konnte allerdings keine signifikante Zuordnung des PolySia-Status der Zellen zu den verschiedenen Zyklusabschnitten erfolgen. Daher wurde für die Auswertungen der Ergebnisse auf eine weitere Unterteilung anhand des Zyklus verzichtet. Bei der Katze konnte hingegen ein Zusammenhang des PolySia-Status der Zellen auf follikulärer Ebene hergestellt werden. Im Folgenden

---

wurde für die Beurteilung der Resultate die histologische Zuordnung zu den einzelnen Follikel- und Atresiestadien genutzt (Jolly 1997) (3.5.5 und 4.1.1). Bei den immunhistologischen Studien an murinen Geweben wurde aufgrund des Fehlens von PolySia im Bereich des Ovars und des mangelnden signifikanten Zusammenhanges zwischen polysialylierten Zellen und den Zykluszeitpunkten vollständige auf eine entsprechende Zuordnung bei der Auswertung verzichtet (4.2.1).

## 5.2.2 Wahl der Methoden

### 5.2.2.1 Antikörperauswahl

Neben der Nutzung von herkömmlichen Antikörpern zur Darstellung von glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -SMA, *smooth-muscle-antigen*), Aktin (FITC-Phalloidin) und den Mitochondrien der Granulosazellen (StAr, *steroidogenic acute regulatory protein*) (3.2.2, Tabelle 2) wurden für die Studien dieser Dissertation weitere Antikörper benötigt, die v. a. bei der Hauskatze bis *dato* nicht etabliert waren.

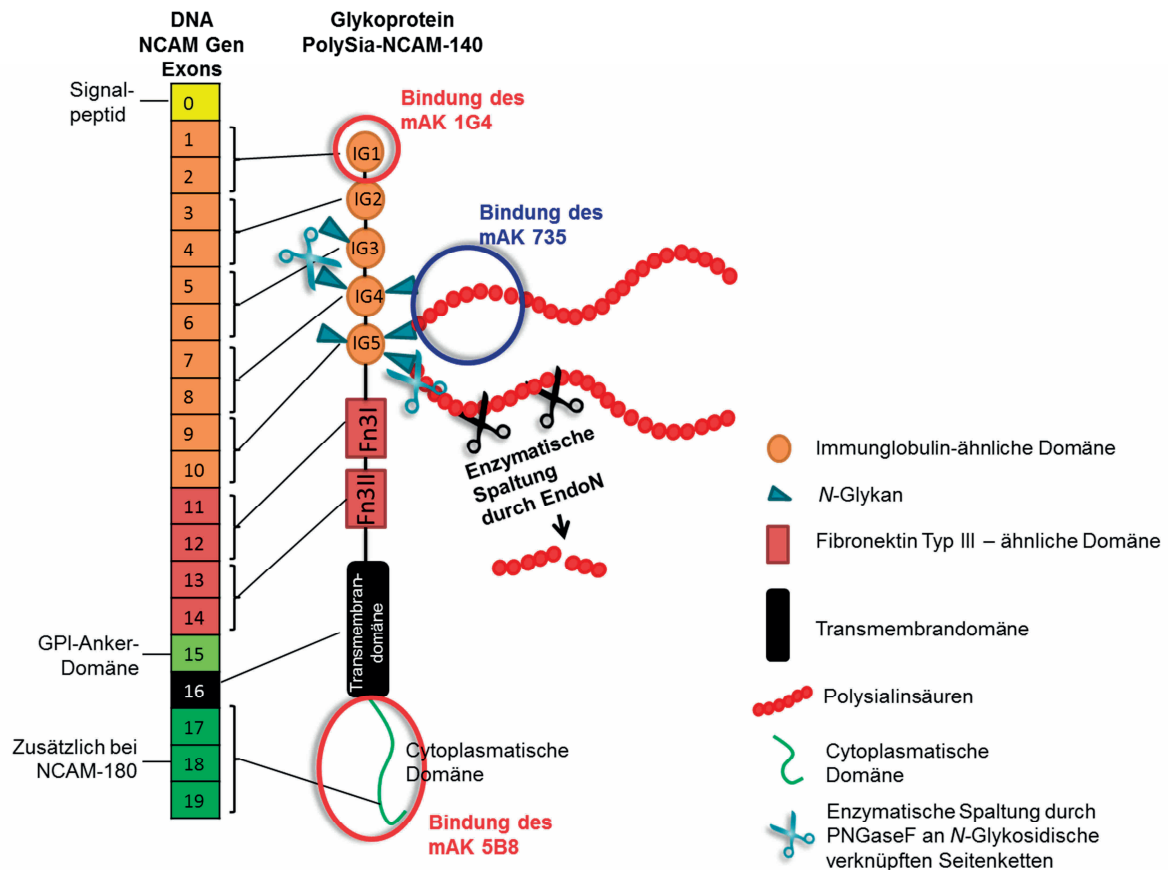
Für eine Detektion von PolySia stehen derzeit zwei Antikörper zur Verfügung: der polyklonale IgM H.46 (*horse*) (Sarff *et al.* 1975) und der monoklonale IgG 735 (*mouse*) (Frosch *et al.* 1985). Diese erkennen Kettenlängen von minimal acht  $\alpha$ 2,8-verknüpften Sialinsäureresten. Weitere Antikörper sind in der Lage Di- und Oligosia-Ketten zu detektieren und eignen sich daher nicht für die Darstellung von Polysialinsäuren (Sato 2013).

Da Antikörper der Klasse IgM aufgrund ihrer Größe und ihrer Pentamer-Konformation eine geringere Diffusion in verschiedene Zellkompartimente sowie eine verringerte Affinität zu bestimmten Epitopen aufweisen können, ist die Wahl eines Antikörpers der Klasse IgG von Vorteil. Weiterhin weisen monoklonale Antikörper eine höhere Spezifität im Hinblick auf die Epitopenbindung im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern auf. Folglich wurde in dieser Studie für die Identifizierung und Lokalisation von PolySia der mAK 735 anstelle des pAK H.46 gewählt. Der mAK 735 erkennt spezifisch, ausgenommen des nicht-reduzierenden terminalen Sialinsäurerestes, die helikale Struktur der internen Region der  $\alpha$ 2,8-verknüpften PolySia-Ketten (Abbildung 33) (Sato und Kitajima 1999; Sato 2013). Um diese helikale Konformation aufrecht zu erhalten, ist eine Verknüpfung von mindestens acht Sialinsäureresten notwendig (Brisson *et al.* 1992; Evans *et al.* 1995).

---

Mit zunehmender Kettenlänge scheint auch die Bindungsaffinität des mAK 735 zu steigen (Jennings *et al.* 1985; Finne und Makela 1985). Der mAK 735 ist in der Lage Kettenlängen von 8 bis zu 400 DP zu detektieren (Sato 2013). Als Negativkontrolle wurde bei den hier angewendeten immunologischen Studien das Enzym EndoN verwendet. Dieses Enzym ist in der Lage  $\alpha$ 2,8-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren der PolySia-Ketten auf eine Restlänge von maximal sieben Einheiten zu verkürzen (Abbildung 33). Als Spaltprodukte verbleiben weiterhin drei- und fünfgliedrige Sialinsäurereste, die aufgrund ihrer Länge keine Bindung des mAK 735 ermöglichen (Hallenbeck *et al.* 1987; Stummeyer *et al.* 2005). Auch steht seit 2001 eine inaktivierte Form der EndoN zur Verfügung (Aalto *et al.* 2001). Durch eine Konjugation mit z. B. HRP, FITC oder Rhodamin ist diese besonders für Immunhistologie oder -fluoreszenz sowie Western Blot-Analysen interessant (Campbell *et al.* 2000; Stummeyer *et al.* 2005).

Für die Identifizierung des Trägerproteins wurde eine Mixtur aus drei NCAM-Antikörpern (3.2.2, Tabelle 2) verwendet. Zuvor wurde die glykosidische Verknüpfung mittels enzymatischer Spaltung durch das Enzym PNGaseF (3.2.3 und 3.7.3) ermittelt. Dies führt zu einer spezifischen Spaltung zwischen GlcNAc und Asparagineresten von *N*-glykosidisch verknüpften Glykoproteinen (Liedtke *et al.* 2001; Galuska *et al.* 2010). Infolge der unterschiedlichen Bindungseigenschaften der drei Antikörper führt wohl ihre Kombination zu einer Signalverstärkung. Da die PolySia-Ketten bedingt durch ihre Größe häufig Bindungsstellen für NCAM-Antikörper maskieren, kann die Verwendung von einer Antikörper-Mixtur zu einer Konformitätsänderung der PolySia-Ketten führen und so erst eine erfolgreiche Kopplung der Antikörper gegen NCAM, insbesondere bei weit verzweigten PolySia-Ketten (~ 60 DP) wie im Bereich der Granulosazellen (s. 4.1.2), ermöglichen. So bindet der mAK 5B8 an zytoplasmatische Anteile von NCAM-140 und -180 (Dodd *et al.* 1988; Milev *et al.* 1994; Leshchyn'ska *et al.* 2003), der mAK 1G4 laut Herstellerangaben an die extrazellulär gelegenen Aminosäuresequenzen 20 bis 178 und der mAK 2D4 erkennt, ebenfalls nach Herstellerangaben, die ganze Proteinlänge von NCAM. In Abbildung 33 sind diese Bindungsmöglichkeiten anhand der Exonabfolge schematisch dargestellt.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung von möglichen Antikörperinteraktionen anhand der Struktur von polysialyliertem NCAM-140 und seinem Gen (modifiziert nach Senkov *et al.* 2012)**

NCAM-140 besteht aus fünf Ig-ähnlichen und zwei Fibronektin-Typ III ähnlichen Domänen sowie einer transmembranen und zyttoplasmatischen Domäne. Im Bereich der Ig-ähnlichen Domäne bestehen sechs Möglichkeiten zur N-Glykosylierung, von denen zwei für die Polysialylierung geeignet sind. Die schematische Darstellung des NCAM-Gens zeigt die 20 Hauptexone, wobei das Exon 15 für die Ausbildung des GPI-Ankers von NCAM-120 und das Exon 18 für den verlängerten zyttoplasmatischen Anteil des NCAM-180 verantwortlich ist. Paarweise codieren die Exons 1 bis 10 für die Ig-ähnlichen Domänen, die Exons 11 bis 14 für die Fibronektin-Typ II ähnlichen Domänen und das Exon 16 für die Transmembrandomäne von NCAM-140 und -180. Das Exon 0 codiert das Signalpeptid. Der mAK 5B8 bindet an den zyttoplasmatischen Anteil (roter Kreis), der mAK 1G4 an die Aminosäuresequenz 20 bis 178 (Exon 1 bis 3, roter Kreis) und der mAK 2D4 erkennt die ganze Proteinstruktur (nicht dargestellt). Der mAK 735 detektiert helikale Strukturen der internen Region der  $\alpha$ 2,8-verknüpften PolySia-Ketten (blauer Kreis). Das Enzym EndoN (schwarze Schere) verkürzt Polysialinsäureketten auf maximal sieben Moleküle. Als Spaltprodukte bleiben drei- und fünfgliedrige Sialinsäurereste. Das Enzym PNGaseF (blaue Schere) spaltet zwischen GlcNAc und Asparagineresten von N-glykosidisch verknüpften Glykoproteinen.

Für die Hauskatze existierte bis *dato* kein etabliertes Protokoll für die antikörpergestützte Eruiierung von NCAM in Gewebeschnitten und Gewebshomogenaten. Die meisten kommerziellen Antikörper sind für eine

---

Visualisierung in humanem oder murinem Gewebe erprobt. Daher wurde in Vorversuchen verschiedene Antikörper (neben den oben genannten weiterhin u. A. mAK H28, mAK H300 und mAK C123C3) in solitären sowie in kombinierten Lösungen und variablen Konzentrationen getestet. Die Kombination aus mAK 5B8, mAK 2D4 und mAK 1G4 in den unter 3.2.2 genannten Konzentrationen erbrachte die aussichtsreichsten Ergebnisse für die Darstellung von NCAM in felinem Gewebe. Bei der Verwendung von mehreren Antikörpern zeitgleich besteht die Option der vermehrten Kopplung an unspezifische Bindungen. Um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurde daher neben dem Western Blot (EndoN- und PNGaseF-Verdau) auch eine Co-Lokalisation von NCAM und PolySia an paraffinierten Serienschnitten durchgeführt.

### **5.2.2.2 Immunologische Verfahren**

Die Immunhistologie gilt als standardisierte und etablierte Methodik. Sie bietet die Möglichkeit mittels markierter Antikörper auf zellulärer Ebene Proteine zu visualisieren und bestimmten Strukturen zuzuordnen. Dabei ist zwischen der direkten und der indirekten Immunhistochemie zu unterscheiden. Bei der direkten Methode führt eine spezifische Kopplung eines markierten Antikörpers an ein Antigen zu einem optischen Signal. Hingegen erfolgt bei der indirekten Methode in einem ersten Schritt zunächst die Kopplung eines Primärantikörpers an ein Antigen. In einem zweiten Schritt schließt sich eine Inkubation mit einem markierten Sekundärantikörper an, was zu einer optischen Signalauslösung führt. Der Einsatz des sekundären Antikörpers dient somit als Signalverstärker und erhöht die Sensitivität der Methode. Das in dieser Dissertation verwendete Protokoll (3.5) wurde in Anlehnung an vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe modifiziert (Ulm *et al.* 2013; Simon *et al.* 2013). Bei murinen Gewebsschnitten und der Verwendung von primären und sekundären Antikörpern aus der Maus wurden zusätzliche Blockierungsschnitte mit entweder 2 % BSA in PBS oder einer *mouse-on-mouse blocking solution* (M.O.M™) etabliert, um die Visualisierung unspezifischer Antikörperbindungen zu reduzieren. In Vorversuchen wurde weiterhin die optimale Konzentration für die verschiedenen Tiere und Gewebe der einzelnen Antikörper ermittelt. Die Auswertung erfolgte immer an dem gleichen Lichtmikroskop (3.5.5). Zu beachten sind bei der Beurteilung der Gewebeschnitte

---

mögliche Fixier-, Präparations- oder Färbeartefakte. Dies galt insbesondere für die Zuordnung der Tertiärfollikel zu einem Atresiestadium. Bei voranschreitender Atresie kommt es zu einem aufgelockerten Erscheinungsbild und schließlich zu einem Ablösen der Granulosazellschicht. Jedoch kann auch bedingt durch die Fixation und Präparation gerade bei antralen Follikeln die innere Granulosazellschicht geschädigt werden. Daher wurde sich bei der Beurteilung der Follikel stets auf multiple Kennzeichen wie Mitosefiguren, Pyknose oder Karyohexis berufen um eine Fehleranfälligkeit zu minimieren (3.5.5). Als Negativkontrolle wurde für die Identifizierung von PolySia das Enzym EndoN verwendet (3.5.3). Bei allen anderen Antikörpern wurde anstelle der Zugabe des Primärantikörpers mit 2 % BSA in PBS inkubiert um unspezifische von spezifischen Bindungen abzugrenzen.

Zur Spezifitätsüberprüfung der immunhistologischen Ergebnisse wurde von feline und murine Gewebshomogenaten von Ovar und *Tuba uterina* Western Blot-Analysen durchgeführt. Zum Austarieren der notwendigen Antikörperkonzentrationen für die Western Blot Analysen wurde in den Vorversuchen jeweils eine Probe lysierten postnatalen murinem Gehirn, der Lunge oder der Niere als Positivkontrolle mitgeführt. In den Hauptversuchen wurde darauf verzichtet. Vor dem eigentlichen Western Blot wurde zur Angleichung der Konzentrationen der Proben und zur Erhöhung der Spezifität eine Aufreinigung mittels Affinitätspräzipitation durchgeführt (3.7.2). Dabei wurde das inaktivierte Enzym EndoN an tosylaktivierte Beads gekoppelt. So konnten ausschließlich polysialylierte Proteine aus den gepoolten Gewebshomogenaten (3.7.1) extrahiert werden. Durch diese Konzentrierung der Proben wurde eine Signalverstärkung erzielt. Bei der anschließenden Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel, wurde eine vergleichsweise niedrige Konzentration (7,5 % Trenngel, 3% Sammelgel) des Polyacrylamids gewählt, da ein recht großes Produkt (100 bis 200 kDa) zu erwarten war. Um eine einheitliche Laufrichtung der Proteine zu gewährleisten wurde SDS zugefügt, um die Proteine negativ zu beladen. Das eingesetzte  $\beta$ -Mercaptoethanol diente der Denaturierung und linearen Ausrichtung des Proteins aufgrund seiner Eigenschaft Disulfidbrücken zu trennen. Zur Immunlokalisation wurde erneut eine indirekte Methode über die Kopplung des Primärantikörpers und in einem zweiten Schritt die Bindung eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers gewählt. Das

---

Protokoll orientierte sich an bereits etablierten Schritten vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe (Simon *et al.* 2013; Ulm *et al.* 2013).

### **5.2.2.3 Kettenlängenbestimmung**

Da weder die Immunhistologie noch der Western Blot Rückschlüsse auf die mögliche Kettenlänge und Struktur der PolySia zulässt, wurde für diesen Zweck das Verfahren der milden DMB-Derivatisierung mit anschließender HPLC unter schwach sauren Bedingungen gewählt (Inoue und Inoue 2001; Inoue *et al.* 2001; Galuska *et al.* 2007). Da diese Methode nicht in einer Antigen-Antikörper-Kopplung begründet ist, sondern auf chemisch-physikalischen Analysemethoden beruht, können so Ergebnisse der immunologischen Verfahren verifiziert bzw. das Vorhandensein von PolySia bewiesen werden. Gegenüber vergleichbaren Techniken, wie z. B. der Massenspektrometrie, ist bei der hier angewendeten Methode ein wesentlich kleineres Probenvolumen notwendig und weist somit eine höhere Sensitivität auf (Galuska *et al.* 2007; Galuska 2013).

Hierbei werden unter schwach sauren Bedingungen die PolySia-Ketten von ihrem Glycokonjugat hydrolytisch abgespalten. Das so freiwerdende reduzierende Ende wird mit DMB markiert, welches wiederum aufgrund der negativen Ladung der PolySia über eine Anionen-Austauscher-Säule detektiert werden kann. Die sauren Bedingungen können aber auch zu einer Laktonisierung sowie zu Spaltungen interner Verknüpfungen der PolySia-Ketten führen. Diese werden dann als Kettenlängenverkürzung realisiert. Vorteilhaft ist weiterhin, dass PolySia-Reste proteingebunden ohne vorherige Separierung analysiert werden können (Galuska *et al.* 2007; Galuska 2013).

### **5.2.2.4 Proteinexpression und mRNA-Analyse**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bietet als etabliertes Verfahren die Möglichkeit, dass mRNA quantitativ oder semi-quantitativ nachgewiesen werden kann. In dieser Dissertation wurde die semi-quantitative RT-PCR gewählt. Dabei wird aus Gewebshomogenaten isolierte mRNA über einen Zwischenschritt mittels der reversen Transkriptase (RT) in stabilere cDNA transformiert. Dem folgt die eigentliche PCR und anschließende Auftrennung der Produkte auf einem Agarosegel sowie deren semi-quantitative optische Auswertung anhand des Vergleichs mit den

---

Expressionsergebnissen der *Housekeeping*-Gene GapDH (ubiquitär vorkommend) (Kessler *et al.* 2009; Hachen *et al.* 2012) und RPS13 (Ribosomen assoziiert) (Bhavsar *et al.* 2010).

Da bei der Katze bisher noch kein Nachweis der Polysialyltransferasen mittels PCR erfolgte, wurden verschiedene mögliche Primersequenzen (NCBI/Primer-BLAST) generiert und in Vorversuchen über Verdünnungsreihen die optimale Konzentration der Primer sowie deren Funktionsfähigkeit ermittelt. Zum Ausschluss möglicher Kontaminationen wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt. Für eine Positivkontrolle der gleichen Spezies hinsichtlich des Expressionsmusters der Polysialyltransferasen lag leider kein entsprechendes Gewebe vor, da bisher hierzu keine validen Erkenntnisse existierten. Denkbar als Positivkontrolle wäre allerdings neurales Gewebe feliner Neonaten, da hier bei anderen Spezies bereits ein effektiver Nachweis von PolySia besteht (Rutishauser und Landmesser 1996; Rutishauser 2008; Mühlhoff *et al.* 2009). Die PCR wurde in dieser Dissertation allerdings als gezielte Nachweismethode der Polysialyltransferasen eingesetzt und nicht wie in anderen Studien als Screening-Verfahren verwendet. Daher ist das Verwenden einer Positivkontrolle nicht obligat.

Für zukünftige Studien bietet sich zum einen der Nachweis von Polysialyltransferasen an isolierten und mittels Zellkultur kultivierten Granulosazellen als auch eine quantitative Analyse mittels real-time-PCR an den genannten Zellen hinsichtlich ihres Atresiestadiums an.

#### **5.2.2.5 *In vivo* Versuche**

Um weitere Hinweise auf die biologische Bedeutung von PolySia auf der Zelloberfläche von Granulosazellen zu ermitteln, wurde ein *in vivo*-Zellkulturmodell in Anlehnung an Studien von Jewgenow und Mitarbeitern (Jewgenow *et al.* 1997) modifiziert. Um Granulosazellen aus dem frischen Ovar zu extrahieren, wurden alle Proben nach der Kastration verarbeitet. Bei längeren Lagerungsintervallen besteht die Gefahr, dass die Zellen nicht mehr lebensfähig und somit nicht mehr für die Zellkultur geeignet sind. Weiterhin neigen Granulosazellen in der Zellkultur zur weiteren Differenzierung zu Luteinzellen. Um dies zu vermeiden, sind eine Bearbeitung der Proben und eine Kultivierung der Granulosazellen auf vier Tage zu

---

begrenzen. Bei längeren Intervallen steigt die Wahrscheinlichkeit zur Luteinisierung zunehmend. In Vorversuchen wurde die benötigte Kultivierungsdauer ermittelt, um eine ausreichend große und aussagekräftige Zellpopulation zu erhalten.

Bei dem „*Slicing*“ der Ovaroberfläche wurde fortwährend darauf geachtet, die Inzisionen möglichst oberflächlich durchzuführen, um eine Kontamination mit z. B. Erythrozyten zu verringern. Ferner wurden nur Ovarien zur Kultivierung verwendet, die frei von Corpora lutea waren, um ein möglichst homogene Zellpopulation zu erhalten. Die Bildung von Gelbkörper setzt eine erfolgte Ovulation und im Falle der Katze meist auch eine Kopulation voraus und bedeutete zumindest eine beginnende Luteinisierung der Granulosazellen.

Die Oozyten wurden mikroskopisch nach (Wood und Wildt 1997) klassifiziert (3.6.1; Abbildung 12). Die Beurteilung erfolgte immer an dem gleichen Lichtmikroskop bei konstanten Einstellungen (10 × 0,25 Objektiv).

Für die physiologische Induktion der Apoptose wurde porcines LH eingesetzt. Es ist bekannt, dass pLH einen positiven Effekt auf die Rezeptortoleranz im feline Reproduktionstrakt aufgrund einer ähnlichen Aminosäurestruktur des Gonadotropins besitzt (Crichton *et al.* 2003; Pelican *et al.* 2006; Neubauer *et al.* 2006). Bei vergleichbaren Hormonen anderer Spezies fehlt diese oder ist nur unzureichend (Pope *et al.* 2012; Goeritz *et al.* 2012). Die eingesetzte Konzentration von pLH orientierte sich an Studien von Sasson und Amsterdam 2002; Crichton *et al.* 2003 und Pelican *et al.* 2006. Zur Vermeidung von Apoptose wurde zur Überprüfung der Funktion der PolySia-Ketten das Enzym EndoN eingesetzt. Die eingesetzte Konzentration orientierte sich an vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe und an den Ergebnissen eigener Verdünnungsreihen aus Vorversuchen.

Als zuverlässiger speziesübergreifender Induktor der Apoptose gilt Forskolin, welches somit als Positivkontrolle eingesetzt werden könnte. Es stammt aus der Buntnessel (*Coleus forskohlii*), induziert eine erhöhte Adenylatcyclaseaktivität und steigert so den intrazellulären cAMP-Spiegel (Aharoni *et al.* 1995; Sasson und Amsterdam 2002). Durch den erhöhten cAMP-Spiegel wird die Apoptoserate um bis zu 25 % gesteigert (Aharoni *et al.* 1995; Tilly 1996). Als Negativkontrolle könnte beispielsweise niedrig dosiertes Dexamethason eingesetzt werden. Eine Inkubation mit Dexamethason führt zu einer Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts und erhöht die

---

Anzahl von *gap junctions*. Daraus ergibt sich ein protektiver Einfluss auf Granulosazellen (Sasson und Amsterdam 2003). Beide Stimulantien könnten für weiterführende, spezieübergreifende Studien Anwendung finden.

### **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **5.3.1 PolySia-NCAM-140 bei der Hauskatze**

Die Studien, die dieser Dissertation zu Grunde liegen, weisen erstmalig ein Vorkommen von PolySia-NCAM-140 auf Granulosazellen feliner Tertiärfollikel nach (s. 4.1.1, 4.1.2 und 4.1.5). In besonderer Weise sticht dabei hervor, dass die Polysialylierung mit voranschreitender Atresie der Follikel zunimmt. Im Gegensatz dazu exprimieren intakte Tertiärfollikel und frühere Follikelstadien lediglich eine nicht-polysialylierte Form von NCAM (Abbildung 15 und Abbildung 16). Daher ist anzunehmen, dass PolySia-NCAM während der Atresie von Tertiärfollikeln eine funktionelle Bedeutung einnimmt. Die posttranslationale Modifikation des Trägerproteins konnte der Polysialyltransferase St8SialIV mittels semiquantitativer RT-PCR zugeordnet werden (Abbildung 19). Die verstärkte Aktivität der St8SialIV im Vergleich zu St8SialII kann damit begründet werden, dass zwar während der embryonalen Entwicklung und *post partum* die Konzentration der St8SialII höher ist, dafür aber im weiteren Verlauf der Entwicklung und im adulten Gewebe die Expression der St8SialII stärker reduziert wird als die der St8SialIV (Finne 1982; Rutishauser und Landmesser 1996; Angata *et al.* 1997; Ong *et al.* 1998). 2009 konnten Tan und Kollegen zudem eine östrogenabhängige Regulation der beiden Polysialyltransferasen St8SialII und St8SialIV nachweisen (Tan *et al.* 2009). Im Gehirn ist ein hohes Maß an Polysialylierung ausschlaggebend für eine östrogenabhängige Modulierung der Synapsen (Hoyk *et al.* 2001). Da Östrogene den weiblichen Geschlechtstrakt stark beeinflussen, kann ein östrogenabhängiger Regulationsmechanismus in Betracht gezogen werden.

Um eine mögliche biologische Funktion von PolySia während der Atresie zu identifizieren, wurde ein Zellkulturmodell anhand primären Granulosazellen etabliert (3.6 und 4.1.7). In Übereinstimmung mit *in vitro* Beobachtungen der Immunhistologie und der proteinanalytischen Methoden erhöhte sich nach der Induktion der Apoptose mit pLH die Anzahl der PolySia-positiven

---

Granulosazellen (Abbildung 25). Beachtenswert ist dabei, dass bei einer parallelen Depolysialylierung von NCAM der Apoptose effizient entgegengewirkt wird und somit ein protektiver Effekt auf die Granulosazellen erzielt werden konnte (Abbildung 26).

Für weiterführende Studien an Granulosazellen könnten Ergebnisse aus vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe von Interesse sein. In diesen wurde ein Angiogenese-Sphäroid-Assay etabliert, bei dem gezeigt werden konnte, dass das Sprossungsverhalten von HUVEC's (*human umbilical vein endothelial cells*) durch eine Stimulierung mit Vorstufen von Sialinsäuren moduliert werden kann (Bayer *et al.* 2013). Zugrundeliegend ist dabei, dass die Sialinsäuresynthese eine hohe Variabilität gegenüber den Substraten aufweist. Bei diesem Modell wurden die Moleküle ManNAc, ManNBut (2-N-Butyl-Mannosamin) und ManNProp (2-N-Propionyl-Mannosamin) eingesetzt. Bei der Inkubation der HUVEC's mit ManNAc kam es zu einem verminderten Sprossungsverhalten. Bei der Verwendung von ManNBut konnte hingegen eine gesteigerte Sprossung gezeigt werden. Der Einsatz von ManNProp führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Sphäroidbildung (Bayer *et al.* 2013). Für die Polysialylierung ist dabei interessant, dass  $\alpha$ -2,8 Sialyltransferasen durch ManNAc stimuliert und durch ManNProp sowie ManNBut inhibiert werden können (Horstkorte *et al.* 2004; Weidemann *et al.* 2010; Seifert *et al.* 2012). Ein ähnliches Zellkulturmodell für die genauere Identifizierung der biologischen Funktion und deren Anwendbarkeit im Bereich der Fertilisationstechniken ist denkbar. Dabei wäre insbesondere interessant, ob eine Stimulierung mit ManNBut zu einer Reduzierung der Apoptoserate der Granulosazellen führt.

Es ist bekannt, dass die intakten interzellulären Kontakte für eine Unterdrückung der Apoptose der Granulosazellen notwendig sind. Hierzu zählen die bei den Granulosazellen vorwiegend vorkommenden Cadherine (Makrigiannakis *et al.* 1999; Peluso *et al.* 2001; Sasson und Amsterdam 2002). PolySia ist nicht nur befähigt die adhäsiven Eigenschaften ihrer Trägerproteine zu beeinflussen, sondern kann darüber hinaus auch Interaktionsprozesse benachbarter Adhäsionsmoleküle, wie z. B. Cadherine, modulieren (Johnson *et al.* 2005). Aufgrund der hohen anionischen Eigenschaften der PolySia-Ketten und der damit verbundenen Vergrößerung des Interzellularraums, sind die benachbarten Cadherine in *trans*-Position nicht mehr in

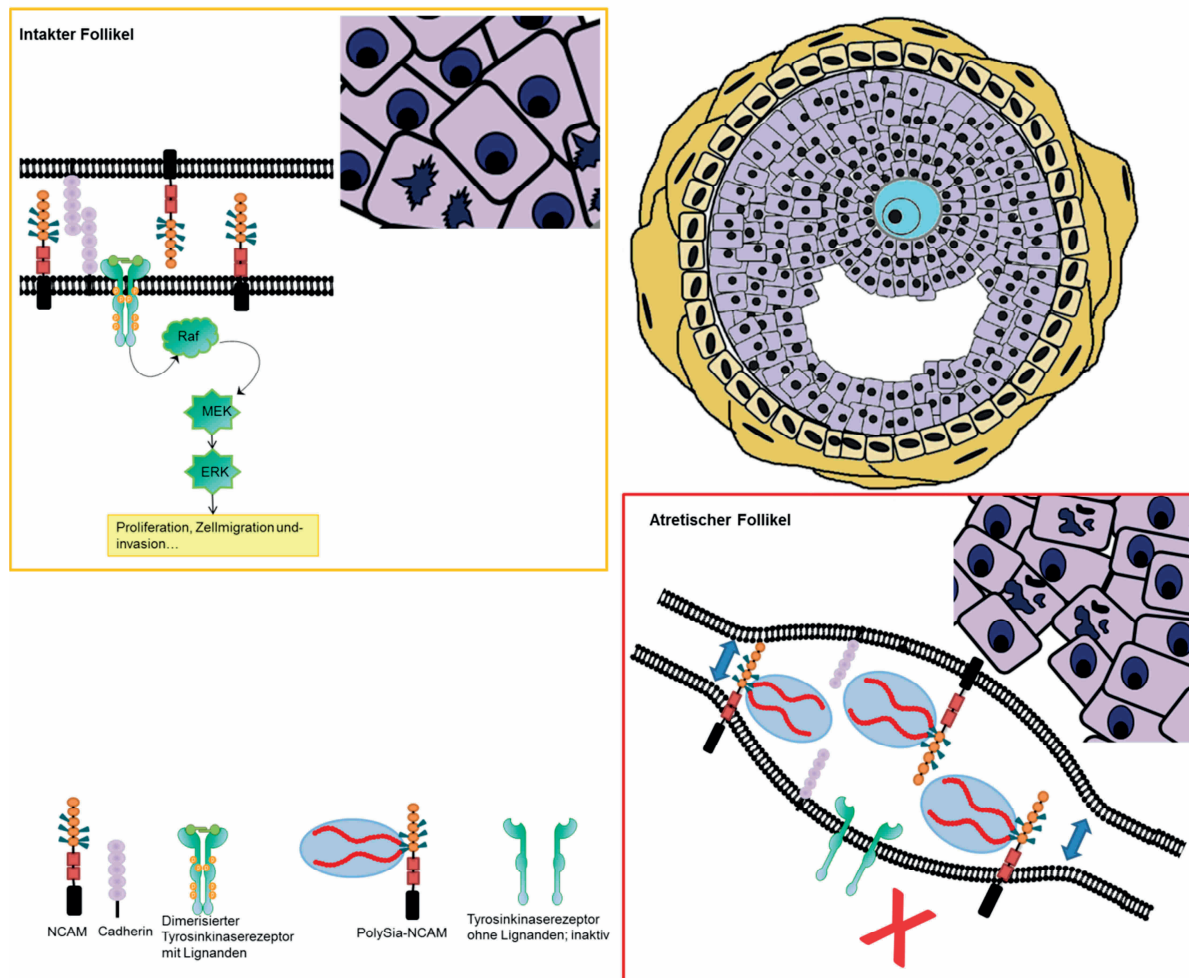
---

der Lage zu interagieren und ihren Kontakt zu erhalten. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen ergaben eine Kettenlänge von ca. 60 Sialinsäuren (Abbildung 18). Ein vergleichbares hohes Maß an Polysialylierung konnte bisher nur bei postnatalen Gehirnen von Mäusen, jedoch nicht bei adulten Gewebeproben ermittelt werden (Galuska *et al.* 2006; Oltmann-Norden *et al.* 2008). So könnte PolySia aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften zu dem Voranschreiten der Apoptose der Granulosazellen beitragen, indem es die Remodulierung der Zelloberfläche unterstützt und Zell-Zell-Wechselwirkungen entgegen wirkt (Sytnyk *et al.* 2006).

Des Weiteren könnte das Auftreten oder der Abbau von PolySia zusätzlich intrazelluläre Signaltransduktionswege beeinflussen. Bei neuronalen Zellen unterstützt die homophile Wechselwirkung von NCAM ohne die Modifikation mit PolySia beispielsweise die Aktivierung der extrazellulären signalregulierenden Kinasen (ERK) und trägt somit zu einem Überleben der Zellen bei (Seidenfaden *et al.* 2003; Rockle *et al.* 2008; Li *et al.* 2011). Die ERK stellen in diesem Zusammenhang nicht nur ein Schlüsselenzyme der Apoptose bei neuronalen Zellen (Xia *et al.* 1995; Cheung und Slack 2004), sondern auch bei Granulosazellen des ovariellen Gewebes dar (Gebauer *et al.* 1999; Peter und Dhanasekaran 2003). So kann bei intakten Tertiärfollikeln die unpolysialylierte Form von NCAM über die Signaltransduktion mittels ERK das Überleben der einzelnen Zellen und Zellproliferation fördern.

Ferner konnte Sato und Kollegen 2008 erstmalig nachweisen, dass PolySia in der Lage ist, Wachstumsfaktoren wie BDNF, NT-3 und NT-4 zu in einem Komplex zu binden und so eine Reservfunktion ermöglicht (Kanato *et al.* 2008). Eine Interaktion mit den jeweiligen Rezeptoren ist dabei weiterhin möglich, sodass eine Unterstützung der synaptischen Plastizität im Gehirn erfolgen kann. Weitere Wechselwirkungen von PolySia mit Wachstumsfaktoren wie FGF2 konnten ebenfalls identifiziert werden (Ono *et al.* 2012). Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und ihre dazugehörigen Rezeptoren beeinflussen parakrin und autokrin die Follikelproliferation. So ist beispielsweise EGF an der zyklischen Freisetzung von FSH und LH beteiligt (Armstrong und Childs 1997) und die Expression von FGF2 und dem entsprechenden Rezeptor auf der Oberfläche der Granulosazellen (Yeh und Osathanondh 1993) scheint einen Einfluss auf

Follikelproliferation und -differenzierung zu haben (Chaves *et al.* 2012). FGF2 weist u. a zum Zeitpunkt der Ovulation eine erhöhte Expression durch Granulosazellen auf (Berisha *et al.* 2006). Eine mögliche Interaktion von PolySia mit zellulären Botenstoffen im Sinne einer Komplexbildung, könnte entweder eine Ligandenbindung an den jeweiligen Rezeptoren hemmen oder pulsatil zu einer Konzentrationserhöhung der Wachstumsfaktoren führen.



**Abbildung 34: Schematisch Darstellung möglicher Auswirkungen von polysialyliertem NCAM-140 auf Granulosazellen und die Follikelatresie**

Schematisch dargestellt ist ein Follikel. Im gelben Kasten sind mitotische und im roten Kasten apoptotischen Anzeichen gezeigt. Bei intakten Follikeln ist die interzelluläre Verbindung über Zelladhäsionsmoleküle wie NCAM und Cadherine nicht beeinträchtigt. Davon beeinflusst sind auch z. B. Tyrosinkinase-Rezeptoren, die aufgrund ihrer Dimerstruktur räumliche Nähe und Stabilität benötigen. Diese Rezeptoren sind beteiligt an dem ERK-Signalweg und fördern eine Zellproliferation und –differenzierung. Durch die posttranslationale Modifikation von NCAM mit PolySia bei atretischen Follikeln wird der interzelluläre Spalt vergrößert und Zelladhäsionsmoleküle können ihre Bindung nicht aufrechterhalten und Signalkaskaden könnten moduliert werden.

---

### 5.3.2 PolySia-NCAM bei der Hausmaus

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Katze konnte PolySia bei der Maus sowohl mit immunhistochemischen (Abbildung 27 und Abbildung 28) als auch proteinanalytischen (Abbildung 29) Methoden nur im Bereich der *Tuba uterina* jedoch nicht in ovariellen Gewebe nachgewiesen werden. Dieser Speziesunterschied könnte beispielsweise mit den verschiedenen Ovulationstypen oder der Saisonalität bzw. Asaisonalität zusammenhängen. Katzen weisen einen saisonalen Zyklus auf und verfügen über eine induzierte Ovulation (s. 2.5). Mäuse hingegen zeigen einen asaisonalen Zyklus, eine spontane Ovulation sowie eine induzierte Gelbkörperbildung (s. 2.6). Für eine weitere Eingrenzung bietet sich daher – wie in 5.2.1 beschrieben - der Vergleich von weiteren Tierarten, die entweder über eine induzierte (z. B. Frettchen, Kaninchen) oder eine spontane (z. B. Pferd, Rind) Ovulation verfügen, an.

Auffällig bei der Lokalisation von PolySia ist, dass es nicht apikal sezerniert wird, sondern sich strangartig zwischen und an den basalen Anteilen der Zellen darstellen lässt. Polysialylierte Bereiche konnten v. a. in der *Lamina propria mucosa* identifiziert werden. In dieser Schicht kommen Nerven, Blut- und Lymphgefäße zum Liegen. Aus früheren Studien ist bereits die zentrale Rolle, die PolySia beim axonalen Nervenwachstum der embryonalen Entwicklung und bei der Nervenregeneration einnimmt, bekannt (Kleene und Schachner 2004; Burgess *et al.* 2008; Rutishauser 2008). Eine Beteiligung oder Beeinflussung von PolySia an der Kontraktion der *Plicae tuberculatae* ist daher denkbar.

Für eine genauere Beurteilung der biologischen Bedeutung von PolySia im Bereich der *Tuba uterina* ist die Identifikation des Trägerproteins essentiell. Zum einen konnten Bock und Kollegen bereits 1991 in ihren immunhistologischen Studien das Vorkommen von NCAM in murinen adulten Ovidukten beschreiben (Møller *et al.* 1991). Zum anderen ist bekannt, dass Neuropilin-2 auf Endothelzellen die Bindung von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Ji *et al.* 2015) und FGF-2 (West *et al.* 2005) begünstigt. Da in der *Lamina propria mucosa* auch Gefäße angesiedelt sind, könnte auch Neuropilin-2 das polysialylierte Trägerprotein sein. Sowohl NCAM (Colley 2010; Mühlenhoff *et al.* 2013) als auch Neuropilin-2 (Mühlenhoff *et al.* 2013; Rollenhagen *et al.* 2013; Bhide *et al.* 2016) sind geeignete

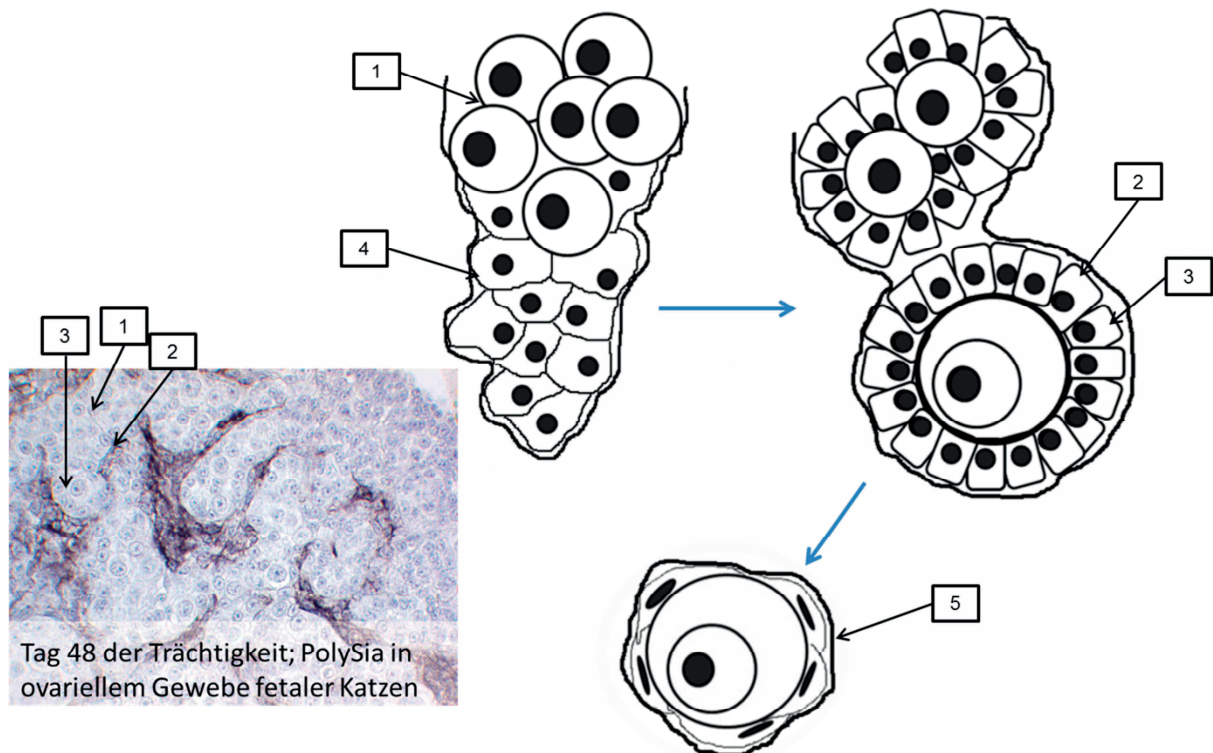
---

Substrate für eine Polysialylierung. Das in den hier gezeigten Gewebeanteilen somit eine polysialylierte Isoform von NCAM oder Nueropilin-2 vorliegt, ist zwar wahrscheinlich, konnte bis *dato* aber nicht hinlänglich geklärt werden. Hinweise auf das Trägerprotein könnte die Analyse der glykosidische Verknüpfung liefern, da Neuropilin-2 O-glykosyliert (Bhide *et al.* 2016) und NCAM N-glykosyliert (Nelson *et al.* 1995) ist. Somit ist die Identifikation des Trägerproteins Teil zukünftiger Studien, ebenso wie die genaue Zuordnung der polysialylierten Zellen. Hierbei wäre beispielsweise eine Azan-Färbung oder einer Immunlokalisation mittels mAK SMA hilfreich. Interessant ist hierbei auch der Vergleich von anderen, schleimhauttragenden Organen, wie z. B. dem Darm.

### **5.3.3 PolySia in felinem fetalem bzw. murinem postnatalem Gewebe**

Neben den Resultaten der Untersuchungen an adulten Geweben, konnten auch Studien an fetalen felinen und postnatalen murinen Proben des weiblichen Geschlechtsaktes vorgenommen werden.

Bei der Katze konnte zu verschiedenen Zeitpunkten während der Gravidität (d 36 und d 48 sowie d 55) PolySia septenartig im Ovar zwischen den Ovogonien bzw. Oozyten lokalisiert werden (Abbildung 30 und Abbildung 31). Nach Vollendung der 1. meiotischen Prophase der Oozyten beginnen die somatischen Begleitzellen die Oozyten in den medullär gelegenen Keimsträngen zu umschließen. Sie gelten als Präfollikelzellen. Die so entstandenen Primordialfollikel kapseln sich von dem Keimstrang ab und sind schlussendlich von einer Basalmembran umhüllt. Zwischen die Primordialfollikel wandern Fibroblasten ein und separieren die einzelnen Follikel voneinander. Exemplarisch ist in Abbildung 35 ein Gewebsschnitt eines felinen fetalen Ovars, 48. Tag der Gravidität, gezeigt. Deutlich erkennbar sind die einzelnen Ovogonien mit z. T. ihren Präfollikelzellen. Auch ist eine beginnende Abnabelung von dem Keimstrang und Einwanderung von PolySia-positiven Zellen ersichtlich. Rein histologisch konnten somit Fibroblasten als polysialylierte Zellen identifiziert werden. Um diese Ergebnisse zu validieren, könnten weiterhin histochemische Bindegewebssnachweise (z. B. Masson-Goldner oder Azan-Färbung) oder immunologische Färbemethoden in zukünftigen Studien angewendet werden.



**Abbildung 35: Schematische Darstellung der Entwicklung der Primordialfollikel und die Lokalisation von PolySia feliner fetaler Gonaden**

1 = Oozyten; 2 = Basalmembran; 3 = Primäre Oozyte, umgeben von Follikelzellen; 4 = Präfollikelzellen; 5 = separater Primordialfollikel – Schematische Darstellung in Anlehnung an Rüsse 1983 und Rüsse und Sinowatz 2015. Die Visualisierung von PolySia im Gewebe erfolgte durch den mAK 735 (3.2.2).

Im Bereich der embryonalen Neurogenese ist die Beteiligung von polysialylierten Trägerproteinen seit längerem insbesondere im Bereich der Zellmigration und Differenzierung bekannt (Rutishauser *et al.* 1988; Rutishauser 1998). Aufgrund des Verteilungsmusters von PolySia in dem vorliegenden fetalen Gewebe ist daher anzunehmen, dass auch hier eine Modulierung der Zellmigration und Formierung bzw. Separierung der Primordialfollikel wahrscheinlich ist. Hierbei ist eine Beeinflussung durch die polyanionischen Eigenschaften von PolySia auf die piezoelektrischen Effekte der Kollagenfasern möglich. Dieses physikalische Phänomen ist maßgeblich an der Proliferation und Ausrichtung der Kollagenfibrillen beteiligt (Bassett *et al.* 1964; Athenstaedt 1970). Für die genauere Zuordnung der biologischen Bedeutung ist daher für anschließende Studien eine Untersuchung auf Proliferation und Apoptose interessant. Hierfür bieten sich immunhistochemische

---

Nachweise an wie z. B. der TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*), der der Anwendung von Apoptosemarkern, wie z. B. AK  $\alpha$ -Ki67 (nukleares Protein Ki67) oder dem Einsatz von Proliferationsmarkern, wie z. B. AK  $\alpha$ -PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, Proliferationsmarker).

Bei der Maus wurde postnatales (d 10) Gewebe hinsichtlich der Polysialylierung analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass PolySia im Bereich der *Tuba uterina*, nicht jedoch im Ovar lokalisiert ist. Bemerkenswert im Vergleich zu adultem Gewebe ist, dass PolySia bei postnatalen Gewebeproben nicht in der *Lamina propria mucosae*, sondern in der *Tunica muscularis* nachgewiesen werden konnte (Abbildung 32). Für die Zuordnung erfolgte eine Co-Immunlokalisation von SMA und PolySia (Tabelle 2). Studien unserer Arbeitsgruppe an postnatalen Hoden und Nebenhoden konnten zeigen, dass die glatten Muskelzellen der Hoden- und Nebenhodenkanälchen PolySia-NCAM-140 tragen (Simon *et al.* 2015). Polysialylierte Zellen zeigten weiterhin eine gesteigerte Proliferationsrate. Dabei nehmen zum einen die Expression von PolySia während der Organentwicklung ab und zum anderen die Ausbildung der bindegewebigen Schicht zu. Dies entspricht einer inversen Korrelation von PolySia und Bindegewebe (Simon *et al.* 2015). Ähnliche Zusammenhänge sind auch für den weiblichen Reproduktionstrakt erdenklich, konnten bis *dato* jedoch nicht hinlänglich geklärt werden. Für die Bedeutung von PolySia ist auch die Betrachtung eines doubleknockout-Mausmodells für zukünftige Studien interessant. Bei diesem Mausmodell versterben 80 % der lebend geborenen Mäuse und die Individuen weisen gravierende Fehlbildungen des zentralen Nervensystems auf (Weinhold *et al.* 2005; Angata *et al.* 2006). Für den weiblichen Reproduktionstrakt gibt es derzeit keine Studie, die mögliche Auswirkungen von einer mangelnden PolySia-Expression darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PolySia sowohl bei der fetalen als auch der postnatalen Organentwicklung beteiligt ist und im weiteren Verlauf auch bei adulten Tieren zur Beeinflussung der Zellkommunikation und -modulierung beiträgt.

---

#### 5.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die vorgelegten Untersuchungen konnten erstmalig zeigen, dass PolySia nicht nur bei proliferativen und regenerativen Prozessen involviert ist, sondern auch auf apoptotische Vorgänge einen wesentlichen Einfluss nehmen kann.

Die Existenz von PolySia ausschließlich in feline, atretischen Tertiärfollikeln legt eine Involvierung von PolySia an der Follikelatresie nahe. Es ist wahrscheinlich, dass zum einen die ERK-Signalkaskade negativ beeinträchtigt und so intrazelluläre Signale zur Proliferation nicht übermittelt und zum anderen Cadherine in ihrer Funktion maßgeblich beeinträchtigt werden können. Daraus folgt eine verminderte interzelluläre Kommunikation und protegierte Apoptose. Weiterhin könnten Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF2 durch PolySia gebunden werden und durch eine Komplexbildung die Rezeptorbindung beeinträchtigen. Von Interesse ist weiterhin die Stimulation mit PolySia-Vorläufermolekülen unter Berücksichtigung der Oozyten-Kultivierung im Rahmen der assistierten Reproduktion. Diese beiden Fragestellungen bedürfen allerdings weiterführender empirischer Studien.

Auch in murinen Proben konnte PolySia nachgewiesen werden. Eine Detektion konnte nur im Bereich der *Lamina propria mucosa* der *Tuba uterina*, nicht jedoch im ovariellen Gewebe erfolgen. Um eine valide Aussage treffen zu können, welche Funktion PolySia im weiblichen Reproduktionstrakt der Maus einnimmt, bedarf es weiterer Untersuchungen u. a. hinsichtlich des polysialylierten Glykoproteins (z. B. NCAM, Neuropillin-2). Auch lässt das unterschiedliche Verteilungsmuster von PolySia bei Katze und Maus vermuten, dass ein Zusammenhang mit dem saisonalen Sexualverhalten oder dem Ovulationstypus (spontan oder induziert) besteht.

Während der postnatalen bzw. fetalen Entwicklung konnte ebenfalls PolySia sowohl bei der Katze als auch der Maus nachgewiesen werden. Prominent ist in erster Linie die Lokalisation von PolySia im Gewebe. Zwar unterschieden sich die jeweiligen Zelltypen, jedoch sind die Organe im Vergleich zu den adulten Tieren identisch. Bei der Katze liegt eine Beteiligung von PolySia bei der Entwicklung der Primordialfollikel und der Separation dieser von den Keimsträngen nahe. Als polysialylierter Zelltyp konnten histologisch Fibroblasten bzw. Fibrozyten identifiziert werden. Bei der Maus ist bemerkenswert, dass ähnlich wie bei männlichen Individuen die glatte Muskulatur der *Tuba uterina* PolySia-positiv ist. Ob PolySia während der postnatalen und fetalen

---

Entwicklung der weiblichen Gonaden eine ähnliche Bedeutung zukommt wie bei männlichen Mäusen, sollte in den Fokus weiterführender Studien gestellt werden.

Das spezies- und organübergreifende Vorkommen von PolySia spricht zusammengefasst für eine stärkere biologische Bedeutung der Polysialinsäuren im Bereich der weiblichen Fertilität und Zellmodulierung im Reproduktionstrakt als bis *dato* bekannt. Die Ergebnisse dieser Dissertation bieten somit eine Grundlage für weiterführende, speziesübergreifende Studien z. B. hinsichtlich der Beeinflussung der weiblichen Fertilität, der möglichen Interaktion von PolySia mit Wachstumsfaktoren sowie den Regulationsmechanismen der Expression von PolySia während der embryonalen Entwicklung.

---

## 6 Zusammenfassung

Die Polysialinsäure (PolySia) besteht aus mindestens acht  $\alpha$ 2,8-verknüpften Sialinsäuren und stellt in Säugern eine posttranslationale Modifikation von Glykoproteinen dar. Das prominenteste Trägerprotein ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM. Die mit dem Polysialylierungsgrad steigenden anionischen Eigenschaften von PolySia sind in der Lage die Zellinteraktion und -kommunikation im gesamten Organismus zu beeinflussen. Bekannt ist hierfür v. A. die Neurogenese, wobei in den letzten Jahren auch in anderen Organen, insbesondere in Teilen des männlichen Reproduktionstrakts, PolySia nachgewiesen werden konnte. Hieraus resultierte die Fragestellung, ob sich PolySia auch im weiblichen Reproduktionstrakt identifizieren lässt. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden immunhistochemische Methoden, Western Blotverfahren, Expressionsnachweise mittels PCR, HPLC basierte Kettenlängenbestimmungen von PolySia sowie ein Zellkulturmodell mit primären Granulosazellen, angewendet.

In den Untersuchungen, die dieser Dissertation zugrunde liegen, konnte gezeigt werden, dass PolySia auch auf apoptotische Prozesse einen wesentlichen Einfluss hat. Die Studien an felinem, ovariellen Gewebe ergaben, dass:

- PolySia auf der Zelloberfläche feliner Granulosazellen in atretischen Tertiärfollikeln präsent ist.
- PolySia nicht auf der Zelloberfläche feliner Granulosazellen früherer Follikelstadien oder proliferativen Follikeln vorkommt.
- NCAM-140 hierbei als Trägerprotein fungiert.
- die Polysialyltransferase St8SialV an der Polysialylierung beteiligt ist.
- Kettenlängen mit mehr als 60 Sialinsäuren synthetisiert werden können.
- die Anzahl der apoptotischen Zellen mit der Polysialylierung korreliert. Dabei führt eine *in cellulo* Stimulierung von Granulosazellen mit pLH zu einer Zunahme der Apoptose und Polysialylierung.

Weiterhin wurden murine Proben hinsichtlich der Polysialylierung untersucht. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass:

- PolySia in der *Lamina propria mucosa* der *Tuba uterina* in adulten Mäusen vorkommt.

- 
- ovarielles Gewebe PolySia-negativ ist.

Zusätzlich konnte an fetalem felinem und postnatalem murinem Gewebe immunhistologisch PolySia detektiert werden. Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, dass:

- PolySia in Ovarien von fetalen Katzen gebildet wird. Als polysialylierte Zellen konnten histologisch Fibroblasten bzw. Fibrozyten identifiziert werden.
- PolySia in der *Tunica muscularis* der *Tuba uterina* postnataler Mäuse vorkommt.

Schlussendlich zeigen die in Zusammenhang mit dieser Arbeit erhobenen Daten, dass polysialyliertes NCAM in verschiedenen Bereichen des weiblichen Reproduktionstraktes vorkommt und dass PolySia wohl eine stärkere biologische Bedeutung im Bereich der weiblichen Fertilität und Zellmodulierung zugeordnet werden kann, als bis *dato* angenommen.

---

## 7 Summary

Polysialic acids (polySia) consists of at least eight  $\alpha$ 2,8-linked sialic acids and represents a posttranslational modification of glycoproteins in mammals. It is best known as a modification of the neural cell adhesion molecule NCAM. The highly anionic properties of polySia increase with the degree of polymerization, which may influence the cell-interaction and -communication in mammals. The most prominent example is the neurogenesis. In recent years also in other organs, especially in parts of the male reproductive tract, polySia could be detected. This led to the question whether polymers of sialic acid residues can be localized in the female reproductive tract.

To confirm this hypothesis immunohistochemical methods, western blotting, mRNA analysis by PCR and chain length determinations (HPLC) in addition to primary granulosa cell culture models were applied.

The investigations underlying this thesis have shown that polySia has a significant influence on apoptotic processes. The studies on feline tissue revealed that:

- polySia occurs on the cell surface of feline granulosa cells in atretic tertiary follicles.
- polySia does not occur on the cell surface of feline granulosa cells of earlier follicular stages or proliferative follicles.
- NCAM-140 acts as carrier protein.
- the polysialyltransferase St8SialIV is involved in the polysialylation.
- chain length consisting of more than 60 sialic acids can be detected.
- the number of apoptotic cells correlates with the polysialylation status.
- a stimulation with pLH *in cellulo* of granulosa cells leads to an increase of apoptosis and polysialylation.

Furthermore, murine samples were examined for polysialylation. The results showed that:

- is formed in the *lamina propria mucosa uteri* in adult mice
- ovarian tissue is polySia-negative.

---

In addition, polySia could be detected on fetal feline and postnatal murine tissue. The investigations showed that:

- polysialylation occurs in ovaries of fetal cats. Fibroblasts and fibrocytes could be identified as polysialylated cells.
- polySia occurs in the *tunica muscularis uteri* of postnatal mice.

In conclusion, the data collected in connection with this work show that polysialylated NCAM is expressed in different areas of the female reproductive tract, and that a stronger biological significance in the area of female fertility and cell modulation can be attributed to polySia than is currently assumed.

---

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>ABC</b>	Antibiotic antimycotic solution
<b>AK</b>	Antikörper
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>Aq. dest.</b>	Aqua destillare, Destilliertes Wasser
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure-Assay
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor
<b>bp</b>	Basenpaare/base pairs
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>C</b>	Kohlenstoff
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosin Monophosphat
<b>CCR7</b>	C-C Chemokinrezeptor Typ 7
<b>CD36</b>	Thrombospondin-Rezeptor
<b>CMP</b>	Cytidinmonophosphat
<b>CO</b>	Cumulus oopherus
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COC</b>	Cumulus-oopherus-Komplex
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMB</b>	1,2-Diamino-4,5-difluorobenzene
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>DP</b>	Degree of Polymerization
<b>dUTP</b>	Dioxyuridintriphosphat
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherischia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EndoN</b>	EndoneuraminidaseN
<b>ERK</b>	Extrazellulären signalregulierten Kinase
<b>FBS</b>	Fetales bovines Serum
<b>FSH</b>	Follikel stimulierendes Hormon
<b>Fitc</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>for</b>	Forward Primer

---

<b>Fuc</b>	Fucose
<b>Gal</b>	Galaktose
<b>GapDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
<b>Glc</b>	Glucose
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -Acetylglucosamin
<b>GNE</b>	UDP-GlcNAc-Epimerase/ManNAc-Kinase
<b>GnRH</b>	Gonadotropin-releasing Hormon
<b>GPI</b>	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>HCL</b>	Salzsäure
<b>HPLC</b>	High prescure liquid chromatography
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase/Merrettichperoxidase
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cells
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>KDN</b>	Deaminoneuraminsäure
<b>LH</b>	Luteinisierendes Hormon
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>mAK</b>	monoklonaler Antikörper
<b>mA</b>	Mili-Ampere
<b>ManNAc</b>	<i>N</i> -Acetyl-D-Mannosamin
<b>ManNBut</b>	2- <i>N</i> -Butyl-Mannosamin
<b>ManNProp</b>	2- <i>N</i> -Propionyl-Mannosamin
<b>MEM</b>	Minimal essential medium
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid
<b>n</b>	Anzahl
<b><i>N</i>-</b>	Amino-
<b>NaClO</b>	Natriumhypochlorit
<b>NCAM</b>	Neurales Zelladhäsionsmolekül
<b>Neu5Ac</b>	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
<b>Neu5Gc</b>	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
<b>NFκB</b>	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NRP-2</b>	Neuropilin-2

---

<b>ns</b>	Nicht significant
<b>NT-3</b>	Neurotrophin-3
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OH</b>	Hydroxid
<b>OT</b>	OT
<b>p</b>	Signifikanz-Wert
<b>P</b>	Phosphor
<b>pAK</b>	Polyklonaler Antikörper
<b>PB</b>	Phosphate buffered
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCNA</b>	Proliferating cell nuclear antigen
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion
<b>PEP</b>	Phosphonoxyprop-2-ensäure
<b>PFA</b>	Polyformaldehyd
<b>pLH</b>	porcines luteinisierendes Hormon
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PNGaseF</b>	Peptide -N-Glycosidase F
<b>PolySia</b>	Polysialinsäuren
<b>PolySia-NCAM</b>	Polysialyliertes neurales Zelladhäsionsmolekül
<b>PRR</b>	Pattern recognition Receptor
<b>PSTD</b>	Polysilyltransferasen-Domäne
<b>rev</b>	Reverse Primer
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>RPS 13</b>	40S ribosomales Protein S13
<b>R. T.</b>	Raumtemperatur
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrilamid Gelelektrophorese
<b>SEM</b>	<i>standard error of the mean</i> /Standardfehler des Mittelwerts
<b>SH</b>	Schwefelwasserstoff
<b>SiaM</b>	Sialylierungsmotiv
<b>SiaM III</b>	Sialylierungsmotiv III
<b>SiaM L</b>	Sialylierungsmotiv large

---

<b>SiaM S</b>	Sialylierungsmotiv small
<b>SiaM VS</b>	Sialylierungsmotiv very small
<b>S<sub>N</sub><sup>2</sup></b>	Nucleophile Substitution 2. Ordnung
<b>St8SialI</b>	α2,8-Sialyltransferase 2
<b>St8SialIV</b>	α2,8-Sialyltransferase 4
<b>SynCAM</b>	Synaptisches Zelladhäsionsmolekül
<b>TdT</b>	Terminal desoxynucleotidyl transferase
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<b>TWEEN</b>	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>v/v</b>	Volume per volume/Volumenprozent
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>w/v</b>	Weight per volume/Massenvolumen
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

---

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktureller Aufbau und Modifikationen der Sialinsäuren (modifiziert nach Schnaar <i>et al.</i> 2014).....	4
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Biosynthese von Sialinsäuren und PolySia (modifiziert nach Schauer 2004) .....	6
Abbildung 3:	Schematische Darstellung eines polysialylierten <i>N</i> -Glykans vom komplexen Typ (modifiziert nach Angata <i>et al.</i> 2006; Schnaar <i>et al.</i> 2014) .....	7
Abbildung 4:	Primärstruktur der Transmembrandomäne der Sialyltransferasen St8SialII und St8SialIV (modifiziert nach Angata und Fukuda 2003 und nach Angaben aus Harduin-Lepers 2013).....	10
Abbildung 5:	Schematisch dargestellte Modifikationen von NCAM (modifiziert nach Kleene und Schachner 2004) .....	12
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Polysialylierung von NCAM-140 durch Polysialyltransferasen (in Anlehnung an Colley 2010; Schnaar <i>et al.</i> 2014 und Thompson <i>et al.</i> 2013) .....	14
Abbildung 7:	Übersicht der biologischen Bedeutung von polysialyliertem NCAM (modifiziert nach Gascon <i>et al.</i> 2007; Schnaar <i>et al.</i> 2014) .....	15
Abbildung 8:	Schematische Übersicht des Ovars am Beispiel der Katze .....	21
Abbildung 9:	Histologischer Aufbau des Tertiärfollikels am Beispiel der Katze ....	23
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des Follikelwachstums (modifiziert nach McGee und Hsueh 2000; Webb <i>et al.</i> 2004) .....	27
Abbildung 11:	Morphologische Charakteristika von Atresie in Tertiärfollikeln.....	44
Abbildung 12:	Klassifizierung der <i>Cumulus-oophorus</i> -Komplexe (COC's) .....	46
Abbildung 13:	Granulosazellen und Oozyte nach Kultivierung .....	46
Abbildung 14:	Immunhistologische Lokalisation von PolySia in felinem Ovargewebe .....	64
Abbildung 15:	Immunlokalisation von PolySia in Tertiärfollikeln .....	65
Abbildung 16:	Auswertung der dominanten und atretischen Follikel in Abhängigkeit von dem Polysialylierungsstatus.....	66
Abbildung 17:	Nachweis von PolySia in lysiertem ovariellen Gewebe anhand Western Blot-Analysen nach Affinitätspräzipitation.....	68
Abbildung 18:	Kettenlängenbestimmung von PolySia mittels milder DMB-HPLC nach Affinitätsaufreinigung .....	69
Abbildung 19:	Nachweis der Polysialyltransferasen St8SialII und St8SialIV mittels RT-PCR.....	70
Abbildung 20:	Identifizierung von polysialyliertem NCAM mittels Western Blot.....	71
Abbildung 21:	Nachweis von NCAM in Primordial-, Primär- und Sekundärfollikeln des felinen Ovars .....	72

---

Abbildung 22:	Immunlokalisation von NCAM in Tertiärfollikeln .....	73
Abbildung 23:	Beurteilung der Vitalität von kultivierten Granulosazellen .....	74
Abbildung 24:	Immunfluoreszenzfärbung feliner Granulosazellen nach Kultivierung .....	75
Abbildung 25:	Verteilung apoptotischer feliner Granulosazellen nach Stimulation.	76
Abbildung 26:	Auswirkung von PolySia auf die Apoptose der Granulosazellen .....	77
Abbildung 27:	Identifikation von PolySia in murinem Gewebe .....	78
Abbildung 28:	Immunhistochemische Untersuchung der murinen <i>Tuba uterina</i> auf PolySia .....	79
Abbildung 29:	Western Blot von lysiertem Gewebe des Ovidukts der Maus nach Affinitätspräzipitation für den Nachweis von PolySia .....	80
Abbildung 30:	PolySia in fetalen Gonaden der Katze (Tag 36 und Tag 48) .....	81
Abbildung 31:	Fetale feline Gonaden Tag 55 der Gravidität .....	82
Abbildung 32:	Histologischer Vergleich von adulten und postnatalen Gewebsproben hinsichtlich der Polysialylierung .....	83
Abbildung 33:	Schematische Darstellung von möglichen Antikörper-interaktionen anhand der Struktur von polysialyliertem NCAM-140 und seinem Gen (modifiziert nach Senkov <i>et al.</i> 2012) .....	88
Abbildung 34:	Schematisch Darstellung möglicher Auswirkungen von polysialyliertem NCAM-140 auf Granulosazellen und die Follikelatresie .....	97
Abbildung 35:	Schematische Darstellung der Entwicklung der Primordialfollikel und die Lokalisation von PolySia feliner fetaler Gonaden .....	100

---

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen (nach Sato 2013) .....	8
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Primärantikörper.....	33
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	34
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Enzyme .....	35
Tabelle 5:	Liste der verwendeten Stimulantien für die Zellkultur.....	36
Tabelle 6:	Übersicht Zyklusstadien und Beurteilung bei der Katze (nach Freistedt <i>et al.</i> 2001).....	37
Tabelle 7:	Übersicht Zyklusstadien und Beurteilung mittels exfoliativer Vaginalzytologie bei der Maus (nach Schutte 1967; Röttger 2010).	38
Tabelle 8:	Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze .....	134
Tabelle 9:	Verwendete Reaktionskits .....	136
Tabelle 10:	Verwendete Geräte und Software .....	136
Tabelle 11:	Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	137

---

## 11 Literaturverzeichnis

- Aalto, J.; Pelkonen, S.; Kalimo, H.; Finne, J. (2001): Mutant bacteriophage with non-catalytic endosialidase binds to both bacterial and eukaryotic polysialic acid and can be used as probe for its detection. In: *Glycoconjugate journal* 18 (10), S. 751–758.
- Aharoni, D.; Dantes, A.; Oren, M.; Amsterdam, A. (1995): cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. In: *Experimental cell research* 218 (1), S. 271–282.
- Albach, C.; Damoc, E.; Denzinger, T.; Schachner, M.; Przybylski, M.; Schmitz, B. (2004): Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 378 (4), S. 1129–1135.
- Allen, E. (1922): The oestrous cycle in the mouse. In: *American Journal of Anatomy* 30 (3), S. 297–371.
- Angata, K.; Fukuda, M. (2003): Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. In: *Biochimie* 85 (1-2), S. 195–206.
- Angata, K.; Lee, W.; Mitoma, J.; Marth, J. D.; Fukuda, M. (2006): Cellular and molecular analysis of neural development of glycosyltransferase gene knockout mice. In: *Methods in enzymology* 417, S. 25–37.
- Angata, K.; Long, J. M.; Bukalo, O.; Lee, W.; Dityatev, A.; Wynshaw-Boris, A. *et al.* (2004): Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (31), S. 32603–32613.
- Angata, K.; Nakayama, J.; Fredette, B.; Chong, K.; Ranscht, B.; Fukuda, M. (1997): Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (11), S. 7182–7190.
- Angata, K.; Suzuki, M.; Fukuda, M. (2002): ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (39), S. 36808–36817.
- Angata, K.; Suzuki, M.; McAuliffe, J.; Ding, Y.; Hindsgaul, O.; Fukuda, M. (2000): Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (24), S. 18594–18601.
- Armstrong, J.; Childs, G. V. (1997): Changes in expression of epidermal growth factor receptors by anterior pituitary cells during the estrous cycle. Cyclic expression by gonadotropes. In: *Endocrinology* 138 (5), S. 1903–1908.

- 
- Athenstaedt, H. (1970): Permanent longitudinal electric polarization and pyroelectric behaviour of collagenous structures and nervous tissue in man and other vertebrates. In: *Nature* 228 (5274), S. 830–834.
- Bassett, C. A.; Pawluk, R. J.; Becker, R. O. (1964): Effects of electric currents on bone in vivo. In: *Nature* 204, S. 652–654.
- Bayer, N. B.; Schubert, U.; Senturk, Z.; Rudloff, S.; Frank, S.; Hausmann, H. *et al.* (2013): Artificial and natural sialic acid precursors influence the angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 18 (3), S. 2571–2586.
- Beers, W. H.; Strickland, S.; Reich, E. (1975): Ovarian plasminogen activator. Relationship to ovulation and hormonal regulation. In: *Cell* 6 (3), S. 387–394.
- Behringer, R.; Gertsenstein, M.; Vintersten Nagy, K.; Nagy, A. (2014): Chapter 2 - Summary of Mouse Development. In: Richard Behringer, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten Nagy und Andras Nagy (Hg.): *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 4. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, S. 23–78.
- Berisha, B.; Steffl, M.; Amselgruber, W.; Schams, D. (2006): Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. In: *Reproduction* 131 (2), S. 319–329.
- Bhavsar, R. B.; Makley, L. N.; Tsonis, P. A. (2010): The other lives of ribosomal proteins. In: *Hum Genomics* 4 (5), S. 327.
- Bhide, G. P.; Fernandes, N. R. J.; Colley, K. J. (2016): Sequence Requirements for Neuropilin-2 Recognition by ST8SialV and Polysialylation of Its O-Glycans. In: *Journal of Biological Chemistry* 291 (18), S. 9444–9457.
- Bjersing, L.; Cajander, S. (1975): Ovulation and the role of the ovarian surface epithelium. In: *Experientia* 31 (5), S. 605–608.
- Block, A.; Bettelheim, F. A. (1970): Water vapor sorption of hyaluronic acid. In: *Biochimica et biophysica acta* 201 (1), S. 69–75.
- Bock, E.; Edvardsen, K.; Gibson, A.; Linnemann, D.; Lyles, J. M.; Nybroe, O. (1987): Characterization of soluble forms of NCAM. In: *FEBS letters* 225 (1-2), S. 33–36.
- Braun, B. C.; Ringleb, J.; Waurich, R.; Viertel, D.; Jewgenow, K. (2009): Functional role of feline zona pellucida protein 4 trefoil domain: a sperm receptor or structural component of the domestic cat zona pellucida? In: *Reproduction in domestic animals* 44 Suppl 2, S. 234–238.
- Brenneman, L. H.; Maness, P. F. (2010): NCAM in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. In: *Advances in experimental medicine and biology* 663, S. 299–317.
- Brisson, J. R.; Baumann, H.; Imberty, A.; Perez, S.; Jennings, H. J. (1992): Helical epitope of the group B meningococcal.alpha.(2-8)-linked sialic acid polysaccharide. In: *Biochemistry* 31 (21), S. 4996–5004.
- Bristol-Gould, S.; Woodruff, T. K. (2006): Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). In: *Theriogenology* 66 (1), S. 5–13.

- 
- Brown, J. L. (2006): Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. In: *Theriogenology* 66 (1), S. 25–36.
- Brown, J. L. (2011): Female reproductive cycles of wild female felids. In: *Animal reproduction science* 124 (3-4), S. 155–162.
- Brummendorf, T.; Rathjen, F. G. (1995): Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. In: *Protein profile* 2 (9), S. 963–1108.
- Burden, H. W. (1972): Ultrastructural observations on ovarian perfollicular smooth muscle in the cat, guinea pig, and rabbit. In: *The American journal of anatomy* 133 (2), S. 125–142.
- Burgess, A.; Wainwright, S. R.; Shihabuddin, L. S.; Rutishauser, U.; Seki, T.; Aubert, I. (2008): Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. In: *Developmental neurobiology* 68 (14), S. 1580–1590.
- Byskov, A. G. (1975): The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. In: *Journal of reproduction and fertility* 45 (2), S. 201–209.
- Caligioni, C. S. (2009): Assessing reproductive status/stages in mice. In: *Current protocols in neuroscience* Appendix 4, Appendix 4I.
- Campbell, B. K.; Telfer, E. E.; Webb, R.; Baird, D. T. (2000): Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. In: *Molecular and cellular endocrinology* 163 (1-2), S. 131–139.
- Campbell, C. M.; Fostier, A.; Jalabert, B.; Truscott, B. (1980): Identification and quantification of steroids in the serum of rainbow trout during spermiation and oocyte maturation. In: *The Journal of endocrinology* 85 (3), S. 371–378.
- Campbell, S.; Swann, H. R.; Seif, M. W.; Kimber, S. J.; Aplin, J. D. (1995): Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 10 (6), S. 1571–1578.
- Carrijo, O. A., JR; Marinho, A. P. S.; Campos, A. A.; Amorim, C. A.; Bao, S. N.; Lucci, C. M. (2010): Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. In: *Cells, tissues, organs* 191 (2), S. 152–160.
- Chaves, R. N.; Matos, M. H. T. de; Buratini, J., JR; Figueiredo, J. R. de (2012): The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. In: *Reproduction, fertility and development* 24 (7), S. 905–915.
- Cheung, E. C. C.; Slack, R. S. (2004): Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004 (251), PE45.
- Cheung, I. Y.; Vickers, A.; Cheung, N.-K. V. (2006): Sialyltransferase STX (ST8Siall): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma. In: *International journal of cancer* 119 (1), S. 152–156.
- Close, B. E.; Colley, K. J. (1998): In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (51), S. 34586–34593.

- 
- Colley, K. J. (2010): Structural basis for the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. In: *Advances in experimental medicine and biology* 663, S. 111–126.
- Concannon, P. (1980): Reflex LH Release in estrous cats following single and multiple copulations. In: *Biology of Reproduction* 23 (1), S. 111–117.
- Crichton, E. G.; Bedows, E.; Miller-Lindholm, A. K.; Baldwin, D. M.; Armstrong, D. L.; Graham, L. H. *et al.* (2003): Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). In: *Biology of Reproduction* 68 (1), S. 105–113.
- Cunningham, B. A.; Hemperly, J. J.; Murray, B. A.; Prediger, E. A.; Brackenbury, R.; Edelman, G. M. (1987): Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. In: *Science (New York, N.Y.)* 236 (4803), S. 799–806.
- Curreli, S.; Arany, Z.; Gerardy-Schahn, R.; Mann, D.; Stamatou, N. M. (2007): Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (42), S. 30346–30356.
- Daniel, L.; Durbec, P.; Gautherot, E.; Rouvier, E.; Rougon, G.; Figarella-Branger, D. (2001): A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process. In: *Oncogene* 20 (8), S. 997–1004.
- Datta, A. K. (2009): Comparative sequence analysis in the sialyltransferase protein family: analysis of motifs. In: *Current drug targets* 10 (6), S. 483–498.
- Datta, A. K.; Paulson, J. C. (1995): The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (4), S. 1497–1500.
- Datta, A. K.; Sinha, A.; Paulson, J. C. (1998): Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (16), S. 9608–9614.
- Dawson, A. B. (1941): The development and morphology of the corpus luteum of the cat. In: *The Anatomical Record* 79 (2), S. 155–177.
- Dodd, J.; Morton, S. B.; Karagogeos, D.; Yamamoto, M.; Jessell, T. M. (1988): Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. In: *Neuron* 1 (2), S. 105–116.
- Eckhardt, M.; Bukalo, O.; Chazal, G.; Wang, L.; Goridis, C.; Schachner, M. *et al.* (2000): Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (14), S. 5234–5244.
- Erickson, G. F.; Magoffin, D. A.; Dyer, C. A.; Hofeditz, C. (1985): The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. In: *Endocrine reviews* 6 (3), S. 371–399.

- 
- Evans, S. V.; Sigurskjold, B. W.; Jennings, H. J.; Brisson, J. R.; To, R.; Tse, W. C. *et al.* (1995): Evidence for the extended helical nature of polysaccharide epitopes. The 2.8 Å resolution structure and thermodynamics of ligand binding of an antigen binding fragment specific for alpha-(2→8)-polysialic acid. In: *Biochemistry* 34 (20), S. 6737–6744.
- Feizi, T.; Mulloy, B. (2003): Carbohydrates and glycoconjugates. Glycomics: the new era of carbohydrate biology. In: *Current opinion in structural biology* 13 (5), S. 602–604.
- Finne, J. (1982): Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (20), S. 11966–11970.
- Finne, J.; Makela, P. H. (1985): Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (2), S. 1265–1270.
- Foley, D. A.; Swartzentruber, K. G.; Colley, K. J. (2009): Identification of sequences in the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV that are required for the protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule, NCAM. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (23), S. 15505–15516.
- Freistedt, P.; Stojkovic, M.; Wolf, E. (2001): Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. In: *Biology of Reproduction* 65 (1), S. 9–13.
- Frosch, M.; Gorgen, I.; Boulnois, G. J.; Timmis, K. N.; Bitter-Suermann, D. (1985): NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (4), S. 1194–1198.
- Galuska, S. P. (2013): Chapter 13: Advances in sialic acid and polysialic acid detection methodologies. In: Joe Tiralongo und Ivan Martinez-Duncker (Hg.): *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*: Bentham Science Publishers, S. 448–475.
- Galuska, S. P.; Geyer, R.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; Geyer, H. (2008): Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 17–28.
- Galuska, S. P.; Geyer, R.; Mühlenhoff, M.; Geyer, H. (2007): Characterization of oligo- and polysialic acids by MALDI-TOF-MS. In: *Analytical chemistry* 79 (18), S. 7161–7169.
- Galuska, S. P.; Oltmann-Norden, I.; Geyer, H.; Weinhold, B.; Kuchelmeister, K.; Hildebrandt, H. *et al.* (2006): Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (42), S. 31605–31615.
- Galuska, S. P.; Rollenhagen, M.; Kaup, M.; Eggert, K.; Oltmann-Norden, I.; Schiff, M. *et al.* (2010): Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (22), S. 10250–10255.

- 
- Gascon, E.; Vutskits, L.; Kiss, J. Z. (2007): Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. In: *Brain research reviews* 56 (1), S. 101–118.
- Gebauer, G.; Peter, A. T.; Onesime, D.; Dhanasekaran, N. (1999): Apoptosis of ovarian granulosa cells: correlation with the reduced activity of ERK-signaling module. In: *Journal of cellular biochemistry* 75 (4), S. 547–554.
- Geremia, R. A.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P. (1997): Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. In: *Glycobiology* 7 (2), S. v–vii.
- Gluer, S.; Schelp, C.; Schweinitz, D. von; Gerardy-Schahn, R. (1998): Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma. In: *Pediatric research* 43 (1), S. 145–147.
- Goeritz, F.; Painer, J.; Jewgenow, K.; Hermes, R.; Rasmussen, K.; Dehnhard, M.; Hildebrandt, T. B. (2012): Embryo retrieval after hormonal treatment to control ovarian function and non-surgical artificial insemination in African lions (*Panthera leo*). In: *Reproduction in domestic animals* 47 Suppl 6, S. 156–160.
- Gudermuth, D. F.; Newton, L.; Daels, P.; Concannon, P. (1997): Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 51, S. 177–184.
- Hachen, A.; Jewgenow, K.; Braun, B. C. (2012): Sequence analysis of feline oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*). In: *Theriogenology* 77 (3), S. 539–549.
- Hallenbeck, P. C.; Vimr, E. R.; Yu, F.; Bassler, B.; Troy, F. A. (1987): Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (8), S. 3553–3561.
- Hänsch, M.; Simon, P.; Schon, J.; Kaese, M.; Braun, B. C.; Jewgenow, K. *et al.* (2014): Polysialylation of NCAM correlates with onset and termination of seasonal spermatogenesis in roe deer. In: *Glycobiology* 24 (6), S. 488–493.
- Harduin-Lepers, A. (2013): Chapter 5: Vertebrate Sialyltransferases. In: Joe Tiralongo und Ivan Martinez-Duncker (Hg.): *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*: Bentham Science Publishers, S. 139–187.
- Harduin-Lepers, A.; Petit, D.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Petit, J.-M.; Oriol, R. (2008): Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. In: *BMC evolutionary biology* 8, S. 258.
- Harduin-Lepers, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Krzewinski-Recchi, M. A.; Samyn-Petit, B.; Julien, S.; Delannoy, P. (2001): The human sialyltransferase family. In: *Biochimie* 83 (8), S. 727–737.
- Hees, H. (2012): Histologie der Organe, Apparate und Systeme. Weibliche Geschlechtsorgane. In: Fred Sinowatz und Herbert Hees (Hg.): *Histologie*.

- 
- Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 5. Aufl. München: Selbstverl., S. 303–321.
- Hinderlich, S.; Stasche, R.; Zeitler, R.; Reutter, W. (1997): A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (39), S. 24313–24318.
- Hinsby, A. M.; Berezin, V.; Bock, E. (2004): Molecular mechanisms of NCAM function. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 2227–2244.
- Horstkorte, R.; Mühlenhoff, M.; Reutter, W.; Nöhring, S.; Zimmermann-Kordmann, M.; Gerardy-Schahn, R. (2004): Selective inhibition of polysialyltransferase ST8Siall by unnatural sialic acids. In: *Experimental cell research* 298 (1), S. 268–274.
- Hoyk, Z.; Parducz, A.; Theodosis, D. T. (2001): The highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus. In: *The European journal of neuroscience* 13 (4), S. 649–656.
- Hromatka, B. S.; Drake, P. M.; Kapidzic, M.; Stolp, H.; Goldfien, G. A.; Shih, I.-M.; Fisher, S. J. (2013): Polysialic acid enhances the migration and invasion of human cytotrophoblasts. In: *Glycobiology* 23 (5), S. 593–602.
- Inoue, S.; Inoue, Y. (2001): Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (34), S. 31863–31870.
- Inoue, S.; Lin, S. L.; Lee, Y. C.; Inoue, Y. (2001): An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. In: *Glycobiology* 11 (9), S. 759–767.
- Jeanneau, C.; Chazalet, V.; Auge, C.; Soumpasis, D. M.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P. *et al.* (2004): Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (14), S. 13461–13468.
- Jemiolo, B.; Harvey, S.; Novotny, M. (1986): Promotion of the whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12), S. 4576–4579.
- Jennings, H. J.; Roy, R.; Michon, F. (1985): Determinant specificities of the groups B and C polysaccharides of *Neisseria meningitidis*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 134 (4), S. 2651–2657.
- Jewgenow, K.; Amelkina, O.; Painer, J.; Goritz, F.; Dehnhard, M. (2012): Life cycle of feline Corpora lutea: histological and intraluteal hormone analysis. In: *Reproduction in domestic animals* 47 Suppl 6, S. 25–29.
- Jewgenow, K.; Wood, T. C.; Wildt, D. E. (1997): DNA degradation in mural granulosa cells of non- and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries. In: *Mol. Reprod. Dev.* 48 (3), S. 350–355.
- Ji, T.; Guo, Y.; Kim, K.; McQueen, P.; Ghaffar, S.; Christ, A. *et al.* (2015): Neuropilin-2 expression is inhibited by secreted Wnt antagonists and its down-regulation is

- 
- associated with reduced tumor growth and metastasis in osteosarcoma. In: *Molecular cancer* 14, S. 86.
- Johnson, C. P.; Fujimoto, I.; Perrin-Tricaud, C.; Rutishauser, U.; Leckband, D. (2004): Mechanism of homophilic adhesion by the neural cell adhesion molecule. Use of multiple domains and flexibility. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (18), S. 6963–6968.
- Johnson, C. P.; Fujimoto, I.; Rutishauser, U.; Leckband, D. E. (2005): Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (1), S. 137–145.
- Jolly, P. D. (1997): Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. In: *Biology of Reproduction* 56 (4), S. 837–846.
- Jorgensen, O. S.; Bock, E. (1974): Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. In: *Journal of neurochemistry* 23 (4), S. 879–880.
- Kaipia, A.; Hsueh, A. J. (1997): Regulation of ovarian follicle atresia. In: *Annual review of physiology* 59, S. 349–363.
- Kanato, Y.; Kitajima, K.; Sato, C. (2008): Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. In: *Glycobiology* 18 (12), S. 1044–1053.
- Karlstetter, M.; Kopatz, J.; Aslanidis, A.; Shahraz, A.; Caramoy, A.; Linnartz-Gerlach, B. *et al.* (2017): Polysialic acid blocks mononuclear phagocyte reactivity, inhibits complement activation, and protects from vascular damage in the retina. In: *EMBO Mol Med.* 9 (2), S. 154–166.
- Kean, E. L. (1991): Sialic acid activation. In: *Glycobiology* 1 (5), S. 441–447.
- Kean, E. L.; Munster-Kuhnel, A. K.; Gerardy-Schahn, R. (2004): CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. In: *Biochimica et biophysica acta* 1673 (1-2), S. 56–65.
- Kelm, S.; Schauer, R. (1997): Sialic acids in molecular and cellular interactions. In: *International review of cytology* 175, S. 137–240.
- Kenney, A. M.; Lanier, D. L.; Dewsbury, D. A. (1977): Effects of vaginal-cervical stimulation in seven species of muroid rodents. In: *Journal of reproduction and fertility* 49 (2), S. 305–309.
- Kessler, Y.; Helfer-Hungerbuehler, A. K.; Cattori, V.; Meli, M. L.; Zellweger, B.; Ossent, P. *et al.* (2009): Quantitative TaqMan real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. In: *BMC molecular biology* 10, S. 106.
- Kiermaier, E.; Mousson, C.; Veldkamp, C. T.; Gerardy-Schahn, R.; Vries, I. de; Williams, L. G. *et al.* (2016): Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6269), S. 186–190.

- 
- Kitazume-Kawaguchi, S.; Kabata, S.; Arita, M. (2001): Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (19), S. 15696–15703.
- Kleene, R.; Schachner, M. (2004): Glycans and neural cell interactions. In: *Nature reviews. Neuroscience* 5 (3), S. 195–208.
- Klenk, E. (1941): Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 268 (1-2), S. 50–58.
- Kohata, Y.; Gupta, P. D.; Yasuzumi, F. (2007): Stereo-electron microscopy of the ovarian follicles of cat and mouse. In: *Okajimas folia anatomica Japonica* 83 (4), S. 97–106.
- König, H. E.; Plendl, J.; Liebich, H.-G. (2014): Kapitel 11: Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina). In: Horst Erich König und Hans-Georg Liebich (Hg.): *Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 6., überarb. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 421–438.
- Kornfeld, S.; Kornfeld, R.; Neufeld, E. F.; O'Brien, P. J. (1964): THE FEEDBACK CONTROL OF SUGAR NUCLEOTIDE BIOSYNTHESIS IN LIVER. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52, S. 371–379.
- Kressin, M.; Schnorr, B.; Brehm, R. (2011): Kapitel 4 - Entwicklung und Bau der Eizelle. In: Monika Kressin und Bertram Schnorr (Hg.): *Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch*. 6., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke, S. 14–25.
- Lackie, P. M.; Zuber, C.; Roth, J. (1990): Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression. In: *Development (Cambridge, England)* 110 (3), S. 933–947.
- Lackie, P. M.; Zuber, C.; Roth, J. (1991): Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development. In: *Differentiation; research in biological diversity* 47 (2), S. 85–98.
- Lackie, P. M.; Zuber, C.; Roth, J. (1994): Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. In: *Differentiation; research in biological diversity* 57 (2), S. 119–131.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lawler, D. F.; Johnston, S. D.; Hegstad, R. L.; Keltner, D. G.; Owens, S. F. (1993): Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47, S. 57–61.
- Lawn, A. M. (1973): The ultrastructure of the endometrium during the sexual cycle. In: *Advances in reproductive physiology* 6 (0), S. 61–95.
- Leiser, R. (2004a): Kapitel 8: Weibliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia feminina. In: Richard Nickel (Hg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 9., unveränd. Aufl. Berlin [u.a.]: Parey (Richard Nickel; August Schummer; Eugen Seiferle; Bd. 2), S. 393–404.
- Leiser, R. (2004b): Kapitel 8: Weibliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia feminina. Weibliche Geschlechtsorgane von Hund und Katze. In: Richard Nickel (Hg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 9., unveränd. Aufl. Berlin [u.a.]: Parey (Richard Nickel; August Schummer; Eugen Seiferle; Bd. 2), S. 414–420.

- 
- Lerner, S. P.; Anderson, C. P.; Harrison, D. E.; Walford, R. L.; Finch, C. E. (1992): Polygenic influences on the length of oestrous cycles in inbred mice involve MHC alleles. In: *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* 19 (6), S. 361–371.
- Leshchyn'ska, I.; Sytnyk, V.; Morrow, J. S.; Schachner, M. (2003): Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC $\beta$ 2 via betal spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. In: *The Journal of cell biology* 161 (3), S. 625–639.
- Li, J.; Dai, G.; Cheng, Y.-B.; Qi, X.; Geng, M.-Y. (2011): Polysialylation promotes neural cell adhesion molecule-mediated cell migration in a fibroblast growth factor receptor-dependent manner, but independent of adhesion capability. In: *Glycobiology* 21 (8), S. 1010–1018.
- Liebich, H.-G. (2004): Kapitel 14: Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalis feminina). In: Hans-Georg Liebich (Hg.): *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 4., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer, S. 293–310.
- Liedtke, S.; Geyer, H.; Wuhrer, M.; Geyer, R.; Frank, G.; Gerardy-Schahn, R. *et al.* (2001): Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. In: *Glycobiology* 11 (5), S. 373–384.
- Little, E. B.; Crossin, K. L.; Krushel, L. A.; Edelman, G. M.; Cunningham, B. A. (2001): A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5), S. 2238–2243.
- Makrigiannakis, A.; Coukos, G.; Christofidou-Solomidou, M.; Gour, B. J.; Radice, G. L.; Blaschuk, O.; Coutifaris, C. (1999): N-Cadherin-Mediated Human Granulosa Cell Adhesion Prevents Apoptosis. In: *The American journal of pathology* 154 (5), S. 1391–1406.
- Mayerhofer, A.; Lahr, G.; Frohlich, U.; Zienecker, R.; Sterzik, K.; Gratzl, M. (1994): Expression and alternative splicing of the neural cell adhesion molecule NCAM in human granulosa cells during luteinization. In: *FEBS letters* 346 (2-3), S. 207–212.
- Mayerhofer, A.; Lahr, G.; Gratzl, M. (1991): Expression of the neural cell adhesion molecule in endocrine cells of the ovary. In: *Endocrinology* 129 (2), S. 792–800.
- McGee, E. A.; Hsueh, A. J. (2000): Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. In: *Endocrine reviews* 21 (2), S. 200–214.
- McKinney, T. D. (1972): Estrous cycle in house mice: effects of grouping, preputial gland odors, and handling. In: *Journal of mammalogy* 53 (2), S. 391–393.
- Mendiratta, S. S.; Sekulic, N.; Hernandez-Guzman, F. G.; Close, B. E.; Lavie, A.; Colley, K. J. (2006): A novel alpha-helix in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule is critical for N-glycan polysialylation. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (47), S. 36052–36059.

- 
- Mendiratta, S. S.; Sekulic, N.; Lavie, A.; Colley, K. J. (2005): Specific amino acids in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule play a role in its recognition and polysialylation by the polysialyltransferase ST8Sia IV/PST. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (37), S. 32340–32348.
- Mikkonen, M.; Soininen, H.; Kälviäinen, R.; Tapiola, T.; Ylinen, A.; Vapalahti, M. *et al.* (1998): Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy. Increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. In: *Ann Neurol.* 44 (6), S. 923–934.
- Mikkonen, M.; Soininen, H.; Tapiola, T.; Alafuzoff, I.; Miettinen, R. (1999): Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease. Changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. In: *European Journal of Neuroscience* 11 (5), S. 1754–1764.
- Milev, P.; Friedlander, D. R.; Sakurai, T.; Karthikeyan, L.; Flad, M.; Margolis, R. K. *et al.* (1994): Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. In: *The Journal of cell biology* 127 (6 Pt 1), S. 1703–1715.
- Mizuhara, F.; Kamei, T.; Fujii, T. (1958): Studies on the estrous cycle in uniform strains of mice; an application of the dimension method. In: *Endocrinologia japonica* 5 (4), S. 243–246.
- Møller, C. J.; Byskov, A. G.; Roth, J.; Celis, J. E.; Bock, E. (1991): NCAM in developing mouse gonads and ducts. In: *Anatomy and embryology* 184 (6), S. 541–548.
- Monnier, P. P.; Beck, S. G.M.; Bolz, J.; Henke-Fahle, S. (2001): The polysialic acid moiety of the neural cell adhesion molecule is involved in intraretinal guidance of retinal ganglion cell axons. In: *Developmental biology* 229 (1), S. 1–14.
- Monzavifar, M.; Ellendorff, F.; Smidt, D. (1970): Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Fortpflanzung bei Mäusen, I. Einfluss von 35 Grad Celsius und 65-70 Prozent RF auf die Fertilität. In: *International journal of biometeorology* 14 (1), S. 77–84.
- Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Bethe, A.; Frosch, M.; Gerardy-Schahn, R. (1996): Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. In: *The EMBO journal* 15 (24), S. 6943–6950.
- Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Gerardy-Schahn, R. (1998): Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. In: *Current opinion in structural biology* 8 (5), S. 558–564.
- Mühlenhoff, M.; Oltmann-Norden, I.; Weinhold, B.; Hildebrandt, H.; Gerardy-Schahn, R. (2009): Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. In: *Biological chemistry* 390 (7), S. 567–574.
- Mühlenhoff, M.; Rollenhagen, M.; Werneburg, S.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. (2013): Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. In: *Neurochemical research* 38 (6), S. 1134–1143.
- Münster-Kühnel, A. K.; Hinderlich, S. (2013): Chapter 3: Sialic acid biosynthesis in vertebrates. In: Joe Tiralongo und Ivan Martinez-Duncker (Hg.): *Sialobiology:*

---

*Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*: Bentham Science Publishers, S. 76–114.

- Murray, B. A.; Hoffman, S.; Cunningham, B. A. (1987): Molecular features of cell-cell adhesion molecules. In: *Progress in brain research* 71, S. 35–45.
- Nakata, D.; Zhang, L.; Troy, F. A. 2. (2006): Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. In: *Glycoconjugate journal* 23 (5-6), S. 423–436.
- Nelson, R. W.; Bates, P. A.; Rutishauser, U. (1995): Protein Determinants for Specific Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (29), S. 17171–17179.
- Neubauer, K.; Jewgenow, K.; Fickel, J. (2006): Follicle-stimulating hormone receptor in felids: intra- and interspecies variation. In: *Theriogenology* 66 (6-7), S. 1737–1742.
- Niethammer, P.; Delling, M.; Sytnyk, V.; Dityatev, A.; Fukami, K.; Schachner, M. (2002): Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. In: *The Journal of cell biology* 157 (3), S. 521–532.
- Niswender, G. D.; Juengel, J. L.; Silva, P. J.; Rollyson, M. K.; McIntush, E. W. (2000): Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. In: *Physiological reviews* 80 (1), S. 1–29.
- Ohe, M. von der; Wheeler, S. F.; Wuhrer, M.; Harvey, D. J.; Liedtke, S.; Mühlenhoff, M. *et al.* (2002): Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. In: *Glycobiology* 12 (1), S. 47–63.
- Okamura, H.; Virutamasen, P.; Wright, K. H.; Wallach, E. E. (1972): Ovarian smooth muscle in the human being, rabbit, and cat. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 112 (2), S. 183–191.
- Okuda, Y.; Okamura, H.; Kanzaki, H.; Takenaka, A. (1983): Capillary permeability of rabbit ovarian follicles prior to ovulation. In: *Journal of anatomy* 137 (Pt 2), S. 263–269.
- Oltmann-Norden, I.; Galuska, S. P.; Hildebrandt, H.; Geyer, R.; Gerardy-Schahn, R.; Geyer, H.; Mühlenhoff, M. (2008): Impact of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (3), S. 1463–1471.
- Ong, E.; Nakayama, J.; Angata, K.; Reyes, L.; Katsuyama, T.; Arai, Y.; Fukuda, M. (1998): Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. In: *Glycobiology* 8 (4), S. 415–424.
- Ono, S.; Hane, M.; Kitajima, K.; Sato, C. (2012): Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid. In: *Journal of Biological Chemistry* 287 (6), S. 3710–3722.
- Palmerini, M. G.; Nottola, S. A.; Tunjung, W. A. S.; Kadowaki, A.; Bianchi, S.; Cecconi, S. *et al.* (2016): EGF-FSH supplementation reduces apoptosis of pig granulosa cells in co-culture with cumulus-oocyte complexes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 481 (1-2), S. 159–164.

- 
- Parkes, A. S.; Brambell, F. W. (1928): The causation of the anoestrous period. In: *The Journal of physiology* 64 (4), S. 388–392.
- Pavelka, M.; Roth, J. (2005): Das Zytoplasma: das sekretorische System. In: Margit Pavelka und Jürgen Roth (Hg.): *Funktionelle Ultrastruktur. Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben*. Wien: Springer, S. 23–80.
- Pedersen, T.; Peters, H. (1968): Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. In: *Journal of reproduction and fertility* 17 (3), S. 555–557.
- Pelican, K. M.; Wildt, D. E.; Pukazhenthil, B.; Howard, J. (2006): Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. In: *Theriogenology* 66 (1), S. 37–48.
- Peluso, J. J.; Pappalardo, A.; Fernandez, G. (2001): E-cadherin-mediated cell contact prevents apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating Akt kinase activity. In: *Biology of Reproduction* 64 (4), S. 1183–1190.
- Peter, A. T.; Dhanasekaran, N. (2003): Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules. In: *Reproduction in domestic animals* 38 (3), S. 209–213.
- Pope, C. E. (2004): In vitro fertilization and embryo transfer in felids. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 254, S. 227–244.
- Pope, C. E.; Gómez, M. C.; Kagawa, N.; Kuwayama, M.; Leibo, S. P.; Dresser, B. L. (2012): In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. In: *Theriogenology* 77 (3), S. 531–538.
- Pope, C. E.; Johnson, C. A.; McRae, M. A.; Keller, G. L.; Dresser, B. L. (1998): Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. In: *Animal reproduction science* 53 (1-4), S. 221–236.
- Pritchett, K. R.; Taft, R. (2007): Reproductive biology of the laboratory mouse. In: James G. Fox (Hg.): *The mouse in biomedical research*. 2nd ed. Burlington, MA: Elsevier Academic Press (American College of Laboratory Animal Medicine series), S. 91–122.
- Rao, F. V.; Rich, J. R.; Rakic, B.; Buddai, S.; Schwartz, M. F.; Johnson, K. *et al.* (2009): Structural insight into mammalian sialyltransferases. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (11), S. 1186–1188.
- Rao, M. (1978): Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. In: *Cell* 14 (1), S. 71–78.
- Rao, Y.; Wu, X. F.; Garipey, J.; Rutishauser, U.; Siu, C. H. (1992): Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. In: *The Journal of cell biology* 118 (4), S. 937–949.
- Rao, Y.; Wu, X. F.; Yip, P.; Garipey, J.; Siu, C. H. (1993): Structural characterization of a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (27), S. 20630–20638.
- Rockle, I.; Seidenfaden, R.; Weinhold, B.; Mühlhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. (2008): Polysialic acid controls NCAM-induced differentiation of neuronal precursors into calretinin-positive olfactory bulb interneurons. In: *Developmental neurobiology* 68 (9), S. 1170–1184.

- 
- Rodgers, R. J.; Irving-Rodgers, H. F. (2010): Morphological classification of bovine ovarian follicles. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 139 (2), S. 309–318.
- Rollenhagen, M.; Buettner, F. F. R.; Reismann, M.; Jirno, A. C.; Grove, M.; Behrens, G. M. N. *et al.* (2013): Polysialic acid on neuropilin-2 is exclusively synthesized by the polysialyltransferase ST8SialIV and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (32), S. 22880–22892.
- Roth, J.; Zuber, C.; Wagner, P.; Blaha, I.; Bitter-Suermann, D.; Heitz, P. U. (1988): Presence of the long chain form of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule in Wilms' tumor. Identification of a cell adhesion molecule as an oncodevelopmental antigen and implications for tumor histogenesis. In: *The American journal of pathology* 133 (2), S. 227–240.
- Röttger, K. (2010): Untersuchungen zur Durchführung der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Hündin. Ein Beitrag zur Standardisierung dieser diagnostischen Methode. 1. Aufl. Giessen: VVB Lauferweiler (Edition scientifique).
- Rüsse, I. (1983): Oogenesis in cattle and sheep. In: *Bibliotheca anatomica* 24, S. 77–92.
- Rüsse, I. (2015): Kapitel 4 - Weiblicher Sexualzyklus. In: Imogen Rüsse und Fred Sinowatz (Hg.): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 3. durchgesehene Auflage. München, Kumbach: Frick Kreativbüro et Onlinedruckerei, S. 93–110.
- Rüsse, I.; Sinowatz, F. (2015): Kapitel 3 - Kapitel Gametogenese. 3.4.1 - Oogenese beim Säugetier. In: Imogen Rüsse und Fred Sinowatz (Hg.): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 3. durchgesehene Auflage. München, Kumbach: Frick Kreativbüro et Onlinedruckerei, S. 72–85.
- Rutishauser, U. (1998): Polysialic acid at the cell surface. Biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity. In: *Journal of cellular biochemistry* 70 (3), S. 304–312.
- Rutishauser, U. (2008): Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9 (1), S. 26–35.
- Rutishauser, U.; Acheson, A.; Hall, A. K.; Mann, D. M.; Sunshine, J. (1988): The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. In: *Science (New York, N.Y.)* 240 (4848), S. 53–57.
- Rutishauser, U.; Landmesser, L. (1996): Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. In: *Trends in neurosciences* 19 (10), S. 422–427.
- Rutishauser, U.; Thiery, J. P.; Brackenbury, R.; Sela, B. A.; Edelman, G. M. (1976): Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (2), S. 577–581.
- Sarff, L. D.; McCracken, G. H.; Schiffer, M. S.; Glode, M. P.; Robbins, J. B.; Orskov, I.; Orskov, F. (1975): Epidemiology of *escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. In: *Lancet (London, England)* 1 (7916), S. 1099–1104.

- 
- Sasson, R.; Amsterdam, A. (2002): Stimulation of apoptosis in human granulosa cells from in vitro fertilization patients and its prevention by dexamethasone: involvement of cell contact and bcl-2 expression. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87 (7), S. 3441–3451.
- Sasson, R.; Amsterdam, A. (2003): Pleiotropic anti-apoptotic activity of glucocorticoids in ovarian follicular cells. In: *Biochemical pharmacology* 66 (8), S. 1393–1401.
- Sato, C. (2013): Chapter 2: Polysialic acid. In: Joe Tiralongo und Ivan Martinez-Duncker (Hg.): *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*: Bentham Science Publishers, S. 33–75.
- Sato, C.; Fukuoka, H.; Ohta, K.; Matsuda, T.; Koshino, R.; Kobayashi, K. *et al.* (2000): Frequent occurrence of pre-existing alpha 2--8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain glycoproteins. Prevalence revealed by highly sensitive chemical methods and anti-di-, oligo-, and poly-Sia antibodies specific for defined chain lengths. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (20), S. 15422–15431.
- Sato, C.; Hane, M.; Kitajima, K. (2016): Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. In: *Biochimica et biophysica acta* 1860 (8), S. 1739–1752.
- Sato, C.; Kitajima, K. (1999): Glycobiology of Di- and Oligosialyl Glycotopes. In: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 11 (62), S. 371–390.
- Sato, C.; Kitajima, K. (2011): New Functions of Polysialic Acid and Its Relationship to Schizophrenia. In: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 23 (133), S. 221–238.
- Schauer, R. (2004): Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. In: *Zoology (Jena, Germany)* 107 (1), S. 49–64.
- Schnaar, R. L.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. (2014): Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. In: *Physiol. Rev.* 94 (2), S. 461–518.
- Schnorr, B.; Kressin, M. (2006): Kapitel 25 Entwicklung der Geschlechtsorgane. - Ovar. In: Bertram Schnorr und Monika Kressin (Hg.): *Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch; 14 Tabellen*. 5., neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke, S. 191–193.
- Schreiber, S. C.; Giehl, K.; Kastilan, C.; Hasel, C.; Mühlhoff, M.; Adler, G. *et al.* (2008): Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. In: *Gastroenterology* 134 (5), S. 1555–1566.
- Schutte, A. P. (1967): Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. In: *The Journal of small animal practice* 8 (6), S. 301–306.
- Schwarzer, D.; Stummeyer, K.; Haselhorst, T.; Freiburger, F.; Rode, B.; Grove, M. *et al.* (2009): Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F. In: *J. Biol. Chem.* 284 (14), S. 9465–9474.

- 
- Seidenfaden, R.; Krauter, A.; Schertzinger, F.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. (2003): Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. In: *Molecular and cellular biology* 23 (16), S. 5908–5918.
- Seifert, A.; Glanz, D.; Glaubitz, N.; Horstkorte, R.; Bork, K. (2012): Polysialylation of the neural cell adhesion molecule: interfering with polysialylation and migration in neuroblastoma cells. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 524 (1), S. 56–63.
- Senkov, O.; Tikhobrazova, O.; Dityatev, A. (2012): PSA-NCAM: synaptic functions mediated by its interactions with proteoglycans and glutamate receptors. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (4), S. 591–595.
- Shahraz, A.; Kopatz, J.; Mathy, R.; Kappler, J.; Winter, D.; Kapoor, S. *et al.* (2015): Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. In: *Scientific reports* 5, S. 16800.
- Shille, V. M.; Lundstrom, K. E.; Stabenfeldt, G. H. (1979): Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. In: *Biology of Reproduction* 21 (4), S. 953–963.
- Shille, V. M.; Munro, C.; Farmer, S. W.; Papkoff, H.; Stabenfeldt, G. H. (1983): Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. In: *Journal of reproduction and fertility* 69 (1), S. 29–39.
- Silberstein, G. B.; Daniel, C. W. (1982): Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of the developing mouse mammary duct. In: *Developmental biology* 90 (1), S. 215–222.
- Simon, P.; Baumner, S.; Busch, O.; Rohrich, R.; Kaese, M.; Richterich, P. *et al.* (2013): Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (26), S. 18825–18833.
- Simon, P.; Feuerstacke, C.; Kaese, M.; Saboor, F.; Middendorff, R.; Galuska, S. P. (2015): Polysialylation of NCAM characterizes the proliferation period of contractile elements during postnatal development of the epididymis. In: *PloS one* 10 (3), e0123960.
- Sinowatz, F.; Topfer-Petersen, E.; Kolle, S.; Palma, G. (2001): Functional Morphology of the Zona Pellucida. In: *Anatom Histol Embryol* 30 (5), S. 257–263.
- Snell, G. D.; Fekete, E.; Hummel, K. P.; Law, L. W. (1940): The relation of mating, ovulation and the estrous smear in the house mouse to time of day. In: *The Anatomical Record* 76 (1), S. 39–54.
- Sorkin, B. C.; Hoffman, S.; Edelman, G. M.; Cunningham, B. A. (1984): Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM. In: *Science (New York, N.Y.)* 225 (4669), S. 1476–1478.
- Stamatos, N. M.; Zhang, L.; Jokilampi, A.; Finne, J.; Chen, W. H.; El-Maarouf, A. *et al.* (2014): Changes in polysialic acid expression on myeloid cells during differentiation and recruitment to sites of inflammation: role in phagocytosis. In: *Glycobiology* 24 (9), S. 864–879.

- 
- Stanley, P.; Schachter, H.; Taniguchi, N. (2009): N-Glycans. In: Ajit Varki, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Hudson H. Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R. Bertozzi et al. (Hg.): *Essentials of Glycobiology*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor (NY).
- Stummeyer, K.; Dickmanns, A.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Ficner, R. (2005): Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. In: *Nature structural & molecular biology* 12 (1), S. 90–96.
- Sytnyk, V.; Leshchyns'ka, I.; Delling, M.; Dityateva, G.; Dityatev, A.; Schachner, M. (2002): Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. In: *The Journal of cell biology* 159 (4), S. 649–661.
- Sytnyk, V.; Leshchyns'ka, I.; Nikonenko, A. G.; Schachner, M. (2006): NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. In: *The Journal of cell biology* 174 (7), S. 1071–1085.
- Tan, O.; Fadiel, A.; Chang, A.; Demir, N.; Jeffrey, R.; Horvath, T. et al. (2009): Estrogens regulate posttranslational modification of neural cell adhesion molecule during the estrogen-induced gonadotropin surge. In: *Endocrinology* 150 (6), S. 2783–2790.
- Tanaka, F.; Otake, Y.; Nakagawa, T.; Kawano, Y.; Miyahara, R.; Li, M. et al. (2000): Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. In: *Cancer research* 60 (11), S. 3072–3080.
- Tanner, M. E. (2005): The enzymes of sialic acid biosynthesis. In: *Bioorganic chemistry* 33 (3), S. 216–228.
- Thompson, M. G.; Foley, D. A.; Colley, K. J. (2013): The polysialyltransferases interact with sequences in two domains of the neural cell adhesion molecule to allow its polysialylation. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (10), S. 7282–7293.
- Thompson, M. G.; Foley, D. A.; Swartzentruber, K. G.; Colley, K. J. (2011): Sequences at the interface of the fifth immunoglobulin domain and first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule are critical for its polysialylation. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (6), S. 4525–4534.
- Tilly, J. L. (1996): Apoptosis and ovarian function. In: *Reviews of reproduction* 1 (3), S. 162–172.
- Tiralongo, J. (2013): Chapter 1: Introduction to sialic acid structure, occurrence, biosynthesis and function. In: Joe Tiralongo und Ivan Martinez-Duncker (Hg.): *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*: Bentham Science Publishers, S. 3–32.
- Tsutsui, T.; Stabenfeldt, G. H. (1993): Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47, S. 29–35.
- Ulm, C.; Saffarzadeh, M.; Mahavadi, P.; Muller, S.; Prem, G.; Saboor, F. et al. (2013): Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (19), S. 3695–3708.

- 
- Vawter, M. P. (2000): Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. In: *European journal of pharmacology* 405 (1-3), S. 385–395.
- Vianney, M. J. (1965): Vaginal cytodiagnosis of the estrous cycle of the mouse with fluorescence microscopy. In: *Fertility and sterility* 16, S. 401–414.
- Walsh, F. S.; Parekh, R. B.; Moore, S. E.; Dickson, G.; Barton, C. H.; Gower, H. J. *et al.* (1989): Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). In: *Development (Cambridge, England)* 105 (4), S. 803–811.
- Walter, P.; Blobel, G. (1981): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. In: *The Journal of cell biology* 91 (2 Pt 1), S. 557–561.
- Wang, Y.; Neumann, H. (2010): Alleviation of Neurotoxicity by Microglial Human Siglec-11. In: *Journal of Neuroscience* 30 (9), S. 3482–3488.
- Webb, R.; Garnsworthy, P. C.; Gong, J.-G.; Armstrong, D. G. (2004): Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. In: *Journal of animal science* 82 E-Suppl, E63-74.
- Weidemann, W.; Klukas, C.; Klein, A.; Simm, A.; Schreiber, F.; Horstkorte, R. (2010): Lessons from GNE-deficient embryonic stem cells: sialic acid biosynthesis is involved in proliferation and gene expression. In: *Glycobiology* 20 (1), S. 107–117.
- Weinhold, B.; Seidenfaden, R.; Röckle, I.; Mühlenhoff, M.; Schertzinger, F.; Conzelmann, S. *et al.* (2005): Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (52), S. 42971–42977.
- Wenzel, J. G.; Odend'hal, S. (1985): The mammalian rete ovarii: a literature review. In: *The Cornell veterinarian* 75 (3), S. 411–425.
- Werneburg, S.; Buettner, F. F. R.; Erben, L.; Mathews, M.; Neumann, H.; Mühlenhoff, M.; Hildebrandt, H. (2016): Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. In: *Glia* 64 (8), S. 1314–1330.
- Werneburg, S.; Buettner, F. F. R.; Mühlenhoff, M.; Hildebrandt, H. (2015): Polysialic acid modification of the synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 in human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte precursor cells. In: *Stem cell research* 14 (3), S. 339–346.
- West, D. C.; Rees, C. G.; Duchesne, L.; Patey, S. J.; Terry, C. J.; Turnbull, J. E. *et al.* (2005): Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (14), S. 13457–13464.
- Whitten, W. K. (1958): Modification of the oestrus cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. In: *Journal of Endocrinology* 17 (3), S. 307–313.

- 
- Wildt, D. E.; Chan, S. Y.; Seager, S. W.; Chakraborty, P. K. (1981): Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. In: *Biology of Reproduction* 25 (1), S. 15–28.
- Wildt, D. E.; Seager, S. W.; Chakraborty, P. K. (1980): Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. In: *Endocrinology* 107 (4), S. 1212–1217.
- Wilson, H. V. (1907): On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. In: *Journal of Experimental Zoology* 5 (2), S. 245–258.
- Wolff, M. (2012): Charakterisierung des non-neuronalen cholinergen Systems in der Tuba uterina. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. Institut für Zellbiologie und Anatomie. Online verfügbar unter urn:nbn:de:hebis:26-opus-87515.
- Wood, T. C.; Wildt, D. E. (1997): Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. In: *Reproduction* 110 (2), S. 355–360.
- Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, R. J.; Greenberg, M. E. (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5240), S. 1326–1331.
- Yabe, U.; Sato, C.; Matsuda, T.; Kitajima, K. (2003): Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13875–13880.
- Yang, P.; Major, D.; Rutishauser, U. (1994): Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (37), S. 23039–23044.
- Yeh, J.; Osathanondh, R. (1993): Expression of messenger ribonucleic acids encoding for basic fibroblast growth factor (FGF) and alternatively spliced FGF receptor in human fetal ovary and uterus. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77 (5), S. 1367–1371.
- Zapater, J. L.; Colley, K. J. (2012): Sequences prior to conserved catalytic motifs of polysialyltransferase ST8Sia IV are required for substrate recognition. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (9), S. 6441–6453.
- Zuber, C.; Lackie, P. M.; Catterall, W. A.; Roth, J. (1992): Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (14), S. 9965–9971.

---

## 12 Anhang

### 12.1 Verwendete Materialien, Laborgeräte und Software

**Tabelle 8: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze**

Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid - Rotiphorese Gel 30 (gebrauchsfertig)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin IgG-frei > 98 % (BSA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
alpha-MEM Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumchlorid 99 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Amonium persulfate for electrophoresis > 98 % (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Antibiotic Antimycotics Solution	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Borat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	New England Biolabs GmbH (Massachusetts, USA)
DAB (Diaminobenzidin- 3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dinatrium Dihydrat Trikomplex (EDTA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
dNTP's	New England Biolabs GmbH (Massachusetts, USA)
DPBS 1 ×	14190-094Gibco life technologies
Entwickler	AGFA (Mortsel, Belgien)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure 100 % Suprapur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol-Uvasol 98 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol, 96 %	Stockemeier Chemie (Bielefeld, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eukitt quick hardening mounting medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
FBS heat inactivated	Gibco life Technologies
Fixierer	AGFA (Mortsel, Belgien)
Formalin Rotipuran 37 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glucose 98 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

---

Glucose-Oxidase ( <i>Aspergillus niger</i> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin 99 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Häma-Schnellfärbung	Henry-Shine (Hamburg, Deutschland),
Kaliumchlorit	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat 99,5 %, Rotipuran	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Laemli-Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
M-280 tylosylactivated Dynabeads	14203-2ml invitrogen
Methanol Rotisolv HPLC-Gradient	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
2-mercaptoethanol > 98 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
mouse-on-mouse-blocking-solution (M.O.M.™)	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)
Natriumchlorit	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorit 99,5 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdeoxycholat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogencarbonat Monohydrat >98 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhypochlorit, 12 % NaClO	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge Suprapur 30 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nickelsulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Polyethylensorbitan Monolaurate (Tween20)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-Propanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Roti-Block; 10 × ready to use	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Clear	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Histol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure 30 % Suprapur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Taq Polymerase Puffer	New England Biolabs GmbH (Massachusetts, USA)
Temed 99 % Elektrophorese	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triethylamin	Merck (Darmstadt, Deutschland)

---

Tris Ultra Pufferan 99,9 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### **Tabelle 9: Verwendete Reaktionskits**

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
EnVision®-Kit (Immunohistochemie)	Dako (Glostrup, Dänemark)
iScript cDNA-Synthese-Kit	BioRad GmbH (Kalifornien, USA)
QiaShredder (RNA-Aufreinigung)	Quiagen (Hilden, Deutschland)
RNEasy (mRNA-Isolierung)	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Super Signal West dura extendat duration (Chemilumineszenz-Kit)	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)

### **Tabelle 10: Verwendete Geräte und Software**

Biology and Medicine PowerPoint Drawing Toolkits for Presentations	Motifolio
Blottingapparatur Trans Blot SD cell	BioRad GmbH (Kalifornien, USA)
Citavi 5.5	Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil, Schweiz)
Geldokumentationssystem, GeldDoc XR	BioRad GmbH (Kalifornien, USA)
Microsoft Excel, Word und Powerpoint 2007	Microsoft
Motic Mikroskop BA410	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Moticam Pro 252B	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM 2255	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
Streckbad, HI1210,	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Thermocycler, TProfessional	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Wärmeschrank Memmert B500	Memmert (Schwabach, Deutschland)

---

**Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Bryopetten	Bioanalytic (Freiburg, Deutschland)
DNA-Pac™ PA100 HPLC-Säule	Dionex (Kalifornien, USA)
Einmalspritzen	Dispomed (Gelnhausen, Deutschland)
High performance chemiluminescence film Amersham Hyperfilm ECL 18 x 24 cm	GE Healthcare (Chalfont, Großbritannien)
Mini Protean 3-System Spacer Plates und Short plates	BioRad GmbH (Kalifornien, USA)
Petrischalen verschiedener Größen	Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen verschiedener Größen	Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Polypropylenröhrchen	Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Polypropylenröhrchen	Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße verschiedener Größen	Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Superfrost OT	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Wartham Filterpapier	BioRad GmbH (Kalifornien, USA)
<i>x-well</i> ZellkulturOT	Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)

---

### 13 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

#### Publikation im Zusammenhang mit dieser Dissertation:

**Kaese, Miriam**; Galuska, Christina E.; Simon, Peter; Braun, Beate C.; Cabrera-Fuentes, Hector A.; Middendorff, Ralf *et al.* (2015):

Polysialylation takes place in granulosa cells during apoptotic processes of atretic tertiary follicles. In: *The FEBS journal* 282 (23), S. 4595–4606.

Preis für herausragende Publikationsleistungen des Biochemischen Instituts der JLU-Gießen (2. Platz)

---

## Posterpräsentationen

**Miriam Kaese**, Beate Braun, Rita Gerardy-Schahn, Martina Mühlenhoff, Axel Wehrend, Katarina Jewgenow, Sebastian P. Galuska

*“Characterization of the polysialylation status of the neuronal cell adhesion molecule NCAM during folliculogenesis of felis catus”*

- 47. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 39. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Conference: 47th Annual Conference for Physiology and Pathology of Reproduction, Reproduction in Domestic Animals, Volume: 49  
27.02. - 28.02.2014 in Gießen, Deutschland
- 24nd Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences  
24.11. - 26.11.2013 in Wittenberg, Deutschland
- Molecular Life Sciences 2013, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM)  
03.10.-06.10.2013 in Frankfurt am Main, Deutschland

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, 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.“

---

Miriam Kaese

---

## Danksagung

**„Entschuldigen Sie, dass ich Ihnen einen so langen Brief schreibe. Ich hatte keine Zeit für einen Kürzeren.“** (*Johann Wolfgang von Goethe*)

**Danke:** Wortherkunft [mittelhochdeutsch danken; althochdeutsch danchōn; Kurzform von „ich danke“]; Synonyme [Anerkennung, Dankeswort, Dankgefühl, Erkenntlichkeit Verbundenheit (...)] – In diesem Sinne...

...gilt ein ganz besonderer Dank meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Axel Wehrend und PD Dr. Sebastian Galuska für die geduldige Unterstützung, gute Beratung und die wissenschaftliche Anleitung sowie zuverlässige Betreuung meiner Dissertation und die initiale Bereitstellung meines Themas.

Danke – an Prof. Dr. Katharina Jewgenow und Dr. Beate Braun des Leibniz Instituts für Zoo- und Wildtierforschung Berlin für die Unterstützung bei der Entwicklung der *in vivo*-Versuche und die konstruktive Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung.

Danke – an meine Eltern für das gute Zureden zu meinem Entschluss, die Dissertation zu beginnen – und besonders an meinen Papa, der mit viel Geduld die ersten Erklärungen im Labor und an diversen technischen Geräten übernommen hat.

Danke - an Werner Mink – das Urgestein! Ohne ihn, seine Besonnenheit beim Berechnen verschiedenster Konzentrationen, beim Auflösen von Gehirnknoten und dem unermüdlichen Erklären chemischer und technischer Zusammenhänge, wären Ergebnisse wohl kaum denkbar gewesen. Danke auch an Sigggi, für die Unterstützung beim MALD-TOF. Und natürlich Christina für die kleinen Pausen im Laboraltag, ihre liebe und offene Art, die gemeinsamen Bastelstunden und die uneingeschränkte Hilfe bei der HPLC!

Danke an meine Probenlieferanten – Silke Wiegand aus der Anatomie, Jana vom ECCPS, Theresa Conze aus der KGGA der JLU Gießen, Bärbel Fühler aus der Biochemie und die Tierarztpraxis Dr. Ahrem in Buseck. Ohne diesen fleißigen Helfer und die gute Zusammenarbeit hätten alle Versuche nur theoretisch stattfinden können. Danke auch an Uwe, Hector und an Gorgett für Tipps und Tricks bei der Zellkultur und Immunfluoreszenz!

---

Danke – und zwar ein GANZ großes - an Gesche und Hannah für das fleißige Gegenlesen und Nachschlagen unbekannter Wörter und das Finden (fast) aller noch so kleiner Fehler ;)!

Danke – an Anika, Nadia, Carmen, Dominik und natürlich nicht zu vergessen an den guten Rüdiger! Eure aufbauenden Worte, manch neuer Denkanstoß und die gemeinsamen Stunden in den Mittagspausen hat die Laborzeit versüßt! Was hätte ich nur ohne euch gemacht?!

Danke – an den kleinen Peter und an Nils – für alle konstruktiven Diskussionen und Verbesserungsvorschläge, für alles mentale Unterstützen und einige lustige Stunden!

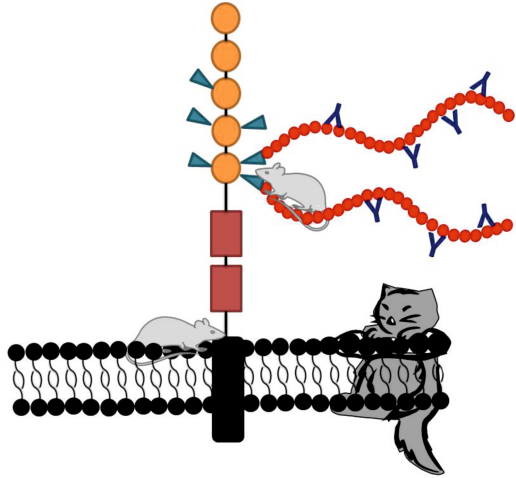
Danke - an Linda. Du hast mit mir Wagenningen und Amsterdam durchgestanden, wir haben zusammen vor unserem ersten Poster gezittert, Laborchaos beseitigt, abenteuerliche Berechnungen angestellt und den Rest auch irgendwie geschafft. Es war immer schön mit dir zusammen zu arbeiten, zu lachen und zwischendrin ein Kännchen zu genießen.

Danke – an die guten Feen der Anatomie – Sabine und Ines. Ich war immer gerne bei euch und habe die Aussicht genossen ;).

Danke – an die Besten der Besten: Karo, Katha, Burki, Otto, Jana und Cari! Seien es nächtliche Spaziergängen, lange Telefonate, Lesen von Texten – immer wart ihr da. Immer mit viel Verständnis und mit mindestens einem Sack voll Unterstützung! Auch Britta Schielke und dem Team der Tierarztpraxis Kilb & Thiem gebührt an dieser Stelle ein Wort des Dankes ;) für das Unterstützen und das Verständnis während der etwas länger dauernden Schlussphase des Schreibens ;).

Danke – an Tim – du musstest viele Schreibstunden ertragen und mit mir immer wieder große und kleine Ziele abstecken. Du hast mich immer unterstützt, an mich geglaubt, mich wieder aufgebaut und ermutigt nicht aufzugeben, wenn ich nicht weiter wusste. Danke für jeden neuen Impuls und das unermüdliche Anspornen!

Euch allen ist meine Dissertation gewidmet – wenn nur einer gefehlt hätte, wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin, wäre niemals so weit gekommen und hätte viel früher aufgegeben! Danke für euren Glauben an mich und eure bestärkenden Worte und euer mit mir geteiltes Wissen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6678-9



9 783835 196678 9