Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-mRNA in Oozyten unterschiedlicher Follikelgröße des Marmoset Affen

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

vorgelegt von Stefan Kuhnert
aus Schramberg

Gießen, 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Ausbildungszentrum der Eurpäischen Akademie für Andrologie

Kommissarischer Leiter:Prof. Dr. P. Mayser
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Hinsch

Gutachter: Prof. Dr. Meinhardt

Tag der Disputation: 31.08.2007

meinen Eltern

Abkürzungen

AS	Antiserum
AT	Annealing-Temperatur
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	copy/complementary DNA
CP	Crossing Point
DAB	3,3´-Diaminobenzidin
EZ	Oozyte
FZ	Follikelzelle
gDNA	genomische DNA
HGAPDH	Humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HT	Hybridisierungstemperatur
ISH	*in situ* Hybridisierung
mRNA	messenger RNA
NTC	No Template Control (Negativkontrolle)
RT-Reaktion	Reverse-Transkriptase-Reaktion *(=Reverse Transkription)*
PBS	Phosphat-buffered-saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
TBS	Tris-buffered-saline
Tm	Schmelztemperatur
TZ	Thekazelle
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
ZP	Zona Pellucida
ZPA	Zona Pellucida A-Protein
ZPB	Zona Pellucida B-Protein
ZPC	Zona Pellucida C-Protein

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 10

1.1 Grundlagen der Befruchtung 10

1.2 Die Oozyte 11

Morphologie und Genese 11

1.3 Zona Pellucida (ZP) 13

1.3.1 Zona Pellucida B-Protein (ZPB) 15

1.3.2 Zona Pellucida A-Protein (ZPA) 15

1.3.3 Zona Pellucida C-Protein (ZPC) 17

1.3.4 Synthese der Zona Pellucida-Proteine 18

1.4 Das Tiermodell 19

1.5 Ziele der Arbeit 21

2 Materialien und Methoden 22

2.1 Materialien 22

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 22

2.1.2 Medien und Lösungen 27

2.1.3 Verwendete Kits 29

2.1.4 Geräte 32

2.1.5 Versuchstiere 35

2.2 Methoden 35

2.2.1 *In situ* Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB-, und ZPC-Transkripten im Marmoset Ovar 35

2.2.1.1 Herstellung der Paraffinschnitte 35

2.2.1.2 Herstellung der Ribosonden zum Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten 36

2.2.1.2.1 Herstellung der Ribosonden ZPB-T3T7, qCZPA und ZPB-SP6T7 36

2.2.1.2.2 Herstellung der Sonden ZPA-F1R1 und ZPC-R2F2 37

2.2.1.3 Durchführung der *in situ* Hybridisierung 38

2.2.2 Gewinnung von Marmoset Oozyten und Follikelzellen 40

2.2.3 Genexpression der Zona Pellucida Glykoproteine in Marmoset Oozyten und Follikelzellen 41

2.2.3.1 Isolierung von mRNA und totalRNA aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen 41

2.2.3.2 mRNA-Extraktion aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen 41

2.2.3.3 totalRNA-Extraktion aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen 42

2.2.3.4 Reverse Transkriptasereaktion (RT-Reaktion) 42

2.2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) 42
2.2.3.5.1 Oligonukleotid-Primer 43
2.2.3.5.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 43
2.2.3.5.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte 44
2.2.3.5.4 Sequenzierung der PCR-Produkte 44
2.2.4 Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten und Follikelzellen mittels RT-PCR 45
2.2.5 Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR 45
2.2.5.1 Schmelzkurvenanalyse der entstandenen PCR-Produkte 47
2.2.5.2 Absolute Quantifizierung von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR 47
2.2.5.3 Relative Quantifizierung von ZPA-, ZPB-, und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten 49
2.2.5.4 Verwendete Kontrollen und Identifizierung der PCR-Produkte 50
2.2.5.5 Statistische Auswertung der relativen Quantifizierung 50
2.2.5.6 Ermittlung der PCR-Effizienzen für die real-time PCR 50
2.2.6 Qualitativer Nachweis von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten in einzelnen Marmoset Oozyten 51

3 Ergebnisse 52

3.1 *In situ* Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten im Marmoset Ovar 52
3.1.1 Verwendete Ribosonden zur Lokalisation von ZPB-Transkripten 52
3.1.2 Verwendete Ribosonden zur Lokalisation von ZPA-Transkripten 55
3.1.3 Verwendete Ribosonde zur Lokalisation von ZPC-Transkripten 58

3.2 Gewinnung von Marmoset Oozyten und Follikelzellen 60

3.3 Isolierung von mRNA und totalRNA aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen 60

3.4 Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten und Follikelzellen mittels RT-PCR 60
3.4.1 Nachweis in Follikelzellen 60
3.4.2 Nachweis in Oozyten 64

3.5 Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR 65
3.5.1 Identifizierung der PCR-Produkte 67
3.5.1.1 Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte 68

3.5.1.2 Gelelektrophorese der PCR-Produkte 70
3.5.1.3 Sequenzierung der PCR-Produkte 71
3.5.2 Absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte mithilfe externer Standards 73
Absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte mit RNA-Standards 77
3.5.3 Relative Quantifizierung der ZP-Transkripte 77
3.5.3.1 Darstellung der Crossing Points der real-time PCR 77
3.5.3.2 Relative Quantifizierung der ZP-Transkripte mit REST-XL 78
3.5.4 Ermittlung der PCR-Effizienzen 81

3.6 Qualitativer Nachweis von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten in einzelnen Marmoset Oozyten 83

4 Diskussion 88

4.1 Lokalisation der Expression der ZP-Glykoproteine im Marmoset Ovar 89
In situ Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB- und ZPC- Transkripten ... 89
Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten und Follikelzellen mittels RT-PCR 91

4.2 Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR 95
Absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte 95
Relative Quantifizierung der ZP-Transkripte 97
Effizienzen bei der Quantifizierung mittels real-time PCR 100

4.3 Qualitativer Nachweis von ZPA-, ZPB- ZPC- und GAPDH-Transkripten in einzelnen Marmoset Oozyten 101

5 Zusammenfassung 104

6 Summary 105

7 Literaturverzeichnis 107

8 Anhang 117

8.1 Tabellarischer Lebenslauf 117

8.2 Danksagung 118

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Befruchtung

Das Verschmelzen der männlichen und weiblichen Keimzellen mit ihren haploiden Chromosomensätzen bezeichnet man als Fertilisation. Ab der ersten Bindung des Spermatozoons an die Eizelle findet dabei eine komplex geregelte Interaktion beider Zellen statt (Wassarman, 1995). Durch den ersten Kontakt zwischen Samenzelle und der die Eizelle umgebenden Zona Pellucida (ZP), die es im folgenden zu durchdringen gilt, wird bei der Samenzelle durch transmembranäre Signalkaskaden die akrosomale Reaktion ausgelöst (Saling *et al.*, 1979). Nach Verschmelzung der äußeren, akrosomalen Membran mit der Plasmamembran des Spermatozoons werden proteolytische Enzyme freigesetzt, die das Durchdringen der ZP unterstützen (Tulsiani *et al.*, 1998; Zaneveld *et al.*, 1991).

Im Anschluss an die Penetration der ZP fusioniert die Samenzelle mit dem Oolemm und die Eizelle wird aktiviert. Es wird angenommen, dass die Membranverschmelzung der inneren akrosomalen Membran des Spermatozoons mit dem Oolemm durch Rezeptoren vermittelt wird. Auf Seiten der Eizelle spielen dabei Integrine eine entscheidende Rolle. Sie erkennen transmembranäre Proteine der ADAM-Familie (*A D*isintegrin *A*nd *M*etalloprotease *D*omain), wie das Heterodimer Fertilin (Blobel *et al.*, 1992) auf der Oberfläche des Spermatozoons als ihre Liganden (Myles und Primakoff, 1997).

Nach der Verschmelzung der Membranen von Eizelle und Samenzelle kommt es zu einer Vielzahl von biochemischen Reaktionen, die das Eindringen eines weiteren Spermatozoons unmöglich machen. Durch bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen findet eine Veränderung des Oolemms („Plasmamembranblock“) statt, so dass keine weitere Spermatozoenbindung mehr stattfinden kann (Horvath *et al.*, 1993; Sengoku *et al.*, 1995). Zusätzlich kommt es zur Degranulation der kortikalen Granula. Die dabei ausgeschütteten Enzyme bewirken eine chemische Modifikation der ZP, es kommt zum so genannten „Zona hardening“ (Barros und Yanagimachi, 1971). Die kortikale Degranulation gehört zum komplexen Prozess der Aktivierung der Eizelle. Im weiteren Verlauf vollendet die Eizelle die Meiose und der weibliche Vorkern wird gebildet. Beide Vorkerne der fusionierten Gameten beginnen mit der DNA-Synthese (Yanagimachi, 1994). Mit der Verschmelzung der beiden Vorkerne entsteht am Endpunkt der Fertilisation die mit diploidem Chromosomensatz ausgestattete Zygote.

1.2 Die Oozyte

Morphologie und Genese

Die weibliche Keimzelle, die Oozyte, stellt sich als sphärische, zytoplasmareiche Zelle dar (Abb. 1). Die Größe der Oozyte zum Zeitpunkt der Ovulation beträgt beim Menschen 100-120µm (Junqueira und Carneiro, 1996). Sie variiert bei verschiedenen Säugetierarten. Zum Beispiel beträgt der Durchmesser der Oozyte des Weißbüschelaffen, *Callithrix jacchus*, ca. 90-100µm (Gilchrist, 1996), während die Oozyte beim Rind etwa einen Durchmesser von 120-150µm (Kanitz , 1994) und die der Maus von etwa 80µm aufweist (Eppig, 1991). Neben Zellkern und zahlreichen Zellorganellen sind im Ooplasma auch die kortikalen Granula lokalisiert. Diese enthalten verschiedene Enzyme, die nach erfolgreicher Fusion von Spermatozoon und Plasmamembran der Eizelle freigesetzt werden und die zur Verhärtung der ZP führen (Barros und Yanagimachi, 1971).

Umgeben wird die Oozyte von der Zona Pellucida (ZP), einer extrazellulären Matrix, die wesentlich an der Befruchtung von Samenzelle und Oozyte beteiligt ist. Zudem konnten Kim *et al.* (2002) zeigen, dass bei der Maus, durch den Einsatz spezifischer Antikörper gegen ZP-Proteine, der Transport in den Tuben deutlich gestört war. Womit der ZP auch eine Bedeutung beim Embyonentransfer durch den Eileiter zukommt.

Durch Einwanderung der Urkeimzellen in die Gonadenanlagen und anschließender Differenzierung über die Primordialkeimzellen entwickeln sich die Oogonien. Diese vermehren sich mitotisch. Ab dem Eintritt in die Prophase, der ersten meiotischen Reifeteilung, werden sie als primäre Oozyte, die im weiteren Verlauf von Follikelzellen umgeben wird, bezeichnet. Es folgt eine Arretierung der Oozyte in der ersten Prophase. In dieser meiotischen Pause finden hohe Syntheseleistungen statt, aus denen eine Volumenzunahme der Oozyte um das 200 fache resultiert (Moor *et al.*, 1990).

Die Follikelzellen, die als innerste Schicht die Oozyte direkt umgeben, bilden Fortsätze und an der Oberfläche der Oozyte entwickeln sich Mikrovilli, dazwischen ist die ZP lokalisiert. Es werden in der Literatur unterschiedliche Syntheseorte für die ZP bei den verschiedenen Spezies angegeben (El Mestrah *et al.*, 2002; Epifano *et al.*, 1995; Lee und Dunbar, 1993). Durch Zunahme der Anzahl der Follikelzellschichten um die Oozyte entwickeln sich aus Primordialfollikeln letztlich Tertiärfollikel. Bis zur Ovulation hat die primäre Oozyte die erste Reifeteilung beendet. Dadurch entstehen die sekundäre Oozyte und das Polkörperchen. Die

sekundäre Oozyte beginnt zum Zeitpunkt der Ovulation mit der zweiten Reifeteilung. Allerdings verharrt die Meiose in der Metaphase erneut und wird erst nach Fusionierung von Spermatozoon und Eizelle beendet (Moore, 1996). Während der Entwicklung nimmt der totalRNA Gehalt einer Oozyte der Maus um etwa 300% zu (Sternlicht und Schultz, 1981). Voll ausgereifte menschliche Oozyten enthalten etwa 100pg poly(A) + mRNA (Neilson *et al.*, 2000). Während der frühen und mittleren Phasen des Wachstums, in der meiotischen Pause der Oozyte, herrscht eine hohe RNA- und Proteinsynthese vor. In der letzten Phase, um den Zeitpunkt der Ovulation, werden beide reduziert. Die totalRNA-Synthese kommt zum Erliegen wenn die Oozyten den „Germinal Vesicle Breakdown" durchlaufen.

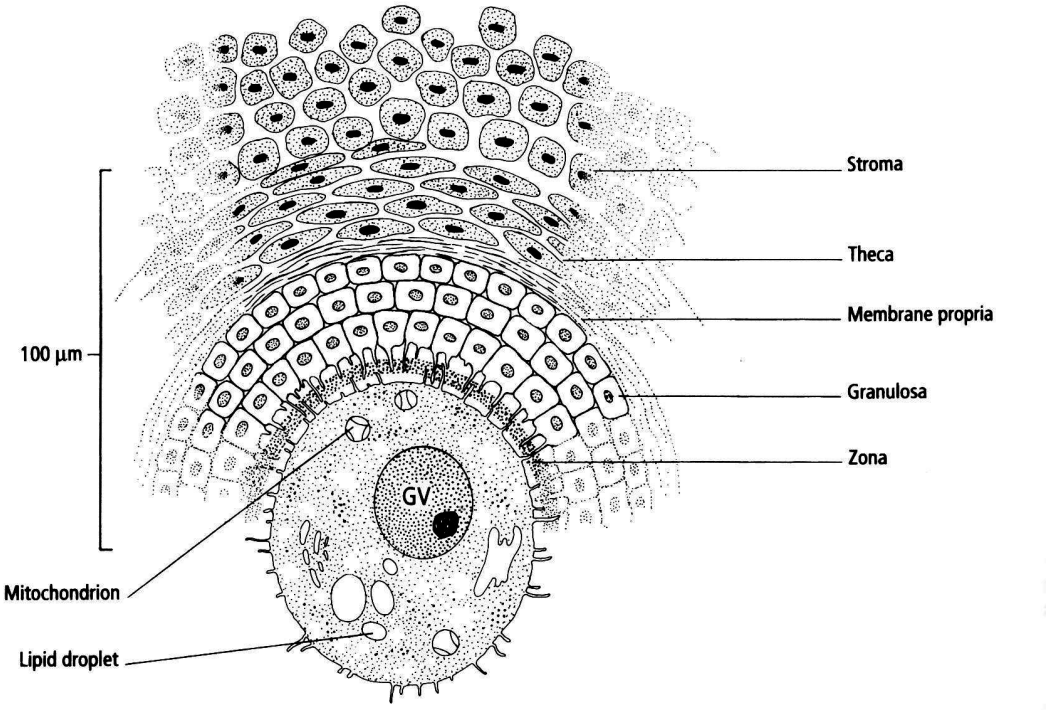


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Oozyte mit angrenzenden Follikelstrukturen (Sekundärfollikel). Aus Johnson und Barry „Essential Reproduction" (1995).

1.3 Zona Pellucida (ZP)

Die ZP umgibt als eine klar durchscheinende, azelluläre Glykoprotein-Hülle vollständig die Oozyte (Yanagimachi, 1994). In licht- und elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass die ZP einen multilamillären Aufbau besitzt (Dunbar *et al.*, 1994). Schon 1975 wurde durch Baranska *et al.* an unbefruchteten Oozyten der Maus eine Zweischichtung der ZP demonstriert. Demnach bestand die Extrazellularmatrix aus einer dickeren inneren und einer dichteren äußeren Schicht. Ein zweischichtiger Aufbau wurde auch beim Hamster festgestellt (Keefe *et al.*, 1997). Beim Menschen erscheint die ZP als mehrschichtige, poröse Matrix, deren Porengröße dabei nach Außen hin zunimmt (Nikas *et al.*, 1994). Nach der Befruchtung der Eizelle konnte anhand von Untersuchungen der bovinen ZP gezeigt werden, dass die ZP dünner wird und die poröse Struktur verschwindet (Suzuki *et al.*, 1994). Es handelt sich also um eine komplex organisierte extrazelluläre Matrix, deren Aufbau und Dicke speziesspezifische Unterschiede aufweist. Während man bei der Maus von einer Zonastärke von ca. 5µm ausgeht, sind es beim Schwein 16µm und beim Rind sogar 27µm (Dunbar, 1983; Dunbar *et al.*, 1991). Im Vergleich dazu ist die ZP des Menschen ungefähr 13-15µm dick (De Vos und Van Steirteghem, 2000) und die des Weißbüschelaffen als ein Vertreter nicht-menschlicher Primaten, ca. 16µm zum Zeitpunkt der Ovulation (Gilchrist, 1996).

Die ZP besteht je nach Spezies aus drei bis fünf Glykoproteinen. Durch posttranslationale Prozessierung, wie Sulfatierung oder Glykosilierung, entsteht eine gewisse Heterogenität zwischen den Spezies (Wassarman, 1988). Die Nomenklatur der ZP-Glykoproteine ist missverständlich. 1980 wurden bei der Maus, als erste und bestuntersuchteste Spezies, die einzelnen Proteine mittels Gelelektrophorese isoliert und nach absteigendem Molekulargewicht als ZP1 (200kDa), ZP2 (120kDa) und ZP3 (83kDa) bezeichnet (Bleil und Wassarman, 1980). Für nachfolgend untersuchte Spezies wurde dieses System nicht konsequent übernommen. Eine einheitliche, Spezies übergreifende Nomenklatur wurde durch die Identifizierung der kodierenden Gene für die Glykoproteine möglich (Harris *et al.*, 1994). Die Einstufung wurde nach Anzahl der Basenpaare vorgenommen. Die Sequenz des murinen ZP2 ist jedoch länger als die des ZP1, so dass die heutige Nomenklatur ZP2 mit ZPA, ZP1 mit ZPB und ZP3 mit ZPC gleichsetzt. Phylogenetische Studien legen die Vermutung nahe, dass sich innerhalb der ZPB-Familie drei verschiedene Gruppen entwickelten, ZPB, ZPB1 und ZPB2 (Spargo und Hope, 2003). Die beiden letzteren sind paralog (auf Genverdopplung zurückzuführen) zueinander und zusammen ortholog (Gene verschiedener Spezies die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind) zu ZPB. ZP1 und ZPB sollten daher nicht grundsätzlich parallel

verwendet werden. Die kodierenden Gene sind auch für den Weißbüschelaffen, *Callithrix jacchus,* bekannt (EMBL-Datenbank Accession Nr. Y10822, Y10767, S71825). Die Sequenzen in der Datenbank sind nach der alten Nomenklatur benannt, im Folgenden wird für ZP1 die Bezeichnung ZPB, für ZP2 wird ZPA und für ZP3 wird ZPC verwendet. Nach Spargo und Hope (2003) gehört das ZPB des Marmoset in die Gruppe ZPB2. Zur vereinfachten Darstellung wird in dieser Arbeit die Bezeichnung ZPB verwendet. Neuere Daten sprechen beim Menschen für das Bestehen eines vierten ZP kodierenden Genabschnitts. Das Vorliegen von ZP1 und dazu paralog ZPB, ZP2 und ZP3 konnte auf Ebene der RNA-Expression und mit Einschränkungen, der Proteinsynthese nachgewiesen werden. (Lefievre *et al.*, 2004). Bei den Altweltaffen wurden bei zwei Familien bislang ebenfalls drei ZP-Proteine identifiziert. Zum einen beim indischen Hutaffen, Bonnet monkey / *Macaca radiata*, zum anderen beim Langschwanzmakak, Cynomolgus monkey / *Macaca fascicularis* (Gupta *et al.*, 1997; Jethanandani *et al.*, 1998; Kolluri *et al.*, 1995). Für Maus, Mensch und Schwein konnte bei jeder der drei Proteinfamilien gezeigt werden, dass zu 50-98% Homologien auf der Ebene der Nukleinsäuren bestehen (Epifano und Dean, 1994; McLeskey *et al.*, 1998).

Als Grundlage für den möglichen strukturellen Aufbau der Zona Pellucida diente das Maus-Modell. Es wird angenommen, dass sich wiederholende Dimere aus ZPA (ZP2)- und ZPC (ZP3)-Protein-Filamente bilden, die ihrerseits durch homodimere ZPB (ZP1)-Moleküle miteinander verknüpft sind (Green, 1997; Wassarman und Mortillo, 1991). Abb. 2 stellt den schematischen Aufbau der ZP unter Beteiligung eines vierten ZP-Glykoproteins (ZP4) dar.

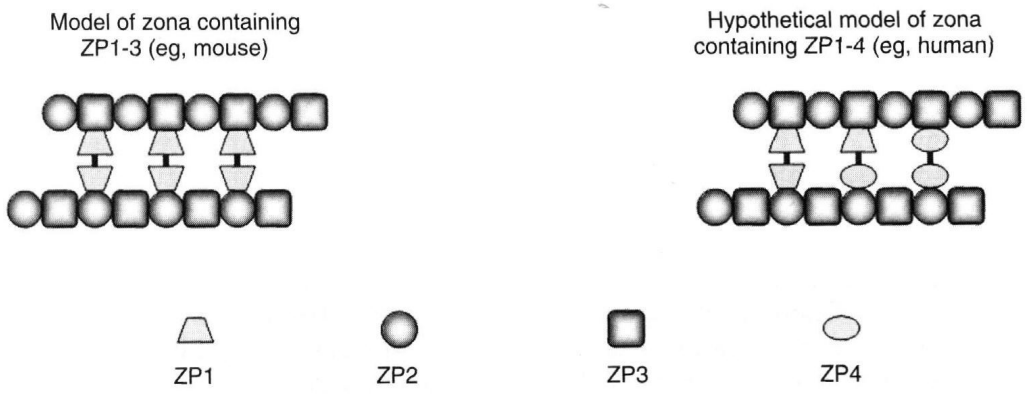


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zona Pellucida. Aus Knobil and Neill „Physiology of Reproduction 4th Edition“.

1.3.1 Zona Pellucida B-Protein (ZPB)

Bleil und Wassarman (1980) bestimmten die Molekularmasse eines Monomers des ZPB-Proteins der Maus mit 130kDa. Das ZPB-Monomer der humanen ZP besitzt unter reduzierenden Bedingungen eine Molekularmasse von 90-110kDa (Shabanowitz und O'Rand, 1988). Das murine ZPB-Protein besteht aus 623 Aminosäuren (Epifano *et al.*, 1995). Bei verschiedenen Primaten liegt eine Proteingröße im Bereich von ca. 540 Aminosäuren vor. Beim Menschen sind es 540 Aminosäuren, beim Marmoset Affen 541 Aminosäuren und beim indischen Hutaffen liegt die Proteingröße bei 539 Aminosäuren (Gupta *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1994; Kerr *et al.*, 1996). Die Aminosäuresequenz des humanen ZPB-Proteins zeigt eine hohe Homologie zu den beiden genannten Affenarten. Für den Marmoset Affen beträgt die Übereinstimmung 88% und für den indischen Hutaffen, *Macaca radiata*, 92%.
Das ZPB-Protein liegt innerhalb der ZP als ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer vor. Greve und Wassarman (1985) untersuchten das ZPB-Protein hinsichtlich einer stabilisierenden Funktion für die ZP. Untersuchungen von Rankin *et al.* (1999) haben gezeigt, dass die murine ZP auch ohne ZPB-Protein als Bestandteil nur durch ZPA und ZPC gebildet werden kann. Allerdings wies die so gebildete ZP starke morphologische Unterschiede auf. Die ZP war dünner und zeigte eine größere Fenestrierung. Zudem kam es teilweise zu einer atypischen Depositon von Granulosazellen zwischen Oolemm und ZP. Dagegen scheint ZPB-Protein in anderen Spezies auch funktionelle Bedeutung während der Spermatozoen-Eizell-Interaktion zu haben. Beim Schwein konnte gezeigt werden, dass ZPB-Protein die Funktion eines Spermatozoenrezeptors besitzt. Auch bei Primaten, wie dem indischen Hutaffen, wurde die Bindung von rekombinantem ZPB sowohl an kapazitierte als auch an akrosom-reagierte Spermatozoen nachgewiesen (Gahlay *et al.*, 2002; Govind *et al.*, 2001).

1.3.2 Zona Pellucida A-Protein (ZPA)

Die cDNA-Sequenzen des ZPA-Gens von Maus und Mensch sind bekannt (Liang *et al.*, 1990; Liang und Dean, 1993), ebenso die verschiedener anderer Spezies (Harris *et al.*, 1994). Für den indischen Hutaffen, wurde aus der cDNA-Sequenz (Jethanandani *et al.*, 1998) des ZPA-Gens die daraus resultierende Proteingröße von 745 Aminosäuren ermittelt. Diese weist eine Homologie von 94% mit der humanen Sequenz (Liang und Dean, 1993) von ebenfalls 745 Aminosäuren auf. Innerhalb der nicht-humanen Primaten wurde die ZPA-Nukleotidsequenz

auch beim Marmoset Affen, *Callithrix jacchus*, identifiziert (EMBL-Datenbank Accession Nr. Y10767). Daraus leitet sich eine Proteingröße von 747 Aminosäuren ab (EMBL-Datenbank Accession Nr. CAA71740).

Durch Untersuchungen an ZPA-Protein Knockout-Mäusen konnten Rankin *et al.* (2001) zeigen, dass durch das Fehlen des ZPA-Proteins eine sehr dünne, abnorme ZP in präantralen Follikeln gebildet wurde. Auch wenn diese Veränderungen in antralen Follikeln nicht mehr nachweisbar waren, kam es nach der Paarung weiblicher ZPA-Knockout-Mäuse zu keiner Entwicklung von Embryonen im Zweizellstadium. Funktionell bezeichnet man das ZPA-Protein als „sekundären Spermatozoenrezeptor" (Bleil *et al.*, 1988).

Mortillo und Wassarman (1991) konnten die Bindung von ZPA an die innere Membran akrosomreagierter Spermatozoen zeigen. Dies wurde durch den Einsatz von rekombinantem ZPA-Protein auch beim Menschen bestätigt (Tsubamoto *et al.*, 1999). Als ein möglicher Ligand des ZPA-Proteins wird auf Spermatozoenseite die Trypsin-ähnliche Protease Akrosin/Proakrosin angesehen (Howes *et al.*, 2001; Howes und Jones, 2002), deren Konversion von Proakrosin zu Akrosin durch den Kontakt von Spermatozoon und ZP ausgelöst wird (Topfer-Petersen und Cechova, 1990). Nachdem gezeigt werden konnte, dass Spermatozoen aus genetisch veränderten Mäusen mit gezielten Mutationen im Akrosin-kodierend Gen murine Oozyten penetrieren und befruchten können, wird allerdings die Existenz weiterer Liganden für ZPA-Protein diskutiert (Adham *et al.*, 1997; Baba *et al.*, 1994). So wurde beim Langschwanzmakak, *Macaca fascicularis*, das Protein PH-20 identifiziert. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen PH-20 konnte gezeigt werden, dass dieses für die sekundäre Spermatozoenbindung mitverantwortlich zu sein scheint (Yudin *et al.*, 1999). PH-20 ist ein Testis-spezifisches Protein, das sowohl in der Plasmamembran als auch nach erfolgter Akrosomreaktion in der inneren akrosomalen Membran lokalisiert wurde (Myles und Primakoff, 1984; Overstreet *et al.*, 1995). Eine weitere wichtige Funktion des ZPA-Proteins ist die Beteiligung am so genannten „Zona Hardening". Im Maus-Modell wird nach dem Eindringen eines Spermatozoons unter anderem die kortikale Degranulation mit Freisetzung verschiedenster Enzyme ausgelöst. Durch die Freisetzung von Proteasen wird ZPA-Protein dabei in das biochemisch modifizierte ZPA_f überführt, welches im Gegensatz zum ursprünglichen ZPA-Protein, mit einer Molekularmasse von 120kDa, nur noch eine Proteingröße von 90kDa aufweist (Bleil *et al.*, 1981; Moller und Wassarman, 1989). Sind mehr als 16% aller ZPA-Moleküle proteolytisch verändert, verhärtet sich die ZP und wird durch dieses „Hardening" undurchdringbar für weitere Spermatozoen. Es kommt zum Polyspermieblock (Sato, 1979).

1.3.3 Zona Pellucida C-Protein (ZPC)

Die cDNA-Sequenz des ZPC-Protein kodierenden Gens vieler Spezies ist bekannt. Die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen weisen eine Homologie von 63-84% auf (Harris *et al.*, 1994). Der direkte Vergleich des ZPC-Proteins zwischen Mensch, Maus, indischem Hutaffen und Marmoset Affen ergab für alle genannten Spezies eine Proteingröße von 424 Aminosäuren. Die Homologie zur humanen Sequenz beträgt bei der Maus 67% (Chamberlin und Dean, 1990), beim indischen Hutaffen 94% (Kolluri *et al.*, 1995) und beim Marmoset Affen 91% (Thillai-Koothan *et al.*, 1993). Die Funktion des ZPC-Proteins während der Befruchtung entspricht der des „primärer Spermatozoenrezeptor“ (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994). Nach der Inkubation von murinen Spermatozoen mit isolierten ZPC-Proteinen wurden diese an einer anschließenden ZP-Bindung gehindert (Bleil und Wassarman, 1980). Allerdings gibt es auch hier Hinweise, dass ZPC nicht alleine für die primäre Spermatozoenbindung verantwortlich zu sein scheint (Rankin *et al.*, 1998). Wurde nämlich bei der Maus murines ZPC-Protein durch humanes ZPC-Protein ersetzt, banden weiterhin ausschließlich murine Spermatozoen an die ZP der Maus-Oozyten. Bei genetisch mutierten Mäusen, die kein ZPC-Protein bilden, war keine ZP um die Oozyte nachweisbar. Diese Tiere waren unfruchtbar (Rankin *et al.*, 1996). Nach der Blockierung mit Antikörpern gegen die Polypeptidkette von ZPC-Protein zeigte sich, dass die Spermatozoenbindungsfähigkeit nicht beeinflussbar war (Florman *et al.*, 1984; Florman und Wassarman, 1985). Diese Tatsache stützt die Vermutung, dass die Bindungsaktivität von ZPC über O-gebundene, Serin/Threonin-ähnliche Oligosaccharide vermittelt wird (Litscher *et al.*, 1995; Wassarman, 1992). Je nach Spezies werden auf der Seite der Spermatozoen unterschiedliche Liganden für den ZPC-Rezeptor diskutiert. Bei der Maus kommen dabei zum Beispiel Galaktosyltransferase oder sp56 in Frage. Beim Menschen Mannose-bindendes Lectin und eine Gruppe von Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 12-16kDa, die Spermadhesine, die bei verschiedenen Spezies gefunden wurden (Sinowatz *et al.*, 1998).

Nach der Bindung des Spermatozoons an den primären Rezeptor induziert dieser auch die akrosomale Reaktion über eine zweite, räumlich getrennte Bindungstelle (Bleil und Wassarman, 1983; Kopf und Gerton, 1991; Saling, 1989). Für die Signaltransduktion auf der Seite der Spermatozoen wird ein 95kDa schweres Protein mit Tyrosinkinase-Aktivität, das die akrosomale Reaktion triggert und als Zona-Rezeptor-Kinase bezeichnet wird, diskutiert (Burks *et al.*, 1995; Duncan und Fraser, 1993; Leyton und Saling, 1989; Saling *et al.*, 1995). Bisher wurde davon ausgegangen, dass zur Auslösung der akrosomalen Reaktion intakte

Polypeptidketten des ZPC-Moleküls voraussetzend sind (Florman *et al.*, 1984). Dabei waren proteolytisch hergestellte ZPC-Fragmente nach ihrer Bindung an die Spermatozoenplasmamembran erst dann in der Lage die akrosomale Reaktion auszulösen, wenn sie wieder miteinander verknüpft wurden. Nach neueren Untersuchungen ist es auch möglich, die Akrosomreaktion mit einem synthetischen Decapeptid der ZPC-Proteindomäne zu induzieren (Hinsch *et al.*, 2005).

1.3.4 Synthese der Zona Pellucida-Proteine

Viele Untersuchungen beschäftigten sich bereits mit der Identifizierung des Syntheseortes der ZP-Proteine. Dabei wurde gezeigt, dass die Synthese der ZP-Proteine speziesspezifisch ausschließlich in der Oozyte oder auch in den anliegenden Follikelzellen stattfinden kann. Beim wohl bestuntersuchtesten Modell, der Maus, die wie oben erwähnt nur eine dünne ZP aufweist, konnte keine ZP-mRNA (Epifano *et al.*, 1995) und auch keine ZP-Proteine in den Follikelzellen nachgewiesen werden (El Mestrah *et al.*, 2002). Schon zu Beginn der 90er Jahre wurde festgestellt, dass beim Kaninchen das 55kDa ZP-Protein, das Pendant zum murinen ZPB-Protein, sowohl in der Oozyte als auch in Granulosazellen exprimiert wird (Lee und Dunbar, 1993). Es folgten weitere Spezies bei denen eine Beteiligung der Follikelzellen nachgewiesen wurde. Charakteristischerweise handelte es sich bei diesen Spezies um solche, die eine relativ dicke ZP produzieren (Sinowatz *et al.*, 2001).

Mittels *in situ* Hybridisierung konnte porcine ZPB-RNA und bovine ZPC-RNA abhängig von der Entwicklungsstufe in den Follikelzellen von Sekundärfollikeln identifiziert werden (Kolle *et al.*, 1996; Kolle *et al.*, 1998). Beim Schwein waren dabei im Stadium der Tertiärfollikel die ZPB-Transkripte sogar ausschließlich in den Granulosazellen nachweisbar. Grootenhuis *et al.* (1996) konnten mittels monoklonaler Antikörper ZPC-Proteine in Follikelzellen unter anderem beim Menschen und auch am Rhesus Affen nachweisen. Für den Langschwanzmakak wird eine Mitbeteiligung der Follikelzellen bei der Proteinsynthese diskutiert. Dabei konnte nur die mRNA von ZPA- und ZPC-Protein in den Granulosazellen lokalisiert werden, während die ZPB-kodierende mRNA nur in Oozyten zu identifizieren war (Martinez *et al.*, 1996). Eberspaecher *et al.* (2001) wiesen mit immunhistochemischen Methoden die drei ZP-Proteine in Formalin fixierten Gewebeschnitten von Mensch, Maus und der Langschwanzmakak im Zytoplasma von Oozyten nach, nicht aber in den angrenzenden Granulosazellen. Für den Marmoset Affen lagen bislang nur wenige Erkenntnisse vor. Grootenhuis *et al.* (1996) gelang

es nicht, ZPC-Protein im Zytoplasma von Granulosazellen des Marmoset Affen nachweisen. In 60% der Follikel konnte allerdings eine extrazelluläre Immunreaktion beobachtet werden. Thillai-Koothan *et al.* (1993) identifizierten als *de novo* Syntheseort von ZPC-Protein die Oozyte, fanden aber keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Follikelzellen. Für die anderen beiden ZP-Proteine ist die Expression der kodierenden Gene noch nicht beschrieben. Neuere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die ZP-Glykoproteine im Marmoset sowohl in Oozyten als auch in Follikelzellen transkribiert und translatiert werden (Bogner *et al.*, 2004).
Neben der Lokalisation lag das Augenmerk verschiedener Untersuchungen auch auf dem zeitlichen Verlauf der ZP-Expression während der Follikulogenese. In der Maus konnte in ruhenden Oozyten nur ZPA-Transkripte nachgewiesen werden. In der Phase des Wachstums wurde eine Anhäufung der ZP-Transkripte beobachtet, welche in den späten Phasen der Follikulogenese stark abnahm (Epifano *et al.*, 1995; Philpott *et al.*, 1987). Am Modell der Hauskatze konnte mittels RT-PCR die Genexpression von allen drei ZP-Proteinen in Sekundärfollikeln und Kumulus-Oozyten-Komplexen dargestellt werden. In wachsenden Follikeln gelang dies nur für die Gentranskripte von ZPB, wogegen in Primordial- und Primärfollikeln keine ZP-Transkripte nachweisbar waren (Jewgenow und Fickel, 1999). Während der Follikulogenese des porcinen und bovinen Ovars konnte gezeigt werden, dass das ZPC-Protein und seine Transkripte hauptsächlich in der Oozyte von Primordial- und Primärfollikeln anzutreffen sind. In Sekundärfollikeln tragen sowohl die Oozyte als auch die Follikelzellen zur Synthese des ZPC-Proteins bei, wohingegen in Tertiär- und präovulatorischen Follikeln das ZPC-Protein und seine Transkripte hauptsächlich in den Corona radiata-Zellen zu finden war (Kolle *et al.*, 1996; Kolle *et al.*, 1998; Sinowatz *et al.*, 1995; Totzauer *et al.*, 1998). Beim Schwein war in den Oozyten berhaupt keine *de novo* Synthese mehr nachweisbar.

1.4 Das Tiermodell

Als Vertreter der Neuwelt-Primaten gehört der Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus* / Marmost Affe (NCBI-Taxonomy ID: 9483), zur Familie der Callitrichiden (Krallenaffen), einer Unterordnung der Neuwelt- oder Breitnasenaffen (*Platyrrhini*). Der Marmoset Affe wiegt etwa 300-360g bei einer Körpergröße von etwa 12-15cm und einer Schwanzlänge von 29,5-35cm. Damit gehört er zu den kleineren Vertretern der Krallenaffen. Seine Lebenserwartung in Gefangenschaft beträgt etwa 16 Jahre. Charakteristisch für den Marmoset Affen sind seine

abstehenden weißen Ohrbüschel, von denen sich die deutsche Bezeichnung ableitet. Des Weiteren zeichnet er sich durch einen weißen Stirnfleck aus. Das Fell ist graubraun mit heller Querbänderung, die besonders stark am Schwanz ausgeprägt ist.

Der natürliche Lebensraum des Weißbüschelaffen beschränkt sich auf die Regenwälder an der Nordostküste Brasiliens. Sie leben in Gruppen von 2-13 Mitgliedern in 1-5 Hektar umfassenden Revieren. Sie sind tagaktiv und ernähren sich in erster Linie von Baumsäften, Früchten, Blüten, Insekten und kleinen Wirbeltieren (Wolters und Immelmann, 1988). Die Geschlechtsreife erlangen die Tiere in einem Alter von 18-20 Monaten (Abbott und Hearn, 1978). Der ovarielle Zyklus der Weibchen von 28 Tagen entspricht in etwa dem der Frau. Nach einer Tragezeit von ungefähr 148 Tagen gebären die Weibchen in der Regel Zwillinge. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit zum Menschen, ihrer hohen Fortplanzungsrate und der relativ einfachen Haltung der Tiere wird der Marmoset Affe in der biomedizinischen Forschung gerne als Modell für den Menschen herangezogen. Durch die Zerstörung seines natürlichen Habitats gehört der Weißbüschelaffe zu einer der bedrohtesten Vertreter der Callithrichiden, aufgrund seiner Größe und geringen Zahl sind Feldstudien über das Verhalten der Tiere mangelhaft. Unterschiede zum Verhalten in Gefangenschaft wurden allerdings beschrieben (Evans, 1986).

1.5 Ziele der Arbeit

Der erste Kontakt zwischen Eizelle und Spermatozoon findet an der Zona Pellucida, der extrazellulären Matrix, statt. Sie spielt somit eine wesentliche funktionelle Rolle bei einer erfolgreichen Befruchtung. Der Syntheseort der ZP-Glykoproteine ist nach wie vor umstritten. Die Erkenntnisse gerade beim Primaten ergeben noch kein zusammenhängendes Bild darüber, wie und in welchem zeitlichen Verlauf die Expression der ZP-Proteine vonstatten geht.

Erstes Ziel der Arbeit war die zelluläre Lokalisation von Marmoset Affen ZP-mRNA Transkripten im Ovar. Mittels *in situ* Hybridisierung sollten die möglicherweise bei der ZP-Synthese beteiligten Zellen (z.B. Oocyte, Kumuluszellen, Granulosazellen) identifiziert und somit ein Beitrag zum besseren Verständnis des Syntheseortes der ZP erbracht werden.

Während durch die männlichen Gameten bei der Fertilisation primär die genetische Information zur Erlangung eines diploiden Chromosomensatzes bereitgestellt werden, akkumuliert die Oozyte Moleküle und Informationen, die der entstehenden Zygote zur Verfügung stehen, bis diese mit eigener Genaktivität die Entwicklung fortsetzt. Ein fein abgestimmter und kontrollierter Verlauf der Genexpression in Oozyten ist hierfür voraussetzend. Durch die Quantifizierung der ZP-Transkripte zu verschiedenen Zeitpunkten der Follikulogenese konnte der zeitliche Verlauf der ZP-Bildung untersucht werden. Deshalb wurde nach der Lokalisation der ZP-Expression im Ovar ein weiteres Ziel, die quantitative Bestimmung der ZPA-, ZPB- und ZPC- mRNA Transkripte von isolierten Oozyten, definiert. Mithilfe der real-time PCR sollte eine mögliche Zu- oder Abnahme der ZP-mRNA im Verlauf der Follikologenese untersucht werden. Zusätzlich sollte die real-time PCR soweit optimiert werden, dass möglichst geringe Mengen des Untersuchungsmaterials zur Versuchsauswertung notwendig sind. Die Generierung von Referenzwerten zur Quantifizierung spezifischer ZP-Transkripte von *in vivo* gereiften Oozyten ist auch die Grundlage für nachfolgende, vergleichende Studien mit *in vitro* maturierten oder pathologisch veränderten Oozyten. Der quantitative Nachweis von ZP Transkripten in einer einzelnen Oozyte könnte klinische Hinweise für die Befruchtungsfähigkeit geben. Des Weiteren können die gewonnenen Erkenntnisse zur Optimierung der *in vitro* Maturierung von Oozyten eingesetzt werden und somit in der klinischen Diagnostik Anwendung finden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Ambion, Huntingdon, UK:

DNA-free Kit

DEPC-Water

RNAlater

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:

Homo Oligomeric DNA d(T)

Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA:

Falcon® org. Kulturgewebsschalen mit Zentrumsvertiefung, 60x15mm

Falcon® Zentrifugenröhrchen 15ml; 50ml

Petrischalen 60x15mm, 100x20mm

Bio Rad, München:

100bp Marker

Molecular Ruler

ß-Mercaptoethanol

Biochrom KG, Berlin:

Fötales Bovines Serum

PBS-Dulbeccos (1x)

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf:

PCR-Softtubes 0,5ml

Filtertips 10µl 100µl 1000µl

SybrGreen I FMC Corporation Rockland USA

Boehringer, Mannheim:

Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente

DIG RNA-Labeling Kit (SP6/T7)

DIG RNA-Labeling Mix

Braun, Melsungen:

Einmalspritzen 2ml; 5ml; 10ml; 20ml

Physiologische Kochsalzlösung

Calbiochem, San Diego, USA:

Imunopen

DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg:

Glycergel Eindeckmedium

Eppendorf, Hamburg:

PCR-Tubes 0,2ml

Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl

FMC, Bioproducts:

SYBR Green I, 10000x in DMSO

Fluka, Buchs, Schweiz:

Paraformaldehyd

rauchende HCl

GeneCraft, Münster:

100mM dNTPs

GibcoBRL, Karlsruhe:

Agarose ultra Pure

RNase OUT

Low DNA-Mass-Ladder

Glaswerk Wertheim, Wertheim:

Küvetten

Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenrot:

Pasteurpipetten aus Plastik, 3ml

Kontes, New Jersey, USA:

Glashomogenisator (4ml) mit Teflon-Pistill

KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories), Guildford, Großbritannien:

BCIP/NBT Phosphate Substrate 1 Component

Menzel-Gläser, Braunschweig:

Deckgläser

Objektträger

Merck, Darmstadt:

Calciumchlorid

di-Natriumhydrogenphosphat

EDTA (Titriplex III)

Eisessig

Essigsäure

Isopropanol

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Magnesiumchlorid-Hexahydrat

Maleinsäure

Natriumacetat

Natriumcitrat

Natriumbicarbonat

Natriumdihydrogenphosphat

Phosphorsäure

Triethanolamin

Xylol

Millipore, Eschborn:

Amicon Bioseparations

Microcon YM-100 Centrifugal Filter Devices

Natutec, Frankfurt:

CPG® MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit

Pan-Biotech, Aidenbach:

Panscript DNA-Polymerase-Kit

PeqLab, Erlangen:

E.N.Z.A DNA-Isolierungs Kit

PFM Produkte für Medizin AG, Köln:

Feather® Einmalskalpell

Polaroid GmbH, Offenbach:

Polaroid Sofortbildfilm Typ 667

Qiagen, Hilden:

Omniscript RT Kit

one-step RT-PCR Kit

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit

Qiaquick Gel Extraction Kit

Qiuaquick PCR Purification Kit

Qiagen RNeasy Mini Kit

RNase-free DNase I Kit

HotStarTaq RT Kit

Riedel-de-Häen, Seelze:

Ethanol

Methanol

Essigsäureanhydrid

Roche, Mannheim:

Blocking Reagent (für Nukleinsäure Hybridisierung)

PCR-Optimization Kit

SP6-RNA-Polymerase

T7-RNA-Polymerase

Bovines Serum Albumin, RNase-frei

FastStart DNA Master SYBR Green I

Roth, Karlsruhe:

Blaubrand® Einmal-Mikropipette mit Ringmarke

Ethidiumbromid

Glycin

Natriumchlorid

Tris-Base

Sarsted, Nümbrecht:

Reaktionsgefäße 1,5ml; 2,0ml

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

3-Aminoprophyltriethoxysilane (APES)

Borsäure

Bromphenolblau

DAB (3,3´-Diaminobinzidin)

Formamid

Glycerin

Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)

Tris EDTA-Puffer 100x

N-Lauroyl-Sacrosinat

Lithiumchlorid

Proteinase K

Sorenson, Salt Lake City, USA:

Microcentrifuge Tubes Rnase/Dnase-free 1,7ml

Terumo, Leuven, Belgien:

Einmalkanülen, Nr. 17, 0,55x25

USB, Cleveland, USA:

Tris-HCl

Vogel, Giessen:

Paraffin

Whatman Biometra, Göttingen:

UltraMicro Quarzküvette 50µl QS 10.00mm

2.1.2 Medien und Lösungen

Blockierungslösung (ISH):

Blocking Reagent

0,5 % BSA sterilfiltriert in Maleinsäurepuffer

Grundmix (20x) (ISH):

400 mM Tris-HCl, pH 7,5

20 mM EDTA, pH 8,0

10 mg/ml t-RNA, 2 mg/ml poly A-RNA, in 4 ml Wasser

2ml 50x Denhardt‘s Lösung

(1 % w/v Ficol 400, 1 % w/v Polyvinylpyrolidon 10000, 1 % w/v BSA).

Hybridisierung-Mix (ISH):

50% Formamid (100%)

1x Grundmix (20x),

0,3M Natriumchlorid (5M),

10% Dextransulfat (50%),

bei 80^{o}C 5 min erhitzte Ribosonde 5-10ng/µl.

Maleinsäurepuffer (ISH):

0,1M Maleinsäure

0,15M Natriumchlorid

pH 7,5

6x Probenpuffer für PCR-Agarosegellauf (Loading buffer):

0,25% (w/v) Bromphenolblau

40% (w/w) Sucrose in A.dest

PBS (Phosphate-buffered-saline):

1,4M Natriumchlorid

27mM Kaliumchlorid

70mM Na_2HPO_4

30mM KH_2PO_4

pH 7,4

Proteinase K Puffer:

0,1M Tris-HCl

50mM EDTA

pH 8,0

Prähybridisierung-Mix (ISH):

100mM Tris-HCl

50mM EDTA

40mM Natriumchlorid

5ml 50x Denhardt‘s Lösung

25mg tRNA in 50ml Mixlösung

pH 7,5 in 45ml Wasser

sterilfiltriert

Puffer I (ISH):

0,1M Tris-HCl

0,15M Natriumchlorid

pH 7,5

Puffer II (ISH):

0,1M Tris-HCl

0,1M Natriumchlorid

pH 9,5

Kurz vor Verbrauch 0,05 M Magnesiumchlorid

20x SSC:

3M Natriumchlorid

0,3M Natriumcitrat

pH 7,0

TBS (Tris-buffered-saline):

25mM Tris-Base

150mM Natriumchlorid

pH 7,4

5xTBE (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer):

0,45M Tris-Borat

0.01M EDTA

pH 8,0

TEA-Puffer:

0,1M Triethanolamin

pH 8,0

2.1.3 Verwendete Kits

CPG® MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit, Natutec:

MPG Streptavidin: 10mg, gelöst in PBS, pH: 7,5, 0,1% BSA, 0,02% NaN_3

G1-Lösung: 1M Kaliumchlorid, pH: 8,0

G2-Lösung: 2M Natriumchlorid, pH: 8,0

G3-Lösung: 4M Guanidine Thiocyanat, 100mM Tris-HCl; pH: 7,2

G4-Lösung: 100mM Tris-HCl, pH: 7,2, 400mM LiCl, 20mM EDTA,

0,5% Lauroylsarcosinat

G5-Lösung: 10mM Tris-HCl, pH: 8,0, 150mM LiCl, 1mM EDTA,
0,1% Lauroylsarcosinat

G6-Lösung: 2mM EDTA, pH: 8,0

G7-Lösung: ß-Mercaptoethanol

Qiagen, RNase-free DNase I Kit:

RNase free DNase I, 550µl (1500 Kunitz Einheiten)

Buffer RDD

RNase-free H2O

Zusatzpuffer: 500mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM MgCl2; 10mM DTT

Qiagen, Omniscript RT Kit:

Omniscript reverse Tanskriptase 4 units/µl

RT-Puffer 10x

5mM dNTP-Mix

RNase freies Wasser

Qiagen, HotStarTaq RT-Kit:

HotStarTaq DNA Polymerase 250 Units

PCR-Buffer 10x

Q-Solution 5x

$MgCl_2$ 25mM

Qiagen, QuantiTect SYBR-Green RT-PCR Kit:

QuantiTect SYBR Green I RT-PCR Master Mix

HotStarTaq DNA-Polymerase

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Buffer

DNTP Mix including dUTP

SYBR Green I

ROX

5mM $MgCl_2$

QuantiTect RT Mix

Omniscript RT

Sensiscript RT

Qiagen, one-step RT-PCR Kit:

One-step RT-PCR Enzyme Mix

(Omniscript RT, Sensiscript RT, HotStarTaq DNA Polymerase)

OneStep RT-PCR Buffer 5x

Q-Solution 5x

DNTP Mix 10mM each

RNase-free water

Qiagen, Qiaquick Gel Extraction Kit:

Buffer QG

Buffer PE

Buffer EB

Collection Tubes 2,0ml

Qiagen, Qiaquick PCR Purification Kit:

QIAquick Spin Colums

Buffer PB

Buffer PE

Buffer EB

Collection Tubes 2,0ml

Qiagen, RNeasy Mini Kit:

RNeasy mini spin colums

Collection Tubes 1,5-2,0ml

Buffer RLT

Buffer RW1

Buffer RPE

Rnase-free water

Boehringer, DIG-RNA Labeling Kit:

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)

pSPT18 DNA

pSPT19 DNA

Kontroll-DNA1, pSPT18-Neo

Kontroll-DNA 2, pSPT19-Neo

Markierte Kontroll-RNA

Unmarkierte Kontroll-RNA

NTP Markierungs-Gemisch

10x Transkriptionspuffer

DNase I, RNase-frei

RNase Inhibitor

SP6-RNA-Polymerase

T7-RNA-Polymerase

Boehringer, PCR Optimization Kit:

16 PCR Optimisierungspuffer 10x

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Gelatine-Stammlösung

(NH4)2 SO4-Stammlösung

Glycerin-Stammlösung

MgCl- Stammlösung

Pan-Biotech, PanScript DNA Polymerase:

Native Taq DNA Polymerase 5units/µl

10x NH_4-Puffer:

160mM $(NH_4)_2SO_4$; 500mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% Tween 20

50mM MgCl

10x KCl-Puffer

2.1.4 Geräte

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz:

Vortex Genie 2 TM

Biometra, Göttingen:

GeneRay UV-Photometer

Fisher Scientific, Nidderau:

Accumet AR20 pH-meter

Heraeus, Hanau:

Begasungsbrutschrank

Biofuge fresco

Hettich, Tuttlingen:

Hettich Universal 30F, Zentrifuge

Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen:

IKA-Combimag RCT

IKA-Schüttler MTS 4

Joun, Unterhaching:

Trockenschrank

Knick, Berlin:

Digital-pH-Meter 761 Calimatic

Leica, Solms:

Leica WILD M8

Leitz, Bensheim:

Mikrotom 212 nach Minot

Leybold-Heraeus, Hürth:

Lyovac GT

Memmert, Schwabach:

Wasserbad 25l

Mettler, Gießen:

Waage PM 4600 Delta Range

Millipore, Eschborn:

Milli-Q Wasseraufereitungsanlage

MJ Research, Watertown, Massachusetts:

Perltier-Thermal Cycler PTC 200

16/16 Twin-Tower *in situ* Block

PeqLab, Erlangen:

EasyCast Minigelsystem Modell B2

Blockheizgerät 1101

Polaroid, Offenbach:

Photoeinheit, Instant Camera, Polaroid MP4+

Roche, Mannheim:

LightCycler, real-time PCR unit

LightCycler Capillaries

LightCycler Capillary-cooler

Sartorius, Göttingen:

Präzisionswaage

Schrickel, Göttingen:

Glasröhrchen, Ø 4-5 mm Öffnung

Zeiss, Frankfurt:

Inverses Mikroskop Axiovert 100 mit elektr. Mikromanipulationseinheit

Stereomikroskop Stemi SV 11

Stereomikroskop Stemi SV 6

Axioskop mit Fotoeinheit MC 80

2.1.5 Versuchstiere

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Gewebe und Zellen des Marmoset Affen, *Callithrix jacchus*, durchgeführt. Die Tiere gehörten zur Versuchstier-Kolonie der Abteilung Reproduktionsbiologie des Deutschen Primatenzentrum GmbH, Göttingen. Das Untersuchungsmaterial wurde freundlicherweise von Frau Dr. P. Nayudu zur Verfügung gestellt. Das Material für die Versuche mit Follikelzellen und den Gewebeschnitten stammte von verschiedenen Tieren. Die Oozyten für die Quantifizierung stammten von einem vier Jahre alten Tier (466g). Die Stimulation erfolgte über 18 Monate mit einer Injektion (i.m.) von 0,8µg Prostaglandin F2α pro Zyklus (ca. 28 Tage beim Marmoset Affen). Die letzte Injektion von 0,8µg erfolgte 8 Tage vor der Entnahme der Ovarien.

2.2 Methoden

2.2.1 *In situ* Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB-, und ZPC-Transkripten im Marmoset Ovar

Um die genaue Lokalisation der Expression von ZPA,- ZPB- und ZPC-mRNA im Ovar des Marmoset Affen zu ermitteln, wurde eine *in situ* Hybridisierung (ISH) durchgeführt. Das Prinzip der *in situ* Hybridisierung beruht auf der spezifischen Bindung zwischen einer markierten einzelsträngigen Nukleinsäuren (der so genannten "Sonde") und einer zu dieser komplementären einzelsträngigen Sequenz in fixiertem Gewebe (Leitch *et al.*, 1994).

2.2.1.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Ovarien wurden unmittelbar nach der Entnahme zügig in PBS gewaschen und mit einer Schere zerkleinert. Die Fixierung der Gewebestücke erfolgte für 2-3 Stunden in frisch hergestelltem, 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C. Die weitere Verarbeitung der Gewebestücke, wie das Waschen und Gießen in Paraffinblöcke, erfolgte automatisiert im Deutschen Primatenzentrum in Göttingen. Für die ISH wurde aus den Paraffinblöcken mit dem Mikrotom 6µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf saubere, 3-Aminoprophyltriethoxysilane (APES) beschichteten Objektträger aufgebracht.

2.2.1.2 Herstellung der Ribosonden zum Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten

2.2.1.2.1 Herstellung der Ribosonden ZPB-T3T7, qCZPA und ZPB-SP6T7

Zur Herstellung der Sonde für ZPA-RNA wurden Primer für ein Fragment innerhalb der Sequenz für Marmoset ZPA-RNA mit Promotoren versehen. Ein Primer wurde dabei mit einem SP6-, der andere mit einem T7-Promotor als Erkennungsstelle für zwei verschiedene RNA-Polymerasen verbunden. Diese Primer wurden durch Veränderung der Annealingtemperatur sowie der MgCl-Konzentration optimiert (Tab. 1). Die PCR erfolgte mit cDNA-Templates aus Marmoset Oozyten. Alle PCR-Produkte wurden vereinigt und zusammen auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde die Menge anhand einer Low DNA-Mass-ladder abgeschätzt. Die entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und das PCR-Produkt mit dem Qiagen Gel Extraction Kit eluiert. Nach einer Konzentrierung mithilfe einer Micron Y-100 Säule, wurden je 1µg des PCR-Produkts in eine *in vitro* Transkription jeweils mit einer SP6- und T7-RNA-Polymerase eingesetzt. Die Transkription wurde mit dem Boehringer DIG-RNA Labeling Kit durchgeführt. Für ein Reaktionsansatz von 20µl wurden folgende Reagenzien verwendet: 2µl Transkriptionspuffer, 2µl DIG-RNA-Labeling Mix, 2µl T7- beziehungsweise SP6-RNA-Polymerase, 1µl RNAse Out (Ribonuklease Inhibitor) und 13µl RNase-freies Wasser. Die Transkription erfolgte über 2 Stunden bei 37°C. Die nach der PCR mit Promotoren versehenen Fragmente dienten als Matrize für die RNA-Polymerasen. Diese erzeugten von ihren Erkennungsstellen aus einen Strang einzelsträngiger RNA, komplementär (antisense) beziehungsweise nichtkomplementär (sense) zur entsprechenden ZP-Sequenz. DIG-gekoppelte Uracil-Nukleotide im Labeling-mix werden etwa alle 50 Basen in die Sondensequenz eingebaut und diese somit markiert. In analoger Weise wurden zwei verschiedene Sonden für Marmoset ZPB-RNA hergestellt (Tab. 1). Statt des für die Transkription der ZPA-Sonde verwendeten SP6-Promotor, kam hier eine Erkennungssequenz für die T3-RNA-Polymerase zum Einsatz. Die Sonden wurden nach der Transkription portioniert und bei –80°C gelagert.

Tab. 1: Zur Sondenherstellung verwendete Primer

Primer	Sequenz	Position	AT	Größe
R-ZPB-T3 F-ZPB-T7	5'-CCA AGC CTT CAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAG GGA TCA GCT GGG TCT GAT A-3' 5'-CAG AGA TGC ATA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TGG TGA CTA CCC AGT GGT GA-3'	1139-1159 1342-1362	61°C	204
R-qCZPB-T3 F-qCZPB-T7	5'-CCA AGC CTT CAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAC GCT GGT GGT GTG AGG GAA ATG-3' 5'-CAG AGA TGC ATA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CAC AGA ACA GAC CCC CAC CTA G-3'	1200 – 1221 1366 – 1387	60°C	188
5-CZPA-SP6a 3-CZPA-T7a	5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA AAA CAA TGA CAG TCA GTC TCC CG-3' 5'-GCA TTA TGC TGA GTG ATA TCC CGC TTG AAG CCT AGA GTT GCC ACC ACG-3'	1970-1993 2205-2227	59°C	258
5-CZPA-SP6b 3-CZPA-T7b	5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA AGG TTT ACA GCC ACC AAA CAC G-3' 5'-GCA TTA TGC TGA GTG ATA TCC CGC TGC AGG ATT AAG GTA AAT GGA CCG-3'	1163-1184 1491-1513	59°C	351

Darstellung der zur Herstellung der Ribosonden ZPB-T3T7, qCZPB und ZPA- SP6T7 verwendeten Primer, deren Position in der kodierenden Sequenz, die Annealingtemperatur (AT) sowie die Größe der hergestellten Sonde in Basenpaaren (bp).

2.2.1.2.2 Herstellung der Sonden ZPA-F1R1 und ZPC-R2F2

Zur Herstellung dieser Sonden wurde ein Primerpaar für ein Fragment (R1F1) innerhalb der Marmoset ZPA-Sequenz und ein Primerpaare (R2F2) für je ein Fragment innerhalb der Marmoset ZPC-Sequenz anhand ihrer Annealingtemperatur und $MgCl_2$-Konzentration für die PCR optimiert (Tab. 2). Die gereinigten PCR-Produkte wurden dann in einen Vektor kloniert und in kompetenten Bakterien vermehrt. Die Fragmente wurden mitsamt, im Vektor enthaltenen Promotoren für die SP6- und T7-RNA-Polymerasen an entsprechenden Schnittstellen aus dem Vektor extrahiert. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden wie unter 2.2.1.2.1 beschrieben in eine *in vitro* Transkription mit DIG-markierten Uracil-Nukleotiden eingesetzt. Die Herstellung der Sonden und Klonierung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem

Labor von Prof. Dr. Steger im Institut für Veterinär Anatomie Histologie und Embryologie der JLU-Giessen. Die fertigen Sonden wurden aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Tab. 2: Zur Sondenherstellung verwendete Primer

Primer	Sequenz	Position	AT	Größe
ZPA-F1 ZPA-R1	5‘-CTT TCC AGG CAC TGT CAT TTG CGA-3‘ 5‘-TCA TCT GGT GCC CGC CAT GCA CT-3‘	167 – 191 350 – 373	65°C	206
ZPC-F2 ZPC-R2	5‘-CAT CTG CCA GTC CTG TAG CAA GG-3‘ 5‘-TTC TGT CAC ATG CCT GCG GTC AC-3‘	961 – 983 1078 – 1056	67°C	118

Angabe der zur Herstellung der Ribosonde ZPA-R1F1, ZPC-R2F2 verwendeten Primer, deren Position in der kodierenden Sequenz, die Annealingtemperatur (AT) sowie die Größe der hergestellten Sonde in Basenpaaren (bp).

2.2.1.3 Durchführung der *in situ* Hybridisierung

Um die mRNA-Sequenz von ZPA, ZPB und ZPC in Marmoset Ovarschnitten nachzuweisen und zu lokalisieren, wurde eine RNA:RNA *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Eine markierte RNA-Sequenz kann unter geeigneten Bedingungen mit ihrer komplementären Sequenz in Gewebeschnitten hybridisiert werden. Nach diversen Waschschritten kann mittels eines farbstoffgebundenen Antikörpers die Sonde anhand ihrer Markierung im Gewebe identifiziert werden. Eine positive Farbreaktion gilt als Nachweis der gesuchten mRNA-Sequenz. Bis zur Hybridisierung der Sonde muss bei allen Arbeitsschritten eine Kontamination des Untersuchungsmaterials mit RNasen sorgfältig vermieden werden. Aus diesem Grund wurden alle Puffer und Lösungen vor Gebrauch steril filtriert, die Glaswaren wurden 4 Stunden lang bei 180°C Heißluft-sterilisiert. Die detaillierte Durchführung wird im Folgenden beschrieben:
Die zur Verwendung kommenden Ovargewebeschnitte wurden zunächst 15min lang bei 60°C erhitzt und anschließend 2x 15min in Xylol bei Raumtemperatur entparaffiniert. Die Schnitte wurden 2x für 5min in Isopropanol gewaschen, durchliefen anschließend jeweils 5min eine absteigende Alkoholreihe von 100%, 80%, 70% und 50%, um die Gewebe zu rehydrieren und wurden am Ende 2x in PBS für jeweils 5min gewaschen. Es folgte eine Inkubierung der

Schnitte in 0,2M HCl für 10min und ein weiterer Waschschritt in PBS für 5min. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde eine 2,5-10µg/ml Proteinase K-Lösung auf die Schnitte aufgetragen, für 20min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert und sofort danach in 0,2% Glycin (in PBS) 5min lang abgestoppt. Die Gewebe wurden in 4%igem Paraformaldehyd für 10min nachfixiert, erneut in 0,2% Glycin (in PBS) 5min gewaschen und in Triethanolaminpuffer und Essigsäureanhydrid (200ml + 0,5ml) für 10min unter Rühren zur Acetylierung belassen.

Zur Prähybridisierung wurden die Ovargewebeschnitte mit ca. 40µl Prähybridisierungsmix bedeckt, und bei der sondenspezifischen Hybridisierungstemperatur (HT) 2h lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden sowohl der 30µl Ribosonde *antisense* (AS) als auch als Negativkontrolle der 30µl Ribosonde *sense* (S) enthaltende Hybridisierungsmix auf jeweils einen der Schnitte gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum luftdicht verschlossen. Danach wurden die Objektträger auf 80°C für 10min erhitzt, um die Nukleotide zu denaturieren. Die Hybridisierung erfolgte bei den entsprechenden HT über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte wie folgt gewaschen: 2x SSC-Lösung bei HT für 30min, 1x SSC in 50% Formamid bei HT für 1h, 2x mit 0,5x SSC jeweils 10min, mit 0,2x SSC für 10min und für 10min mit Maleinsäurepuffer jeweils bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dann mit 40µl Blockierungslösung bedeckt und für 1h bei 37°C in eine feuchte Kammer verbracht. Anschließend wurden die Schnitte mit 100µl alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Anti-DIG (Sondenmarkierung) Fab-Fragmenten in einer Verdünnung von 1:500 mit Blockierungslösung bei 37°C 1h lang inkubiert. Es folgten 3 Waschschritte, 2x in Puffer I jeweils 15min, und 1x in Puffer II für 2min. Zum Nachweis der erfolgten Hybridisierung wurden 50µl BCIP/NBT Substrat aufgetragen und die Schnitte in einer abgedunkelten feuchten Kammer belassen. Die alkalische Phosphatase (AP) spaltet die Farbstoffe in einer Redoxreaktion. Es entsteht ein blaues Präzipitat. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Zum Teil erfolgte die Reaktion aber auch über Nacht. Am Ende wurde die Substratsreaktion mit Puffer II abgestoppt. Die Schnitte wurden mit Wasser gewaschen und anschließend mit DAKO Glycergel eingedeckt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop bei Durchlichtbetrachtung.

2.2.2 Gewinnung von Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Eierstöcke geschlechtsreifer Marmoset-Weibchen wurden nach Euthanasierung der Tiere im Deutschen Primatenzentrum Göttingen durch die dort tätigen Tierärzte entnommen und direkt in 4°C kaltes PBS überführt. Um eine Degradation der zellulären RNA soweit als möglich zu vermeiden, wurden auch alle weiteren Schritte der Oozytengewinnung möglichst schnell in gekühltem PBS durchgeführt. Zur Gewinnung der Oozyten wurden zunächst die Follikel unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Stereomikrokop Stemi SV6, Zeiss, Frankfurt) bei 250 facher Vergrösserung aus der ovariellen Matrix isoliert und nach Größe sortiert. Die erste Unterscheidung erfolgte durch Trennung von präantralen und antralen Follikeln; des Weiteren wurden die antralen Follikel nach ihrem Durchmesser in Kategorien unterteilt (Tab. 3): Kategorie 1 umfasst periantrale Follikel (< 600µm), Kategorie 2 kleine antrale Follikel (600-1000µm) und Kategorie 3 große antrale Follikel (> 1000µm) (Gilchrist *et al.*, 1995). Anschließend wurden die Oozyten aus den Follikeln isoliert, indem diese mit Einmalkanülen (Nr. 17) eröffnet wurden. Freiliegende Oozyten, deren Zuordnung zu einer bestimmten Follikelgröße nicht möglich war, wurden nach Oozytengröße unterteilt. Es wurde zwischen den Oozytengrößen <80µm, 80-100µm und >120µm unterschieden. Alle Oozyten, die bis dahin noch von Kumuluszellen umgeben waren, wurden anschließend durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen durch eine ausgezogene Glaskapillare von diesen befreit.

Sowohl Oozyten als auch Follikelzellen aus den Marmosetfollikeln wurden getrennt in RNase-freien, silikonisierten 1,7ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Bei den Follikelzellen handelte es sich um ein Gemisch aus Kumulus- und Granulosazellen unbestimmter Anzahl. Die Oozyten und Follikelzellen wurden einmal in Wasser aufgenommen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren, oder als Alternative in RNAlater, einer RNA-stabilisierenden Lösung, bei -20° C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Tab. 3: Einteilung der untersuchten Oozyten nach Follikelgröße (Durchmesser)

Kategorie	Bezeichnung	Durchmesser
Kategorie 1	Periantral	<600µm
Kategorie 2	Kleine antrale	600-1000µm
Kategorie 3	Große antrale	>1000µm

2.2.3 Genexpression der Zona Pellucida Glykoproteine in Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Untersuchungen zur Identifizierung des Proteinsyntheseortes der drei Glykoproteine der Zona Pellucida im Marmoset Modell erfolgten durch die Darstellung der Genexpression der ZP-Proteine. Dazu wurde aus verschiedenen Zellarten (Oozyten und Follikelzellen) unterschiedlicher Follikelstadien die mRNA isoliert und anschließend eine reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden näher charakterisiert.

2.2.3.1 Isolierung von mRNA und totalRNA aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit der Firma CPG, New Jersey. Dies ist für die direkte mRNA-Isolierung aus Zellen sowie tierischem und pflanzlichem Gewebe bestimmt. Die totalRNA-Isolierung wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit durchgeführt.

2.2.3.2 mRNA-Extraktion aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit superparamagnetischen, komplett porösen Glaspartikeln, an deren Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden war (Direct mRNA Purification Kit der Firma CPG). Durch die Kopplung von Streptavidin mit biotinylierten Oligo d(T) konnte Poly(A)-RNA spezifisch gebunden und magnetisch separiert werden. Das Protokoll entsprach den Angaben des Herstellers. Zur Verarbeitung des Probematerials wurde dieses in den bereitgestellten Lösungen für ca. 5min mit einem Glashomogenisator (4ml) mit dazugehörigem Teflon-Pistill der Firma Kontes, New Jersey, USA homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung 10-20mal durch eine Kanüle Nr. 17 (Terumo, Leuven/Belgien) gezogen. Die beschriebene Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.
Die isolierte mRNA wurde im weiteren Verlauf mit 100µl Ethanol 100% und 15µl Natrium-Acetat gemischt. Es folgte eine Fällung über 20min bei –80°C. Die Probe wurde dann für 30min bei 4°C bei 13.800xg zentrifugiert. Das sich bildende Sediment wurde noch einmal mit 100µl Ethanol (70%) gewaschen, für 5min bei 13.800xg zentrifugiert, der Überstand verworfen

und nach Lufttrocknung in 20µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Erfolgte nicht unmittelbar anschließend eine reverse Transkriptasereaktion, wurde zur Lagerung vor dem Tiefgefrieren bei –80°C noch 1µl RNase-Inhibitor zum Schutz vor RNasen zugegeben.

2.2.3.3 totalRNA-Extraktion aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Die totalRNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Je nach Lagerung wurden die Zellen dabei unterschiedlich vorbereitet. Den in Wasser und Stickstoff gelagerten Zellen wurde direkt 350µl Lysepuffer mit 1% β-Mercaptoethanol zugegeben. Die in RNAlater bei –20°C gelagerten Zellen wurden bei 300xg für 5min zentrifugiert, der Überstand wurde abgezogen und 350µl Lysepuffer mit 1% β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Alle Lysate wurden mit dem Qiashredder homogenisiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Eluiert wurde die RNA mit 30-50µl RNase-freiem Wasser.

2.2.3.4 Reverse Transkriptasereaktion (RT-Reaktion)

Ziel der reversen Transkriptasereaktion war die Herstellung einer cDNA aus der isolierten mRNA. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz für 1h bei 37°C im PCR-Cycler inkubiert: mRNA 50% (v/v), RT-Puffer 1x, Oligo (dT)-Primer 1µM und das dNTP-Gemisch 0,5µM. Zusätzlich waren 10U RNase-Inhibitor und 4U reverse Transkriptase enthalten. Die Differenz zum Endvolumen von 20µl wurde mit RNase freiem Wasser ausgeglichen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene cDNA bei –20°C tiefgefroren.

2.2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, ausgewählte DNA-Sequenzbereiche spezifisch und schnell zu vervielfältigen. Als Startpunkt der DNA-Polymerase müssen sich spezifische Primer anlagern. Primer sind kurze DNA-Stränge, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Zielsequenz sind. Ihre Anlagerung erfolgt spezifisch bei der so genannten Annealingtemperatur (AT), die sich nach

der Schmelztemperatur (Tm) der Oligonukleotide richtet, im Endeffekt aber experimentell bestimmt werden muss.
Ausgehend von den gebundenen Primern ist im weiteren Verlauf der PCR eine Kettenverlängerung und somit eine Neusynthese des Komplementärstranges durch die DNA-Polymerase möglich. Mehrfache Wiederholung dieser Vorgänge führen zur exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz.

2.2.3.5.1 Oligonukleotid-Primer

Die kompletten kodierenden Sequenzen für alle untersuchten Gene wurden der Internet Datenbank PubMed entnommen. Die verwendeten Primer wurden von PD Dr. Lutz Konrad und Rrof. Dr. Klaus Steger ausgewählt und für weiter Arbeiten zur Verfügung gestellt Der abschließende Sequenzvergleich erfolgte über das Internetportal NCBI-Blast. Bei der realtime-PCR wurde besonderer Wert darauf gelegt, komplementäre Regionen der Oligonukleotide untereinander zu vermeiden, um die Verfälschung der Messwerte durch unspezifische PCR-Produkte (z.B. Primerdimere) zu reduzieren. Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

2.2.3.5.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Besonderheit der RT-PCR ist das Vorliegen eines neu synthetisierten cDNA-Stranges, komplementär zum isolierten mRNA-Strang. Dadurch ist ein Nachweis der mRNA-Expression möglich. Für den Reaktionsansatz wurde zunächst ein PCR-Mastermix hergestellt. Dieser bestand aus 1x NH_4-Puffer, 2mM $MgCl_2$, 0,25mM dNTPs, je 100pmol der Primer eines Primerpaares und 2,5U der Taq-Polymerase, aufgefüllt auf ein Endvolumen von 48µl mit autoklaviertem Wasser. Nach ausgiebiger Durchmischung wurden 2µl cDNA als Template zugegeben. Bei den PCR-Negativkontrollen wurde das Volumen des Templates durch Wasser ersetzt. Die Proben mit einem Endvolumen von 50µl wurden erneut durchmischt und kurz zentrifugiert. Dann wurde die PCR im Thermocycler gestartet.
Jede Sequenzvervielfältigung begann mit einer Denaturierung der cDNA bei 94°C für 4min. Daran schlossen sich für jede PCR 35 Zyklen an. Ein PCR-Zyklus lief wie folgt ab:

Denaturierung bei 94°C für 45sec

Primerannealing bei der jeweiligen Annealing-Temperatur für 45sec

Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase bei 72°C für 90sec

Beim letzten Zyklus erfolgte der Schritt der Kettenverlängerung bei 72°C für 5min. Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarose-Gelsystem getrennt, identifiziert und danach bei –20°C eingefroren.

2.2.3.5.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Darstellung der amplifizierten PCR-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte im Agarosegel. Dazu wurde Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung mit 15µl Ethidiumbromid versetzt. Fragmente unter 200 Basenpaaren wurden in einem 2%igem (w/v), Fragmente über 200 Basenpaare in einem 1,5%igem Agarosegel getrennt. Nach Polymerisation des Gels folgte die Elektrophorese. Es wurden 18µl Probe, zusammengesetzt aus 10µl PCR-Produkt 3µl 6 fach konzentriertem Loading Puffer und 5µl Wasser, aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer eingesetzt. Die Fragmentgrößen wurden an Hand eines 100bp-Markers bestimmt.
Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100V für die Dauer von 1,5h. Dann wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 366nm) betrachtet und mit einer Polaroidkamera des Typs Instant Camera, Polaroid MP4+ photographiert. Abschließend wurde die Größe vorhandener PCR-Fragmente durch den Vergleich mit dem bp-Marker annähernd bestimmt.

2.2.3.5.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Firma MWG Biotech. Dazu mussten 20ng DNA pro 100 Nukleotiden des jeweiligen PCR-Fragmentes lyophilisiert werden. Das so vorbereitete PCR-Produkt wurde dann zusammen mit den eingesetzten Primern (10µl mit einer Konzentration von 10pmol) und einem Photo des Agarose-Gellaufs zur Sequenzierung eingeschickt.

2.2.4 Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten und Follikelzellen mittels RT-PCR

Es wurden in Stickstoff eingefrorene Follikelzellen ohne einheitliche Zuordnung zu einer bestimmten Follikelgröße verwendet. Nach einer totalRNA-Isolierung mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit wurde die isolierte RNA mit wechselnden Konzentrationen von DNase I verdaut. Anschließend erfolgte eine RT-Reaktion mit dem Qiagen Omniscript RT Kit. Das so gewonnene cDNA-Template wurde in eine PCR mit Primern für ZPA, ZPB, ZPC eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Primer für humanes GAPDH verwendet. Zur Überprüfung auf Kontaminationen mit genomischer DNA (gDNA) wurden Primer für GAPDH eingesetzt, die allein gDNA, nicht aber cDNA amplifizieren konnten. Als weitere Kontrolle, wurden die Primer für ZPB und ZPC so gewählt, dass sie in ihrer genomischen Sequenz ein Intron enthalten. Dies führt dazu, dass bei der Amplifikation von gDNA ein Produkt entsteht, das um das eingeschlossene Intron größer ist als die Produkte einer reinen cDNA-Amplifikation. Die Primer für ZPA wurden so gewählt, dass sie in ihrer cDNA Sequenz eine Exon-Exon-Grenze überspannten. Wird diese Grenze durch ein Intron unterbrochen, können die Primer nicht mehr binden. Eine Amplifikation von gDNA war somit unmöglich. Zur Verdeutlichung wurden alle Primer mit Templates aus cDNA sowie Templates aus gDNA eingesetzt. Gewonnen wurde gDNA aus in RNAlater gelagerten Follikelzellen mit dem E.N.Z.A Kit (Peqlab).
Der Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten erfolgte nach demselben Protokoll wie für die Follikelzellen beschrieben.

2.2.5 Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR

Die real-time PCR bietet die Möglichkeit, das Entstehen von PCR-Produkten in Echtzeit zu verfolgen. Eine Einsatzmöglichkeit ist die Quantifizierung von mRNA-Transkripten in verschiedenen Probenmaterialien. Eine Methode beruht dabei darauf, dem PCR-Reaktionsgemisch einen Farbstoff wie SYBR Green I zuzugeben, der zur Fluoreszenz angeregt werden kann, sobald er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Wird im real-time PCR-Gerät die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen, kann deren Anstieg mit dem entstehenden PCR-Produkt gleichgesetzt werden. Die Reaktionskinetik der PCR zeigt dabei einen sigmoidalen Verlauf.

In den ersten Zyklen der Amplifikation steigt die Menge der PCR-Produkte nur langsam an. Sie erreicht dann einen Punkt, Crossing Point (CP), an dem die Reaktion einen exponentiellen Verlauf annimmt und geht gegen Ende in eine Plateauphase über. Im exponentiellen Abschnitt der Reaktion wird im günstigsten Fall pro Zyklus das PCR-Produkt verdoppelt. Die Effizienz der Amplifikation beträgt damit zwei, kann, abhängig von den Reaktionsbedingungen, aber auch niedriger liegen. Die Zahl der Zyklen, die eine PCR-Reaktion benötigt, um die exponentielle Phase zu zerreichen, hängt neben der Effizienz von der Zahl der Kopien gesuchter Sequenz im Ausgangstemplate ab (Abb. 3). Dies macht man sich bei der quantitativen PCR zunutze. Bei der absoluten Quantifizierung vergleicht man dabei Proben unbekannter Konzentration mit Standards der gleichen Sequenz und bekannter Konzentration. Die Ergebnisse dieser Methode lassen die zahlenmäßige Angabe von Transkripten im Probenmaterial zu.

Bei der relativen Quantifizierung werden Proben untereinander oder mit einem kontinuierlich transkribierten Gen, einem sogenannten housekeeping Gen, verglichen.

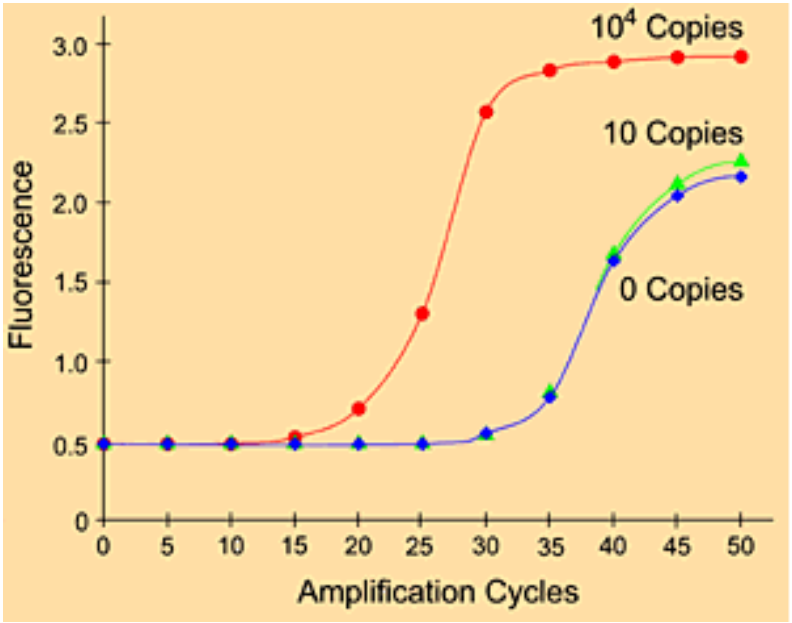


Abb. 3: Grafische Darstellung der real-time PCR. Die gemessene Fluoreszenz (y-Achse) ist gegen die PCR-Zyklen (x-Achse) aufgetragen. Proben mit hoher Kopienzahl erscheinen bei niedrigeren Zykluszahlen (rote Kurve), Proben mit niedrigen Kopienzahlen relativ später (grüne Kurve). Bei hohen Zykluszahlen können unspezifische PCR-Produkte nachweisbar sein (blaue Kurve). Aus Roche Applied Science Homepage.

2.2.5.1 Schmelzkurvenanalyse der entstandenen PCR-Produkte

Für alle PCR-Versuche im LightCycler wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Wird die Temperatur nach erfolgter Amplifikation langsam kontinuierlich erhöht und die Fluoreszenz durchgehend gemessen, kann bei der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts ein Einbruch der Fluoreszenz beobachtet werden. Durch dessen Denaturierung wird das SYBR Green I wieder freigesetzt und kann nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden. Unspezifische Produkte wie Primer-Dimere schmelzen dabei bei einer wesentlich geringeren Temperatur als die eigentlichen PCR-Produkte.

2.2.5.2 Absolute Quantifizierung von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR

Für die absolute Quantifizierung von ZP-mRNA-Transkripten aus Marmoset Oozyten wurden Primer für cDNA von ZPA, ZPB und ZPC sowie dem housekeeping Gen GAPDH hergestellt. Die Primer wurden in der Annealingtemperatur und der $MgCl_2$-Konzentration für die PCR optimiert. Die entstandenen Produkte wurden in geeignete Vektoren (Plasmide) kloniert und in kompetente Bakterien transfiziert.
Die Arbeiten wurden von Prof. Dr. Steger und Mitarbeitern im Institut für Veterinär Anatomie, Histologie und Embryologie der JLU-Giessen durchgeführt. Die so hergestellten RNA-Transkripte wurden 15min mit 10µl DNase I (ca. 30 IU) aus dem DNase I Kit von Qiagen inkubiert um die doppelsträngigen Matrizen abzubauen. Anschließend wurden die Transkripte mit einem Qiagen RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Die Menge der RNA-Transkripte wurde anschließend in TE-Puffer, pH 7,5 mit einem Hitachi U-3000 UV-Photospektrometer bestimmt und die Zahl der Transkripte pro µl berechnet. Danach wurden die Transkripte in logarithmischen Schritten seriell mit RNase-freiem Wasser verdünnt und portioniert in silikonisierten Reaktionsgefäßen bei –80°C gelagert. Alternativ wurde die Bestimmung der RNA-Transkriptanzahl auch mit einem RNA-Chip im Agilent Bioanalyzer durchgeführt.
Für die Quantifizierung wurde die one-step RT-PCR mit den beschriebenen Primern im Roche LightCycler optimiert. Diese Methode bietet den Vorteil, dass unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkriptase-Reaktion berücksichtigt werden. Hierzu wurde das Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit

Die beschriebenen *in vitro* Transkripte wurden in einer Verdünnungsreihe von 10^9 bis 10^5 Kopien als externe Standards zusammen mit RNA-Präparationen unbekannter Konzentration aus Marmoset Oozyten unterschiedlicher Größe in einer one-step real-time RT-PCR amplifiziert. Durch den Vergleich der CPs und der zugehörigen Kopienzahlen der Standards, mit den CPs der unbekannten Probe, errechnete die Software des LightCyclers die entsprechenden Kopienzahlen der Probe.
Die absolute Quantifizierung wurde auch mit Standards aus gereinigten PCR-Produkten vorgenommen. Hierzu wurden in einem konventionellen Blockcycler mit denselben Primern, die später zur Quantifizierung verwendet wurden, entsprechenden Sequenzen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden ausgeschnitten und die PCR-Produkte mit dem Qiagen Gel Extraction Kit extrahiert. Die Mengen der PCR-Produkte wurden photospektrometrisch bestimmt, anschließend in logarithmischen Schritten von 10^6 bis 10^2 verdünnt, portioniert und als externe Standards in den nachfolgenden Versuchen verwendet.

PCR-Protokoll für die absolute Quantifizierung

Zuerst wurden die RNA-Transkripte bei 50°C für 20min durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Es folgte für 15min ein Aktivierungsschritt der Hot Start DNA-Polymerase bei 95°C. Die Amplifikation fand in 50 Zyklen statt. Der Denaturrierungsschritt erfolgte bei einer Temperatur von 95°C für 15sec. Die jeweilige Annealingtemperatur wurde für 20sec konstant gehalten, darauf folgte die Elongation bei 72°C für 10sec. In allen Reaktionsgefäßen wurde die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen. Im Anschluss erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, wobei die Temperatur von 72°C langsam um 0,2°C pro Sekunde auf 95°C angehoben wurde. Die Fluoreszenz wurde während dieser Zeit kontinuierlich registriert.
Die Standards aus gereinigten PCR-Produkten wurden gleichzeitig mit den Proben, die relativ quantifiziert wurden, eingesetzt.

2.2.5.3 Relative Quantifizierung von ZPA-, ZPB-, und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten

Bei dieser Methode wird die Menge der Transkripte nicht in Kopienzahlen angegeben, sondern in Relation zu einem kontinuierlich exprimiertem Gen der zu untersuchenden Zellen. Für diesen Zweck kommen verschiedene so genannte housekeeping Gene, wie etwa 18s-RNA, Ubiquitin oder GAPDH, in Frage.
Für die relative Quantifizierung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten wurden Primer für die genannten Gene und das houskeeping Gen GAPDH hergestellt und für die Verwendung in der real-time PCR optimiert. Quantifiziert wurden totalRNA-Isolierungen aus zehn Oozyten der Kategorie 1, zehn Oozyten der Kategorie 2 und neun Oozyten der Kategorie 3 (Tab. 3). Die RT-Reaktion wurde für alle Proben gleichzeitig mit einem Qiagen Omniscript RT Kit durchgeführt. Alle Primer wurden für dan Roche FastStart DNA-Master SYBR Green I im LightCycler optimiert. Für die eigentliche Quantifizierung wurden alle Proben zusammen mit den entsprechenden Standards in Triplikaten im LightCycler inkubiert. Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm REST-XL (Pfaffl *et al*., 2002). Zusätzlich wurden die Daten auch in einem EXCEL-Diagramm grafisch dargestellt.

PCR-Protokoll für die relative Quantifizierung

Um die Hot Start Polymerase des PCR-Mix zu aktivieren, wurde initial die Temperatur im LightCycler für 10min bei 95°C konstant gehalten. Die Amplifikation erfolgte in 50 Zyklen. Die Denaturrierungstemperatur betrug 95°C für 15sec. Die jeweilige Annealingtemperatur wurde für 10sec konstant gehalten, die Elongation erfolgte bei 72°C für 10sec. Danach wurde die Temperatur auf einen Wert angehoben der 2°C unterhalb der für jedes Primerpaar spezifischen Schmelztemperatur (Tm) lag und die Fluoreszenz in allen Reaktionsgefäßen gemessen. Dadurch wurde garantiert, dass unspezifische PCR-Produkte geschmolzen wurden und nicht in die Messung mit einflossen.
Im Anschluss daran erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, wobei die Temperatur von 72°C langsam um 0,1°C pro Sekunde auf 95°C angehoben wurde. Die Fluoreszenz wurde während dieser Zeit kontinuierlich registriert.

2.2.5.4 Verwendete Kontrollen und Identifizierung der PCR-Produkte

Um etwaige Kontaminationen zu erkennen, wurde bei jedem PCR-Experiment eine Negativkontrolle mit der gleichen Menge an Wasser statt Template verwendet.Bei der geringen Zahl der in die RNA-Isolierung eingesetzten Oozyten wurden auf Kontrollen bezüglich gDNA-Kontaminationen verzichtet. Im Anschluss an jede PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um entstandene PCR-Produkte zu identifizieren und zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten zu diskriminieren.
Eine Auswahl aller Produkte wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und abgebildet. Zwei Produkte aller verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech sequenziert.

2.2.5.5 Statistische Auswertung der relativen Quantifizierung

Die Rohdaten der Amplifikationen im LightCycler wurden durch die Roche LC-Software verarbeitet. Die Software stellt den Verlauf der Fluoreszenz während der PCR und der Schmelzkurvenanalyse grafisch dar und berechnet die CPs der einzelnen Proben. Alle ermittelten Effizienzen der einzelnen Primerpaare sowie alle gemessenen CPs wurden mit dem Programm REST-XL (Pfaffl *et al*., 2002) verarbeitet. Des Weiteren wurden die CPs aller gemessenen ZP-Proben in einem Microsoft EXCEL-Balkendiagramm gegen die CPs des houskeeping Gens GAPDH aufgetragen. Die Errechnung der absoluten Kopienzahlen erfolgte ebenfalls durch die LightCycler-Analysesoftware. Die Kopienzahlen wurden zusätzlich in einem EXCEL Balkendiagramm dargestellt.

2.2.5.6 Ermittlung der PCR-Effizienzen für die real-time PCR

Um die Effizienz der einzelnen Amplifikationen zu bestimmen, wurde ein Teil der drei verschiedenen Proben vereinigt und seriell in Zehnerschritten bis zu tausendfach verdünnt. Jede dieser Proben wurde im LightCycler amplifiziert. Um inter- und intra-Test-Variabilitäten auszugleichen, wurde jede Probe in Triplikaten eingesetzt und jede Messung zweimal wiederholt. Die Software des LightCyclers trägt nach der Amplifikation die CPs gegen die

Konzentrationen in einer halblogarithmischen Darstellung auf. Aus der Steigung dieser Standardkurve kann die Effizienz der Amplifikation errechnet werden.
Um eine noch genauere Bestimmung der Effizienzen zu erreichen, wurden alle eingesetzten Proben sowie die als Standards verwendeten PCR-Produkte mit dem Programm LinReg-PCR analysiert (Ramakers *et al*., 2003). Das Programm ermittelt die Effizienzen für jede Probe und jeden Standard individuell. Für alle weiteren Berechnungen wurde der Mittelwert der einzelnen Effizienzen verwendet. Die möglichst exakte Übereinstimmung der Effizienzen zwischen Proben und Standards sind für die korrekte statistische Auswertung von Bedeutung.

2.2.6 Qualitativer Nachweis von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten in einzelnen Marmoset Oozyten

Für die Versuche mit einzelnen Oozyten wurden aus in RNAlater tiefgefrorenen Oozyten drei unter dem Stereomikroskop ausgewählt. Je eine Oozyte unbestimmter Größe wurde in ein Reaktionsgefäß zu 350µl Lysepuffer des RNeasy Mini Kits von Qiagen gegeben. Es folgte unmittelbar anschließend die Isolierung der totalRNA mit dem Qiagen Kit nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde für jedes Isolat eine reverse Transkriptasereaktion durchgeführt. Von der entstandenen cDNA wurden je 4µl als Template in die real-time PCR eingesetzt. ZPA, ZPB, und ZPC sowie GAPDH wurden dabei gleichzeitig bestimmt. Es wurden dieselben Primer wie für die Quantifizierung verwendet. Eines der Templates wurde für weitere Versuche seriell 1:10 und 1:100 mit Wasser verdünnt.

3 Ergebnisse

3.1 *In situ* Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB- und ZPC- Transkripten im Marmoset Ovar

Mit der *in situ* Hybridisierung auf Formalin fixierten Schnitten von Marmoset Ovarien wurde die Lokalisation der Transkription der ZPA-, ZPB- und ZPC-Gene ermittelt. Es kamen zwei unterschiedliche Ribosonden für ZPB-RNA, eine für ZPC-RNA sowie drei unterschiedliche Ribosonden für ZPA-RNA zum Einsatz. Die Gewebeschnitte wurden zu Beginn mit unterschiedlichen Konzentrationen (7,5-10µg/ml) Proteinase K permeabilisiert. Es erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Ribosonden bei der in vorhergehenden Experimenten optimierten Hybridisierungstemperatur. Anschließend wurden verschiedene Waschschritte, sowie das Aufbringen des gegen die Sondenmarkierung gerichteten, alkalische Phosphatase konjugierten Antikörpers. Die Detektion der spezifischen Hybridisierung erfolgte durch das NBT/BCIP-Detektionssystems. Im Fall einer positiven Hybridisierung kam es zu einem dunkelblauen bis braunen Farbniederschlag im Zytosol der Zellen. In verschiedenen Versuchen konnte mehrfach die Transkriptionen mit allen drei Ribosonden für ZPA-RNA, zwei Ribosonden für ZPB-RNA und mit einer Ribosonde für ZPC-RNA lokalisiert werden. Als Negativkontrolle dienten separate Schnitte, die mit markierten Ribosonden der gleichen Sequenz wie die native mRNA (sense Orientierung) inkubiert wurden. Die Bedingungen entsprachen denen der Sonden mit komplementärer Sequenz zur nativen mRNA (antisense Orientierung). Die Negativkontrollen zeigten bei einer generell schwachen Hintergrundfärbung keine spezifische Anfärbung.

3.1.1 Verwendete Ribosonden zur Lokalisation von ZPB-Transkripten

In ersten Experimenten konnten zwei verschiedene Ribosonden für den Nachweis von ZPB-Transkripten auf Formalin fixierten Gewebeschnitten von Marmoset Ovarien optimiert werden. Die Ribosonden wiesen komplementäre Basensequenzen zu jeweils unterschiedlichen Regionen des ZPB-mRNA-Moleküls auf. Die Sonde qCZPB (188bp) wurde bei 46°C, die Sonde ZPB-T3T7 (204bp) bei 48°C hybridisiert. In beiden Fällen wurden die Gewebeschnitte zur Vorbehandlung mit einer Proteinase K Konzentration von 10µg/ml inkubiert. Die

lichtmikroskopische Auswertung nach erfolgter Hybridisierung ist in den Abb. 4A; 4A1-3 für die Sonde qCZPB und in den Abb. 4C; 4C1-3 für die Sonde ZPB-T3T7 dargestellt. In Primordialfollikeln konnte nach Einsatz der Sonden qCZPB und ZPB-T3T7 spezifische Transkripte für ZPB in Oozyten und Follikelzellen nachgewiesen werden (Abb. 4A; 4A3; 4C3). Abb. 4A zeigt eine *in situ* Hybridisierung mit der Sonde qCZPB. In den dargestellten Primärfollikeln (I) ist eine deutliche, spezifische Färbung des Zytoplasmas der Oozyten (★) und Follikelzellen (FC) zu erkennen (siehe auch Abb. 4A3). Im Sekundärfollikel (II) konnte eine erfolgreiche Hybridisierung im Zytoplasma der Oozyte (★) und in den die Oozyte umgebenden Follikelzellen (FC) festgestellt werden (Abb. 4A; 4A2). Auffallend hierbei war die starke, gleichmäßige Färbung aller Follikelzellschichten bis hin zur Theka interna (TI). In Tertiärfollikeln konnte eine spezifische Farbreaktion nur im Zytoplasma der Follikelzellen, ähnlich der im Sekundärfollikel, beoachtet werden (Abb. 4A1). Eine Aussage über eine erfolgreiche *in situ* Hybridisierung in der Oozyte konnte nicht getroffen werden, da in diesem Tertiärfollikel keine Oozyte vorhanden war. Identische *in situ* Hybridisierungsergebnisse für Oozyten und Follikelzellen in Primordial-, Primär- und Sekundärfollikeln wurden nach Einsatz der Sonde ZPB-T3T7 erzielt (Abb. 4C2-3). Abb. 4C demonstriert einen Tertiärfollikel (III) nach *in situ* Hybridiesierung mit der Sonde ZPB-T3T7. Neben einer starken Markierung des Zytoplasmas der Oozyte und der Follikelzellen sind hier auch deutlich gefärbte Kumuluszellen (CC) erkennbar (Abb. 4C1). Die Negativkontrollen wiesen keinerlei spezifischen Färbungen auf (Abb. 4B; 4D).

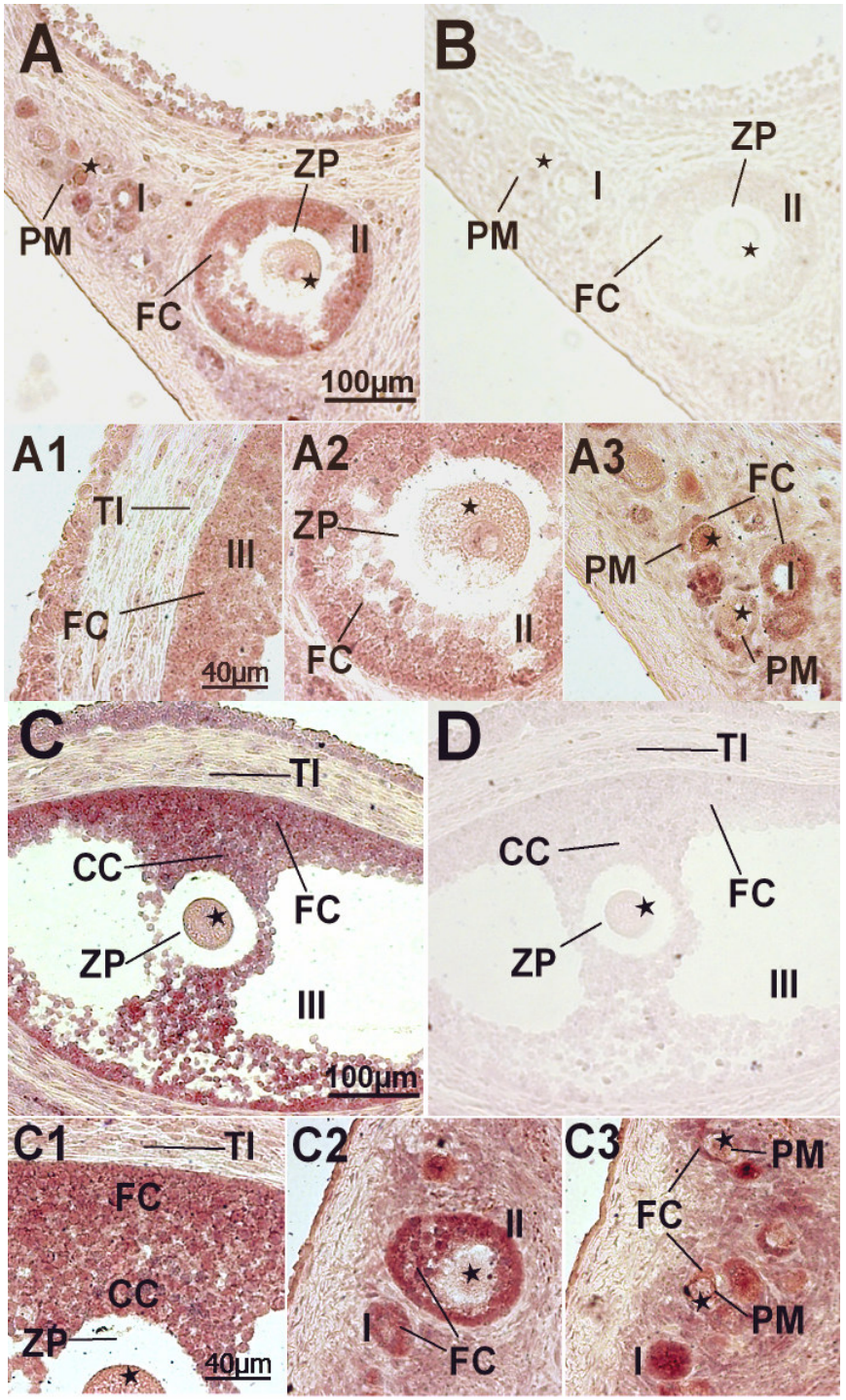


Abb. 4: Dargestellt ist eine *in situ* Hybridisierung auf Formalin fixierten Gewebeschnitten von Marmoset Ovarien. Zur Detektion von ZPB-RNA eingesetzt wurden die Ribosonde qCZPB antisense (A; A1-3) und die Ribosonde ZPB-T3T7 antisense (C; C1-3). Als Negativkontrollen wurden die Ribosonde qCZPB sense und Ribosonde ZPB-T3T7 sense (B; D) verwendet. FC = Follikelzellen; TI = Theka interna Zellen; ZP = Zona Pellucida; ⋆ = Oozyte; CC = Kumuluszellen; PF = Primordialfollikel; I = Primärfollikel; II = Sekundärfollikel; III = Tertiärfollikel.

3.1.2 Verwendete Ribosonden zur Lokalisation von ZPA-Transkripten

Ribosonde ZPA-R1F1

Mit der Ribosonde ZPA-R1F1 (Größe 206 bp) wurden nach der Optimierung zwei Versuche bei einer Hybridisierungstemperatur von 44°C durchgeführt (Abb. 5A; 5A1-3). Die Permeabilisierung erfolgte für alle Gewebeschnitte mit 10µg/ml Proteinase K. Schon in den Primordialfollikeln konnte eine starke Farbreaktion im Ooplasma beachtet werden, wohingegen Follikelzellen nicht gefärbt waren (Abb. 5A2). ZPA-Transkripte konnten bevorzugt im Zytoplasma der Oozyten von Primärfollikeln nachgewiesen werden (Abb. 5A1). In Sekundärfollikeln wurde bei einzelnen Oozyten zwar auch eine eindeutige Hybridisierung detektiert, die Intensität der Farbreaktion nahm aber mit steigenden Follikelstadium ab (Abb. 5A1). Oozyten aus Tertiärfollikeln konnten nicht bewertet werden, weil sich keine auf dem Schnitt befanden. Im Gegensatz dazu, konnte eine intensive, spezifische, gleichmäßige Anfärbung aller Follikelzellen vom Primärfollikel (Abb. 5A1-2) über den Sekundärfollikel (Abb. 5A; 5A1 und 5A3) bis zum Tertiärfollikel (nicht gezeigt) festgestellt werden. Bei diesen Versuchen fielen vereinzelt angefärbte Theka interna Zellen auf (Abb. 5A; 5A3 (⬅)). Die Negativkontrollen (sense) zeigten keinerlei spezifische Färbung (Abb. 5B).

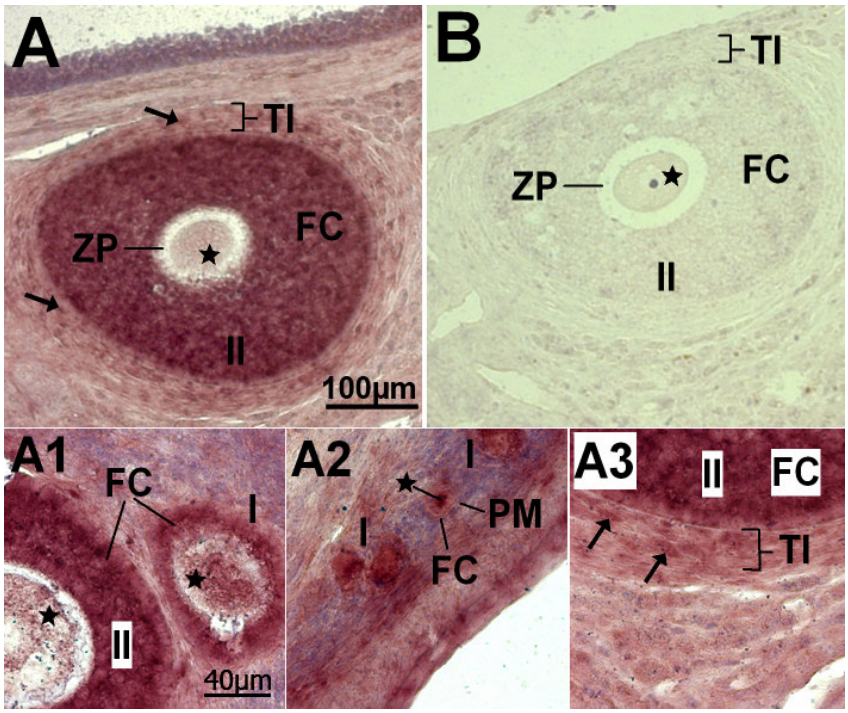
Ribosonde ZPA-GATC

Mit der Sonde ZPA-GATC (Größe 362bp) wurden nach Optimierung zwei Versuche durchgeführt. Im ersten Versuchsansatz wurden die Schnitte einmal mit 2,5µg/ml und einmal mit 5µg/ml Proteinase K behandelt. Im zweiten Experiment wurde die Permeabilisierung mit 15µg/ml Proteinase K durchgeführt. Die Hybridisierung fand jeweils bei 48°C statt. In den Primordialfollikeln war keine Hybridisierungsreaktion in Oozyten erkennbar, ein sehr schwaches Signal konnte in einzelnen Follikelzellen gefunden werden. (Abb. 5C3). Auch in anderen Follikelstadien konnte ein eindeutiger Nachweis von ZPA-Transkripten im Ooplasma von Oozyten mit dieser Sonde nicht erbracht werden. (Abb. 5C; 5C2-3). Prinzipiell war das Zytoplasma der Follikelzellen von Primär- Sekundär- und Tertiärfollikeln, von der ZP bis zur Theka interna, angefärbt (Abb. 5C; C1-3). Die ungefärbten Zellkerne sind hier als helle Aussparungen erkennbar (Abb. 5C; 5C1 (➤)). Die Kumuluszellen wiesen ein analoges Bild auf (Abb. 5C2). Die bereits beschriebene *(siehe Ribosonde ZPA-R1F1)*, vereinzelte Färbung von

Theka interna Zellen war bei dieser Sonde besonders deutlich ausgeprägt (Abb. 5C1 (⬅)). Keine spezifische Anfärbung wiesen die entsprechenden Negativkontrollen auf (Abb. 5D).

Ribosonde ZPA-SP6T7

Weitere zwei Versuche erfolgten mit der Ribosonde ZPA-SP6T7 (Größe 258 bp). Die Permeabilisierung wurde mit 10µg/ml Proteinase K, die Hybridisierung jeweils bei 44°C durchgeführt. Ab dem Primordialfollikel-Stadium bis zum antralen Follikel war ein spezifischer Nachweis von ZPA-Transkripten im Ooplasma und im Zytoplasma aller Follikelzellen möglich (Abb. 5E; 5E1-3). Im Gegensatz dazu konnte in Theka interna Zellen keine Hybridisierung beobachtet werden. In Abb. 5E sind exemplarisch Sekundärfollikel und ein Anschnitt eines antralen Follikels dargestellt. Abb. 5E1 zeigt den Detailausschnitt eines Sekundärfollikels. Die spezifischen Färbungen unterschieden sich in den einzelnen Versuchen nur in deren Intensität. Die Negativkontrollen zeigten eine geringe Hintergrundfärbung aber keinerlei spezifische Anfärbungen (Abb. 5F).



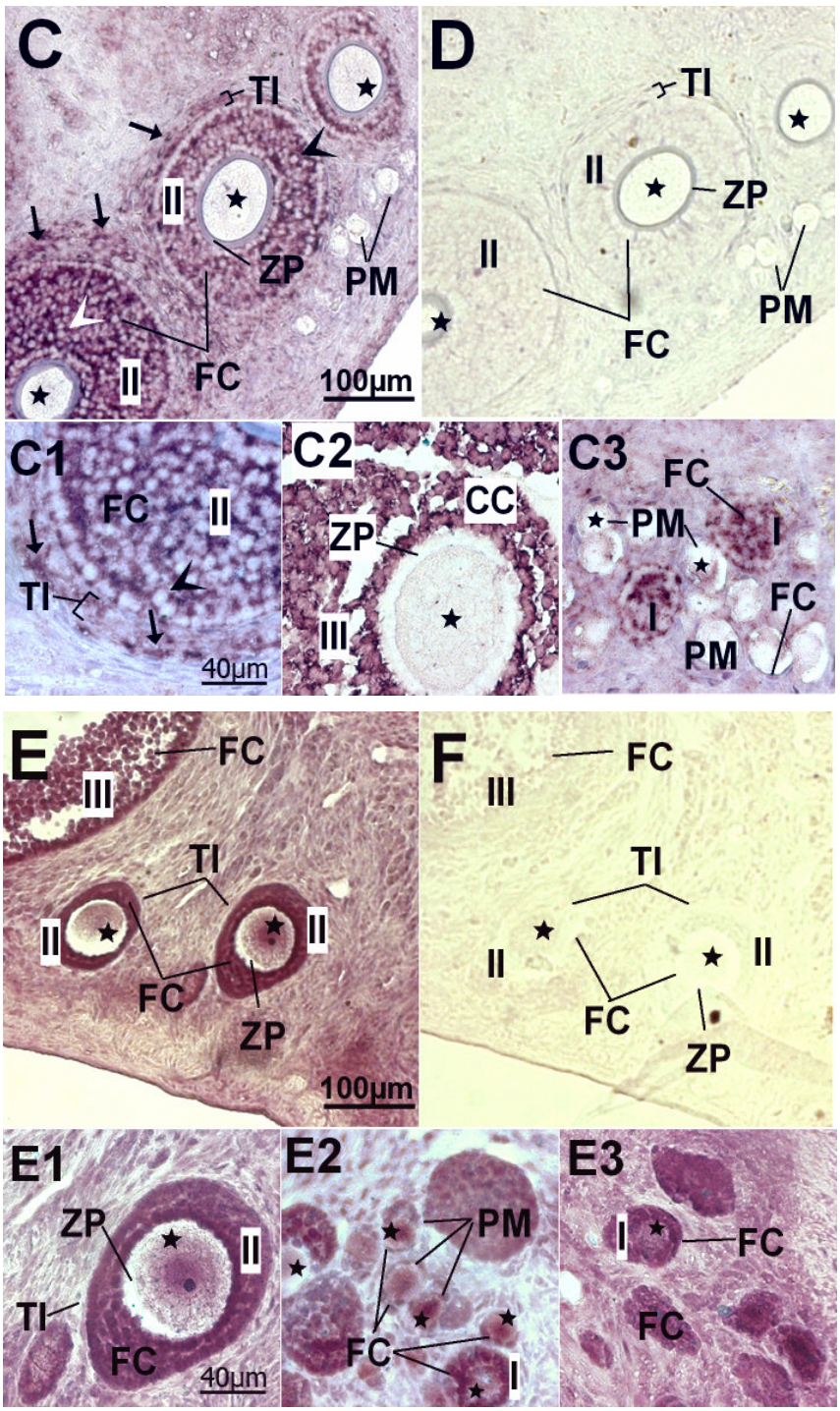


Abb. 5: Dargestellt ist eine *in situ* Hybridisierung auf Formalin fixierten Gewebeschnitten von Marmoset Ovarien. Zur Detektion von ZPA-RNA eingesetzt wurden die Ribosonde ZPA-R1F1 antisense (E; E1-E3), die Ribosonde ZPA-GATC antisense (C; C1-3) und die Ribosonde ZPA-SP6T7 antisense. Als Negativkontrollen wurden die Ribosonde ZPA-R1F1 sense, die Ribosonde ZPA-GATC sense und die Ribosonde ZPA-SP6T7 sense verwendet (B; D; F). FC = Follikelzellen; TI = Theka interna Zellen; ⬅ = gefärbte TI-Zellen; ZP = Zona Pellucida; ⋆ = Oozyte; CC = Kumuluszellen; PM = Primordialfollikel; I = Primärfollikel; II = Sekundärfollikel; III = Tertiärfollikel; Zellkerne = ➤.

3.1.3 Verwendete Ribosonde zur Lokalisation von ZPC-Transkripten

Mit der Ribosonde ZPC-R2F2 (118bp) wurden, nach Optimierung, zwei Versuche durchgeführt. Zur Permeabilisierung wurden wiederum 10µg/ml Proteinase K verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei 46°C. Das Ergebnis der Untersuchung für Zellen aus Primordialfollikel, Primärfollikel und Sekundärfollikel ist in Abb. 6A und 6A1-3 dargestellt. In den Primordialfollikeln konnte eine spezifische Hybridisierung nur in Follikelzellen detektiert werden (Abb. 6A3). Die Farbreaktion und somit der Nachweis von ZPC-Transkripten im Ooplasma der Oozyten aus Primär- und Sekundärfollikeln war sehr gering und nicht in allen Oozyten einheitlich. (Abb. 6A; A1-2). Oozyten von Tertiärfollikeln wiesen keine Reaktion auf (nicht gezeigt). In den Follikelzellen der Primär- und Sekundärfollikel war eine gleichmäßige Anfärbung erkennbar (Abb. 6A; 6A1-2), ebenso in Tertiärfollikeln (nicht gezeigt). Insgesamt war die Farbintensität nach der *in situ* Hybridisierung mit der Ribosonde ZPC-R2F2 schwächer als nach Einsatz der Ribosonden für die Lokalisierung von ZPA- und ZPB-RNA. Die Negativkontrolle wies keine spezifische Färbung auf (Abb. 6B).

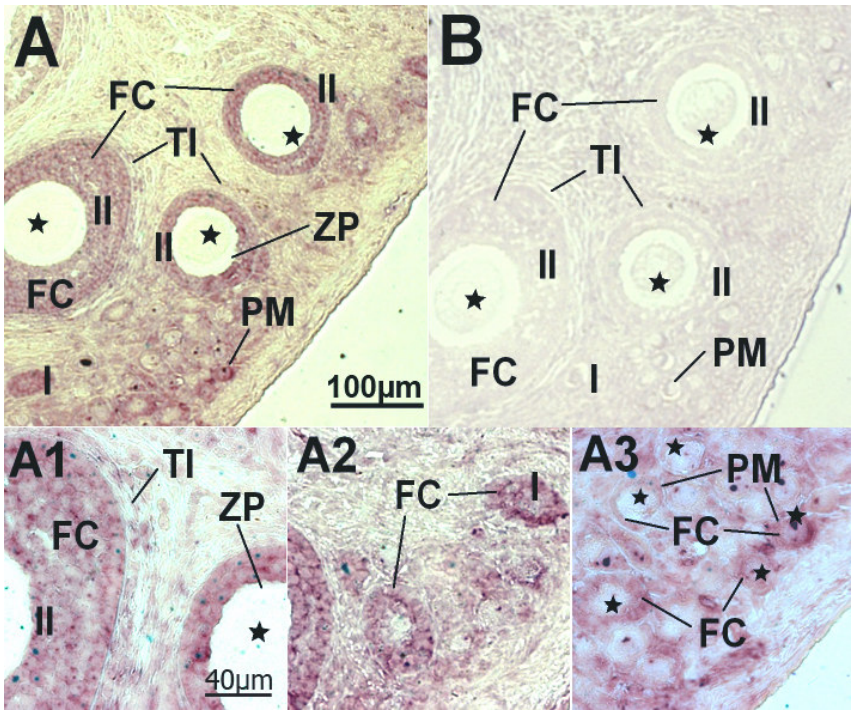


Abb. 6: Dargestellt ist eine *in situ* Hybridisierung auf Formalin fixierten Gewebeschnitten von Marmoset Ovarien. Zur Detektion von ZPC-RNA eingesetzt wurde die Ribosonde ZPC-R2F2 antisense (A, A1-3), Als Negativkontrolle wurde die Ribosonde ZPC-R2F2 sense verwendet (B). FC = Follikelzellen; TI = Theka interna Zellen; ZP = Zona Pellucida; ★ = Oozyte; PM = Primordialfollikel; I = Primärfollikel; II = Sekundärfollikel.

Zusammenfassung der Ergebnisse der in situ Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Schnitten von Marmoset Ovarien

Die verschiedenen antisense Ribosonden für ZPA-, ZPB- und ZPC-RNA wiesen untereinander ein ähnliches Reaktionsmuster auf. Eine spezifische Anfärbung des Ooplasmas konnten nicht in allen Oozyten beobachtet werden. In der Regel war diese eher schwächer als bei den Follikelzellen und bevorzugt in Oozyten von Primärfollikeln detektierbar. Wobei nach Hybridisierung mit den Sonden für ZPB-RNA die eindeutigste Färbung des Ooplasmas beobachtete wurde. Besonders ausgeprägt bei allen Sonden war der Farbniederschlag im Zytoplasma in den die Oozyten umgebenden Follikelzellen. Diese wurden in allen Schichten gleichmäßig, in Follikeln ab der Größe von Primärfollikeln angefärbt. Dabei konnte kein Unterschied im Färbeverhalten von Kumulus- und Granulosazellen festgestellt werden. Nach Einsatz der Sonden *ZPA-GATC* und ZPA-R1F1 waren uneinheitliche Anfärbungen einzelner Thekazellen zu beobachten. Eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der *in situ* Hybrisierung gibt die nachfolgende Tab. 4.

Tab. 4: Übersicht der Ergebnisse für die *in situ* Hybridisierung

Sonden	**Primordialfollikel**			**Primärfollikle**			**Sekundärfollikel**			**Tertiärfollikel**		
	Oo	FC	TI	Oo	FC	TI	Oo	FC	TI	Oo	FC	TI
qCZPB	+	+	–	++	++	–	++	++	–	∗	++	–
ZPB-T3T7	(+)	+	–	+	+	–	++	++	–	++	++	–
ZPA-SP6T7	++	++	–	++	++	–	++	+++	–	+	+++	–
ZPA-R1F1	+	(–)	–	+	(–)	–	+/–	+++	+/–	∗	++	+/–
ZPA-GATC	–	+/–	–	–	+	–	–	+++	+/–	–	+++	+/–
ZPC-R2F2	–	+	–	+/–	(+)	–	+/–	+	–	–	+	–

Dargestellt sind die Hybidisierungsreaktion entsprechend ihrer Farbintensität: negativ = –; nicht eindeutig negativ = (–); schwach positv = (+); positiv = +; stark positiv = ++; sehr stark positiv = +++; nur vereinzelt = +/–; Oozyten = Oo; Follikelzellen = FC; Theka interna Zellen = TI; auf untersuchtem Schnitt nicht vorhanden = ∗

3.2 Gewinnung von Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Das Sammeln der Oozyten und Follikelzellen aus Ovarien des Marmoset Affen für die RT-PCR und die real-time PCR erfolgte unter der Einhaltung allgemeiner Richtlinien für das Arbeiten mit RNA. Bei den Follikelzellen handelte es sich um ein Zellgemisch aus Kumulus– und Granulosazellen.

3.3 Isolierung von mRNA und totalRNA aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen

Alle beschriebenen Methoden wurden zuerst für ihre jeweilige Anwendung optimiert. Bei der Optimierung der RNA-Isolierungen aus Marmoset Oozyten und Follikelzellen zeigte sich, dass die Gewinnung von totalRNA über eine Silika-Gel-Säule der direkten Isolierung von mRNA mittels an magnetic Beads gekoppelten oligo-dT-Ankern überlegen war. Nach anschließender reversen Transkription und Amplifikation mittels PCR war eine bessere Produktausbeute mit revers transkribierter totalRNA zu beobachten. Dies zeigte sich besonders deutlich bei der Herstellung der Ribosonden für die *in situ* Hybridisierung mittels PCR und dem Nachweis von ZP-Proteintranskripten in Follikelzellen. Kontaminationen mit gDNA hingegen waren bei der direkten mRNA-Isolierung weniger vorhanden als bei einer totalRNA-Isolierung.

3.4 Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten und Follikelzellen mittels RT-PCR

3.4.1 Nachweis in Follikelzellen

Mit der hochsensitiven Methode der RT-PCR wurde in verschiedenen Versuchen ZP-Transkripte in Follikelzellen des Marmoset Affen nachgewiesen. Es wurde totalRNA und mRNA aus verschiedenen Follikelzellpräparationen unbestimmter Anzahl isoliert und revers transkribiert. Die entstandene cDNA wurde als Template für die PCR mit Primern für ZPA, ZPB sowie für ZPC eingesetzt (Tab. 5). Als Positivkontrolle diente GAPDH (HRGAPDH). Um eine Kontamination der Proben mit gDNA auszuschließen, wurden verschiedene Kontrollen eingesetzt. Die für diese Versuche verwendeten Primer für ZPB und ZPC waren so gewählt, dass unterschiedliche Fragmentlängen bei der Verwendung von cDNA beziehungsweise von

gDNA als Template entstanden. Die Primerwahl für ZPA erfolgte so, dass bei einer Amplifikation von gDNA kein Produkt zu erwarten war. Dies sollte sicherstellen, dass nur revers transkribierte mRNA ein positives PCR-Ergebnis zeigte, und nicht gDNA, was als falsch positiv hätte gewertet werden müssen. Zudem wurde ein spezifischer Primer für GAPDH eingesetzt, welcher ausschließlich gDNA amplifizierte (Tab. 5; HIGAPDH). Eine Leerprobe mit Wasser statt Template wurde in jedem Experiment zum Ausschluss von Kontaminationen mitgeführt.

Tab. 5: Aufstellung der zur Ermittlung der ZP-Glykoprotein Expression in Follikelzellen verwendeten Primer

Primer	**Sequenz**	**Position**	**AT**	**Größe**	**gDNA**
5-qCZPB	5‘-CAC AGA ACA GAC CCC CAC CTA G-3‘	1200 – 1221	60° C	188	263bp Exon 9
3-qCZPB	5‘-CGC TGG TGG TGT GAG GGA AAT G-3	1366 – 1387			Exon 10
5-qCZPA	5‘-CAA GCG AGC CAC AGG AAC CAA TG-3‘	1941 – 1963	60°C	179	Exon 18
3-qCZPA	5‘-AGC CTG CCT CCT CCC TTG TTT CA-3‘	2097 – 2119			Exon 19
5-qCZPC	5‘-TGT GGC ACT CCA AGC CAT GC-3‘	979 – 998	62° C	163	1393bp Exon 7
3-qCZPC	5‘-AGG GCG AGC CAC AGG AAC CAA TG-3‘	1122 – 1141			Exon 8
5-HRGAPDH	5‘-TCA TCA GCA ATG CCT CCT GC-3‘	Unpubli-zierte Daten	59°C	234	
3-HRGAPDH	5‘-GCT CAG GGA TGA CCT TGC C-3‘				
5-HIGAPDH	5‘-GGC TCC CAC CTT TCT CAT C-3‘	Unpubli-zierte Daten	59°C		240bp
3-HGAPDH	5‘-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3‘				

Angegeben sind die Sequenz, die Position, die Annealingtemperatur (AT), sowie die Fragmentgrößen des zu erwartenden PCR-Produkts in Basenpaaren (bp) für cDNA- und gDNA-Templates.

Nachweis von ZPA- und ZPC-Transkripten in Templates aus totalRNA und mRNA

In diesem Versuch wurden zwei verschiedene Templates aus Marmoset Follikelzellen eingesetzt. mRNA aus Follikelzellen der Follikelgröße 600-1000µm wurden mit dem CPG-Kit der Firma Natutec isoliert. totalRNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit isoliert und zweimal für 15min mit DNase I bei 37°C inkubiert. Es folgte die reverse Transkription und die PCR mit spezifischen Primern für ZPA und ZPC. Primer für ZPB standen zum Zeitpunkt des Versuchs nicht zur Verfügung. Im Agarosegel zeigten sich nach elektrophoretischer Auftrennung für beide Isolierungsmethoden PCR-Fragmente für ZPA (179bp), ZPC (163bp) sowie GAPDH (234bp) in den für cDNA-Templates zu erwartenden Größen (Abb. 7, Spuren 2 u. 3; 5 u. 6; 11 u.12). Weitere Fragmente, die auf eine Kontamination des Templates mit gDNA hingewiesen hätten, wurden nicht beobachtet. Die Kontrollen auf Verunreinigungen mit gDNA mittels HIGAPDH waren in beiden Fällen negativ (Abb. 7, Spuren 8 u. 9). Die Primer für ZPC zeigten in der Negativkontrolle eine äußerst schwache Bande (Abb. 7, Spur 7), die restlichen Negativkontrollen wiesen kein Produkt auf (Abb. 7, Spuren 4, 10, 13).

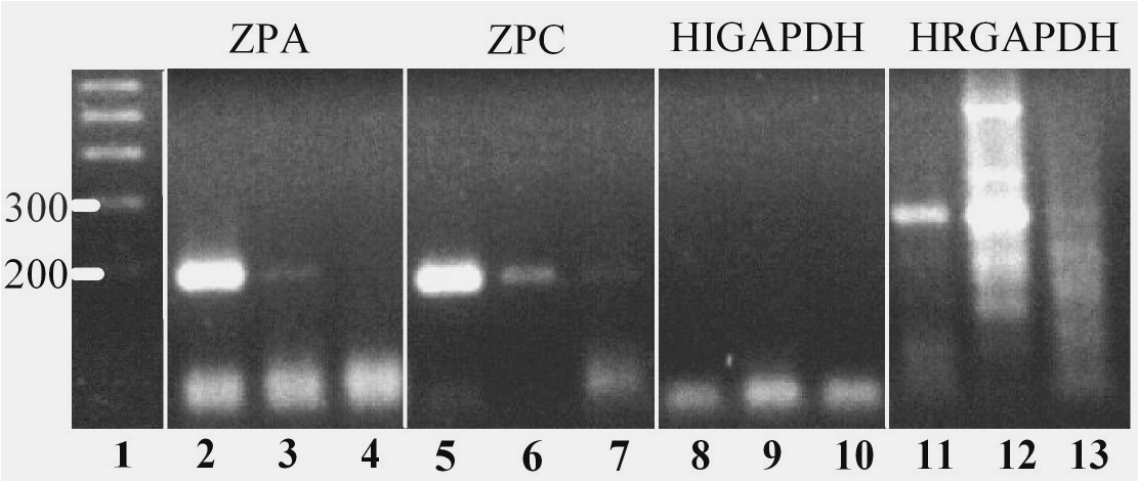


Abb. 7: Dargestellt ist ein 2%iges Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. Gezeigt ist die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate nach PCR mit Templates aus Marmoset Follikelzellen. Aufgetragen sind für ZPA (179bp), ZPC (163bp), HIGAPDH (240bp) und HRGAPDH (234bp) jeweils Produkte einer PCR mit einem cDNA-Template hergestellt aus totalRNA (Spuren 2, 5, 8, 11), eine Probe mit einem cDNA Template aus mRNA (Spuren 3, 6, 9, 12) sowie eine Negativkontrolle (Spuren 4, 7, 10, 13). Links am Bildrand ist die Basenpaarmarkierung von 200 und 300 bp angegeben (Spur1).

Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC- Transkripten in Templates aus totalRNA

Bei diesem Versuch wurden Marmoset Follikelzellen aus Follikeln unbestimmter Größe verwendet. Die totalRNA-Isolierung erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit. Das Template wurde zweimal für 15min bei 37°C mit DNase I verdaut. Nach der reversen Transkription, PCR und elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte waren für ZPA (179bp), ZPB (188bp), ZPC (163bp), HRGAPDH (234bp) und HIGAPDH (240bp) jeweils eine Bande bei der für das cDNA-Template zu erwarteten Größe erkennbar (Abb. 8, Spuren 2, 5, 9, 13, 17). Weitere Banden, die auf Kontaminationen des Templates mit gDNA hingewiesen hätten, waren nicht vorhanden. Zur Kontrolle wurden die Primer auch mit einem Template aus gDNA eingesetzt. Mit Primern für ZPB wurde dabei die entsprechende Bande (263bp) dargestellt (Abb. 8, Spur 3). Mit Primern für ZPA zeigte sich eine Bande auf derselben Höhe wie für das cDNA-Template (179bp), was vom Primerdesign her zunächst einmal ausgeschlossen schien (Abb. 8, Spur 6). In einem Teil der totalRNA-Isolierung, die vor der reversen Transkription abgenommen und als weitere Kontrolle auf gDNA-Kontamination mit besagtem Primer für ZPA amplifiziert wurde, zeigte sich dagegen kein identisches Fragment (Abb. 8, Spur 7). Die Amplifikation eines ZPC-Fragments aus einem gDNA-Template war nicht möglich (Abb. 8, Spur 10). Mithilfe von HIGAPDH-Primern als Kontrolle wurde ein Fragment der Größe von 240bp dargestellt, was auf das Vorhandensein von Kontaminationen mit gDNA im cDNA-Template hinwies (Abb. 8, Spur 17). In der Negativkontrolle mit Primern für GAPDH (234bp) war eine schwache Bande sichtbar, was auf eine mögliche Verunreinigung hinwies (Abb. 8, Spur 15).

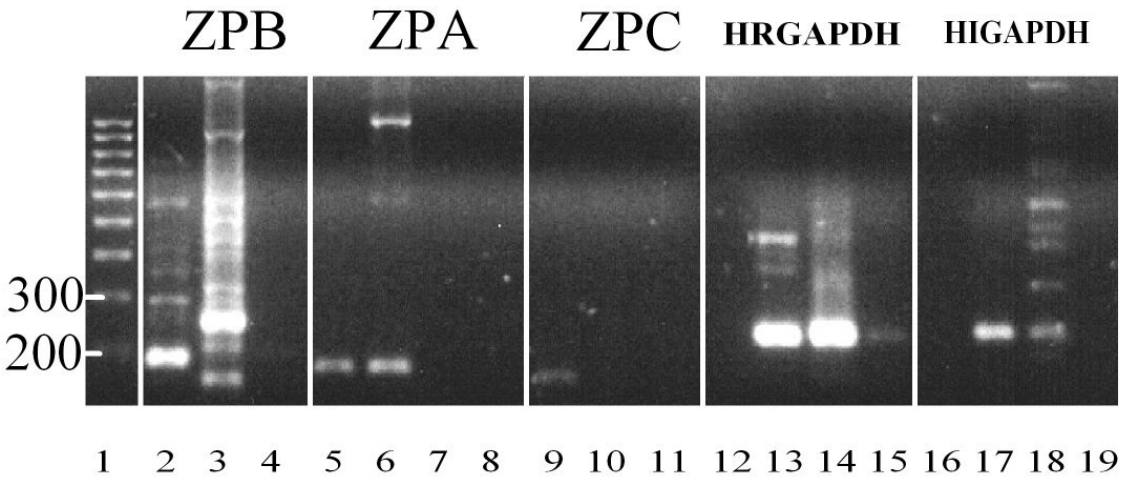


Abb. 8: Dargestellt ist ein 2%iges Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. Gezeigt ist die elektrophoretische Auftrennung von Amplifikaten nach PCR mit Templates aus Marmoset Follikelzellen. Aufgetragen sind für ZPB (188bp), ZPA (179bp), ZPC (163bp), HRGAPDH (234bp) und HIGAPDH (240bp) jeweils Produkte einer PCR mit einem cDNA-Template (Spuren 2, 5, 9, 13, 17), einem gDNA-Template (Spuren 3, 6, 10, 14, 18) sowie einer Negativkontrolle (Spuren 4, 8, 11, 15, 19). Für ZPA ist in Spur 7 zusätzlich ein Template aus totalRNA eingesetzt. Links am Bildrand ist die Basenpaarmarkierung von 200 und 300 bp angegeben (Spur 1). Spuren 12 und 16 wurden leer gelassen.

In verschiedenen Versuchen konnten mit spezifischen Primern der Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-RNA in Templates aus Follikelzellen des Marmoset Affen geführt werden. Der Nachweis gelang sowohl in Templates aus totalRNA als auch in Templates aus mRNA. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Kontrollen wurden falsch positive Ergebnisse durch Kontaminationen der Reaktionsansätze mit gDNA weitgehend ausgeschlossen.

3.4.2 Nachweis in Oozyten

Neben den Experimenten mit Follikelzellen, wurden auch RT-PCR-Versuche mit totalRNA aus isolierten Marmoset Oozyten durchgeführt. Es wurden dieselben Primer verwendet wie zum Nachweis von ZP-RNA in Follikelzellen. In den gewonnenen Oozyten konnten ebenfalls Transkripte der drei ZP-Glykoproteine mit den entsprechenden Größen (ZPA=179bp; ZPB=188bp; ZPC=163bp) detektiert werden (nicht gezeigt). Damit wurden Ergebnisse weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigt (Bogner *et al*., 2004). Der Nachweis von ZPA-,

ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mithilfe der konventionelle RT-PCR lies allerdings nur eine qualitative Aussage der Expression zu. Diese Erkenntnisse dienten jedoch als Ausgangspunkt für Untersuchungen zur Quantifizierung der Expression von ZP-Glykoproteinen in Marmoset Oozyten.

3.5 Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR

Alle drei ZP-Proteintranskripte wurden mittels real-time PCR in wiederholten Experimenten mit jeweils spezifischen Primern (Tab. 6) amplifiziert. Alle Primer konnten für die Anwendung im LightCycler optimiert werden, so dass sich die Amplifikationskurven für alle untersuchten Gene in ihrem typischen Verlauf darstellten (Abb. 9). Unspezifische PCR-Produkte, wie zum Beispiel Primerdimere, waren nur in Ausnahmefällen zu beobachten. Nach der Isolierung der totalRNA aus den verschiedenen Materialien wurde diese in je drei Probenansätzen in die reverse Transkriptase-Reaktion mit Random Hexamer Primern eingesetzt. Alle Materialien wurden gleichzeitig mit identischem Reaktionsgemisch revers transkribiert. Verglichen wurden RT-Produkte aus zehn Marmoset Oozyten der Kategorie 1, zehn Oozyten der Kategorie 2, sowie neun Oozyten der Kategorie 3 (Tab. 3). GAPDH diente als housekeeping Gen und zur Normalisierung der Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Zellzahlen und Volumina. Für die statistische Auswertung wurden verschiedene Methoden gewählt. Neben der grafischen Darstellung der Crossing Points (CPs) und der absoluten Kopienzahlen wurde auch eine Auswertung mit dem Programm REST-XL vorgenommen.

Tab. 6: Aufstellung der für die real-time PCR verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Position	AT	Tm	Größe
5-qCZPB 3-qCZPB	5‘-CAC AGA ACA GAC CCC CAC CTA G-3‘ 5‘-CGC TGG TGG TGT GAG GGA AAT G-3	1200-1221 1366-1387	60° C	88°C	188
CZPA-220-F1 CZPA-220-R1	5‘-ACT CCC CTC TGT GTT CTG TG-3‘ 5‘-CTG CCT CCT CCC TTG TTT-3‘	1899 – 1917 2099 – 2117	60° C	85°C	220
5-qCZPC 3-qCZPC	5‘-TGT GGC ACT CCA AGC CAT GC-3‘ AGG GCG AGC CAC AGG AAC CAA TG-3‘	979 – 998 1122-1141	62° C	87°C	163
5‘HRGAPDH 3‘HRGAPDH	5‘-TCA TCA GCA ATG CCT CCT GC-3‘ 5‘-GCT CAG GGA TGA CCT TGC C-3‘	Unpublizierte Daten	59°C	89°C	234

Angegeben sind die Sequenzen, die ermittelten Positionen, die Annealingtemperaturen (AT), die Schmelztemperaturen (Tm) sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp).

In Abb. 9 sind am Beispiel von ZPA exemplarisch die Amplifikationskurven eines real-time PCR-Experiments gezeigt. Die zu quantifizierenden Proben aus Oozyten der drei unterschiedlichen Follikelgrößen (Kategorie 1, 2 und 3) sind farbig dargestellt, sie wurden zusammen mit externen cDNA-Standards (schwarz), mit definierter cDNA-Kopienmenge amplifiziert. Die Negativkontrolle ist gelb dargestellt. Nach der Optimierung der real-time PCR für die verwendeten Primer konnten alle ZP-Glykoproteintranskripte in den verschiednen Probematerialien quantifiziert werden.

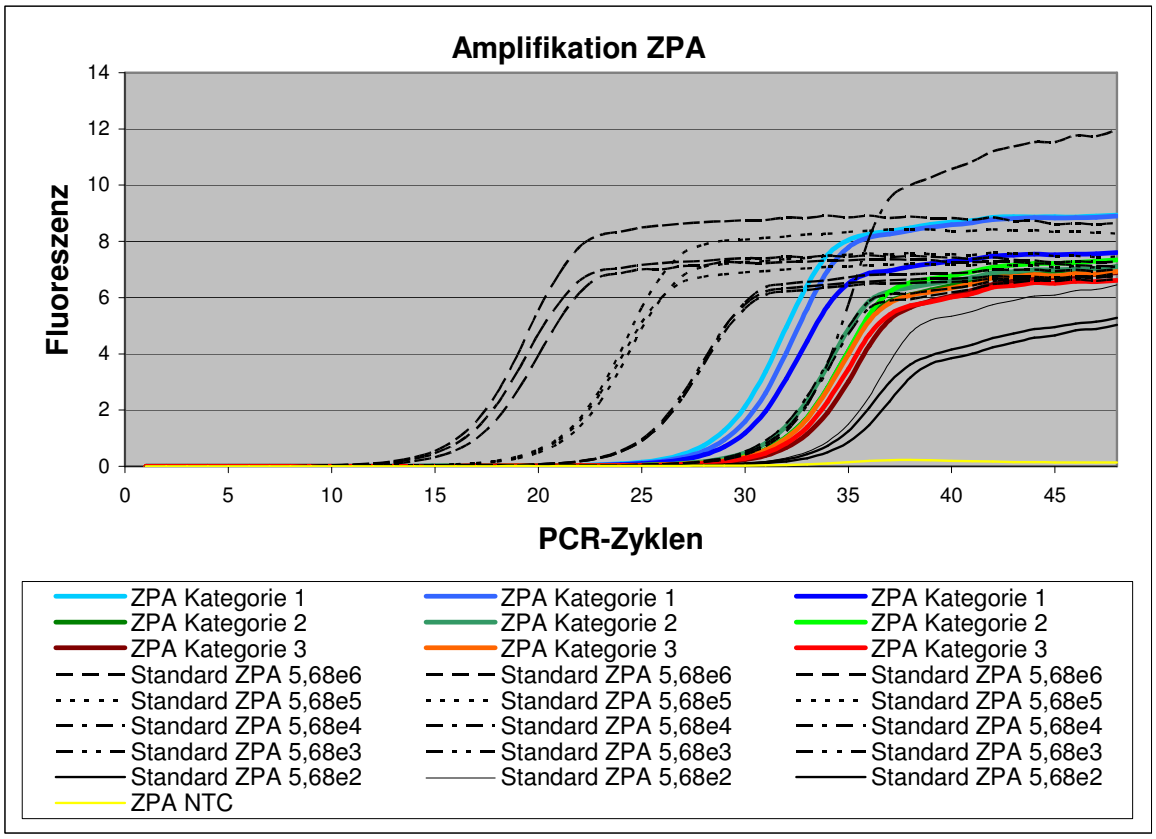


Abb. 9: Darstellung des gemessenen Fluoreszenz-Verlaufs in der real-time PCR am Beispiel von ZPA. Der Verlauf der Kurven kann mit der Menge der entstehenden PCR-Produkte gleichgesetzt werden. Die quantifizierten Proben aus den drei verschiedenen Kategorien von Marmoset Oozyten (farbig) und cDNA-Standards bekannter Konzentration (schwarz) sind in Triplikaten eingesetzt. Die Negativkontrolle (gelb) einzeln. Die Messung der Fluoreszenz in den Reaktionsgefäßen (y-Achse) erfolgt am Ende jedes einzelnen PCR-Zyklus (x-Achse).

3.5.1 Identifizierung der PCR-Produkte

Nach jedem Versuch wurden die Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse identifiziert (3.5.1.1). Für alle Versuche ergab sich dabei immer die für das spezifische PCR-Produkt typische Schmelztemperatur. Zur Verifizierung der entstanden PCR-Produkte wurde aus jeder untersuchten Follikelgröße für jedes Gen jeweils eines der identischen PCR-Produkte in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.5.1.2). Jeweils zwei PCR-Produkte wurden zusammengefasst und von der Firma MWG-Biotech sequenziert (3.5.1.3).

3.5.1.1 Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte

Die spezifische Schmelztemperatur hängt zum einem von der Anzahl und der Sequenz der Basenpaare des Produktes und zum anderen von dessen GC-Gehalt ab. Sie kann so zur Identifikation eines spezifischen PCR-Produktes herangezogen werden. Die Schmelztemperaturen für die bei der Quantifizierung entstandenen PCR-Produkte sind in Tab. 7 aufgestellt. Für alle Produkte bestanden nur geringe Abweichungen von der mittleren Schmelztemperatur der spezifischen PCR-Produkte.

Tab. 7: Auswertung der Schmelztemperaturen (Tm in °C) für die untersuchten Gene

Schmelztemperaturen (Tm in °C)	**ZPB**		**ZPA**		**ZPC**		**GAPDH**	
	Probe	Stand.	Probe	Stand.	Probe	Stand.	Probe	Stand.
Mittelwert	88,57	88,02	85,85	85,31	89,95	89,54	89,79	89,36
SD	0,097	0,286	0,178	0,138	0,147	0,144	0,155	0,209

Alle Proben wurden einzeln ausgewertet und gemittelt. Die Schmelztemperaturen sind für die zu messenden Proben aus Marmoset Oozyten (Probe) und die verwendeten cDNA Standards (Stand.) der gleichen Sequenz getrennt angegeben, wobei eine möglichst hohe Übereinstimmung erwünscht war. SD=Standardabweichung.

In nur einem von insgesamt 12 Versuchen konnte eine Kontamination in einer Negativkontrolle (NTC) mit einem vergleichbaren Schmelzpunkt wie das gesuchte PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 10 und Abb. 11, rot-gestrichelt). Da die Kontamination aber erst nach Zyklus 35 auftrat, also außerhalb des normalen Messbereichs, wurden auch die Werte dieses Versuchs in die Auswertung mit einbezogen.

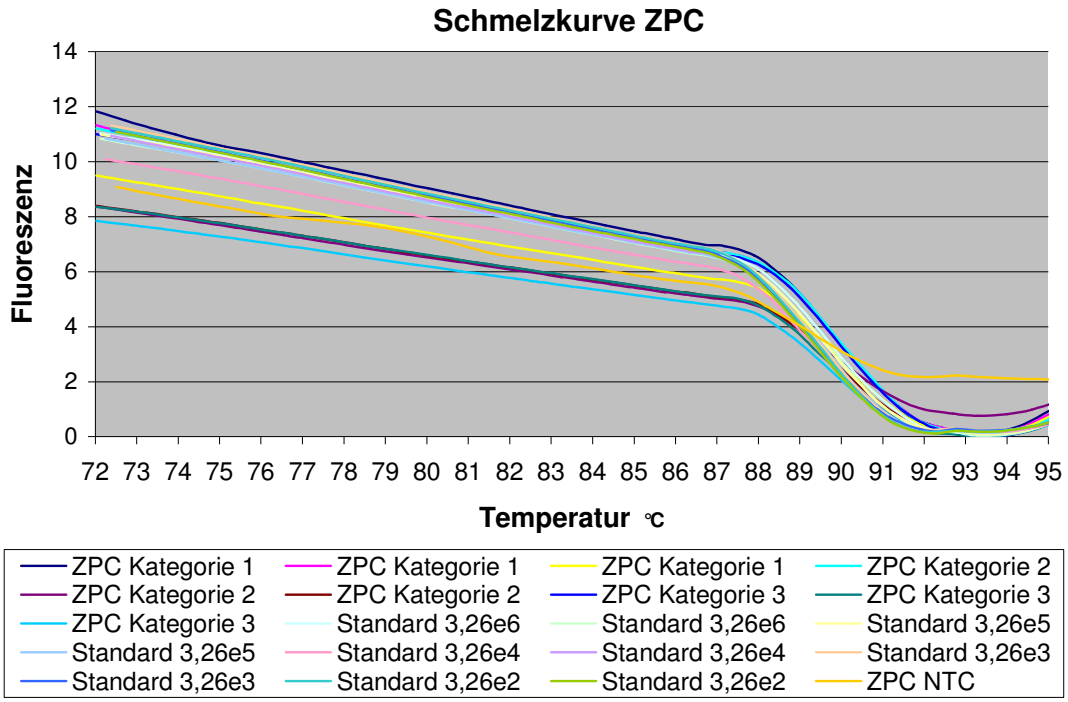


Abb. 10: Schmelzkurvenverlauf der quantifizierten Proben aus den drei Kategorien von Marmoset Oozyten sowie die cDNA-Standards am Beispiel von ZPC. Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenz-Verläufe bei steigender Temperatur. Die Negativkontrolle (NTC, rot gestrichelt) zeigt dasselbe Schmelzverhalten wie Proben und Standards. Auf der x-Achse aufgetragen ist die Temperatur in °C, auf der y-Achse die gemessene Fluoreszenz.

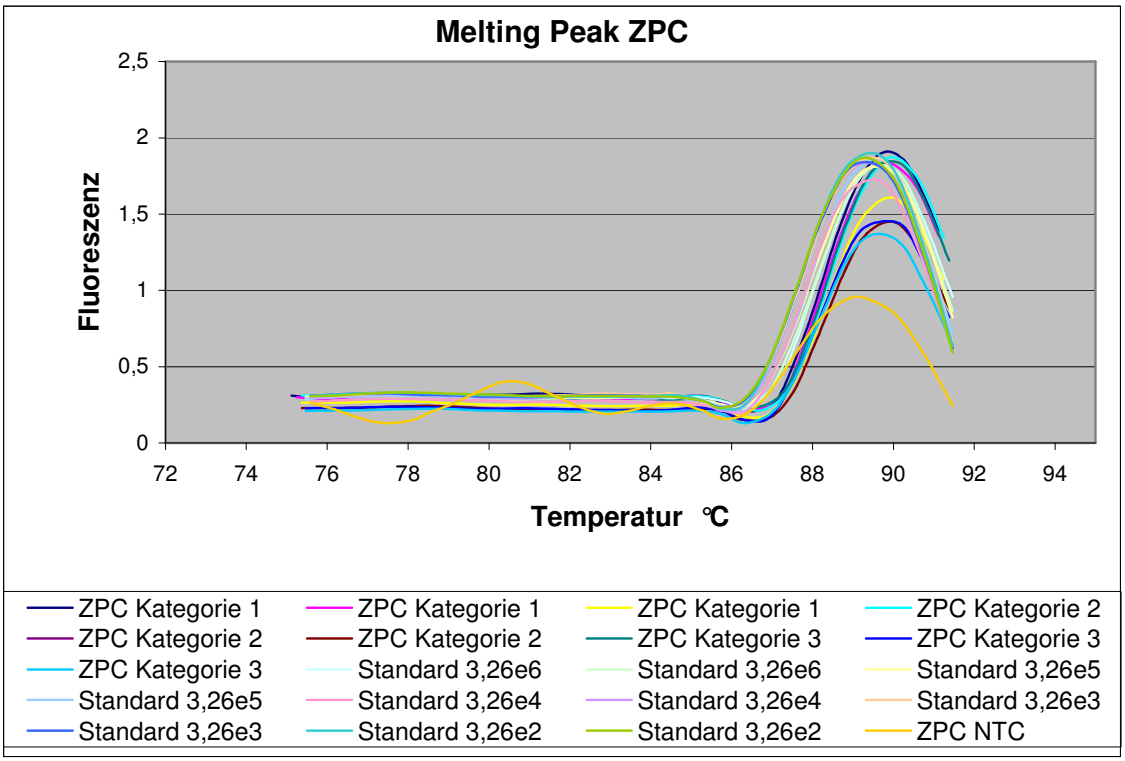


Abb. 11: Dargestellt sind die Melting Peaks der Proben und Standards nach der Schmelzkurvenanalyse (s. Abb. 10) am Beispiel der ZPC-Fragmente. Die Fluoreszenz ist in der ersten negativen Ableitung gegen die Temperatur aufgetragen. Dadurch wird eine bessere Darstellung des Schmelzverhaltens erreicht. Auf der x-Achse aufgetragen ist die Temperatur in °C, auf der y-Achse die Fluoreszenz.

Die Schmelzkurvenanalyse wurde zur Identifizierung der PCR-Produkte nach jedem Versuch durchgeführt. Alle spezifischen PCR-Produkte wiesen in jedem Fall ihre entsprechenden Schmelztemperaturen auf. In nur einem Experiment konnte eine Kontamination der Leerprobe festgestellt werden.

3.5.1.2 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Neben der Identifizierung mittels Schmelzkurvenanalyse wurden eine Auswahl der PCR-Produkte auch auf ein Agarosegel aufgetragen und mithilfe eines geeigneten bp-Markers anhand ihrer Größe identifiziert (Abb. 12).

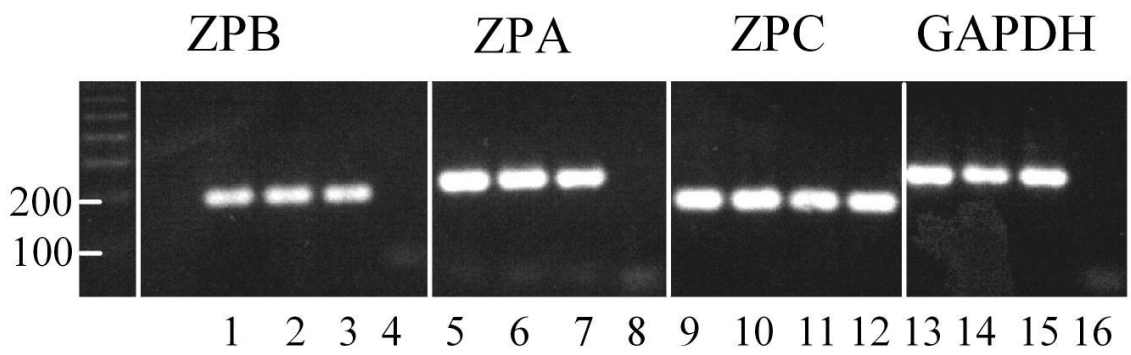


Abb. 12*:* Dargestellt ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes, 1,5%iges Agarosegel. Gezeigt ist die elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten für ZPB (188bp), ZPA (220bp), ZPC (163bp) und GAPDH (234bp). Die quantifizierten Proben aus Oozyten der Kategorie 1 finden sich in den Spuren 1, 5, 9 und 13, Proben aus Oozyten der Kategorie 2 in den Spuren 2, 6, 10 und 14 und Proben aus Oozyten der Kategorie 3 in den Spuren 3, 7, 11 und 15. Die Negativkontrollen befinden sind in den Spuren 4, 8, 12 und 16.

Auf das Gel wurde für jedes untersuchte Gen und für jede untersuchte Follikelgröße eine von insgesamt neun identischen PCR-Produkten aufgetragen. Die zuvor für ZPC beschriebene Kontamination (3.5.1.1) ist auch im Agarosegel deutlich erkennbar (Abb. 12, Spur 12). Anhand des bp-Markers konnte die geforderte Größe für die jeweiligen PCR-Produkte annähernd bestimmt werden. (Tab. 6)

3.5.1.3 Sequenzierung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierung wurden für jedes untersuchte Gen und für jede untersuchte Follikelgröße zwei von insgesamt neun identischen Proben vereinigt und von der Firma MWG-Biotech im Comfort-Read-Verfahren sequenziert. Die Nukleotidsequenz wurde dabei für den Minusstrang ausgehend vom jeweiligen 3'-Primer und der Plusstrang ausgehend vom jeweiligen 5'-Primer ermittelt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden über das Internetportal NCBI-BLAST mit der jeweiligen Sequenz der Datenbank verglichen. Eine Übersicht über die Sequenzierungsergebnisse gibt Tab. 8.

Sequenzierung des Marmoset ZPB-Fragments

Die Sequenzierung des Plusstrangs konnte von MWG-Biotech auch in mehreren Versuchen nicht durchgeführt werden. Die Sequenzierung des Minusstrangs ergab eine Sequenz von 161 Basen mit einer Übereinstimmung von 94% mit der Marmoset Sequenz der Datenbank.

Sequenzierung des Marmoset ZPA-Fragments

Die Sequenzierung des Plusstrangs ergab ein Fragment mit 224 Basen mit einer Übereinstimmung von 96% mit der Sequenz der Datenbank. Die Sequenzierung ergab für den Minusstrang ein Fragment mit einer Länge von 236 Basen. Die Übereinstimmung der Nukleotidabfolge für ZPA von Marmoset verglichen mit der Datenbank betrug 99%.

Sequenzierung des Marmoset ZPC-Fragments

Bei der Sequenzierung des Plusstrangs wurde ein Fragment mit einer Länge von 177 Basen und einer Übereinstimmung von 100% mit der Sequenz der Datenbank identifiziert. Für den Minusstrang stellte sich ein Fragment mit einer Länge von 179 Basen dar, wobei die Übereinstimmung der Nukleotidabfolge für ZPA von Marmoset, verglichen mit der Datenbank, 97% betrug.

Sequenzierung von humanem GAPDH

Sowohl der Plusstrang mit einer Länge von 246 Basen als auch der Minusstrang mit einer Länge von 232 Basen ergaben eine Übereinstimmung von 95% mit der humanen Sequenz der Datenbank.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Fragmente der ZP-Glykoproteine sowie GAPDH in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Sequenzierungsergebnisse der Amplifikate von ZPA, ZPB, ZPC und GAPDH

	ZPB Plus	**ZPB Minus**	**ZPA Plus**	**ZPA Minus**	**ZPC Plus**	**ZPC Minus**	**GAPDH Plus**	**GAPDH Minus**
Länge (bp)	-	161	224	236	177	179	246	232
Übereinstimmung	-	94%	96%	99%	100%	97%	95%	95%

Die Angaben beziehen sich jeweils auf den Plus- und den Minusstrang. Angegeben sind die Länge in Basenpaaren (bp) und die prozentuale Übereinstimmung des Sequenzierungsergebnises mit den Sequenzen der Datenbank NCBI-BLAST.

3.5.2 Absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte mithilfe externer Standards

Zur Ermittelung der absoluten Kopienzahlen wurden zu den drei gemessenen Oozytengrößen externe Standards eingesetzt, die aus gereinigten PCR-Produkten derselben Sequenz bestanden. Die jeweiligen Konzentrationen der gereinigten Standards wurden photospektrometrisch ermittelt. Nach serieller Verdünnung standen mehrere Probenportionen für alle untersuchten Gene in einem Konzentrationsbereich von 10^2 bis 10^6 Kopien pro µl zur Verfügung. Bei der Verwendung externer Standards generiert die LightCycler-Software eine Standardkurve. Dabei werden die PCR-Zyklen gegen den Logarithmus der Konzentration der verwendeten Standards aufgetragen. Die Software berechnet die lineare Regressionslinie durch die gegebenen Datenpunkte. Anhand dieser kann die Konzentration jeder unbekannten Probe interpoliert werden.

In den nachfolgenden Abbildungen 13, 14, 15 und 16 sowie in Tabelle 9 sind jeweils die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen aller Messungen für die untersuchten Gene dargestellt. Die angegebenen Kopienzahlen beziehen sich dabei nicht auf eine einzelne Oozyte, sondern jeweils auf die in die Reaktion eingesetzte Menge an Template. Untersucht wurden Proben aus totalRNA-Isolierungen von zehn Marmoset Oozyten der Kategorie 1, zehn Marmoset Oozyten der Kategorie 2 und neun Marmoset Oozyten der Kategorie 3.

Kopienzahlen von ZPB-Transkripten

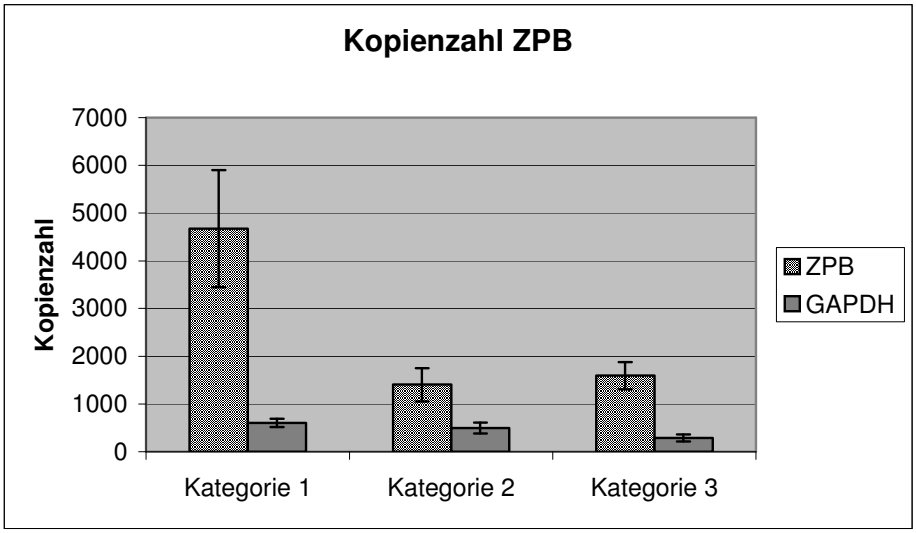


Abb. 13: Grafische Darstellung der absoluten Kopienzahlen der ZPB-Transkripte. Es sind angegeben die Mittelwerte und Standardabweichungen der anhand externer cDNA-Standards ermittelten Menge an Transkripten in den verwendeten Templates aus den drei verschiedenen Oozytenkategorien (Tab. 3). Neben den Kopienzahlen für ZPB sind zum Vergleich die Kopienzahlen des housekeeping Gens GAPDH angegeben.

Kopienzahlen von ZPA-Transkripten

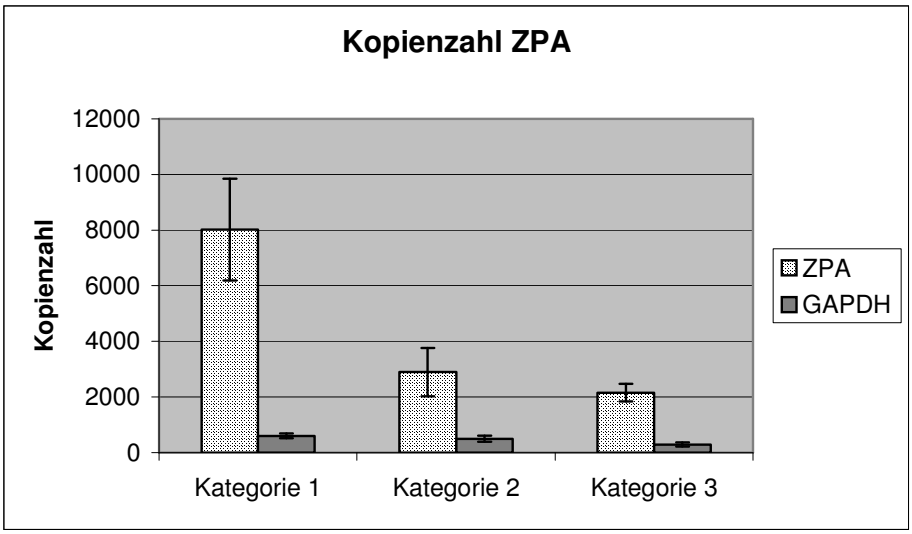


Abb. 14: Grafische Darstellung der absoluten Kopienzahlen der ZPA-Transkripte. Es sind angegeben die Mittelwerte und Standardabweichungen der anhand externer cDNA-Standards ermittelten Menge an Transkripten in den verwendeten Templates aus den drei verschiedenen Oozytenkategorien (Tab. 3). Neben den Kopienzahlen für ZPA sind zum Vergleich die Kopienzahlen des housekeeping Gens GAPDH angegeben.

Kopienzahlen von ZPC-Transkripten

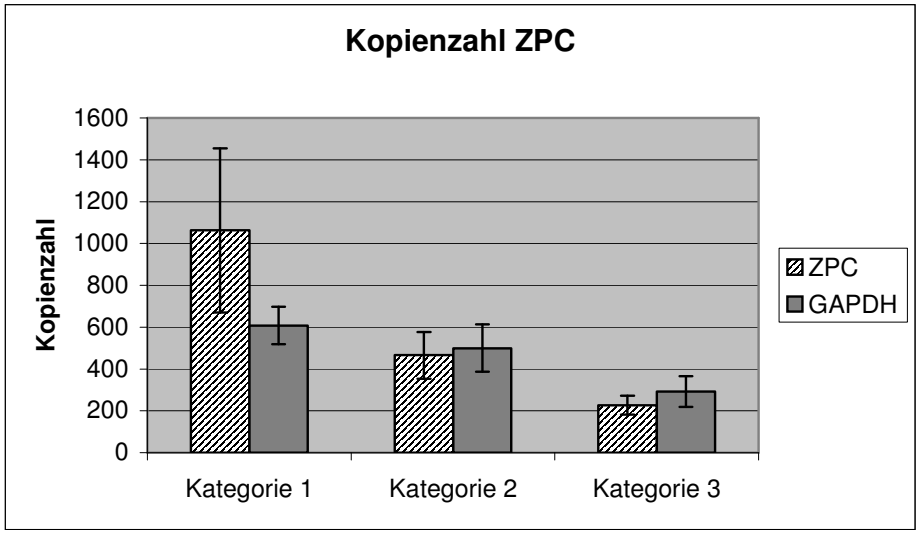


Abb. 15: Grafische Darstellung der absoluten Kopienzahlen der ZPC-Transkripte. Es sind angegeben die Mittelwerte und Standardabweichungen der anhand externer-cDNA Standards ermittelten Menge an Transkripten in den verwendeten Templates aus den drei verschiedenen Oozytenkategorien (Tab. 3). Neben den Kopienzahlen für ZPC sind zum Vergleich die Kopienzahlen des housekeeping Gens GAPDH angegeben.

Kopienzahlen von GAPDH-Transkripten

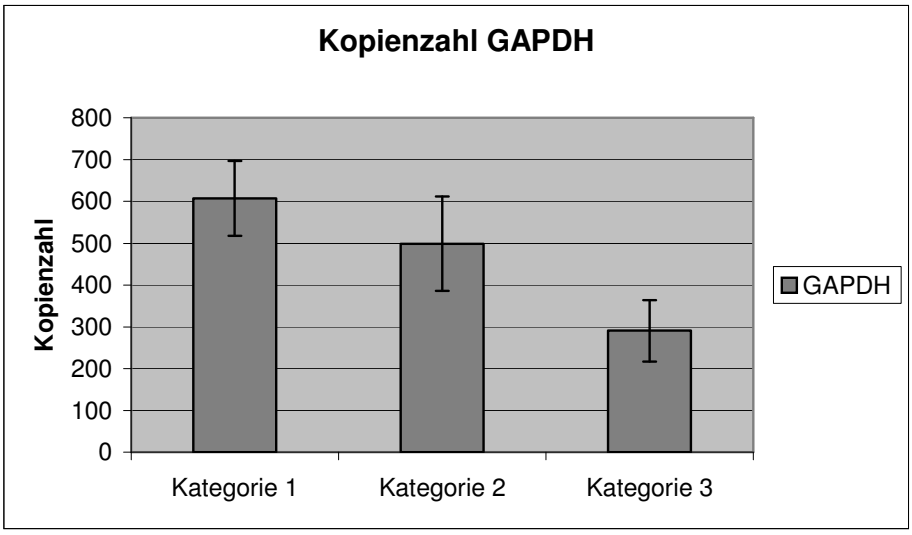


Abb. 16: Grafische Darstellung der absoluten Kopienzahlen der GAPDH-Transkripte. Es sind angegeben die Mittelwerte und Standardabweichungen der anhand externer cDNA-Standards ermittelten Menge an Transkripten in den verwendeten Templates aus den drei verschiedenen Oozytenkategorien (Tab. 3).

Die absoluten Zahlen sowie die errechneten Standardabweichungen aus den Quantifizierungen von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten aus Marmoset Oozyten der jeweiligen Kategorien sind in der nachfolgenden Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Angabe der absoluten Kopienzahlen für ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripte

	Kategorie 1	**Kategorie 2**	**Kategorie 3**
ZPB-Kopienzahlen Mittelwert (SD)	4674 (1228,1)	1404 (348,02)	1595 (286,73)
ZPA-Kopienzahlen Mittelwert (SD)	8022 (1827,8)	2898 (867,89)	2156 (316,65)
ZPC-Kopienzahlen Mittelwert (SD)	1062 (392,6)	465 (111,78)	226 (44,8)
GAPDH-Kopienzahlen Mittelwert (SD)	607 (89,64)	499 (113,24)	291 (73,47)

Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen (SD) errechnen sich aus den einzelnen Ergebnissen der in Triplikaten in drei unabhängigen Versuchen eingesetzten Templates aus Marmoset Oozyten der unterschiedlichen Follikelgrößen.

Für die einzelnen ZP-Transkripte innerhalb einer Kategorie wurden variierende Kopienzahlen ermittelt. So wurde z.B. in der Kategorie 1 für ZPA mit 8022 die höchste und für ZPC mit 1062 die geringste Anzahl von Transkripten nachgewiesen. Die Kopienanzahl für ZPB lag bei Kategorie 1 bei 4674. Bei allen drei ZP-Glykoproteinen konnte auch ein Unterschied in der Menge der Transkripte zwischen den einzelnen Follikelgrößen festgestellt werden. Die Kopiezahl nahm von Kategorie 1 nach Kategorie 3 ab. Wobei die stärkste Verringerung der Zahl der drei ZP-Transkripte dabei zwischen den Oozyten der Kategorie 2 im Vergleich zu Oozyten der Kategorie 1 festgestellt wurde. Weniger starke Unterschiede ergaben sich bei den GAPDH-Transkripten, von 607 für die Kategorie 1, 465 für Kategorie 2 bis zu 291 für die Kategorie 3. Die deutlichste Verringerung der GAPDH-Transkriptmenge zeigte sich dabei in den Oozyten der Kategorie 3.

Absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte mit RNA-Standards

Um die Effizienz der RT-Reaktion als Störgröße auszuschalten, wurde eine absolute Quantifizierung mit RNA-Standards nach der one-step RT-PCR-Methode vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden gereinigte PCR-Produkte aus Amplifikationen mit Primern für ZPA, ZPC und GAPDH in geeignete Vektoren kloniert und in kompetenten Bakterien vermehrt. Nach Restriktion der klonierten Fragmente wurden diese in eine *in vitro* Transkription eingesetzt. Nach Verdauung mit DNase I wurden die Konzentrationen der Standards photospektrometrisch bestimmt. Die Standards wurden seriell verdünnt und portioniert gelagert.
Trotz mehrerer Versuche war es nicht möglich, die one-step RT-PCR auf dem LightCycler zu optimieren. Verschiedene Anstrengungen, eine Standardkurve mit den RNA-Standards zu generieren, führten nur bedingt zum Erfolg. Während der Optimierungsversuche konnte eine allmähliche Verschlechterung der Amplifikationskurven beobachtet werden, die höchstwahrscheinlich auf eine schnelle Degradation der Standards zurückzuführen ist. Eine Überprüfung der RNA-Standards mit dem Agilent Bioanalyzer ergab, entgegen der photospektrometrischen Messungen, keine nachweisbaren RNA-Fragmente einer bestimmten Größe. Die Versuche wurden daraufhin nicht weiter fortgeführt.

3.5.3 Relative Quantifizierung der ZP-Transkripte

3.5.3.1 Darstellung der Crossing Points der real-time PCR

Die Crossing Points (CPs) wurden von der LightCycler-Analysesoftware nach der Second Derivative Maximum Methode berechnet. Sie geben denjenigen Zyklus der Reaktion wieder, an dem die Reaktionskurve einen exponentiellen Verlauf annimmt und korrelieren mit der Menge der Transkripte im Ausgangstemplate. Hierbei gilt: Je später der CP im Verlauf der Reaktion auftritt, desto geringer ist die Konzentration der gesuchten Transkripte. Es werden keine externen Standards verwendet, auch werden unterschiedliche Anzahlen von eingesetzten Oozyten nicht berücksichtigt. Die Darstellung der CPs dient einer einfachen Verdeutlichung der gemessenen Daten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen Messungen für jedes Gen sowie die Standardabweichungen. Für alle untersuchten Gene war ein Anstieg der CP-Werte

innerhalb der drei untersuchten Oozytenkategorien zu verzeichnen (Abb. 17). Ein Anstieg der CP-Werte ist dabei mit einer Abnahme der Transkriptmenge in den untersuchten Proben gleichzusetzen. Eine Zunahme der CP-Werte war bei den drei untersuchten ZP-Glykoproteinen in den Oozyten der Kategorie 2, im Vergleich zu den Oozyten der Kategorie 1 zu verzeichnen. Auch die CP-Werte für GAPDH zeigten einen leichten Anstieg.

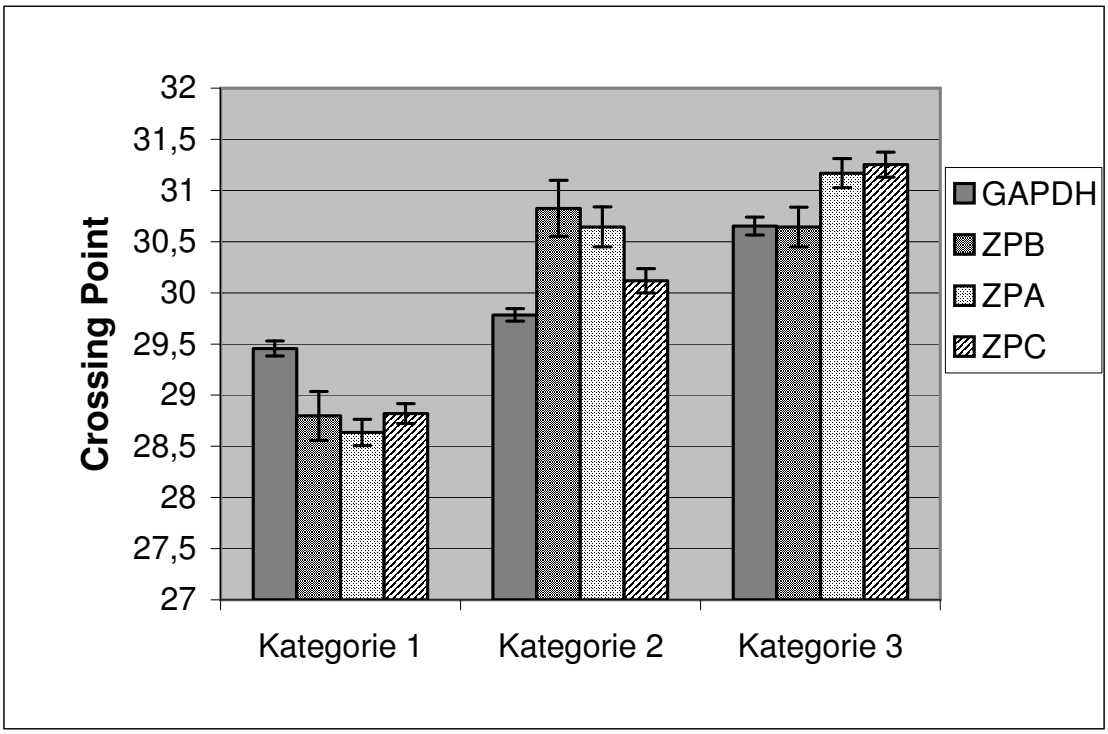


Abb. 17: Grafische Darstellung der CPs aller untersuchten ZP-Glykoproteine in den drei verschiedenen Oozytenkategorien im Vergleich zu GAPDH als housekeeping Gen. Die angegebenen CPs sind Mittelwerte aus den Ergebnissen von drei verschiedener real-time PCR-Experimente in denen die quantifizierten Probe der zu untersuchenden Oozyten für jedes ZP-Glykoprotein als Triplikate eingesetzt wurden.

3.5.3.2 Relative Quantifizierung der ZP-Transkripte mit REST-XL

Das Programm REST-XL (Relative Expression Software Tool) ermöglicht die Berechnung der relativen Expression eines zu untersuchenden Gens in einer Probengruppe im Verhältnis zu einer Kontrollgruppe. Das mathematische Modell, der so genannte „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test“, erlaubt sowohl die Korrektur unterschiedlicher PCR-Effizienzen als auch die Normalisierung mittels eines unregulierten housekeeping Gens. Nach

der Eingabe der ermittelten PCR-Effizienzen und der gemessenen CPs für die Kontrollen, die Proben und das housekeeping Gen errechnet REST-XL die Verhältnisse zwischen Proben und Kontrollen für bis zu vier verschiedene Gene. Es gibt weiterhin die Mittelwerte der CPs, deren Standardabweichung und den Variationskoeffizienten für alle eingegebenen Messdaten an (Tab. 10). Die Varianzen werden hervorgerufen durch Unterschiede zwischen den in Triplikaten eingesetzten Proben eines Laufs, sowie durch Lauf-zu-Lauf-Unterschiede.

Tab. 10: Statistische Überprüfung der real-time PCR-Ergebnisse

	GAPDH	**ZPB**	**ZPA**	**ZPC**
Oozyten der Kategorie 1				
Mittelwert der CPs	29,46	28,8	28,64	28,82
Standardabweichung	0,05	0,51	0,14	0,08
CV (%)	0,17	1,78	0,5	0,29
Oozyten der Kategorie 2				
Mittelwert der CPs	29,78	30,89	30,65	30,12
Standardabweichung	0,04	0,47	0,34	0,12
CV (%)	0,12	1,53	1,11	0,41
Oozyten der Kategorie 3				
Mittelwert der CPs	30,65	30,64	31,17	31,25
Standardabweichung	0,07	0,33	0,19	0,14
CV (%)	0,23	1,09	0,60	0,44

Angegeben sind die Mittelwerte der CPs aller Messungen für das jeweilige untersuchte Gen aus allen Versuchen (n=9), deren Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CV).

Es wurden die Expressionen der ZP-Glykoproteine in den Oozyten der Kategorie 2, sowie Kategorie 3 (Probengruppen), jeweils mit der Expression der ZP-Glykoproteine in Oozyten der Kategorie 1 (Kontrollegruppe) gegenüber gestellt. Alle Proben und Kontrollen wurden zusätzlich mit dem housekeeping Gen GAPDH normalisiert. Unterschiede in den PCR-Effizienzen der untersuchten Gene wurden ebenfalls berücksichtigt.

Aus den Berechnungen von REST-XL lässt sich eine Tendenz der Expression zwischen den Kontroll- und Probengruppen ableiten. In Abb. 18 und Abb. 19 ist der Verlauf der Transkription der ZP-Glykoproteine sowie GAPDH dargestellt. Die Kurven verdeutlichen die relativen Veränderungen der Transkription bei den Oozyten der Kategorie 2 und Kategorie 3 wenn man die Transkription in Oozyten der Kategorie 1 als Ausgangspunkt definiert. Abb. 18 zeigt alle Ergebnisse normalisiert mit GAPDH. Abb. 19 zeigt dieselben Ergebnisse ohne entsprechende Normalisierung. GAPDH selbst ist in beiden Abbildungen nicht normalisiert (nn). Kategorie 2 verglichen mit Kategorie 1 zeigte normalisiert einen Unterschied im Bereich von Faktor 2,5 für ZPA und ZPB und von Faktor 1,8 für ZPC. Kategorie 3 verglichen mit Kategorie eins zeigt unterschiede im Bereich von Faktor 2 für ZPA und ZPC sowie keinen signifikanten Unterschied für ZPB. Die angegebnen Faktoren sollen dabei Größenordnungen wiedergeben und keine genauen Verhältnisse.

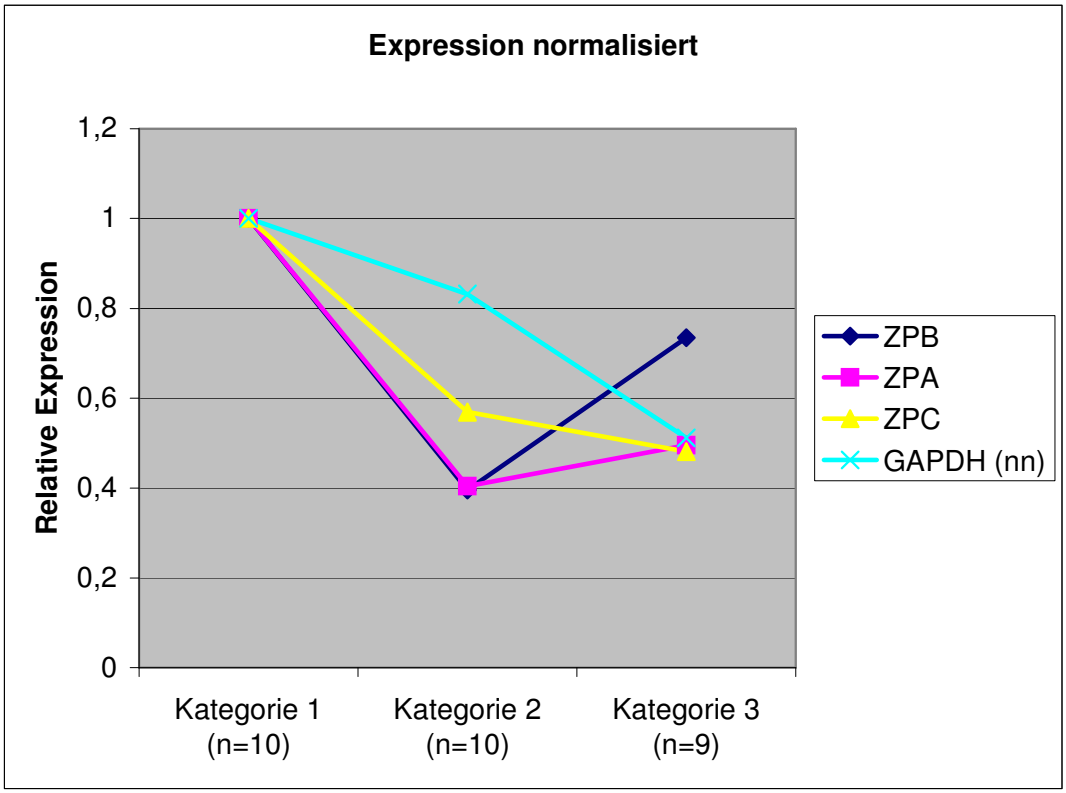


Abb. 18: Relative Unterschiede in der Expression der ZP-Glykoproteine und GAPDH in den drei verschiedenen Oozytenkategorien (Tab. 3). Kategorie 1 wurde als Bezugsgröße gewählt. Die Werte der ZP-Glykoproteine sind normalisiert mit GAPDH. Das housekeeping Gen (GAPDH) selber ist nicht normalisiert (nn).

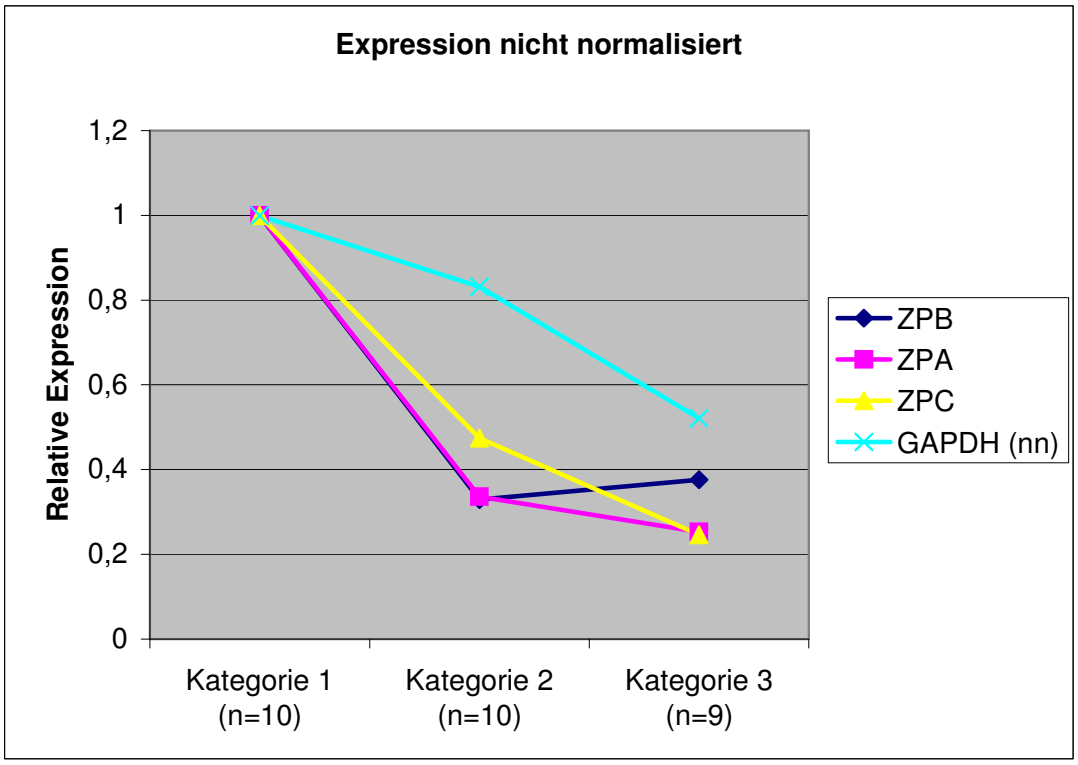


Abb. 19: Verlauf der Expression der ZP-Glykoproteine und GAPDH ohne Normalisierung.

3.5.4 Ermittlung der PCR-Effizienzen

Bei den Auswertungen mit REST-XL konnten Unterschiede in den Effizienzen rechnerisch korrigiert werden. Für alle Proben aus den drei verschiedenen Kategorien von Marmoset Oozyten sowie für die cDNA Standards wurden die Effizienzen mit dem Programm LinRegPCR bestimmt. Dieses Programm errechnete für jede quantifizierte Probe und jeden cDNA-Standard individuell die Effizienz mittels linearer Regressionsanalyse (Ramakers *et al*., 2003). Für alle Berechnungen wurde der Mittelwert der Proben beziehungsweise Standards verwendet.

In Tab. 11 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der errechneten Effizienzen aller Proben und Standards der untersuchten Gene gegenübergestellt. Die Differenz zwischen Proben und Standards sollte so klein wie möglich gehalten werden. Ebenfalls angegeben ist der prozentuale Fehler der im 30. Zyklus der PCR aus den unterschiedlichen PCR-Effizienzen resultiert. Er errechnet sich aus den mittleren Effizienzen der Proben und der Standards und des entsprechenden PCR-Zyklus (n) nach der Formel: $(E_1^n/E2^n-1)*100$ wobei der größere Wert als E_1 und der kleinere als E_2 gewählt werden muss.

Tab. 11: Darstellung der Berechnung der Effizienzen mit LinRegPCR

	GAPDH		**ZPB**		**ZPA**		**ZPC**	
	Probe	Standard	Probe	Standard	Probe	Standard	Probe	Standard
Mittelwert	1,748	1,770	1,698	1,718	1,715	1,709	1,783	1,800
Maximum	1,781	1,820	1,734	1,762	1,753	1,761	1,805	1,842
Minimum	1,718	1,607	1,673	1,662	1,658	1,669	1,752	1,750
Standard-abweichung	0,0171	0,0373	0,0224	0,0259	0,0203	0,0219	0,0143	0,0253
Differenz	0,022		0,02		0,006		0,017	
Fehler	n = 30 45,53%		n = 30 42,09%		n = 30 11,08%		n = 30 32,93%	

Die Mittelwerte mit Standardabweichungen der Proben aus den drei verschiedenen Oozytenkategorien und der externen cDNA-Standards für jedes untersuchte Gen sind getrennt angegeben. Die daraus resultierende Differenz bestimmt den prozentualen Fehler hier im dreißigsten Zyklus (n) der PCR.

Durch die nur geringen Differenzen in den PCR-Effizienzen der externen Standards und der Proben waren diese geeignet um eine absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte durchzuführen. Die berechneten Effizienzen der Proben wurden auch für die Berechnungen mit REST-XL für die relative Quantifizierungen der ZP- Glykoproteintranskripte verwendet.

Mithilfe der real-time PCR konnte der Verlauf der Expression zwischen den drei untersuchten Oozytenkategorien absolut und relativ quantifiziert werden. Mit einer Ausnahme zeigten beide Techniken vergleichbare Unterschiede. Kategorie zwei verglichen mit Kategorie eins weist für ZPA einen relativen Unterschied in der Größenordnung von Faktor 2,5 auf. Die Transkriptmenge sank von 8022 auf 2898. In gleicher Größenordnung sank die Transkriptmenge von ZPB von 4674 auf 1404, dass entsprach einem Faktor von 2,5. ZPC war in der Größenordnung von Faktor 1,8 herunterreguliert, es wurde ein Abfall von 1062 auf 465 Transkripten verzeichnet. Kategorie drei verglichen mit Kategorie eins zeigte ähnliche Tendenzen. ZPA war hier in der Größenordnung von 2 weniger nachweisbar. Es wurden 2156 Transkripte ermittelt. ZPB wies relativ gemessen keinen Unterschied zwischen den Kategorien auf. In absoluten Zahlen sank die Transkriptmenge aber auf einen Tiefststand von 226 Kopien. ZPC war um Faktor 2 weniger vorhanden, 1595 Transkripte wurden gemessen. Für das

housekeeping Gen GAPDH wurde ein leichter Abfall der absoluten Transkriptmenge beobachtet. Kategorie 1 wies 607 Transkripte auf. In Kategorie 2 waren 499 Transkripten und in 291 Transkripte Kategorie 3 nachweisbar.

3.6 Qualitativer Nachweis von ZPA-, ZPB-, ZPC- und GAPDH-Transkripten in einzelnen Marmoset Oozyten

Für diese Versuche wurden aus in RNAlater tiefgefrorenen Marmoset Oozyten drei Zellen (a,b,c) aus präantralen Follikeln unter dem Mikroskop ausgewählt. Die Isolierung der totalRNA erfolgte individuell für jede Oozyte. Nach anschließender reverser Transkription wurde von der entstandenen cDNA je 4µl als Template in die real-time PCR eingesetzt. Die Amplifikation der ZPA-, ZPB- und ZPC- sowie der GAPDH-Fragmente wurde dabei gleichzeitig bestimmt. Es wurden dieselben Primer wie für die Quantifizierung verwendet. Die Amplifikation der untersuchten Gene im LightCycler gelang mit den verwendeten Primern bei jeder der drei verschiedenen Oozyten. In den Negativkontrollen mit Primern für ZPA und ZPC zeigten sich unerwünschte PCR-Produkte, die dasselbe Schmelzverhalten zeigten wie das gesuchte Produkt (Tab. 12). Allerdings lag der CP der Negativkontrolle deutlich über dem Durchschnitt der eingesetzten Proben.

Tab. 12: Angabe der CPs und der Schmelztemperaturen für die Amplifikation der ZPB-, ZPA-, ZPC- und GAPDH-Transkripte

		GAPDH	**ZPB**	**ZPA**	**ZPC**
Crossing Point (CP)	a	26,96	22,04	27,28	31,50
	b	28,97	22,13	29,88	30,76
	c	26,55	22,06	29,99	30,94
	NTC	35,09	45,86	38,15	36,24
Schmelz-temperatur °C	a	89,61	88,91	86,47	90,03
	b	89,54	88,88	86,27	89,96
	c	89,59	89,01	86,37	90,01
	NTC	85,21	83,77	87,00	89,87

Es wurden drei verschiedene totalRNA-Isolierungen aus jeweils einer einzelnen Marmoset Oozyte (a,b,c) eingesetzt. NTC = Negativkontrolle.

In Abb. 20 zeigen die Amplifikationskurven einen charakteristischen Verlauf der real-time PCR. Die drei verschiedenen totalRNA-Isolierungen aus jeweils einer einzelnen Oozyte (a,b,c) sind für die untersuchten Gene in jeweils einheitlichem Farbton angegeben. Die Negativkontrollen (NTC) sind gestrichelt gezeichnet und weisen für ZPA und ZPC auf eine Kontamination mit Fremd-DNA hin.

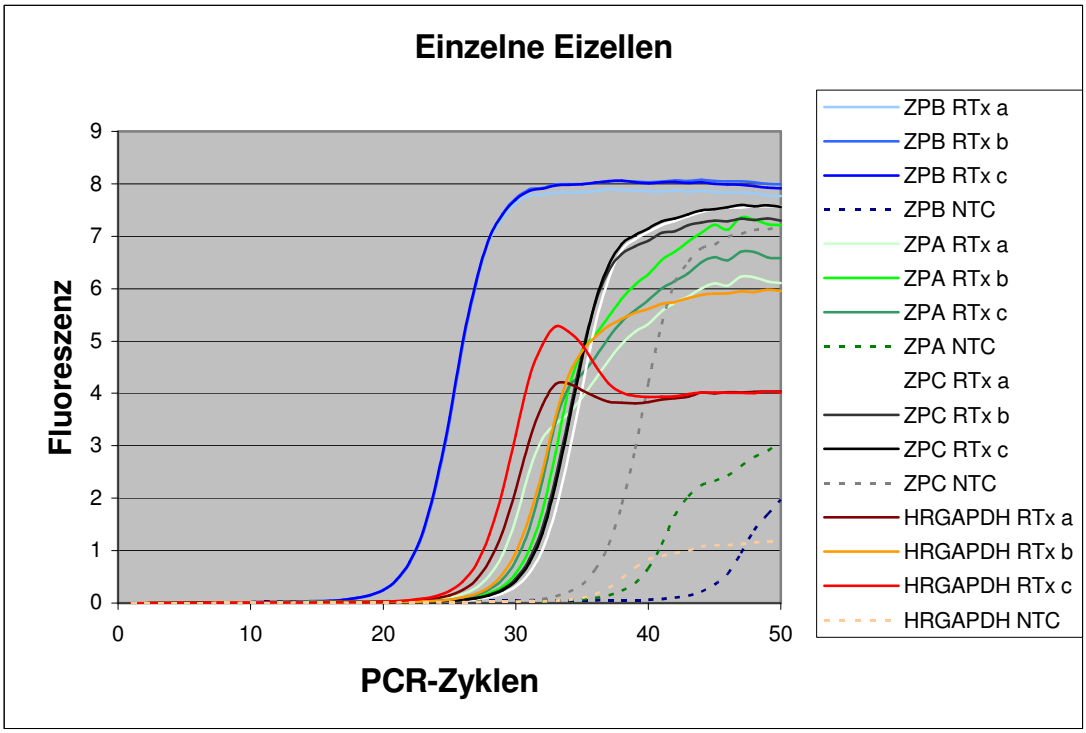


Abb. 20: Amplifiktionskurven der ZP-Glykoproteine und GAPDH. Die Kurven ergeben sich aus der Messung der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß (y-Achse) nach jedem Zyklus der real-time PCR (x-Achse). Die Negativkontrollen (NTC) sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Als Template dienten totalRNA-Isolierungen aus jeweils einer einzelnen Marmoset Oozyten (a,b,c).

Die PCR-Produkte des geschilderten Experiments wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die beschriebenen DNA-Kontaminationen in den Negativkontrollen (Abb. 21; Spuren 8 und 12) der ZPA- und ZPC-Glykoproteine sind deutlich als Bande auf gleicher Höhe mit den spezifischen PCR-Produkten (Abb. 21; Spuren 1, 2, 3 für das ZPB-Produkt; 5, 6, 7 für das ZPA-Produkt; 9, 10, 11 für das ZPC-Produkt und 13, 14, 15 für das GAPDH-Produkt) zu erkennen. Die restlichen Negativkontrollen befinden sich in den Spuren 4 und 16.

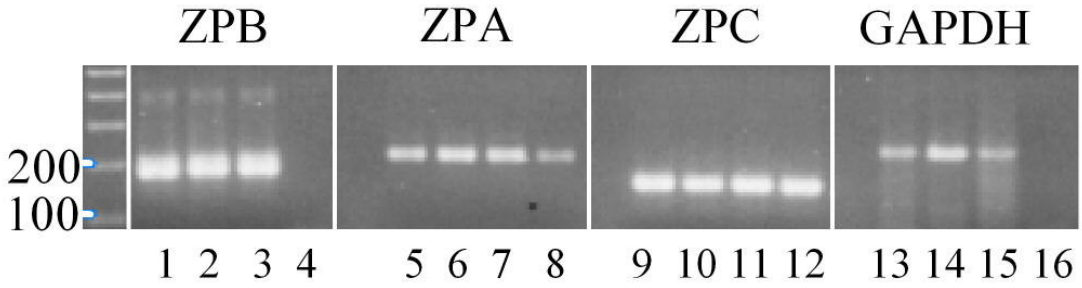


Abb. 21: Dargestellt ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes, 1,5%iges Agarosegel. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte nach Amplifikation von drei verschiedenen Templates (a,b,c) aus je einer einzelnen Marmoset Oozyte. Alle Templates wurden jeweils mit Primern für ZPB (188bp) (Spuren 1, 2, 3), ZPA (220bp) (Spuren 5, 6, 7), ZPC (163bp) (Spuren 9, 10, 11) und GAPDH (234bp) (Spuren 13, 14, 15) amplifiziert. Die zugehörigen Negativkontrollen sind in den Spuren 4, 8, 12 und 16 dargestellt. DNA-Kontaminationen sind in den Spuren 8 und 12 erkennbar. Links am Bildrand ist die Basenpaarmarkierung angegeben.

In einem weiteren Versuch wurde eines der Templates seriell 1:10 und 1:100 mit Wasser verdünnt. Für jedes untersuchte Gen wurden wieder 4µl des unverdünnten sowie der verdünnten Templates im LightCycler amplifiziert. Für das ZPB-Glykoprotein konnte dabei das spezifische Produkt für alle Verdünnungsstufen nachgewiesen werden. Für das ZPA-Glykoprotein zeigten sich keine spezifischen Produkte in einer der Verdünnungen. Beim ZPC-Glykoprotein sowie GAPDH war eine spezifische Amplifikation noch bei einer Verdünnung von 1:10 nachweisbar (Tab. 13, Abb. 22). Kontaminationen der Leerproben traten in diesem Versuch für keines der untersuchten Gene auf.

Die Versuche sollten zeigen, dass es die hohe Sensitivität eines optimierten real-time PCR-Systems gestattet, molekularbiologische Untersuchungen an einzelnen Marmoset Oozyten vorzunehmen. Auf spezielle Lagerungs- und Isolierungsmethoden konnte dabei verzichtet werden. Die CPs des real-time Experiments mit verdünnten Templates sowie die Ergebnisse der sich anschließenden Schmelzkurvenanalyse sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Angabe der CPs und der Schmelztemperaturen für alle untersuchten Gene

		GAPDH	**ZPB**	**ZPA**	**ZPC**
Crossing Point	Unverdünnt	27,90	24,89	28,88	32,09
	Verdünnt 1:10	31,70	29,30	-	35,96
	Verdünnt 1:100	33,53	32,96	-	38,71
	NTC	37,17	-	48,43	40,06
Schmelz-temperatur°C	Unverdünnt	89,60	88,77	87,05	90,32
	Verdünnt 1:10	89,44	88,80	78,19	90,16
	Verdünnt 1:100	87,41	88,84	78,33	82,79
	NTC	80,54	-	78,03	82,58

Das verwendete Template aus einer einzelnen Marmoset Oozyte wurde für jedes untersuchte Gen zusätzlich 1:10 und 1:100 mit Wasser verdünnt eingesetzt.

In Abb. 22 sind die Amplifikationskurven für die ZP-Glykoproteine sowie GAPDH dargestellt. Alle untersuchten Proben wurden unverdünnt sowie in Verdünnungen mit Wasser von 1:10 und 1:100 untersucht. Die in Blautönen gezeichneten Amplifikationskurven von ZPB zeigten in allen Verdünnungsstufen einen charakteristischen, exponentiellen Verlauf. Für ZPA (Grüntöne) war eine Amplifikation nur mit dem unverdünnten Template nachweisbar. ZPC (Gelbtöne) und GAPDH (Rottöne) wiesen eine exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte noch bei einer 1:10 Verdünnung auf. Ein spezifisches Produkt in einer der Negativkontrollen war nicht nachweisbar.

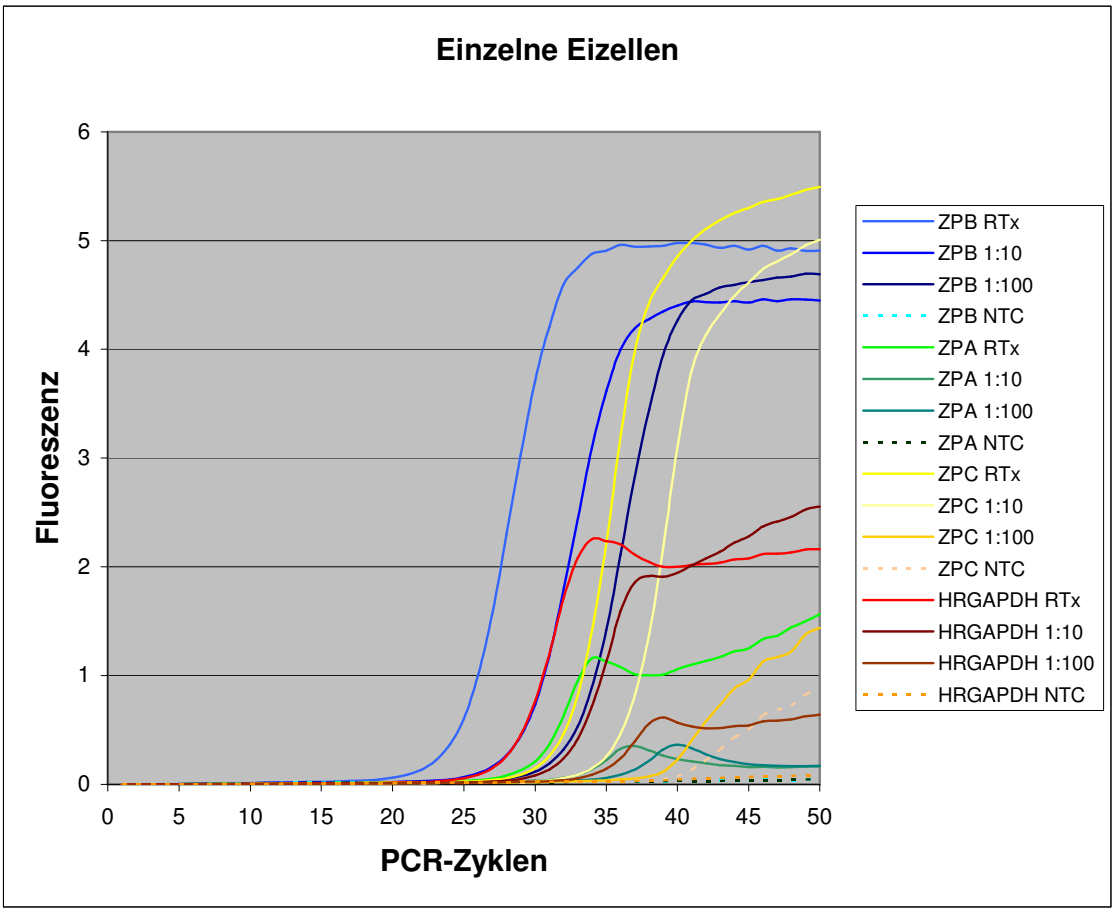


Abb. 22: Amplifikationskurven der ZP-Glykoproteine und GAPDH. Die Kurven ergeben sich aus der Messung der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß (y-Achse) nach jedem Zyklus der real-time PCR (x-Achse). Die Negativkontrollen sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Als Template diente eine totalRNA-Isolierungen aus einer einzelnen Marmoset Oozyten (RTx), dieses wurde zudem 1:10 und 1:100 mit Wasser verdünnt in die PCR eingesetzt wurde.

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Isolierung von totalRNA, die anschließende reverse Transkription sowie die real-time PCR mit geringsten Mengen an Untersuchungsmaterial (einzelne Oozyten bzw. mit deren verdünnten Ausgangstemplates) durchgeführt werden konnte.

4 Diskussion

Die dargestellten Untersuchungen dienten dazu, die *de novo* Synthese der ZP-Glykoproteine durch den Nachweis von mRNA Transkripten in ovariellem Gewebe des Marmoset Affen zu lokalisieren. Des Weiteren sollte die Expression der ZP-Glykoproteine in Oozyten verschiedener Entwicklungsstadien quantifiziert und untereinander verglichen werden. Obwohl eine murine Oozyte im Vergleich zu einer somatischen Zelle etwa die 200-fache Menge an mRNA enthält (Wassarman und Kinloch, 1992), stehen qualitative und quantitative Genexpressionsstudien vor dem Problem der stark eingeschränkten Verfügbarkeit von Untersuchungsmaterial. Für eine mögliche, spätere klinische Verwendung dieser Methode als Routinediagnostik, sollte die quantitative real-time PCR zum Nachweis von RNA Amplifikaten einzelner Oozyten auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft werden. Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Sensitivität und Spezifität der real-time PCR ausreichten, um geringste Mengen an mRNA aus totalRNA aus Marmoset Oozyten zu analysieren.

Die Erforschung der Genexpression schreitet mit neueren Methoden wie der Mikroarray Analyse voran. Die Bedeutung einer exakt abgestimmten Kontrolle der Genexpression einer Oozyte auf dem Weg zur Ovulation kommt mehr und mehr ins Bewusstsein. Auswirkungen von unterschiedlichen Faktoren auf das Expressionsmuster wurden bei der *in vitro* Kultivierung von Oozyten unter verschiedenen Bedingungen in mehreren Studien beobachtet (Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002). Mittels real-time PCR wurde in murinen Oozyten die Runterregulation der Expression von housekeeping Genen wie β-Actin in *in vitro* maturierten Oozyten beschrieben (Steuerwald *et al.*, 1999; 2000). Knijn *et al.* (2002) untersuchten die Expression von Desmocollin 2, Glukosetransporter 1, Plakophilin, Heat shock protein 70.1, E-cadherin und poly(A) Polymerase, sechs für die Entwicklung bedeutsame Marker-Gene, *in vitro* und *in vivo* maturierter, boviner Oozyten. Auswirkungen der *in vitro* Kultivierung von porcinen Oozyten auf verschiedene Aspekte der Zellmorphologie wurden von Wang *et al* (1998) untersucht. Sie fanden dabei signifikante Unterschiede in der Dicke der ZP, die bei den *in vitro* kultivierten Oozyten deutlich dünner war als bei ovulierten und zudem deutlich empfindlicher gegenüber dem proteolytischen Enzym Pronase. Auch ultrastrukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie zeigten eine geringere Dicke und Veränderungen in der Oberflächenbeschaffenheit der ZP in *in vitro* maturierten Oozyten (Funahashi *et al.*, 2001). Mit der Quantifizierung der ZP-Glykoproteine in den hier

dargestellten Ergebnissen wurden nicht zuletzt erste Referenzwerte aus *in vivo* herangereiften Oozyten gewonnen.

4.1 Lokalisation der Expression der ZP-Glykoproteine im Marmoset Ovar

In situ Hybridisierung zur Lokalisation von ZPA-, ZPB- und ZPC- Transkripten

Bereits publizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten die Lokalisation von ZPA- und ZPC-Protein in Gewebeschnitten des Marmoset Affen. Mittels Immunhistochemie mit spezifischen Antikörpern konnte dabei ZPA-Protein sporadisch in Follikelzellen von Primordialfollikeln und permanent in Oozyten und Follikelzellen von Primär- bis Tertiärfollikeln gefunden werden. Bei Oozyten kleiner und großer präantraler Follikel fiel die Anfärbbarkeit des Ooplasmas dezenter aus, wobei deren Follikelzellen deutlich gefärbt waren. Immunhistochemisch konnte ZPC-Protein eindeutig in den Oozyten und Follikelzellen ab dem Primärfollikelstadium nachgewiesen werden, allerdings mit geringerer Intensität als für das ZPA-Protein (Bogner *et al*., 2004).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen ein ähnliches Verhalten auf der Transkriptionsebene von ZPA wobei der Nachweis in Oozyten und Follikelzellen ab dem Stadium des Primordialfollikels mit verschiednen Sonden erbracht werden konnte. Die Intensität der Färbung in Oozyten höherer Follikelstadien war dabei ebenfalls geringer. Der Nachweis von ZPC-Transkripten gelang in Follikelzellen aller untersuchten Stadien vom Primordialfollikel bis hin zum Tertiärfollikel, wobei mit Heranreifen des Follikels eine Intensitätssteigerung der Reaktion zu verzeichnen war. In Oozyten konnte der Nachweis sporadisch in Primär- und Sekundärfollikeln geführt werden. ZPB-Transkripte dagegen wurden deutlich in Oozyten und Follikelzellen aller untersuchten Follikelstadien detektiert.

Insgesamt konnte mittels *in situ* Hybridisierung in den hier dargestellten Untersuchungen die Expression von ZPA-, ZPB- und ZPC-RNA in Schnitten von Marmoset Ovarien lokalisiert werden. In unterschiedlichen Versuchen wurden mehrfach die Transkriptionen, mit drei verschiedenen Ribosonden für ZPA-RNA und mit einer Ribosonde für ZPC-RNA nachgewiesen. Mit zwei verschiedenen Ribosonden gelang der Nachweis von ZPB-RNA. Besonders deutlich bei allen Sonden war der Farbniederschlag im Zytoplasma der die Oozyten umgebenden Follikelzellen. Diese wurden in allen Schichten gleichmäßig, in Follikeln ab dem Primärfollikelstadium angefärbt. Mit einigen, wenn auch nicht mit allen, Ribosonden konnten

zumindest ZPA- und ZPB-Transkripte schon in Oozyten und Follikelzellen von Primordialfollikeln nachgewiesen werden.

Die Mitwirkung der Follikelzellen am Aufbau der ZP konnte bei den meisten untersuchten Spezies, mit Ausnahme der Maus (El Mestrah *et al*., 2002) bestätigt werden. Beobachtungen wie die limitierte Syntheseleistung einer Oozyte (Schultz *et al.*, 1979) oder allein der relativ kurze Zeitraum zum Aufbau der ZP (Sacco, 1990) sprechen für die Beteiligung der Ganulosazellen an der *de novo* Synthese, gerade bei Spezies mit vergleichsweise dicker ZP. Die hier aufgeführten Ergebnisse sprechen auch beim Marmoset, dessen ZP mit einer Dicke von 16µm (Gilchrist, 1996) mit der des Menschen vergleichbar ist, für ein Zusammenspiel von Oozyte und Ganulosazellen. Im Kontrast dazu stehen Beobachtungen von Thillai-Koothan *et al*. (1993), die eine *de novo* Synthese von ZPC-Protein zwar in Oozyten des Marmoset Affen lokalisieren konnten aber keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Follikelzellen fanden Die Arbeitsgruppe von Grootenhuis *et al*. (1996), konnte mit Antikörpern gegen ZPC-Protein eine Immunreaktion in 60% der Primordialfollikel beim Marmoset Affen zeigen. Follikelzellen waren auch hier nicht gefärbt. Für den Langschwanzmakak wird diskutiert, dass Follikelzellen bei der ZP-Proteinsynthese mitwirken. Martinez *et al*. (1996) konnten ZPA- und ZPC-Transkripte entsprechend detektieren. Der Nachweis von ZPB dagegen gelang nur in Oozyten.

Bei den hier durchgeführten *in situ* Hybridisierungen konnte mit zunehmendem Reifegrad der Follikel, tendenziell eine Zunahme der Intensität der spezifischen Färbung in Follikelzellen und eine Abnahme der Intensität in Oozyten beobachtet werden. Ein ähnliches Verhalten wurde bei *in situ* Hybridisierungen mit Sonden gegen ZPC im Schwein beobachtet (Kolle *et al*., 1996). Im Rind dagegen konnten sowohl in Oozyten als auch in Follikelzellen höherer Follikelstadien Transkripte nachgewiesen werden (Kolle *et al*., 1998). Diese Beobachtungen könnten das sequentielle Muster der Expression der ZP-Glykoproteine widerspiegeln, wie es bereits für einige Spezies beschrieben wurde (Epifano *et al*., 1995; Jewgenow und Fickel, 1999; Martinez *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 2000; Roller *et al.*, 1989). Anhand von *in situ* Hybridisierungsergebnissen sind quantitative Aussagen über den ZP-Expressionsverlauf nicht möglich. Als weiteres Ziel dieser Arbeit wurde daher die Quantifizierung der ZP-Transkripte in Oozyten unterschiedlicher Follikelstadien vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge der ZP-Transkripte im Verlauf der Follikulogenese in Oozyten zwar abnimmt, sie aber dennoch mittels RT-PCR nachweisbar war. Die Tatsache, dass durch *in situ* Hybridisierung der Nachweis von ZP-Transkripten in Oozyten aus Tertiärfollikeln nicht immer gelang, könnte mit der geringeren Sensitivität dieser Methode zusammenhängen. Eine

Reduktion der Farbdichte im Ooplasma von großen Oozyten könnte auch mit deren höheren Volumen und dem damit einhergehendem Verdünnungseffekt erklärt werden.
Mit zwei der insgesamt drei verwendeten Ribosonden zum Nachweis von ZPA wurden positive Reaktionen in vereinzelten Zellen der Theka interna gefunden. Bislang gibt es keine Berichte, dass diese Zellen ZP-Glykoproteine exprimieren. Ob es sich dabei um Artefakte oder den tatsächlichen Nachweis von Transkripten handelte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Eine Laser-Mikrodissektion dieser Zellen mit anschließender RT-PCR könnte dahingehend Klarheit schaffen. Allerdings müssen Beobachtungen berücksichtigt werden, die die Arbeitsgruppe von Eberspaecher *et al.* (2001) machten: Mittels Antikörpern konnten sie die drei ZP-Proteine in Formalin fixierten Gewebeschnitten von Mensch, Maus und dem Langschwanzmakak im Zytoplasma von Oozyten nachweisen, nicht aber in den angrenzenden Granulosazellen. Bei Gewebeschnitten der Maus, die mit Bouin'schem Reagenz fixiert waren, konnten deutliche morphologische Veränderungen der Struktur der ZP und ein positives Signal mit Antikörpern gegen ZPC-Protein zwischen den ersten zwei Schichten der umliegenden Granulosazellen beobachtet werden. Eine desintegrative Wirkung von Bouin'schem Reagenz auf die Morphologie der ZP wird als Ursache für diese Resultate angeführt. Der Nachweis von ZPC-mRNA gelang mittels *in situ* Hybridisierung in humanen Oozyten, nicht aber in Follikelzellen.
Ob diese Effekte zu falsch positiven Ergebnissen bei der Lokalisation von mRNA-Transkripten führen, scheint zumindest in der hier vorliegenden Arbeit, als unwahrscheinlich. Alle *in situ* Hybridisierungen wurden auf Formalin fixierten Schnitten von Marmoset Ovarien durchgeführten. Das Signal konnte im Zytoplasma aller die Oozyte umgebenden Follikelzellen eindeutig detektiert werden.

Nachweis von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten und Follikelzellen mittels RT-PCR

Die dargestellten Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung werden gestützt durch entsprechende Resultate aus RT-PCR-Experimenten mit isolierten Oozyten und Follikelzellen. Nach Isolation der totalRNA und mRNA aus Follikelzellen und anschließender reversen Transkription konnten mit speziesspezifischen Primern für ZPA-, ZPB- und ZPC-cDNA die entsprechenden Transkripte indirekt nachgewiesen werden.

Zur Lokalisation der Expression der ZP-Proteine wurden bisher vorwiegend Hybridisierungstechniken verwendet, oder der Nachweis der ZP-Proteine erfolgte direkt mit Hilfe spezifischer Antikörper. Jewgenow und Fickel (1999) setzten die RT-PCR zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expression der ZP-Proteine bei Katzen ein, allerdings verwendeten sie komplette Follikel und machten keine Aussage über den Ursprung der mRNA. In der hier vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von ZP-RNA in einem Follikelzellen-Gemisch (Zellkomplexe aus Kumulus- und Granulosazellen), nach vorheriger Trennung von Follikelzellen und Oozyten.

Zum Nachweis von ZPA in Oozyten von Beuteltieren wurde ebenfalls die RT-PCR eingesetzt. Die Suche in Follikelzellen blieb hierbei ergebnislos (Voyle *et al.*, 1999). Im Marmoset Modell kann nach den hier vorliegenden RT-PCR-Ergebnissen von einer Expression von ZP-Glykoprotein-RNA in Follikelzellen ausgegangen werden. Verschiedene RT-PCR-Versuche mit spezifischen Primern für ZPA-, ZPB- und ZPC-cDNA aus dem Follikelzellen-Gemisch des Marmoset Affen wiesen die erwarteten PCR-Produkte auf. Der Nachweis gelang sowohl aus totalRNA als auch aus mRNA und stützt die Ergebnisse der oben genannten *in situ* Hybridisierungsversuche. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit neu konzipierten Primern aus anderen Regionen der ZP-Glykoprotein kodierenden RNA bestätigten zweifelsfrei die vorliegenden Angaben (Bogner *et al*., 2004).

Die Sensitivität der RT-PCR ist eine Stärke der Methode, bringt allerdings auch Probleme mit sich. Zum Beispiel ist, wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, der spezifische Nachweis von mRNA-Transkripten aus einem Bruchteil der aus einer Marmoset Oozyte gewonnenen RNA möglich. Auf der anderen Seite macht die hohe Sensitivität der RT-PCR diese auch anfällig für Kontaminationen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können, weshalb der Einsatz verschiedener Kontrollen unerlässlich ist (Freeman *et al*., 1999).

In den hier beschriebenen Experimenten konnte die genaue Zahl der verwendeten Follikelzellen nicht bestimmt werden. Um Kontaminationen mit gDNA auszuschließen, wurden verschiedene Kontrollen zum spezifischen Nachweis von mRNA-Transkripten der ZP-Proteine eingesetzt. Eine mögliche Kontamination mit gDNA wurde mit Hilfe spezieller Primer für humanes GAPDH, die ausschließlich Templates aus gDNA amplifizierten, überprüft. In einem der dargestellten RT-PCR-Versuche war der Gehalt an gDNA unter der Nachweisgrenze dieser Primer. Ein anderer Versuch dagegen zeigte deutliche Kontaminationen. Keine zurzeit bekannte RNA-Isolierungs-Methode kann die völlige Abwesenheit von gDNA garantieren (Bustin, 2002). Versuche mit mRNA, die mit an Magnetic Beads gekoppelten oligo-dT-Ankern direkt isoliert wurde, zeigten generell nur ein sehr geringes Maß an gDNA-Beimengung.

Aufgrund der wesentlich höheren Ausbeute wurden für die hier dargestellten Versuche hauptsächlich totalRNA verwendet, welche nach der Isolierung mit DNase I behandelt wurde. Selbst mit zweimaliger DNase I-Behandlung von jeweils 15min bei 37° C konnte in keinem Fall ein enzymatischer Abbau von gDNA unter die Nachweisgrenze erreicht werden. Ein zu langes oder zu hoch konzentriertes Einwirken von DNase I führte zudem zu einer deutlichen Verschlechterung der in der anschließenden PCR erreichten Resultate. Zum weiteren Ausschluss einer Kontamination mit gDNA wurden die Primer zur Amplifikation der ZPB- und ZPC-Fragmente so gewählt, dass sie jeweils ein oder mehrere Introns überspannen. Im Resultat sollte bei einer Amplifikation von gDNA ein um die besagten Introns größeres PCR-Produkt als für die cDNA erkennbar sein (Hurteau und Spivack, 2002). Die Primer für die Amplifikation des ZPA-Fragments überspannten genau eine Intron-Exon-Grenze, wodurch eine Amplifikation von gDNA unmöglich wird. Die Verwendung von cDNA-spezifischen Primern kann unter Umständen auch zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn der gDNA-Strang entsprechende Pseudogene aufweist. Es handelt sich dabei um Sequenzen innerhalb des Genoms, die durch Retrotransposition ausgehend von mRNA entstehen, so genannte „processed pseudogenes (Mighell *et al.*, 2000). Diese sind zwar inaktiv, weisen aber eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den mRNA-Transkripten auf. Beim Vorliegen dieser Pseudogene ist eine Diskriminierung zwischen der Amplifikation von cDNA und eben solchen pseudogenen Sequenzen in der gDNA nicht mehr sicher möglich. Für eine Reihe von Genen einschließlich einiger housekeeping Gene wie GAPDH oder β-Actin sind solche Pseudogene beschrieben (Tso *et al.*, 1985), nicht allerdings für die ZP-kodierenden Gene.

Als weiterer zu berücksichtigender Faktor gilt, dass zum Zeitpunkt des Primerdesigns die komplette genomische Sequenz der ZP-kodierenden Gene für den Marmoset Affen nicht bekannt war. Es wurde daher zur Bestimmung der Intron-Exon Grenzen auf die genomischen Sequenzen für den Menschen zurückgegriffen. Trotz der hohen Homologie der Sequenzen von Mensch und Marmoset Affe können Unterschiede zwischen den Intron-Exon Grenzen und damit Fehler im Primerdesign nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Primer wurden diese auch mit gDNA als Template eingesetzt, die zuvor mit RNase A behandelt wurde. Beim Vorliegen eines Pseudogens müsste in beiden Templates, sowohl cDNA sowie gDNA, ein Fragment entstehen, das in etwa die Größe des cDNA-Fragments aufweist. Versuche mit Primern für ZPC zeigten den erwarteten Unterschied zwischen cDNA und gDNA. Hier kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, dass spezifisch die cDNA amplifiziert wurde (nicht gezeigt). Die Primer für ZPB wiesen, wie oben dargestellt, ebenfalls den erwarteten Unterschied in der Fragmentgröße von 75bp bei der Amplifikation von cDNA

und gDNA auf. Zusätzlich waren mit diesen Primern bei der Verwendung von gDNA-Templates allerdings weitere Banden in der Größenordnung des cDNA-Fragments zu finden, auch wenn sie diesem nicht gänzlich entsprachen.

Überraschenderweise zeigte sich nach elektrophoretischer Auftrennung der mit Primern für ZPA gewonnen Fragmente aus Templates mit gDNA eine robuste Bande auf der exakten Höhe des cDNA-Fragments, was durch das Design der verwendeten Primer zunächst als ausgeschlossen galt. Nach Untersuchung der ZPA-, und ZPB-PCR-Produkte aus gDNA und cDNA-Templates mittels Schmelzkurvenanalyse zeigte sich eine große Ähnlichkeit im Schmelzverhalten der genannten PCR-Produkte. Die Sequenzierung der verdächtigen PCR-Produkte ergab eine hohe Übereinstimmung mit der kompletten mRNA Sequenz für ZPB beziehungsweise ZPA. Durch Klonierung der besagten PCR-Fragmente in einen geeigneten Vektor und erneute, exakte Sequenzierung ließ sich die Annahme, dass es sich hierbei um die Amplifikation eines Pseudogenes handele, nicht bestätigen. Beim Menschen konnte kürzlich ein viertes ZP-Gen, ZPB, welches paralog zum humanen ZP1 sein soll, als aktiv transkribiert nachgewiesen werden (Lefievre *et al*., 2004). Vergleichbare Berichte beim Marmoset gibt es nicht, das Auftreten der beschriebenen PCR-Produkte könnte aber auf paraloge Sequenzen im Marmoset Genom hinweisen.

Das methodische Vorgehen bei der Präparation von Follikelzellen schien von Bedeutung für die Qualität der daraus isolierten totalRNA zu sein. So lag der Verdacht nahe, dass eine schnelle Degradation von RNA bei Nichteinhaltung verschiedener Vorsichtsmassnahmen stattfand. Erste RT-PCR-Versuche mit dissektierten Follikelzellen, die erst nach mehreren Stunden aus 37°C warmem Zellkulturmedium gesammelt wurden, verliefen negativ. Es ist anzunehmen, dass es bei der Dissektion der Follikel und der Präparation der Oozyten zu einer massiven Freisetzung endogener RNasen kam, die bei 37°C zu einem schnellen Abbau der mRNA führten. Positive Ergebnisse ergaben sich mit Follikelzellen, die sofort nach der Follikeldissektion in gekühltem PBS präpariert und direkt in RNAlater oder in Wasser in flüssigem Stickstoff verbracht wurden. Um eine weitere Stabilisierung der mRNA zu erreichen, wurden alle Arbeitsschritte auch in einem Gemisch aus gekühltem PBS und RNAlater (1:1) durchgeführt (Barrett *et al.*, 2002). Die mechanische Trennung von Oozyten und Kumuluszellen durch mehrfaches Aufziehen mit der Mundpipette war bei der Verwendung dieses Mediums erheblich erschwert. Es gelang nicht, die Oozyten mit diesem Verfahren vollständig von den Kumuluszellen zu befreien, so dass dieses Material nur als Kumulus-Oozyten-Komplex in Vorversuchen und zur Optimierung der PCR beziehungsweise real-time PCR verwendet werden konnte.

Neben den beschriebenen Untersuchungen in Follikelzellen, wurden auch RT-PCR-Versuche mit Marmoset Oozyten durchgeführt. In den Oozyten konnten ebenfalls Transkripte der drei ZP-Glykoproteine nachgewiesen werden. Sie bestätigten damit Ergebnisse weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Bogner *et al*., 2004). Mit diesen Betrachtungen konnte allerdings nur eine qualitative Aussage über die Expression der ZP-Glykoproteine getroffen werden, da die konventionelle RT-PCR keine Rückschlüsse auf die eingesetzte Transkriptmenge zulässt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit weiterführend die quantitative real-time PCR für Templates aus Marmoset Oozyten optimiert.

4.2 Quantitative Bestimmung von ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripten in Marmoset Oozyten mittels real-time PCR

Viele Prozesse, die Überleben, Wachstum und Differenzierung von Zellen betreffen, spiegeln sich in veränderten Mustern der Genexpression wieder. Die Quantifizierung von Transkripten spielte daher schon immer eine zentrale Rolle in der Erforschung von Genfunktionen. Neben Methoden wie Northern Blot-Analyse, *in situ* Hybridisierung, RNase Protection-Assay, RT-PCR und Microarray-Analysen, stellt die quantitaive real-time RT-PCR die mit Abstand flexibelste und sensitivste Möglichkeit der Quantifizierung dar. Die erste Beschreibung der real-time PCR findet sich bereits bei Higuchi *et al.,* (1993). Bei diesem Verfahren wird die Fluoreszenz eines Farbstoffes erfasst, der nach Bindung an Doppelstrang-DNA angeregt werden kann. Der Anstieg der Fluoreszenz wird nach jedem Temperaturzyklus gemessen und kann mit der Menge der entstehenden Doppelstrang DNA gleichgesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der real-time PCR ein LightCycler (Roche Diagnostics GmbH) herangezogen (Wittwer *et al.*, 1997)
Es wurden somit die drei ZP-Glykoproteine in Oozyten dreier verschiedener Follikelgrößen quantifiziert. Dabei wurde die relative Menge an ZP-Transkripten in den drei verschieden Probengruppen verglichen. Durch die Verwendung von DNA-Standards war zudem die Bestimmung der absoluten Kopienzahl der Transkripte möglich.

Absolute Quantifizierung der ZP-Transkripte

Zur absoluten Quantifizierung von ZPA-, ZPC-, und GAPDH-mRNA Transkripten in Oozyten des Marmoset Affen wurden *in vitro* transkribierte mRNA-Standards hergestellt. Diese wurden

zusammen mit den zu untersuchenden Proben in eine real-time one-step RT-PCR eingesetzt. Dieses Verfahren lieferte auch nach mehreren Optimierungsversuchen nur inkonstante Ergebnisse. Hauptursache dafür war mit aller Wahrscheinlichkeit die Verwendung von nicht optimal konzipierten Primern. Weiterhin war bei photospektrometrischer Kontrolle eine Qualitätsabnahme der *in vitro* Transkripte schon nach kurzer Lagerungsdauer zu beobachten. Zudem wurden widersprüchliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Konzentration der *in vitro* Transkripte mittels Photospektrometrie beobachtet. Deutliche Unterschiede zeigten sich bei der Messung der Konzentration in verschiedenen Lösungsmedien (Wilfinger *et al.*, 1997). Eine Überprüfung der *in vitro* Transkripte mittels Gelelektrophorese im Agilent Bioanalyzer ergab in verschiedenen Proben keine nachweisbaren Transkripte der entsprechenden Größen, auch wenn die gleichen Proben vorher scheinbar photospektrometrisch messbare Mengen an Nukleinsäuren aufwiesen.

Für die absolute Quantifizierung wurden daraufhin gereinigte PCR-Produkte als externe Standards verwendet. Diese konnten für alle drei ZP-Glykoproteine hergestellt werden. Die Konzentration der Standards wurde wiederum mittels Photospektrometrie bestimmt. Insgesamt erwiesen sich diese als wesentlich stabiler als RNA-Transkripte. Der Nachteil dieser Art von Standards besteht darin, dass unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkriptase bei der Bestimmung der Kopienzahlen nicht berücksichtigt werden. Die gängigen RT-Enzyme arbeiten sequenzabhängig in einem Effizienzbereich von 5-90% (Ferre *et al.*, 1994). Die breite Streuung bleibt bei der Verwendung von PCR-Produkten als Standard unberücksichtigt. Die Standards wurden in den einzelnen Versuchen mit relativ konstanter Effizienz amplifiziert, auch waren die PCR-Effizienzen zwischen Standards und Proben durchaus vergleichbar. Trotzdem wiesen die Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen nicht unerhebliche Abweichungen auf.

Als Kernaussage wurde aber auch bei dieser Quantifizierungstechnik die Abnahme von nachweisbaren ZP-Proteintranskripten mit dem Fortschreiten der Follikulogenese deutlich (Tab. 9). Der Vergleich der Transkription zwischen Oozyten der Kategorie 1 und der Kategorie 2 zeigt bei den drei ZP-Glykoproteinen eine vergleichbare tendenzielle Abnahme, die später bei der relativen Quantifizierung bestätigt wurde.

Die Expression der ZP-Glykoproteine scheint nach den vorliegenden Zahlen auf unterschiedlichem Niveau zu erfolgen. So konnte in der Kategorie 1 für ZPA eine maximale Kopienzahl von 8022 Transkripten, von ZPB dagegen 4674 Transkripte und von ZPC nur 1062 Transkripte ermittelt werden. Insgesamt scheint die Expression der ZP-Transkripte die von GAPDH mit einer maximal ermittelten Zahl von 607 Transkripten zu überwiegen. Im weiteren Verlauf der Follikulogenese reduzierten sich die Kopienzahlen in der Kategorie 2 für ZPA auf

2898, für ZPB auf 1404, ZPC auf 465 und für GAPDH auf 499. In der Kategorie 3 wurden für ZPA noch 2156 Transkripte, für ZPB 1595, für ZPC 226 und für GAPDH 291 Transkripte nachgewiesen Allerdings müssen die oben angesprochenen Einschränkungen bei der absoluten Quantifizierung mit cDNA-Standards bei diesen Beobachtungen berücksichtigt werden.

Relative Quantifizierung der ZP-Transkripte

Es stellt sich die Frage, ob der erhebliche Mehraufwand zur Ermittlung absoluter Kopienzahlen gerechtfertigt ist, da die Bestimmung der Transkripte in verschiedenen Proben in Relation zueinander oder zu einem Referenzgen oft mehr Aussagekraft besitzt (Livak und Schmittgen, 2001). Der Vorteil dieser relativen Quantifizierung ist, dass auf die schwierige Herstellung und Konzentrationsbestimmung von externen Standards verzichtet werden kann. Zudem bietet die relative Quantifizierung durch die Verwendung eines Referenzgens die Möglichkeit, in viel größerem Umfang Inhomogenitäten zwischen einzelnen Proben zu korrigieren. (Freeman *et al*., 1999; Roche Molecular Biochemicals, LightCycler Technical Notes 10/2000).

Verschiedene mathematische Modelle zur relativen Quantifizierung wurden in den letzten Jahren beschrieben (Liu und Saint, 2002; Livak und Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Die hier vorgelegten Daten wurden mit der LightCycler Software 3.5 (Roche Molecular Biochemicals) in der Second Derivative Maximum Methode gewonnen (Rasmussen, 2001) und mit dem Programm REST-XL verarbeitet. REST-XL bietet die Möglichkeit, die Rohdaten mehrerer Quantifizierungen von bis zu vier verschiedenen Genen simultan zu analysieren. Eine Korrektur verschiedener PCR-Effizienzen kann ebenso durchgeführt werden wie die Normalisierung der Daten mit einem housekeeping Gen. Bei der Auswertung von real-time PCR-Daten mit REST-XL wird eine Normalisierung mit einem Referenzgen zum Ausgleich von Lauf-zu-Lauf Variationen grundsätzlich empfohlen. Dies gilt ganz besonders, wenn Untersuchungsmaterialien von unterschiedlichen Individuen oder zu unterschiedlichen Bedingungen gewonnen werden (Pfaffl *et al*., 2002).

Eine Normalisierung mit einem Referenzgen erfolgte bei den vorgelegten Untersuchungen, um unterschiedliche Volumina der Oozyten in den drei verschiedenen Entwicklungsstadien auszugleichen. Theoretisch sind housekeeping Gene aprobate Referenzgene, da sie in allen kernhaltigen Zellen vorkommen und für den Grundumsatz der Zelle nötig sind. Sie müssen allerdings die Bedingung einer konstanten Expression, auch unter experimenteller Behandlung,

erfüllen. Nach Untersuchungen der letzten Zeit wird klar, dass auch diese housekeeping Gene durchaus reguliert und nicht konstant exprimiert werden.

Für das in dieser Studie als housekeeping Gen verwendete humane GAPDH wird dies in verschiedenen Arbeiten bestätigt. Bustin (2000) fasste in dieser Hinsicht einige Erkenntnisse über GAPDH in verschiedenen Spezies und Zellpopulationen zusammen. So wird deutlich, dass die Expression von GAPDH signifikant variiert in der Schwangerschaft, in verschiedenen Stadien der Entwicklung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus. Verschiedene Medikamente, Insulin, Wachstumshormone, Vitamine, oxidativer Stress und Hypoxie sind bekannt als Aktivatoren der GAPDH-Expression. Nahrungskarenz hingegen reguliert die Expression herunter. Bustin (1999) selber fand interindividuelle Unterschiede sowie Unterschiede in Proben desselben Individuums, die zu unterschiedlichen Zeiten entnommen wurden.

Die für die dargestellten Versuche verwendeten Oozyten stammten aus den Ovarien eines einzelnen Individuums, wurden simultan entnommen und anschließend in der gleichen Weise verarbeitet. Interindividuelle und intraindividuelle Schwankungen sowie Reaktionen auf unterschiedliche Behandlungen im Expressionsmuster von GAPDH können somit ausgeschlossen werden. Die Menge des eingesetzten Materials war zudem bekannt, in den Kategorien 1 und 2 standen je zehn, in der Kategorie 3 neun Oozyten zur Verfügung. Die Probengruppen waren bezüglich des eingesetzten Materiels, abgesehen von eventuellen Unterschieden im Volumen der Oozyten, vergleichbar. Bei der Auswertung mit REST-XL werden die Berechnungen mit und auch ohne die Normalisierung mit GAPDH angegeben. Für alle ZP-Glykoproteine wurde dabei in den drei verschiedenen Follikelgrößen etwa dasselbe Verhältnis zueinander gefunden, ob die Daten normalisiert waren oder nicht. Die Abnahme der Transkription fällt bei den nicht normalisierten Ergebnissen deutlicher aus, zeigt aber einen annähernd identischen Verlauf wie die normalisierten Daten.

Die erhobenen Werte beschreiben eine tendenzielle Abnahme der ZP-Transkripte im Verlauf der Follikulogenese. Der größte Unterschied wurde dabei zwischen den Kategorien 1 und zwei gefunden. Kategorie 2 verglichen mit Kategorie 1 zeigte normalisiert einen Unterschied in der Größenordnung von Faktor 2,5 für ZPA und ZPB und von Faktor 1,8 für ZPC. Kategorie 3 verglichen mit Kategorie 1 zeigt Unterschiede in der Größenordnung von Faktor 2 für ZPA und ZPC sowie keinen signifikanten Unterschied für ZPB. Übereinstimmend damit wurden auch die größten Abnahmen der absoluten Kopienzahlen der ZP-Transkripte zwischen Kategorie 1 und 2 verzeichnet. Die Kopienzahlen von ZPA reduzierten sich von 8022 auf 2898 Transkripte. Für ZPB wurde eine Abnahme der Kopienzahl von 4674 auf 1404 Transkripte verzeichnet und

für ZPC von 1062 auf 465. Analog zur relativen Quantifizierung blieben die absoluten Kopienzahlen in der Kategorie 3 für ZPA mit 2156 Transkripten und ZPB mit 1595 Transkripten weitgehend konstant. Nur für ZPC wurde eine etwas deutlichere Abnahme der Kopienzahlen auf 226 Transkripte verzeichnet. Die relative Expression, sowie die absoluten Kopienzahlen von GAPDH zeigten zwar ebenfalls einen leichten Abfall zwischen den Kategorien 1 und 2, allerdings nicht in der Größenordnung wie ZPA, ZPB, und ZPC. Ein fast 50%iger Abfall der Kopienzahlen von GAPDH findet sich in den Oozyten der Kategorie 3, verglichen mit den Oozyten der Kategorie 2. Wie oben beschrieben waren in diesen Gruppen, abgesehen von ZPC, stabile Verhältnisse gefunden worden. Wahrscheinlich ist, dass die Herunterregulation der ZP-Glykoprotein Expression stattfindet, bevor in den letzten Stadien der Entwicklung der Oozyten die gesamte Transkription heruntergefahren wird. Roller *et al.* (1989) quantifizierten die Transkripte von LDH-B, MOM-1 und ZPC in Oozyten verschiedener Größen der Maus. Sie fanden eine Akkumulation der Transkripte bis zum Stadium der voll ausgewachsenen Oozyte. Um den Zeitpunkt der Ovulation entdeckten sie eine Abnahme aller Transkripte sowie des gesamten mRNA-Gehalts der Oozyten. Den dramatischsten Einbruch der Transkriptmenge mit 98% verzeichneten sie bei ZPC. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den hier gewonnenen Daten im Marmoset. Zu bedenken ist dabei, dass bei der Maus der Oozyte alleine die *de novo* Synthese der ZP-Glykoproteine obliegt, woran, zumindest nach den hier dargestellten Erkenntnissen, beim Marmoset Affen gezweifelt werden kann. Die Quantifizierung der Expression in Follikelzellen des Marmoset Affen könnte dazu beitragen, dieses Bild abzurunden.

Die gezeigten Unterschiede in der Expression der ZP-Glykoproteine sind als tendenzielle Veränderungen zu interpretieren. Um von einer Reglulation auf Ebene der Transkription zu sprechen, wurde von einigen Autoren eine Änderung der Transkripte um den Faktor 4 definiert. Dies gilt allerdings nicht für alle Gene und alle Zellen einheitlich (Warrington *et al.*, 2000). Die biologische Relevanz der gefundenen Unterschiede wäre bestätigt, wenn Quantifizierungen auf der Proteinebene ähnliche Ergebnisse erbringen würden. Gezeigt wurde der Verlauf der Expression der ZP-Glykoproteine in einem vergleichsweise engen Fenster der Follikulogenese. Wie oben dargestellt bestätigt sie die Annahme der Runterregulation der ZP-Transkription in den späteren Follikulogenesestadien. Weitere Quantifizierungen in früheren Stadien der Follikulogenese zeigen eventuell eine noch größere Menge an ZP-Transkripten.

Wie bei der konventionellen RT-PCR wurden auch bei der Quantifizierung verschiedene Kontrollen eingesetzt. Diese richteten sich allerdings weniger gegen den Nachweis von gDNA oder Pseudogenen. Bei der Verwendung von zehn, beziehungsweise neun Oozyten schien die

Gefahr einer Verfälschung der Quantifizierungsergebnisse durch den Nachweis gDNA unwahrscheinlich. Die Primer für das ZPB-Fragment (188bp) und das ZPC-Fragment (163bp) waren zudem Intron überspannend und zeigten in keinem Fall größere Fragmente als die für die mRNA konzipierten. Kontaminationen traten in nur einem Fall auf. Die Leerprobe zeigte bei einem von drei Versuchen bei der Quantifizierung mit Primern für ZPC ein spezifisches positives Ergebnis. Allerdings trat die Kontamination erst nach Zyklus 35 auf, also außerhalb des normalen Messbereichs der zu untersuchenden Proben und Standards. Die Werte aus diesem Versuch zeigten keine signifikanten Abweichungen zu denen der anderen Experimente. Problematisch für die Quantifizierung mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff ist das Auftreten unspezifischer Produkte wie Primerdimere, die zu einer Erhöhung der gemessenen Fluoreszenz führen. Diese unspezifischen Produkte können in der anschließenden Schmelzkurvenanalyse erkannt werden. Durch die Verwendung einer Hot Start Polymerase und sorgfältigem Primerdesign konnte das Auftreten von Primerdimeren verhindert werden. Zur Sicherheit wurde die Fluoreszenzmessung bei einer Temperatur durchgeführt, die jeweils 2°C unter der spezifischen Schmelztemperatur der gesuchten Fragmente lag. Alle niedermolekularen unspezifischen PCR-Produkte wurden dabei geschmolzen und interferierten so nicht mit der Fluoreszenzmessung (Ball *et al.*, 2003).

Durch die Auswertung der durchgeführten Versuche gelang es zum einen, Erkenntnisse über die Lokalisation der *in vitro* Transkription von ZPA-, ZPB-, und ZPC-Glykoprotein in Marmoset Ovarien zu gewinnen. Zum anderen war es möglich, die Expression der drei Glykoproteine in Oozyten quantitativ zu erfassen. Damit wurde ein Vergleich der Expressionsstärke der ZP-Glykoproteine in unterschiedlichen Stadien der Follikulogenese im Marmoset Modell angestellt. Optimierte Arbeitsweisen bei der Isolierung von Marmoset Oozyten und Follikelzellen trugen zu einer höheren Ausbeute der daraus gewonnenen totalRNA-Proben bei.

Effizienzen bei der Quantifizierung mittels real-time PCR

Die Effizienz der Amplifikation der PCR ist abhängig von der Sequenz, der Fragmentlänge und der Reinheit der Nukleinsäuren. Sie beträgt im optimalen Fall zwei, was eine Verdopplung der Fragmente pro Zyklus in der exponentiellen Phase entsprechen würde. Tatsächlich wird eine Effizienz von zwei nur selten erreicht. Selbst kleine Unterschiede in den Effizienzen von Standards und Proben, beziehungsweise zwischen untersuchtem Gen und housekeeping Gen

bei der relativen Quantifizierung, können dabei zu erheblichen Fehlern führen. So beträgt zum Beispiel bei einem Crossing Point von 30 der Fehler für einen Unterschied von 0,05 bereits 113% (Roche Molecular Biochemicals, Technical Note 13/2001). Ein Unterschied von nur 5% in der PCR-Effizienz bei zwei ursprünglich gleichen Proben kann dazu führen, dass ein Produkt die scheinbar doppelte Menge aufweist wie das andere. Dieser Fehler potenziert sich mit steigenden Zykluszahlen (Liu und Saint, 2002).

Die PCR-Effizienz sollte deshalb zwischen Proben und Standards nicht mehr als 0,05 differieren. Die Arbeitsgruppe von Ramakers (2003) beschrieb dieses Problem ebenfalls und stellten ein Programm (LinRegPCR) zur Verfügung, mit dem die PCR-Effizienzen für jede Probe individuell ermittelt werden kann. Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden mit LinRegPCR analysiert. Für weitere Berechnungen wurde der Mittelwert der Effizienzen aller Proben eines Primersystems verwendet. Diese bewegten sich für die untersuchten Gene zwischen 1,7 und 1,8 was realistische Werte für optimierte Primersysteme darstellt.

Die ermittelten Effizienzen wurden mit REST-XL in die Berechnung der relativen Expression einbezogen. Der Unterschied der Effizienzen zwischen Standards und Proben bei der absoluten Quantifizierung kann gegenwärtig mathematisch nicht befriedigend korrigiert werden. Die ermittelten Werte für Standards und Proben wiesen allerdings in keinem Fall einen Unterschied über 1% auf, was einen vertretbaren Wert darstellt. Mit dieser Vorgehensweise sollten die Möglichkeiten, Fehler, die bei der Nichtbeachtung unterschiedlicher PCR-Effizienzen entstehen können, so weit wie möglich vermieden werden.

Die in dieser Arbeit angeführten Ergebnisse zeigten zwischen den einzelnen Messwerten nur geringe Standardabweichungen. Erreicht wurde dies durch die sorgfältige und einheitliche Zusammenstellung der Reaktionsgemische, im immer gleichen Verfahren zum immer gleichen Zeitpunkt.

4.3 Qualitativer Nachweis von ZPA-, ZPB- ZPC- und GAPDH-Transkripten in einzelnen Marmoset Oozyten

Um den zeitlichen Verlauf der Genexpression in der Entwicklung der Oozyte und des frühen Embryos zu untersuchen, etablierte Loimas (1997) die RT-PCR mit einzelnen Oozyten für verschiedene housekeeping Gene. Zum selben Zweck entwickelten Steuerwald *et al.,* (1999; 2000) ein Verfahren zur Quantifizierung verschiedener housekeeping Gene in einzelnen Oozyten und Embryonen des Menschen und der Maus mittels real-time PCR. Er wies dabei auf

die Möglichkeit hin, prognostische Marker für die Entwicklung der Oozyte und des Embryos aus kleinsten Mengen an Probematerial zu untersuchen. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch mit Bruchteilen der revers transkribierten totalRNA einer einzelnen Marmoset Oozyte mit der real-time PCR der spezifische Nachweis von ZP-mRNA-Transkripten möglich ist. Der Nachweis gelang in drei verschiedenen Oozyten, jede davon wurde mit herkömmlichen totalRNA-Isolierungsmethoden verarbeitet. Die gewonnenen Templates wurden einmal um den Faktor zehn und einmal um den Faktor 100 verdünnt. Mit einer Teilmenge dieser Templates konnte die cDNA von ZPB in einer Verdünnung von 1:100, von ZPC und GAPDH in einer Verdünnung von 1:10 nachgewiesen werden. Das zeigt, dass auch ein Bruchteil des Zytoplasmas einer Oozyte ausreicht, um eine quantitative Bestimmung verschiedener Transkripte vorzunehmen.

In dieser Arbeit wurde die Expression der ZP-Glykoproteine ZPA, ZPB und ZPC beim Marmoset Affen mit verschiedenen Methoden untersucht. *In situ* Hybridisierung und RT-PCR erbrachten übereinstimmende Ergebnisse und belegen, neben der Oozyte, eine Beteiligung der Follikelzellen am Aufbau der ZP beim Marmoset. Diese Ergebnisse bestätigen ähnliche Erkenntnisse von anderen Primaten. Die speziesspezifische Verteilung der Transkription der ZP-mRNA innerhalb eines Follikels wurde im Vergleich mit anderen Arten demonstriert.
Des Weiteren wurde der Verlauf der Expression der ZP-Glykoproteine während der Follikulogenese quantitativ erfasst. Hierzu wurde mittels real-time PCR eine absolute Bestimmung der ZP-Transkriptmenge vorgenommen, sowie deren Relation zu einem housekeeping Gen bestimmt. Es konnte in beiden Fällen eine tendenzielle Abnahme der ZP-Glykoprotein-Expression mit fortschreiten der Entwicklung der Follikel gezeigt werden. Wobei ZPA die höchste Anzahl an Kopien aufwies und der deutlichste Abfall aller untersuchten ZP-Transkripte zwischen den Kategorien 1 und 2 zu beobachten war. Vergleichbare Daten standen bisher nicht zur Verfügung, so dass hiermit auch Referenzwerte für spätere Untersuchungen erstellt wurden. Die real-time PCR sollte schließlich auf die Anwendung mit kleinsten Mengen an Untersuchungsmaterial überprüft werden. Durch Optimierung der Methode konnte aus Mengen von rechnerisch weniger als 1% des Zytoplasmas einer Oozyte Ergebnisse mittels real-time PCR erzielt werden.

Durch weiterführende Quantifizierungen der ZP-Expression *in vitro* maturierter Oozyten könnte untersucht werden, ob sich morphologische Veränderungen der ZP bei der Kultivierung auf der Ebene der Genexpression wieder finden. Sollten signifikante Zusammenhänge zwischen der Expression der ZP-Gene und der Qualität der *in vitro* Methode gefunden werden, stünde ein schnelles und sensitives Verfahren zur Qualitätssicherung in der assistierten Reproduktion zur Verfügung. Außerdem könnte in ähnlicher Weise wie es hier für Oozyten beschrieben wurde die Quantifizierung der ZP-Transkripte in Follikelzellen erfolgen, um auch deren anteilsmäßigen Beitrag am Aufbau der ZP im Verlauf der Follikulogenese zu erforschen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation der *de novo* Synthese der ZP-Glykoproteine ZPA, ZPB und ZPC in Gewebeschnitten des Marmoset Affen untersucht. Hierzu wurden mehrere spezifische Ribosonden gegen die entsprechenden ZP-Glykoprotein-mRNAs hergestellt, gereinigt und für den Einsatz in einer *in situ* Hybridisierung auf Formalin fixierten Gewebeschnitten von Marmoset Ovarien optimiert. Mit Sonden gegen jeweils unterschiedliche Bereiche der entsprechenden mRNA-Moleküle waren ZPA-, ZPB- und ZPC-Transkripte im Marmoset Ovar nachzuweisen. Besonders intensive Reaktionen konnten im Zytoplasma der Follikelzellen von Prämordialfollikeln bis zu Tertiärfollikeln festgestellt werden. Auch in den Oozyten konnten ZP-mRNA Transkripte nachgewiesen werden. Allerdings nahm die Farbreaktion im Laufe der Follikulogense ab; die Intensität der Reaktion war in Oozyten aus Tertiärfollikeln besonders gering. Mithilfe spezifischer Primer und der RT–PCR konnte ZP-mRNA in isolierten Oozyten und Follikelzellen des Marmoset Affen nachgewiesen werden.

Die quantitative Bestimmung von ZPB-, ZPA- und ZPC-mRNA-Transkripten in Marmoset Oozyten erfolgte mittels real-time PCR. Die Oozyten wurden nach dem Reifestadium (Oozyten aus Follikeln mit einem Durchmesser von <600µm, von 600-1000µm und >1000µm, die periantralen, kleinen und großen antralen Follikel entsprechen) klassifiziert. Bestimmt wurde sowohl die absoluten Kopienzahl der ZP-Transkripte sowie des housekeeping Gens GAPDH, als auch die relative Expression von ZPB, ZPA und ZPC. Es zeigte sich ein Unterschied in der Menge der ZP-Expression in Bezug auf die einzelnen Follikelgrößen. Im Vergleich wurde die größten Differenzen aller drei ZP-Transkripte zwischen den Oozyten aus Follikeln der Größe 600-1000µm (geringste Menge an Transkripten) und Follikeln der Größe <600µm (größte Menge an Transkripten) festgestellt. Im Verlauf der Follikulogenese kam es zu einer Abnahme der Transkription aller ZP-Glykoproteine der Oozyte. Mit Ausnahme von ZPC war dieser Unterschied beim Vergleich von Oozyten aus großen antralen Follikeln (>1000µm) mit den Oozyten aus periantralen Follikeln (<600µm) weniger deutlich ausgeprägt.

Abschließend wurde die real-time PCR für kleinste Mengen an Untersuchungsmaterial optimiert. Es gelang der Nachweis von ZP-Transkripten in einem Bruchteil der aus einer Oozyte isolierten totalRNA (ZPB 1:100, ZPC 1:10). Die hier vorgestellten Untersuchungen dienen zum einem dem besseren Verständnis bezüglich Lokalisation, Verteilung und Synthese der ZP-Proteine in Marmoset Oozyten und bilden zum anderen die Basis für weitere Versuche mit *in vitro* kultivierten Marmoset Oozyten. Die Ergebnisse liefern möglicherweise grundlegende Erkenntnisse zur Optimierung der *in vitro* Follikelreifung im humanen System und könnten somit in der klinischen Diagnostik Anwendung finden.

6 Summary

In this thesis the localisation of the ZP-glycoproteins and their *de novo* synthesis in marmoset ovary cells was studied by means of *in situ* hybridisation with several specific riboprobes for the three ZP-glycoprotein mRNAs. After synthesizing the riboprobes with complementary sequences against various regions of the respective ZP-mRNA, their application was optimized for hybridisation on formalin fixed tissue sections of marmoset ovaries. The results show that clear signals from all riboprobes could be detected in the cytoplasm of marmoset monkey follicle cells. Signals were found as well in oocytes, however not constantly, and even more rarely in oocytes of larger follicles. Respective negative controls did not display any non-specific signals. Alternatively, ZP-glycoprotein mRNA could be detected in marmoset follicle cells by applying RT-PCR experiments.

Subsequently, the quantitative expression of ZPA-, ZPB- and ZPC-mRNA transcripts in three different categories of marmoset monkey oocytes was determined. Oocytes were isolated and classified by the diameter and stage of maturity of the follicles they derived from. In particular, expression of ZP-mRNA in oocytes from periantral follicles with a diameter of <600µm, oocytes from small antral follicles with a diameter of 600-1000µm and large antral follicles with >1000µm of diameter was studied. For quantification of ZP-glycoprotein transcripts the real-time PCR method was used. The determination of the absolute transcript copy numbers of ZP-transcripts including the housekeeping gene GAPDH was performed, as well as the determination of the relative ZP-mRNA expression in the three above mentioned oocyte categories. A distinct difference in the amount of transcripts of the three ZP-glycoproteins in oocytes could be found within the different follicle sizes. The largest amount of transcripts was determined in oocytes from periantral follicles (<600µm), while the most distinct decline of ZP-mRNA transcription was found in oocytes from small antral follicles (600-1000µm). Relative comparison of ZP-mRNA expression in oocytes from periantral follicles (<600µm) with oocytes from small antral follicles (600-1000µm) showed the most particular decrease of transcription of ZPA-, ZPB- and ZPC-glycoproteins in small antral follicles. With exception for ZPC this difference was not obvious by comparing large antral follicles (>1000µm) with periantral follicles (<600µm). A slight up regulation of ZP-protein transcription towards the end of folliculogenesis could be found particularly for ZPA and ZPC. Finally, quantitative real-time PCR for ZP-mRNA was optimized to detect very low amounts of ZP-mRNA in specimen. It could be demonstrated that the method was sensitive enough to amplify templates from fractional amounts of a single marmoset oocyte, even when total mRNA from one oocyte was

diluted (e.g. up to a factor of 100 for ZPB). In conclusion, the data obtained in this thesis provide a better understanding of localization, distribution and synthesis of ZP-glycoproteins in the marmoset monkey. The results might be used as reference values for further ZP-mRNA quantification studies with *in vitro* maturated marmoset oocytes. Furthermore, the results and techniques that were established could be the basis for further studies regarding the human and animal reproductive system leading to important new information needed for successful *in vitro* maturation of follicles in assisted reproduction.

7 Literaturverzeichnis

Abbott DH and Hearn JP (1978): Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, Callithrix jacchus. *J.Reprod.Fertil.* 53 (1), 155-166

Adham IM, Nayernia K, Engel W (1997): Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol.Reprod.Dev.* 46 (3), 370-376

Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y (1994): Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J.Biol.Chem.* 269 (50), 31845-31849

Ball TB, Plummer FA, HayGlass KT (2003): Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 130 (1), 82-86

Baranska W, Konwinski M, Kujawa M (1975): Fine structure of the zona pellucida of unfertilized egg cells and embryos. *J.Exp.Zool.* 192 (2), 193-202

Barrett MT, Glogovac J, Prevo LJ, Reid BJ, Porter P, Rabinovitch PS (2002): High-quality RNA and DNA from flow cytometrically sorted human epithelial cells and tissues. *Biotechniques* 32 (4), 888-90, 892, 894, 896

Barros C and Yanagimachi R (1971): Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233 (5317), 268-269

Bleil JD, Beall CF, Wassarman PM (1981): Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev.Biol.* 86 (1), 189-197

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM (1988): Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev.Biol.* 128 (2), 376-385

Bleil JD and Wassarman PM (1980): Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20 (3), 873-882

Bleil JD and Wassarman PM (1980b): Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev.Biol.* 76 (1), 185-202

Bleil JD and Wassarman PM (1983): Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev.Biol.* 95 (2), 317-324

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM (1992): A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356 (6366), 248-252

Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E (2004): Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (Callithrix jacchus) ovary. *Mol.Hum.Reprod.* 10 (7), 481-488

Burks DJ, Carballada R, Moore HD, Saling PM (1995): Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269 (5220), 83-86

Bustin SA (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 25 (2), 169-193

Bustin SA (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.* 29 (1), 23-39

Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S (1999): Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br.J.Cancer* 79 (11-12), 1813-1820

Chamberlin ME and Dean J (1990): Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (16), 6014-6018

De Vos A and Van Steirteghem A (2000): Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues.Organs* 166 (2), 220-227

Dunbar BS (1983): Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida. *J.F.Hartmann (ed): Mechanism and Control of Animal Fertilization.Academic Press, New York* , 139-157

Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B (1994): The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod.Fertil.Dev.* 6 (3), 331-347

Dunbar BS, Prasad SV, Timmons TM (1991): Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. *in B.S.Dunbar, M.G.O´Rand (eds): A Comparative Overview of Mammalian Fertilization.Plenum Press, New York* , 97-114

Duncan AE and Fraser LR (1993): Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an M(r) 95,000 phosphotyrosine-containing protein. *J.Reprod.Fertil.* 97 (1), 287-299

Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der ML, Donner P (2001): Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res.* 303 (2), 277-287

Eichenlaub-Ritter U and Peschke M (2002): Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum.Reprod.Update.* 8 (1), 21-41

El Mestrah M, Castle PE, Borossa G, Kan FW (2002): Subcellular distribution of ZP1, ZP2, and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. *Biol.Reprod.* 66 (4), 866-876

Epifano O and Dean J (1994): Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod.Fertil.Dev.* 6 (3), 319-330

Epifano O, Liang LF, Familari M, Moos MC, Jr., Dean J (1995): Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* 121 (7), 1947-1956

Eppig JJ (1991): Mammalian oocyte development in vivo and in vitro. *P.M.Wasssarman (ed.): Elements of Mammalian Ferilization* CRC Press, Inc., Boca Raton, (Volume I), 57-76

Evans S (1986): The Pair Bond of the Common Marmoset (Callithrix jacchus jacchus). *in D.Taub, F.King, (eds.) Current Perspectives in Primate Social Dynamics* New York: Van Nostrand Reinhold Company., 51-65

Ferre, Marchese, Pezzoli (1994): Quantitative PCR an overview. *The polymerase chain reaction* Birkhäuser

Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM (1984): Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev.Biol.* 106 (1), 243-255

Florman HM and Wassarman PM (1985): O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41 (1), 313-324

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26 (1), 112-115

Funahashi H, Ekwall H, Kikuchi K, Rodriguez-Martinez H (2001): Transmission electron microscopy studies of the zona reaction in pig oocytes fertilized in vivo and in vitro. *Reproduction.* 122 (3), 443-452

Gahlay GK, Srivastava N, Govind CK, Gupta SK (2002): Primate recombinant zona pellucida proteins expressed in Escherichia coli bind to spermatozoa. *J.Reprod.Immunol.* 53 (1-2), 67-77

Gilchrist R (1996): The meiotic and developmental potential of marmoset monkey oocytes in vitro. *Dissertation im Fachbereich Agrarwirtschaft* Georg-August-Universität Göttingen

Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK (1995): Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol.Reprod.* 52 (6), 1234-1243

Govind CK, Gahlay GK, Choudhury S, Gupta SK (2001): Purified and refolded recombinant bonnet monkey (Macaca radiata) zona pellucida glycoprotein-B expressed in Escherichia coli binds to spermatozoa. *Biol.Reprod.* 64 (4), 1147-1152

Green DP (1997): Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev.Reprod.* 2 (3), 147-156

Greve JM and Wassarman PM (1985): Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J.Mol.Biol.* 181 (2), 253-264

Grootenhuis AJ, Philipsen HL, Breet-Grijsbach JT, van Duin M (1996): Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 50, 43-54

Gupta SK, Sharma M, Behera AK, Bisht R, Kaul R (1997): Sequence of complementary deoxyribonucleic acid encoding bonnet monkey (Macaca radiata) zona pellucida glycoprotein-ZP1 and its high-level expression in Escherichia coli. *Biol.Reprod.* 57 (3), 532-538

Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG (1994): Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 4 (6), 361-393

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 11 (9), 1026-1030

Hinsch E, Aires VA, Hedrich F, Oehninger S, Hinsch KD (2005): A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Theriogenology* 63 (6), 1682-1694

Horvath PM, Kellom T, Caulfield J, Boldt J (1993): Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol.Reprod.Dev.* 34 (1), 65-72

Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R (2001): Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J.Cell Sci.* 114 (Pt 22), 4127-4136

Howes L and Jones R (2002): Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J.Reprod.Immunol.* 53 (1-2), 181-192

Hurteau GJ and Spivack SD (2002): mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts. *Anal.Biochem.* 307 (2), 304-315

Jethanandani P, Santhanam R, Gupta SK (1998): Molecular cloning and expression in Escherichia coli of cDNA encoding bonnet monkey (Macaca radiata) zona pellucida glycoprotein-ZP2. *Mol.Reprod.Dev.* 50 (2), 229-239

Jewgenow K and Fickel J (1999): Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biol.Reprod.* 60 (2), 522-526

Junqueira LC and Carneiro J (1996): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 4. Auflage (Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York), 586-587

Kanitz vW (1994): Biologische Grundlagen der Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. *Züchtungskunde*

Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R (1997): Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum.Reprod.* 12 (6), 1250-1252

Kerr LE, Wilson MR, Aitken RJ (1996): Molecular characterisation of zona pellucida 1 (ZP1) in the marmoset monkey, Callithrix jacchus. *J Reprod Fertil, Abstr.* 18, 29-30

Kim CH, Seo BB, Yamanouchi K, Kuromaru M, Sawasaki T, Hinsch E, Hinsch KD, Naito K, Tachi C, Tojo H (2002): Essential role of ZP molecules in tubal transport of embryos in mice. *Mol.Reprod.Dev.* 61 (3), 327-334

Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ (2002): Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction.* 124 (3), 365-375

Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G (1998): Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol.Reprod.Dev.* 49 (4), 435-443

Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Totzauer I, Amselgruber W, Plendl J (1996): Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem.J.* 28 (6), 441-447

Kolluri SK, Kaul R, Banerjee K, Gupta SK (1995): Nucleotide sequence of cDNA encoding bonnet monkey (Macaca radiata) zona pellucida glycoprotein-ZP3. *Reprod.Fertil.Dev.* 7 (5), 1209-1212

Kopf GS and Gerton GL (1991): The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. 153-203

Lee VH and Dunbar BS (1993): Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev.Biol.* 155 (2), 371-382

Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL (2004): Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum.Reprod.* 19 (7), 1580-1586

Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994): In situ Hybridisierung.

Leyton L and Saling P (1989): 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57 (7), 1123-1130

Liang LF, Chamow SM, Dean J (1990): Oocyte-specific expression of mouse Zp-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol.Cell Biol.* 10 (4), 1507-1515

Liang LF and Dean J (1993): Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes. *Dev.Biol.* 156 (2), 399-408

Litscher ES, Juntunen K, Seppo A, Penttila L, Niemela R, Renkonen O, Wassarman PM (1995): Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry* 34 (14), 4662-4669

Liu W and Saint DA (2002): A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal.Biochem.* 302 (1), 52-59

Livak KJ and Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4), 402-408

Loimas S (1997): Quantitative RT-PCR Amplification of RNA in Single Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos. *Circle Reader*

Martinez ML, Fontenot GK, Harris JD (1996): The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). *J.Reprod.Fertil.Suppl* 50, 35-41

McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM (1998): Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int.Rev.Cytol.* 177, 57-113

Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF (2000): Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett.* 468 (2-3), 109-114

Moller CC and Wassarman PM (1989): Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev.Biol.* 132 (1), 103-112

Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T (1990): Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 40, 197-210

Moore KL (1996): Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. *F.K.Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* 4. Auflage, 16-17

Mortillo S and Wassarman PM (1991): Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* 113 (1), 141-149

Myles DG and Primakoff P (1984): Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J.Cell Biol.* 99 (5), 1634-1641

Myles DG and Primakoff P (1997): Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol.Reprod.* 56 (2), 320-327

Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF, III, Stanton JA, Green DP (2000): Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics* 63 (1), 13-24

Nikas G, Paraschos T, Psychoyos A, Handyside AH (1994): The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Hum.Reprod.* 9 (11), 2135-2138

Overstreet JW, Lin Y, Yudin AI, Meyers SA, Primakoff P, Myles DG, Katz DF, Vandevoort CA (1995): Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol.Reprod.* 52 (1), 105-114

Paterson M, Wilson MR, van Duin M, Aitken RJ (1996): Evaluation of zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 50, 175-182

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9), e45

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 (9), e36

Philpott CC, Ringuette MJ, Dean J (1987): Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev.Biol.* 121 (2), 568-575

Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS (2000): Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues.Organs* 166 (2), 148-164

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci.Lett.* 339 (1), 62-66

Rankin T, Familari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J (1996): Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 122 (9), 2903-2910

Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J (1999): Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126 (17), 3847-3855

Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J (2001): Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128 (7), 1119-1126

Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J (1998): Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125 (13), 2415-2424

Rasmussen R (2001): Quantification on the LightCycler. *In: Meuer, S., Wittwer, C.and Nakagawara, K.(eds) Rapid Cycle Real - Time PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg, 21-34

Roche Molecular Biochemicals, LightCycler Technical Notes 10/2000

Roche Molecular Biochemicals, Technical Note 13/2001

Roller RJ, Kinloch RA, Hiraoka BY, Li SS, Wassarman PM (1989): Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Development* 106 (2), 251-261

Sacco AG (1990): Development and Maturation of the Zona Pellucida. *Gement Interaction*

Saling PM (1989): Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev.Reprod.Biol.* 11, 339-388

Saling PM, Burks DJ, Carballada MR, Dowds CA, Leyton L, McLeskey SB, Robinson A, Tomes CN (1995): Sperm interaction with the zona pellucida: the role of ZRK. *in: P.Fénichel, J.Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction* Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 85-104

Saling PM, Sowinski J, Storey BT (1979): An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J.Exp.Zool.* 209 (2), 229-238

Sato K (1979): Polyspermy-preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro. *J.Exp.Zool.* 210 (2), 353-359

Schultz RM, Letourneau GE, Wassarman PM (1979): Program of early development in the mammal: changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev.Biol.* 73 (1), 120-133

Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Takaoka Y, Ishikawa M, Dukelow WR (1995): Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *J.Reprod.Fertil.* 105 (1), 85-90

Shabanowitz RB and O'Rand MG (1988): Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J.Reprod.Fertil.* 82 (1), 151-161

Sinowatz F, Amselgruber W, Topfer-Petersen E, Totzauer I, Calvete J, Plendl J (1995): Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat.Embryol.(Berl)* 191 (1), 41-46

Sinowatz F, Kolle S, Topfer-Petersen E (2001): Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues.Organs* 168 (1-2), 24-35

Sinowatz F, Plendl J, Kolle S (1998): Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat.(Basel)* 161 (1-4), 196-205

Spargo SC and Hope RM (2003): Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol.Reprod.* 68 (2), 358-362

Sternlicht AL and Schultz RM (1981): Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J.Exp.Zool.* 215 (2), 191-200

Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA (1999): Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol.Hum.Reprod.* 5 (11), 1034-1039

Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA (2000): Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol.Hum.Reprod.* 6 (5), 448-453

Suzuki H, Yang X, Foote RH (1994): Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Mol.Reprod.Dev.* 38 (4), 421-430

Thillai-Koothan P, van Duin M, Aitken RJ (1993): Cloning, sequencing and oocyte-specific expression of the marmoset sperm receptor protein, ZP3. *Zygote.* 1 (2), 93-101

Topfer-Petersen E and Cechova D (1990): Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *Int.J.Androl* 13 (3), 190-196

Totzauer I, Kolle S, Sinowatz F, Plendl J, Amselgruber W, Topfer-Petersen E (1998): Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in the bovine ovary during pre- and postnatal development. *Anat.Anz.* 180 (1), 37-43

Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R (1985): Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13 (7), 2485-2502

Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K (1999): Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol.Reprod.* 61 (6), 1649-1654

Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BM (1998): The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp.Cell Res.* 240 (2), 151-164

Voyle RB, Haines BP, Loffler KA, Hope RM, Rathjen PD, Breed WG (1999): Isolation and characterisation of zona pellucida A (ZPA) cDNAs from two species of marsupial: regulated oocyte-specific expression of ZPA transcripts. *Zygote.* 7 (3), 239-248

Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN (1998): Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol.Reprod.Dev.* 49 (3), 308-316

Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M (2000): Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2 (3), 143-147

Wassarman PM (1988): Zona pellucida glycoproteins. *Annu.Rev.Biochem.* 57, 415-442

Wassarman PM (1992): Mouse gamete adhesion molecules. *Biol.Reprod.* 46 (2), 186-191

Wassarman PM (1995): Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7 (5), 658-664

Wassarman PM and Kinloch RA (1992): Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat.Res.* 296 (1-2), 3-15

Wassarman PM and Mortillo S (1991): Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int.Rev.Cytol.* 130, 85-110

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22 (3), 474-481

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ (1997): The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22 (1), 176-181

Wolters J and Immelmann K (1988): Krallenaffen. *i* Kindler Verlag GmbH München, 120ff

Yanagimachi R (1994): Mammalian Fertilization. Second (5), 189-317

Yudin AI, Vandevoort CA, Li MW, Overstreet JW (1999): PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol.Reprod.Dev.* 53 (3), 350-362

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR (1991): Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum.Reprod.* 6 (9), 1265-1274

8 Anhang

8.1 Tabellarischer Lebenslauf

Name	Stefan Kuhnert	
Geburtsdatum	20.07.1976	
Geburtsort	Schramberg	
Familienstand	ledig	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Schulbesuch	**09/1987 – 06/1996**	*Kepler – Gymnasium* Freudenstadt
Zivildienst	**10/1996 – 10/1997**	Rettungsdienst DRK Freudenstadt
Ausbildung	**10/1996 – 12/1996**	Ausbildung zum Rettungshelfer
	Bis **03/1997**	Schrittweise Weiterbildung zum Rettungssanitäter
Akademische Ausbildung	**03/1998 – 11/2005**	Studium der Humanmedizin an der *Justus-Liebig-Universität-Giessen*
	09/2000	Ärztliche Vorprüfung
	03/2001 – 09/2004	Stipendiat im DFG-Graduiertenkolleg *„Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen"*
	04/2003	Erstes Staatsexamen
	09/2004	Zweites Staatsexamen
	10/2004 – 09/2005	Praktisches Jahr
	11/2005	Drittes Staatsexamen

8.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. E. Hinsch sowie Herrn Prof. K.D. Hinsch für die umfassende Betreuung meiner Dissertationsarbeit, ihrer immerwährenden Hilfe in allen wissenschaftlichen Belangen und die vielen fruchtbaren Diskussionen. Die Arbeit mit ihnen machte viel Spaß und gab neben der Wissenschaft viel Raum für die persönliche Weiterentwicklung.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. P. Nayudu vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen. Unter ihrer Anleitung erfolgte die Gewinnung des Gewebes und der Zellen der Marmoset Affen. Außerdem möchte ich ihr für die vielen Denkanstösse bezüglich meiner Arbeit danken. An dieser Stelle auch herzlichen Dank an Nicole Umland vom Deutschen Primatenzentrum für ihre ständige Hilfe in allen „labortechnischen Angelegenheiten“

Ebenso vielen Dank an Herrn PD L. Konrad, der immer für Fragen offen war, mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich vor allem in molekularbiologischen Belangen immer wieder unterstützte. So auch Herrn Prof. Dr. R. Steger und Herrn Prof. Dr. Dr. R. Einspanier, die mich in meiner Arbeit immer wieder auf den entscheidenden, richtigen Weg brachten.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Labors Viviana und Rina für die so selbstverständliche Untersützung und das angenehme Zusammenarbeiten, und nicht zuletzt Katja die mir den Einstieg mit ihrer Hilfe sehr erleichtert hat.

Carolina- danke, als Kollege, Freund und Partner.

Zum Schluss möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium in Giessen ermöglichten, zu jeder Zeit voll und ganz hinter mir standen und immer an mich geglaubt haben. Ebenso Dank an meinen Bruder Martin und meine Schwester Kerstin, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, mich stets motivierten und bei Problemen immer hilfreich zur Seite standen.

Die Arbeit entstand mit freundlicher Unterstützung eines Doktorandenstipendiums im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ (GK 533).

Ich erkläre:
Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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."

Gießen im August 2006