

Aus der Abteilung Stammzellbiologie
(Prof. Dr. rer. nat. R. Behr)
Im Deutschen Primatenzentrum (DPZ)

**Ist DEAD box-protein 4 (DDX4) ein spezifischer
Keimzellmarker?
Expressionsanalyse im Weißbüschelaffen (*Callithrix
jacchus*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Lucia Dorothee Lewerich
aus Heidelberg
Göttingen 2015

Dekan :

I. Berichtstatter:

II. Berichtstatter/in:

III. Berichtstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

Prof. Dr. Rüdiger Behr

Prof. Dr. Ibrahim Mohamed Adham

Prof Dr. Martin Oppermann

15.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DER MODELLORGANISMUS <i>CALLITHRIX JACCHUS</i>	1
1.2	DER KEIMZELLMARKER VASA.....	2
2	MATERIAL UND METHODEN.....	5
2.1	MATERIAL	5
2.1.1	<i>Technische Geräte</i>	5
2.1.1.1	Zentrifugen	5
2.1.1.2	Histologie	5
2.1.1.3	Molekularbiologie	5
2.1.2	<i>Elektronische Datenverarbeitung</i>	6
2.1.3	<i>Verbrauchsmaterial</i>	6
2.1.4	<i>Chemikalien</i>	6
2.1.5	<i>Enzyme</i>	7
2.1.6	<i>Antikörper</i>	7
2.1.7	<i>Primer</i>	8
2.1.8	<i>Lösungen und Puffer</i>	8
2.1.9	<i>Fertigsysteme (Kits)</i>	9
2.1.10	<i>Größenstandards</i>	10
2.2	METHODEN.....	11
2.2.1	<i>Gewinnung von Tiermaterial</i>	11
2.2.2	<i>Fixierung, Vorbereitung und immunhistochemische Färbung der Gewebeprobe</i>	11
2.2.3	<i>Molekularbiologische Verfahren</i>	13
2.2.3.1	RNA-Isolation	13
2.2.3.2	Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptionsreaktion.....	15
2.2.3.3	Die Polymerasekettenreaktion	16
2.2.3.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	18
2.2.3.5	Isolation, Sequenzierung und Alignment von cDNA-Fragmenten	19
2.2.4	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	19
2.2.4.1	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.2.4.2	Färbung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung	21
2.2.4.3	Western Blotting und immunologischer Nachweis von Protein	22
3	ERGEBNISSE.....	24
3.1	IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	24
3.1.1	<i>Vergleich verschiedener VASA-Antikörper auf Hodengewebe</i>	24
3.1.2	<i>Immunhistochemische Detektion von VASA in Gewebeschnitten von <i>C. jacchus</i></i>	27
3.1.2.1	IHC-Färbungen des Hodens.....	29
3.1.2.2	IHC-Färbungen des Ovars	31
3.1.2.3	IHC-Färbungen des Magens	34
3.1.2.4	IHC-Färbungen des Pankreas	37
3.1.2.5	IHC-Färbungen der Leber.....	39
3.1.2.6	IHC-Färbungen der Niere	41
3.1.2.7	IHC-Färbungen der Haut	45
3.2	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON VASA MITTELS WESTERN BLOTTING	48
3.2.1	<i>Coomassie-Gelfärbung</i>	48
3.2.2	<i>Western Blotting und immunhistochemischer Nachweis</i>	50
3.3	NACHWEIS VON VASA-MRNA MITTELS RT-PCR.....	52
3.4	VERIFIZIERUNG DER PCR-PRODUKTE	56
4	DISKUSSION	58
4.1	NACHWEIS VON VASA-MRNA.....	58
4.2	NACHWEIS VON VASA MITTELS WESTERN BLOTTING.....	59
4.3	NACHWEIS VON VASA MITTELS IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNGEN.....	60
4.4	VASA-EXPRESSION IN DER HAUT DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELAFEN	64
4.5	SPLICE-VARIANTE VON VASA IN HODEN UND OVAR	66
4.6	VASA-POSITIVES SIGNAL IN DEN LEYDIG-ZELLEN	67
4.7	AUSBLICK.....	68
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	70

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	71
ANHANG.....	75

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 ZUSAMMENSETZUNG DER POLYACRYLAMID-SAMMEL- UND TRENNGELE.....	21
TABELLE 2 ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN.....	28
TABELLE 3: DATEN ZU DEN PROBEN, DIE FÜR DIE PCR VERWENDET WURDEN.....	78
TABELLE 4: DATEN ZU DEN PROBEN, DIE FÜR DIE WESTERN BLOTS VERWENDET WURDEN.....	79

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1-1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EXON-INTRON-STRUKTUREN DES VASA-GENS.....	2
ABB. 3-1 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM HODEN VON WEIBBÜSCHELaffen, MENSCH UND MAUS MIT VASA-ANTIKÖRPER R&D.....	24
ABB. 3-2 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM HODEN VON <i>C. JACCHUS</i> , MENSCH UND MAUS MIT VASA-ANTIKÖRPER ABCAM.....	24
ABB. 3-3 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM HODEN VON <i>C. JACCHUS</i> , MENSCH UND MAUS MIT VASA-ANTIKÖRPER MILLIPORE.....	25
ABB. 3-4 NEGATIVKONTROLLEN IM HODEN VON <i>C. JACCHUS</i> , MENSCH UND MAUS.....	25
ABB. 3-5 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM HODEN DES ADULTEN WEIBBÜSCHLaffen.....	29
ABB. 3-6 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM HODEN DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	30
ABB. 3-7 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM OVAR DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	32
ABB. 3-8 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM OVAR DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	33
ABB. 3-9 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM MAGEN DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	34
ABB. 3-10 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM MAGEN DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	35
ABB. 3-11 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM PANKREAS DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	37
ABB. 3-12 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM PANKREAS DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	38
ABB. 3-13 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER LEBER DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	39
ABB. 3-14 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER LEBER DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	40
ABB. 3-15 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER NIERE DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	42
ABB. 3-16 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER NIERE DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen:.....	43
ABB. 3-17 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER HAUT DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	45
ABB. 3-18 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER HAUT DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	46
ABB. 3-19 COOMASSIE-GELFÄRBUNG.....	48
ABB. 3-20 ERGEBNISSE DES WESTERN BLOTTING.....	50
ABB. 3-21 <i>B-ACTIN</i> -PCR AUS GEWEBEPROBEN DES NEUGEBORENEN UND DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	53
ABB. 3-22 VASA-PCR AUS GEWEBEPROBEN DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen:.....	54
ABB. 3-23 VASA-PCR AUS GEWEBEPROBEN DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen:.....	55
ABB. 3-25 ERGEBNIS DER SEQUENZIERUNG DES PCR-PRODUKTS AUS DER HAUT DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen:.....	57
ABB. 4-1 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM COLON DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	75
ABB. 4-2 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM COLON DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	75
ABB. 4-3 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM DÜNNDARM VOM ADULTEN <i>C. JACCHUS</i>	75
ABB. 4-4 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IM DÜNNDARM DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	76
ABB. 4-5 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER MILZ DES ADULTEN WEIBBÜSCHELaffen.....	76
ABB. 4-6 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER MILZ DES NEUGEBORENEN WEIBBÜSCHELaffen.....	76

ABB. 4-7 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER LUNGE DES ADULTEN WEIßBÜSCHELAFEN, ANSCHNITT EINES BRONCHUS	77
ABB. 4-8 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON VASA IN DER LUNGE DES NEUGEBORENEN WEIßBÜSCHELAFEN	77

Abkürzungsverzeichnis

BSA	<i>bovine serum albumin</i>
<i>C. jacchus</i>	<i>Callithrix jacchus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
Met	Methionin
NB	Neugeborenes (<i>newborn</i>)
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Callithrix jacchus*

Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) ist ein Neuweltaffe (*Platyrrhinus*), der zur Familie der Krallenaffen (*Callithrichidae*) gehört. Weißbüschelaffen sind gut etablierte und häufig verwendete Modellorganismen für wissenschaftliche Studien. Aufgrund ihrer großen genetischen, physiologischen und metabolischen Ähnlichkeit zum Menschen eignen sie sich gut für biologische Grundlagenforschung auf den Gebieten der Neurowissenschaften, der Infektionserkrankungen, der Reproduktionsbiologie und der Stammzellforschung (Mansfield et al. 2004). Besonders in der Neurowissenschaft werden Weißbüschelaffen häufig als Modellorganismen für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Morbus Alzheimer und Multiple Sklerose (Kendall et al. 2000; Eslamboli 2005; Okano et al. 2012). Der Weißbüschelaffe ist mit einer Körperlänge von 18 bis 20cm vom Kopf bis zum Schwanzansatz relativ klein, was viele Vorteile in Bezug auf Haltung, Handhabung und Haltungskosten mit sich bringt. Weißbüschelaffen vermehren sich gut in Gefangenschaft. Heutzutage werden für wissenschaftliche Studien fast ausschließlich Tiere verwendet, die in Gefangenschaft geboren wurden (Orsi et al. 2011) was unter anderem eine höhere Reproduzierbarkeit der Daten gewährleistet (SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risk) 2009).

Weißbüschelaffen sind ursprünglich in den Galeriewäldern Brasiliens beheimatet. Sie leben in Gruppen von 4 bis 15 Individuen, von denen in der Regel nur das dominante Weibchen während einer Fortpflanzungsperiode fruchtbar ist und Junge gebiert. Bei den übrigen Weibchen wird der Eisprung unterdrückt. Um in der Zucht eine höhere Reproduktionsrate zu erzielen, werden die Tiere paarweise mit je einem Weibchen und einem Männchen gehalten (Abbott et al. 2003). Ein Weißbüschelaffenweibchen gebiert in der Tierhaltung normalerweise 2 bis 4 Jungtiere pro Wurf, wobei es sich meistens um Zwillingsgeburten handelt. Die Tragezeit beträgt etwa 143 Tage. Pro Jahr werden also 4 bis 6 Junge geboren. Jungtiere erlangen mit etwa 18 Monaten die Geschlechtsreife. Weißbüschelaffen zeigen einen Chimärismus des hämatopoetischen Systems auf, der sich im Uterus zwischen Geschwistern aufgrund einer gemeinsamen Plazenta ausbildet, was die Geschwistertiere tolerant gegenüber Zellen des jeweils anderen macht (Ross et al. 2007).

Die Lebenserwartung von Weißbüschelaffen beträgt in freier Wildbahn maximal 12 Jahre. In der Tierhaltung liegt sie bei etwa 15 Jahren, einige Tiere werden jedoch deutlich älter.

1.2 Der Keimzellmarker VASA

VASA ist ein Protein, das zuerst in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde. VASA werden in dieser Spezies essentielle Funktionen in der Keimbahnentwicklung zugeschrieben (Hay et al. 1988). In Säugetieren gilt es als spezifischer Keimzellmarker (Castrillon et al. 2000).

VASA gehört zur Familie der DEAD-Box-Proteine. Diese sind charakterisiert durch neun konservierte Motive, die in sich nur sehr geringe Variationen aufweisen. Sie spielen eine wichtige Rolle im RNA-Metabolismus und zeigen in vitro RNA-abhängige ATPase- sowie ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivitäten. Die Funktionen von DEAD-Box-Proteinen reichen von der Transkription bis zur Degradierung von RNA und umfassen pre-mRNA-Splicing, mRNA-Export, Translationsinitiation und Genexpression in den Organellen (Linder 2006). Die folgende Abbildung zeigt die Positionen der verwendeten Primer im VASA-Gen. Die Informationen wurden *ensembl.org* entnommen (ENSCJAT00000003873).

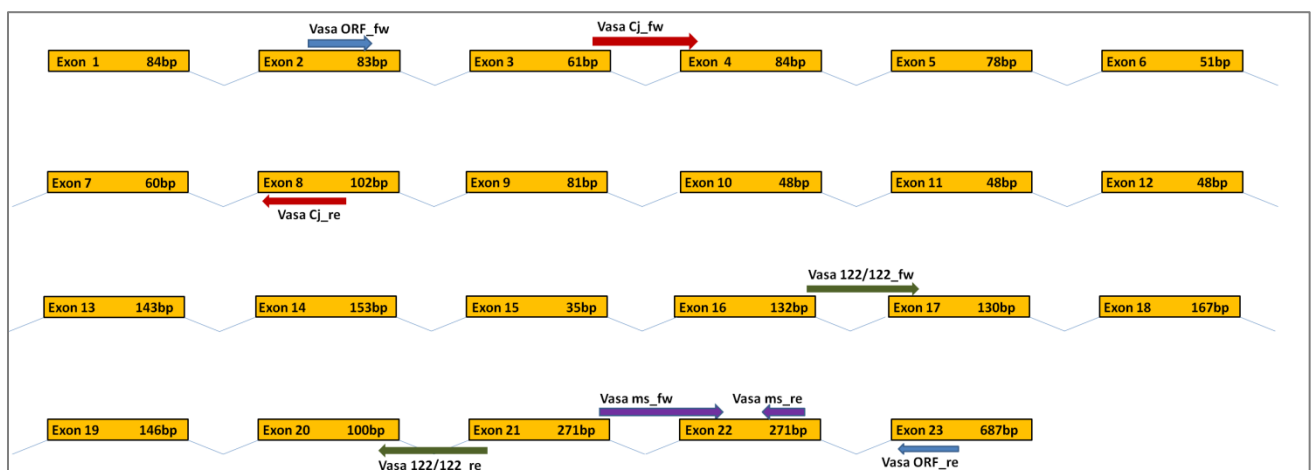


Abb. 1-1 schematische Darstellung der Exon-Intron-Strukturen des VASA-Gens

Die verwendeten Primer sind mit Pfeilen eingezeichnet. Die gelben Kästchen demonstrieren die Exone. Die blauen Verbindungslinien zwischen den Exonen repräsentieren die Introns. Die Informationen über die Länge und Position der Introns und Exons wurde der Datenbank *ensembl.org* entnommen. Die Länge der Pfeile, der Kästchen und der blauen Verbindungslinien korrelieren nicht mit der tatsächlichen Länge der Primer bzw. Exone bzw. der Introns. Die Primer wurden basierend auf der cDNA-Sequenz von VASA, die nur aus Exons besteht, ausgewählt. Die Introns wurden nur zur Verbesserung der Anschaulichkeit im Schema der Genstruktur mit dargestellt.

VASA wurde in jedem bisher untersuchtem Organismus in der Keimbahn gefunden (Raz 2000; Yajima und Wessel 2011b). Aufgrund seiner sequentiellen Ähnlichkeit zum Initiationsfaktor eIF4a (Lasko und Ashburner 1988) sowie aufgrund von Gen-Knockout-Studien an Mäusen (Tanaka et al. 2000) und an *Drosophila* (Johnstone und Lasko 2004) wird VASA eine essentielle Rolle in der Entstehung und Erhaltung von Keimzellen zugeschrieben,

indem es als positiver Transkriptionsregulator agiert (Yajima und Wessel 2011a). Hinweise auf die Funktion von VASA stützen sich allerdings bisher hauptsächlich auf Studien, die mit *Drosophila* durchgeführt wurden (Yajima und Wessel 2011b).

VASA gilt in Säugetieren als keimbahnspezifisch (Castrillon et al. 2000), allerdings zeigen neuere Daten aus unkonventionellen Modellorganismen wie *Planaria* (Plattwürmer), *Pilobrachia Pileus* (Seestachelbeere) und *Hydractinia echinata* Vasa-Aktivität in außerhalb der Keimbahn liegenden Zellen (Agata et al. 2006; Pfister et al. 2008; Rebscher et al. 2008; Alié et al. 2011), in denen Vasa eine Funktion als Stammzellfaktor zu haben scheint (Gustafson und Wessel 2010a). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Funktion von Vasa in der Tumorgenese. In einer Studie wurden *Drosophila*-Larven, die die Mutation *l(3)mbt* (lethal (3) malignant brain tumor) aufwiesen, untersucht. Diese Mutanten entwickeln bereits im Larvenstadium Hirntumoren. In den Tumorzellen der Versuchstiere wurde während der Tumorgenese eine Hochregulation von Vasa festgestellt (Janic et al. 2010).

Neuere Daten weisen auf eine weitere, bisher unbekannte Funktion von Vasa hin: Untersuchungen in Seeigel und *Drosophila* zeigen, dass Vasa eine Rolle im mitotischen Zellzyklus spielt (Yajima und Wessel 2011b). In Seeigelembryonen wird Vasa Zellzyklus-abhängig während des Blastulastadiums in allen Zellen exprimiert. Dabei scheint es mit den Mikrotubuli zu interagieren. Eine selektive pharmakologische Unterdrückung der weiteren Vasa-Translation durch Vasa-Morpholino-Antisense-Oligonukleotide führte dosisabhängig zu starken Verzögerungen im Zellzyklus sowie zu Veränderungen im Spindelapparat (Yajima und Wessel 2011a). In *Drosophila* dagegen scheint Vasa die mitotische Chromosomenkondensation in der Keimbahn zu regulieren (Pek und Kai 2011).

Die dargestellten Untersuchungen zeigen, dass VASA in unkonventionellen Tiermodellen und in *Drosophila* zusätzlich zu seiner Funktion bei der Entstehung und Erhaltung von Keimzellen noch weitere Funktionen auch außerhalb der Keimbahn übernimmt. Bisher existieren allerdings keine vergleichbaren Daten, die die Keimzellspezifität von VASA in Säugetieren widerlegen. Deshalb gilt VASA in Säugetieren weiterhin als robuster und sehr aussagekräftiger Keimzellmarker (Alié et al. 2011) und findet sowohl *in situ* als auch in Zellkulturstudien sehr häufige Anwendung. Vorarbeiten von Selma Drallé, die in der Abteilung Stammzellbiologie des DPZ unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. R. Behr durchgeführt wurden, ergaben jedoch in immunhistochemischen Färbungen und PCR Hinweise, dass das Protein VASA beim *C. jacchus* nicht nur keimzellspezifisch in Hoden und Ovar vorkommt, sondern auch in somatischen Zellen von adulten und neugeborenen

Weißbüschelaffen (Drallé, Selma Irina 2009). Diese Daten ließen sich jedoch aufgrund technischer Probleme (z.B. Verfügbarkeit von bestimmten VASA-Antikörper-Lots; variable Qualitäten von RNA- und cDNA-Präparationen) nicht klar verifizieren. Daher wurde in Weiterführung dieser Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit eine systematische Expressionsanalyse in unterschiedlichen Organen des adulten und neugeborenen Weißbüschelaffen durchgeführt, um die Keimzellspezifität von VASA im Weißbüschelaffen systematisch zu überprüfen. Hierfür wurden verschiedene Organe von neugeborenen und adulten Weißbüschelaffen mit immunhistochemischen Färbungen, Western Blotting und PCR auf eine mögliche Expression von VASA untersucht.

Es wurden zunächst elf verschiedene Organe in immunhistochemischen Färbungen mit einem VASA-Antikörper untersucht, von denen fünf Organe für weitere Analysen ausgewählt wurden. Die Auswahl der Organe erfolgte auf Grundlage der immunhistochemischen Färbungen und der Vorarbeiten von Selma Drallé. Die weiteren Untersuchungen umfassten Kontrollfärbungen unter Verwendung des VASA-Blocking-Peptids, Western Blots sowie cDNA-Synthese und anschließende PCR mit vier verschiedenen Primerpaaren. Bei allen durchgeführten Untersuchungen dienten jeweils Hoden und Ovar von adulten Tieren als Positivkontrollen. Ziel der Untersuchungen war es hierbei, die Keimzellspezifität von VASA im Weißbüschelaffen zu verifizieren oder zu falsifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

2.1.1.1 Zentrifugen

- Mikrozentrifuge 220 Vac Roth
- MiniSpin Eppendorf
- Thermomixer compact Eppendorf
- Zentrifuge C1301B Labner

2.1.1.2 Histologie

- Entparaffinierer Shandon Varistain Gemini Thermo Fisher Scientific
- Heizschrank Mov – 112 Sanyo
- Kamera Nuance FX Caliper
- Mikroskop Kamera Axiophot Zeiss
- Mikrowelle Alaska
- Mirkrotom HM 360 Microm International
- Orbitalshaker Polymax 1040 Heidolph
- Thermoblock compact Eppendorf
- Wasserbad Köttermann

2.1.1.3 Molekularbiologie

- Blot Paper GB003 Whatman
- Chemilumineszenzsystem ChemoCam Imager Intas
- Magnetrührer MR 3001 Heidolph Instrumente
- Mingle Twin Kammer Standard Power Pack P25 Biometra
- Nanophotometer Implen
- Orbitalshaker Duomax 1030 Heidolph
- Pipetten Reference Eppendorf
- Präzisionswaage Handy Sartorius
- PVDF-Membran Amersham Hybond-P GE Healthcare
- QIAcube Qiagen

- QIAxcell Qiagen
- QX DNA Screening Cartridge Qiagen
- Semi-Dry Blotter 20x20cm Unit V20-SDB SGIE-PLAS
- Seven Multi PH-Meter Mettler Toledo
- Thermocycler T300 Biometra
- TissueLyser Bead Dispenser Qiagen
- Vortexer Rottberg

2.1.2 Elektronische Datenverarbeitung

PC Suppwin
ensembl.org

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Firma Sarstedt

Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips

Firma Whatmann

Blot Paper GB 003

Firma GE Healthcare

PVDF-Membran Amersham Hybond-P

2.1.4 Chemikalien

Firma GE Healthcare:

ECL Western Blotting Detection Reagents Amersham RPN 2106/8/9

Firma ROTH

50x TAE Puffer, A CL86.1

Brompheolblau, M 691,9 g/mol. A5121

Citronensäure >99,5 % p.a., AX863.1

Essigsäure 100 % p.a., M 60,05 g/mol, A 3738.1

Ethanol 99,8 %, A5054.2

Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), A 2218.2

Formaldehyd 37 %, A4979.3

Methanol 99,9 %, M 32,04 g/mol, A P717

Milchpulver, AT145.1

Natriumchlorid >99,5 % p.a., M 58,44 g/mol, A 3957.1

Salzsäure (HCl) Maßlösung, 1M, A K025.1

SDS ultra pur, M 288,38 g/mol, A 2326.3

TRIS 99,9 % p.a., M 121,14 g/mol, A 4855.3

TRIS-HCl >99 % p.a., M 157,69 g/mol, A 9090.2

Tween 20, A9127.1

Firma AppliChem

Acrylamid-Lösung (30 %), A 3026.0500

Amidoschwarz 10B, M: 616,5 g/mol, A 1399

Glycin, M 75.05 g/mol, A 1067.50000

Pikrinsäure 1,2 %, A 2520.10000

TEMED, M 118,21 g/mol, A 1148.0250

β-Mercaptoethanol, M 78,13 g/mol, A 4338

Firma SIGMA

Albumin from bovine serum (BSA) >96 %, A 065K068

Ponceau S, M 760,6 g/mol, A P3504

Firma MERCK

Coomassie Brilliantblau R250, A 12553

Hämalaunlösung nach Meyer, A 1.09249.0500

Firma Biozyme

LE Agarose, A 84000

2.1.5 Enzyme

Firma BioLabs

Crimson Taq DNA Polymerase

Firma Qiagen

Omniscript Reverse Transkriptase

RNase-Free DNase I

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Firma antibodiesonline

IgG Ziege 5 µg/ml, A BIN 376825, Lot. 12410-MC31

Firma Santa Cruz Biotechnology

B-ACTIN, rabbit polyclonal IgG, 200 µg/ml, A SC-1616-R, Lot. B2505

Firma R&D

VASA, polyclonal Goat IgG, 200 µg/ml, AF2030, Lot. KPX01

Firma abcam

DDX4, monoclonal Rbt IgG, 1 µg/µl, ab13841, Lot. 37657-1

Firma Millipore

Anti-DDX4 (Vasa) polyclonal Rbt IgG AB4330, Lot. NRG 1835983

Sekundärantikörper

Firma R&D

Anti-goat IgG HRP conjugated, A HAF017

Anti-rabbit IgG HRP conjugated A HAF008

2.1.7 Primer

Primer 100µM	Sequenz fw	Sequenz rev	Produktgröße
B-ACTIN	5'- GACGACATGGAGAAGATCTGG-3'	5'- GGAAAGAAGGCTGGAAGAGTG-3'	562 bp
Vasa 121/122	5'- TTGGG CTGTGTAAAGAGCTG-3'	5'- CCCGATCACCATGAATA TTG-3'	555 bp
Vasa_Cj	5'- CCCACTTCATCCTCAGAAACG -3'	5'- GACCAAATCCTCCATGGCAAC-3'	370 bp
Vasa_ms	5'- AAGTATTAACAG ATG CTCAACAGGATG-3'	5'- TGAAGCCAGGAATGTATGCTACTA-3'	78 bp
Vasa_ORF	5'- GGGAGATGAACATTGGGAAGC-3'	5'- GAGAGAACACAAGGACAGGAG-3'	2280 bp

2.1.8 Lösungen und Puffer

10 mM Natrium-Citrat:

2,941 g Natrium-Citrat auf 1l Aqua dest., pH 6,0 mit HCl eingestellt

Waschpuffer (TBS 1x)

6,075 g/l TRIS, 8,76 g/l NaCl, pH 7,6 eingestellt mit HCl

10x Laufpuffer:

1 % (w/v) SDS, 250 mM Tris, 1,92 M Gycin, ad 1 l Aqua dest.

Anodenpuffer I

0,3 M Tris pH 10,4, 20 % (v/v) Methanol, ad 1 l Aqua dest.

Anodenpuffer II

0,025 M Tris pH 10,4, 20 % (v/v) Methanol, ad 1 l Aqua dest.

Kathodenpuffer

0,025 M Tris pH 9,4, 20 % (v/v) Methanol, 0,04 M Glycin, ad 1 l Aqua dest.

Amidoschwarz-Färbelösung

0,5 % (w/v) Amidoschwarz B10, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, ad 250 ml Aqua dest.

Amidoschwarz-Entfärbelösung

90 % (v/v) Methanol (vergällt), 2 % (v/v) Essigsäure, ad 1 l Aqua dest.

4x SDS Probenpuffer

8 % (w/v) SDS, 200 mM Tris/HCl pH 6,8, 50 % (v/v) Glycerol, 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau

Ponceau S Färbelösung

0,5 % Ponceau S, 1 % Ethanol (100 %ig) ad 250 ml Aqua dest.

Coomassie-Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R250, 30 % Ethanol (vergällt), 10 % (v/v) Essigsäure, ad 250 ml Aqua dest.

Coomassie-Entfärbelösung

30 % (v/v) Ethanol (vergällt), 10 % (v/v) Essigsäure, ad 1 l Aqua dest.

TBS-T

0,05 % (v/v) Tween 20, ad 1 l TBS 1x

Magermilchpulver 5 % in TBS-T (Blocklösung für Immunoblots)

5 g Magermilchpulver, ad 0,1 l TBS-T, Lagerung bei 4°C

2.1.9 Fertigsysteme (Kits)

Firma Dako:

LSAB + HRP Kit K0690

Firma Qiagen:

Omniscript RT Kit 205111

RNeasy Mini Kit 74104

2.1.10 Größenstandards

Firma Life-Technologies:

Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard 5 µl Lot no. 866154

MagicMark™ XP Western Protein Standard 5 µl Lot no. 862838

Firma New England BioLabs:

Quick-Load® 1 kb DNA Ladder

Quick-Load® 100 bp DNA Ladder

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Tiermaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeprobe­nen stammen aus Tieren der DPZ-eigenen Zucht, die unter täglicher tierärztlicher und -pflegerischer Aufsicht standen. Die Tiere wurden durch eine Überdosis des Narkotikums Göttinger Mischung II (Ketamin (100 mg/kg) 5 ml; Xylazin (10 %ig) 1 ml; Atropin (1 %ig) 0,1 ml; Aqua ad injectionem 3,9 ml) eingeschläfert und ihre Organe entnommen. Für diese Arbeit wurde auf die umfangreiche Gewebesammlung der Abteilung Stammzellbiologie zurückgegriffen. Es konnten je nach Verwendungszweck des Tierkadavers nicht immer alle Organe entnommen bzw. fixiert werden. Daher wurden von vielen verschiedenen Tieren Organe verwendet, um ein komplettes Organspektrum zusammenstellen zu können. Die in der Arbeit verwendeten menschlichen Hodenpräparate (vergl. 3.1.1) tragen die Ethiknummer AZ. 2006-588-fs Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Münster (vergl. hierzu auch Aeckerle et al. 2012).

2.2.2 Fixierung, Vorbereitung und immunhistochemische Färbung der Gewebeprobe­nen

Zum qualitativen Nachweis des VASA-Proteins wurde eine immunhistochemische Färbung nach der LSAB (Labeled Streptavidin-Biotin-)-Methode durchgeführt. Hierfür wurde das Universal LSAB Kit von der Firma DAKO verwendet. Die IHC-Färbung mit der LSAB-Methode ist eine indirekte Färbemethode. Das Prinzip beruht darauf, dass ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex über einen Sekundärantikörper mit dem Primärantikörper, der spezifisch VASA bindet, verbunden wird.

Ein Organ, von dem histologische Schnitte angefertigt werden sollen, wird nach der Entnahme für mindestens 12 bis 16 Stunden in Bouinscher Lösung fixiert. Danach wird das Gewebe in 70 %iges Ethanol überführt, welches täglich gewechselt wird, bis die Lösung keine Gelbfärbung durch die in der Bouinschen Lösung enthaltene Pikrinsäure mehr zeigt. Als Vorbereitung zur Einbettung in Paraffin wird die Probe in einer aufsteigenden Ethanolreihe inkubiert, um sie zu entwässern. Das Gewebe wird in Paraffin eingebettet und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wird das Gewebe am Mikrotom in 5µm dünne Scheiben geschnitten, im warmen Wasserbad bei ca. 42°C gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte bei 37°C auf den Objektträgern fixiert. Anschließend werden die Objektträger über Nacht bei 37°C im Heizschrank getrocknet. Die Schnitte werden im Shandon Varistain Gemini in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden

Ethanolreihe rehydriert. Im Anschluss erfolgt ein Antigenretrieval, um Quervernetzungen von Proteinen, die sich während der Fixierung ausbilden, aufzulösen und die Immunreaktivität wiederherzustellen. Hierfür werden die Schnitte 20 min in Natriumcitratlösung in der Mikrowelle gekocht. Danach erfolgt ein Waschschrift, bei dem die Schnitte für 5 min in Waschpuffer bei Raumtemperatur geschwenkt werden. Durch einen Peroxidase-Block aus 3 % H₂O₂ wird die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes blockiert. Hierzu wird jede Gewebeprobe für 15 min mit Peroxidase-Blocklösung (DAKO-Kit) inkubiert. Inkubationsschritte erfolgen stets in einer feuchten Kammer, um die Gewebeproben vor Austrocknung zu schützen. An den Peroxidase-Block schließt sich ein Waschschrift über 5 min an. Anschließend werden die Gewebeproben mit dem entsprechend der verwendeten Konzentration in Waschpuffer + 3 % BSA verdünnten Primärantikörper bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgen zwei Waschschriffe über jeweils 10 min. Anschließend werden die Gewebeproben für 15 min bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wird ein biotinyliertes Link-Polymer verwendet das Anti-Maus-, Anti-Kaninchen- und Anti-Ziege-Immunglobuline in PBS enthält. Dieses bindet an den Primärantikörper. Nach zwei Waschschriffen über jeweils 10 min erfolgt die Inkubation mit dem Streptavidin HRP (*horseradish peroxidase*) über 15 min bei Raumtemperatur. Das Streptavidin bindet über vier Bindestellen an Biotin und verbindet so den Sekundärantikörper mit dem Enzym. Als Substrat wird DAB verwendet, das von der Peroxidase in ein braunes Endprodukt umgesetzt wird. Über die Detektion dieser Braunfärbung lässt sich auf das Vorhandensein von VASA-Protein schließen. Das DAB wird nach zwei weiteren Waschschriffen über jeweils 10 min auf die Schnitte verteilt. Nach ca. 10 min wird die Färbung in Aqua dest. abgestoppt. Es erfolgt eine Gegenfärbung in Hämalaun. Nach der Färbung werden die Schnitte unter fließendem Wasser für ca. 10 min gebläut und mit Hilfe von Glycergel und Deckgläsern eingedeckt.

Negativkontrollen

Für jeden mit einem Primärantikörper inkubierten Gewebeschnitt wurden parallel Negativkontrollen angefertigt. Es kamen drei verschiedene Kontrollen zum Einsatz:

1. Um eine mögliche unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde von allen verwendeten Geweben jeweils ein entsprechender Schnitt nur mit Waschpuffer mit 3 % BSA ohne Zugabe eines Primärantikörpers inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie beschrieben durchgeführt.

2. Bei der IHC-Färbung kann eine unspezifische Bindung zustande kommen, wenn der verwendete Antikörper mit einer unspezifischen Bindestelle an ein Epitop bindet. Um eine solche Bindung auszuschließen, wurden Kontrollfärbungen mit Immunglobulinen durchgeführt. Hierzu wird ein Gemisch aus Immunglobulinen aus der Spezies, in der der Primäantikörper generiert wurde, als Primäantikörper verwendet. Zeigt sich ein farbiges Präzipitat im Schnitt, das dem Färbemuster in der Positivfärbung ähnlich ist, so ist dies ein Indikator für eine unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers.

3. Um eine weitere Kontrolle für die Spezifität des verwendeten Antikörpers vorzunehmen, wurden bei den Gewebeschnitten, die eine mutmaßlich spezifische Färbung zeigten, Kontrollfärbungen mit dem entsprechenden Blocking-Peptid durchgeführt. Es handelt sich hierbei um das Peptid, gegen das der Antikörper generiert wurde. Inkubiert man den verwendeten Antikörper mit dem entsprechenden Peptid, so werden alle spezifischen Bindestellen durch das Peptid abgesättigt. Führt man mit dem so behandelten Antikörper eine Färbung durch, und wird ein farbiges Präzipitat im entsprechenden Gewebe detektiert, so handelt es sich um eine unspezifische Bindung. Äquimolare Mengen des entsprechenden Antikörpers und des Blocking-Peptid wurden in TBS plus 3 % BSA verdünnt und über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Der so behandelte Antikörper wurde als Primäantikörper eingesetzt.

Die Analyse und Dokumentation aller Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop Axiophot von Zeiss. Die Gewebeschnitte wurden einzeln mikroskopiert und fotografiert.

2.2.3 Molekularbiologische Verfahren

2.2.3.1 RNA-Isolation

Um die Expression des *VASA*-Gens in den Zellen verschiedener Organe zu untersuchen, wurde aus den jeweiligen Organen RNA isoliert. Dies erfolgte mittels des RNeasy Mini Kit im QIAcube. Bei der RNA-Präparation bindet die RNA an eine Silicium-beschichtete Säulenmembran und kann so isoliert werden. Pro Säule können 20 mg Gewebe eingesetzt werden. Zunächst wird RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol versetzt (100 μ l 14,3 M β -Mercaptoethanol in 10 ml RLT-Puffer) und für jede zu verarbeitende Probe werden 350 μ l in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Der RLT-Puffer ist ein Hochsalzpuffer und enthält das chaotrope Guanidinthiocyanat, welches Proteine durch Zerstörung der Wasserstoffbrücken denaturiert und RNasen inaktiviert. Damit während der Präparation ein DNase-Verdau durchgeführt werden kann, wird eine DNase-Verdau-Lösung vorbereitet. Dafür wird

lyophilisierte DNase I (1500 Kunitz units) in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Pro Probe werden 10 µl DNase stock solution in 70 µl RDD-Puffer gelöst und durch vorsichtiges Invertieren miteinander vermischt. Die bei -80°C gelagerten Organe werden auf Trockeneis zwischengelagert. Mittels eines Skalpells werden Gewebestücke von jeweils 20 mg vom entsprechenden gefrorenen Organ abgeschnitten und jeweils in ein mit Puffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Jedem Reaktionsgefäß wird eine Stahlkugel mit einem Durchmesser von 5 mm hinzugefügt. Das Gewebe wird im Tissuelyser 5 min bei 50 Hz mechanisch aufgeschlossen.

Das Lysat wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Stahlkugel wird entfernt. Danach wird das Lysat 3 min bei einer Drehzahl von 18.000/min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und laut Beladungsplan in das QIAcube gestellt. Die RNA-Isolation erfolgte nach dem RNeasy Standardprotokoll. Im QIAcube wird die Probe mit 70 % igem Ethanol versetzt und auf eine RNeasy spin Säule überführt, deren Membran mit Silicium beschichtet ist. Das Ethanol verbessert die Bindung der RNA an die Membran. Durch das Guanidinthiocyanat sind die Wasserstoffbrücken in der Probe zerstört worden. Positive Ionen aus dem eingesetzten Hochsalzpuffer verbinden nun über Ionenbindungen das negativ geladene Silizium mit der negativ geladenen RNA. Auf der Membran wird nur RNA, die mehr als 200 Nukleotide umfasst, gebunden. Dies führt zu einer Anreicherung von mRNA, da die meisten RNAs aus anderen RNA-Klassen (z.B. 5S rRNA, tRNA) aus weniger als 200 Nukleotiden bestehen.

Auf die Säule wird RW1-Puffer gegeben und die Membran wird unter Zentrifugation gewaschen. Der Durchfluss wird verworfen. Anschließend erfolgt auf der Säule ein DNase-Verdau über 15 min um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu verhindern. Im Anschluss wird die Säule wiederum mit RW1-Puffer und zweimal mit RPE-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation über 2 min um die Membran zu trocknen und das Ethanol zu entfernen. Als letzter Schritt werden jeweils 30 µl RNase-freies Wasser auf jede Säule gegeben. Die Nucleinsäuren werden rehydriert und lösen sich von der Membran ab. Das nun die präparierte RNA enthaltende Eluat wird durch die Säule in ein 2 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt.

Nanophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Um den Erfolg der RNA-Isolierung zu kontrollieren und durch die anschließende Reverse Transkription vergleichbare Mengen an cDNA zu erhalten, wird die Konzentration der isolierten RNA nanophotometrisch bei $\lambda=260$ nm, dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren, bestimmt. Zusätzlich werden vom Gerät Messungen bei $\lambda=280$ nm, dem

Absorptionsmaximum von Proteinen, sowie bei $\lambda=230$ nm und $\lambda=320$ nm durchgeführt. Aus den gemessenen Werten werden Quotienten gebildet, die Rückschlüsse auf eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen oder Pufferlösung erlauben.

Für eine Messung wird das Gerät zunächst mit 1 μ l RNase-freiem Wasser geeicht. Danach wird je 1 μ l Probe in die Quarzküvette gegeben und die RNA-Konzentration in μ g/ μ l bestimmt. Die jeweils gemessenen RNA-Konzentrationen der verwendeten Proben sind im Anhang aufgelistet (vergl. S. 78).

2.2.3.2 Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptionsreaktion

Um die Expression des VASA-Gens auf mRNA-Ebene in den ausgewählten Organen zu untersuchen, wird die gewonnene mRNA mittels Reverser Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Dies ist erforderlich, da bei der anschließenden PCR eine DNA-abhängige TaqPolymerase verwendet wird. Bei der Reversen Transkriptionsreaktion wird ein Oligonukleotid aus Thymin (Oligo-dT Primer) als Starter verwendet. Dieser Primer ist komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA. Die Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert nun zunächst eine RNA-DNA-Hybride. Im Weiteren wird durch das Enzym eine doppelsträngige cDNA synthetisiert.

Für die Reverse Transkriptasereaktion wurde das Omniscript RT Kit verwendet. Für jede verwendete Probe wurden zwei Ansätze pipettiert, wobei jeweils einem Ansatz Reverse Transkriptase (RT) zugesetzt wurde (+RT), dem anderen jedoch nicht (-RT). Die Proben ohne zugesetzte RT dienen als Negativkontrollen. Ist in einer Probe keine RT enthalten, kann die enthaltene RNA nicht in cDNA umgeschrieben werden. Wenn nach einer PCR im PCR-Produkt in der Negativkontrolle eine Bande zu sehen ist, muss es sich daher um eine unspezifische Bindung der Primer an Reste von nicht verdauter genomischer DNA handeln.

Substanzen	-RT	+RT
10x Puffer	2 µl	2 µl
dNTPs	2 µl	2 µl
Oligodt (10 µM)	2 µl	2 µl
Reverse Transkriptase (RT)	-	1 µl
Rnase-freies Wasser	1 µl	-
eluierte RNA	x µl	x µl
ad 20 µl RNase-freies Wasser		

Das Volumen der für die cDNA-Synthese einzusetzenden RNA wurde nach der gemessenen RNA-Konzentration bestimmt. Pro Probe wurden 2 µg RNA eingesetzt. Die Proben wurden kurz herunterzentrifugiert und bei 37°C für 90 min in den Thermocycler gestellt. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um einen definierten Abschnitt eines DNA-Doppelstranges zu vervielfältigen, die von Mullis et al. (1986) eingeführt wurde. Hierbei wird eine Reihe von Reaktionsschritten ausgeführt, die sich zyklisch wiederholen. Es genügt eine sehr geringe Menge an DNA, welche als Matrize dient, als Ausgangsmaterial. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge an synthetisierter DNA. Für die DNA-Synthese wird eine TaqPolymerase verwendet, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Die für die PCR benötigten Komponenten sind die DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt (Template) enthält, zwei Primer, die den zu synthetisierenden Abschnitt auf der DNA flankieren und auf dem jeweiligen Strang den Startpunkt für die Polymerase festlegen, die DNA-abhängige TaqPolymerase, dNTPs als Substrat für die TaqPolymerase, Mg²⁺, welches für die Funktion der TaqPolymerase essentiell ist, sowie ein Puffer, der eine für die TaqPolymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellt.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize bei 95°C. Bei dieser Temperatur trennt sich der DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge auf. Anschließend erfolgt eine rasche Abkühlung, um eine neue Aneinanderlagerung der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Im nächsten Schritt erfolgt die Primerhybridisierung: die Primer

lagern sich an die definierten Abschnitte der DNA-Einzelstränge an und legen so die Startpunkte für die TaqPolymerase fest. Die Annealing-Temperatur T_A berechnet sich aus der Länge und dem G-C-Gehalt der verwendeten Primer. Da G-C-Basenpaare jeweils eine Wasserstoffbrücke mehr ausbilden als A-C-Basenpaare, haben sie eine höhere Annealing-Temperatur. Die Annealing-Temperatur wurde für jeden der beiden für eine PCR verwendeten Primer nach folgender Formel berechnet:

$$T_A[^\circ\text{C}] = ((A+T) \times 2) + ((G+C) \times 4) - 4$$

Als dritter Schritt erfolgt die Elongation, in der die TaqPolymerase den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt synthetisiert. Die Elongation erfolgte bei 68°C. Die Dauer der Elongation pro Zyklus richtet sich nach der Länge des zu synthetisierenden Fragments sowie der Syntheserate der verwendeten TaqPolymerase. Die verwendete Crimson Taq hat laut Herstellerangaben bei einer Temperatur von 68°C eine Syntheserate von 1 kb/min.

PCR: Reaktionsansatz pro Probe:

Substanz	Volumen
5x Puffer	3 μl
25mM MgCl ₂	0,9 μl
10mM dNTPs	0,3 μl
Primermix: 5 μM forward Primer, 5 μM reverse Primer	0,15 μl
TaqPolymerase	0,075 μl
Rnase-freies Wasser	10,575 μl – x μl
cDNA	x μl
Gesamtvolumen	15 μl

Die Menge an eingesetztem Template wurde nach der Signalstärke der in der Gelelektrophorese detektierten Banden für *B-ACTIN* variiert und für jede Probe individuell festgelegt. Sie betrug je nach Probe zwischen 0,5 und 2 μl .

Die für die PCR erforderlichen Substanzen wurden zusammenpipettiert und in den Thermocycler gestellt. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer (vergl. 3.1.7) wurden folgende Einstellungen gewählt:

Programm für <i>B-ACTIN</i>			
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 s	-
Denaturierung	95°C	20 s	25
Hybridisierung	62°C	45 s	
Elongation	68°C	45 s	
Verlängerung	68°C	5 min	-
Lagerung	4°C	∞	-

PCR-Programme für <i>VASA</i> -Primer			
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 s	-
Denaturierung	95°C	30 s	32
Hybridisierung	s.u.	45 s	
Elongation	68°C	s.u.	
Verlängerung	68°C	5 min	-
Lagerung	4°C	∞	-

Primerpaar	Hybridisierungstemperatur	Elongationszeit
Vasa_121/122	58°C	60 s
Vasa_cj	62°C	2 min
Vasa_ms	60°C	60 s
Vasa_ORF	62°C	2 min 30 s

2.2.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die Gelelektrophorese wird ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel gegossen, an das eine elektrische Spannung gelegt wird. Über Taschen wird das zu untersuchende PCR-Produkt eingefüllt. Die negativ geladene DNA wandert in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der ein Fragment durch ein elektrisches Feld wandert, hängt von dessen Größe ab. Durch die Verwendung eines Größenstandards, der ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe enthält, kann die Größe eines Fragmentes bestimmt werden.

Zum Teil wurde die Elektrophorese im QIAxcell durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einer Kartusche aus Kapillaren, die mit Elektrophorese-Gel und Ethidiumbromid befüllt sind. Die Proben mit dem amplifizierten cDNA-Fragment wandern in den Kapillaren durch ein elektrisches Feld, wobei sie einen Detektor passieren, der ihr Fluoreszenzsignal misst. Ein Photomultiplier-Detektor wandelt das Emissionssignal in ein elektrisches Signal und übermittelt es dem angeschlossenen Computer, der aus den Daten ein Gelbild rekonstruiert.

Bei jedem Lauf wird ein Alignment-Marker mitverwendet. So ist es möglich, eine im Gelbild erscheinende Bande einer bestimmten Größe zuzuordnen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Alignment-Marker verwendet, der einen Bereich von 15 bp bis 1 kbp abdeckt.

2.2.3.5 Isolation, Sequenzierung und Alignment von cDNA-Fragmenten

Von zwei in der Gelelektrophorese detektierten Banden wurde eine Sequenzierung vorgenommen, um die Identität der amplifizierten DNA zu bestätigen. Um das entsprechende Fragment aus dem PCR-Produkt zu isolieren, wird eine Gelelektrophorese bei 200 V über 20 min durchgeführt. Unter UV-Licht wird die entsprechende Bande auf einer Glasplatte mittels eines Skalpell ausgeschnitten und in ein mit Glaswolle befülltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, dessen Boden mit einem Loch versehen ist. Das Reaktionsgefäß wird auf ein zweites 2 ml-Reaktionsgefäß gestellt und für 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Das Eluat mit dem entsprechenden cDNA-Fragment wird hierbei durch die Glaswolle hindurchzentrifugiert und im unteren Reaktionsgefäß gesammelt. Das Eluat wurde zusammen mit jeweils 20 µl der zur Sequenzierung gedachten Primer (5 µM) an LGC Genomics (Berlin) verschickt. Die so erhaltene Basensequenz wurde mittels PCsuppwin mit einer von *ensembl.org* entnommenen DNA-Sequenz des VASA-Gens von *C. jacchus* verglichen, um die Identität der amplifizierten cDNA zu bestätigen.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen und Peptiden nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Sodiumpyridylsulfat (SDS) wird im Überschuss der zu untersuchenden Proteinprobe zugesetzt und bindet mit seinem hydrophoben Teil an die Proteine. Mit seinem negativ geladenen Teil stößt es andere SDS-Moleküle ab. Es bilden sich

SDS-Protein-Komplexe, die eine hohe negative Nettoladung aufweisen und dadurch die Eigenladung der Proteine überdecken. Durch die Wirkung von SDS, die Zugabe von reduzierendem β -Mercaptoethanol und durch eine anschließende Erhitzung der Proben auf 95°C wird eine Denaturierung der Proteine erreicht. Die negative Ladung der Proteine durch SDS führt zu einer gegenseitigen Abstoßung. Bei der sich anschließenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wandern die SDS-Protein-Komplexe in einem angelegten elektrischen Feld durch ein Acrylamidgel zur Anode. Durch die Polyacrylamidmatrix werden die Proteine entsprechend ihrer Länge, proportional zu ihrem Molekulargewicht, aufgetrennt, da kleinere Proteine schneller durch das Polyacrylamidgel wandern können als größere. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung der Proteine ein Trenngel (Tris HCl-Puffer pH 8,8 mit 10 % Acrylamid) verwendet, auf das ein Sammelgel (Tris HCl-Puffer pH 6,8 mit 5 % Acrylamid) geschichtet ist. Die Proteine sammeln sich am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel und werden dann im Trenngel durch die engmaschige Acrylamidmatrix entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Vorbereitung der Proben

Es wurde bei -80°C tiefgefrorenes Gewebe verwendet. Auf Trockeneis wurden pro verwendetem Organ 20 mg Gewebe abgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und weiter auf Trockeneis zwischengelagert. In jedes Reaktionsgefäß wurden 560 μ l PBS und 80 μ l SDS 10 % zugegeben. Die Gewebe wurden im *Tissuelyser* für 3 min bei 50 Hz mechanisch aufgeschlossen und anschließend für 3 min bei einer Drehzahl von 18.000/min zentrifugiert, um die sich auf den Proben befindende Schaummenge zu verringern. Dann wurden pro Probe 160 μ l 4xProbenpuffer (vergl. **2.1.8**) zugesetzt und die Probe im Heizblock für 5 min bei 95°C erhitzt.

Sofern die Proben nicht sofort weiterverwendet wurden, wurden sie bei -20°C gelagert.

Gießen der Gele und Elektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden ein 10 %iges Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel verwendet.

Die Zusammensetzung der Gele ergibt sich wie folgt:

Tabelle 1 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Sammel- und Trenngele

	Sammelgel 5 %	Trenngel 10 %
Tris HCl 0,5M pH 6,8	1,0 ml	3,0 ml
SDS 10 % (w/v)	40 µl	120 µl
APS 10 % (w/v)	80 µl	80 µl
TEMED	7 µl	9 µl
Aqua dest.	2,24 ml	4,84 ml
Acrylamid (w/v)	0,68 µl	4,0 ml

Die Gele werden zwischen zwei mit Gummi abgedichtete Glasplatten gegossen. Zuerst wird das Trenngel gegossen und mit 100 %igem Ethanol überschichtet, um eine gerade und blasenfreie Trennschicht zu erzeugen. Wenn das Trenngel polymerisiert ist, wird das Ethanol abgegossen und Rückstände werden mit einem Filterpapier aufgesaugt. Das Sammelgel wird über das Trenngel gegossen, und in das noch nicht polymerisierte Trenngel werden spezielle Kämme gesteckt, die nach der Polymerisation des Gels entfernt werden und so Taschen zur Befüllung mit Probenmaterial bilden. Das Polyacrylamidgel wird mit Hilfe der Glasplatten senkrecht zwischen die Kathode und die Anode in eine Laufkammer eingespannt. Der Stromkreis wird mit Laufpuffer geschlossen. In die entstandenen Taschen wurden zwischen 15 und 25 µl Probenmaterial gefüllt. Um die Proben im Sammelgel zu sammeln, wurde eine Stromstärke von 15 mA verwendet, danach wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht, um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Trenngel aufzutrennen.

Die Proteinproben wurden anschließend entweder mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt oder für einen immunologischen Nachweis auf eine PVDF-Membran mittels Western Blotting übertragen.

2.2.4.2 Färbung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung

Es wurde eine Färbung mit Coomassie-Färbelösung vorgenommen, um die in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen und um zu beurteilen, ob jede Probe ausreichend Protein enthielt bzw. um eine Degradation der Proteine auszuschließen. Hierfür werden die SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie-Färbelösung bedeckt und über Nacht auf dem Orbitalshaker bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend werden die Gele für 2,5 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt und mittels eines Scanners fotografiert.

2.2.4.3 Western Blotting und immunologischer Nachweis von Protein

Direkt nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die Proteine mittels Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Sammelgel wird vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Um den Blot aufzubauen, werden Schalen mit Kathodenpuffer, Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Methanol bereitgestellt. Um ein Gel auf eine PVDF-Membran zu blotten, werden sechs Whatman-Filterpapiere und eine PVDF-Membran in der passenden Größe zugeschnitten. Drei Filterpapiere werden mit Kathodenpuffer getränkt, zwei Filterpapiere mit Anodenpuffer I und ein Filterpapier mit Anodenpuffer II. Die PVDF-Membran wird in Methanol aktiviert und dann in Anodenpuffer II gelegt. Für den Blot wurde ein Semi-dry Blotter verwendet. Dieser enthält zwei Metallplatten – die Kathode und die Anode – zwischen denen der Blot aufgebaut wird. Auf die Anode des Gerätes werden zuerst die in Anodenpuffer I getränkten Filterpapiere gelegt, darauf werden passgenau das Filterpapier mit Anodenpuffer II, darüber die PVDF-Membran und darüber zuletzt das Gel gestapelt. Mit einem mit Anodenpuffer II benetztem Handschuh werden Luftblasen ausgestrichen. Auf das Gel werden übereinander die drei mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere gelegt. Auf den Blot wird nun die Kathode aufgesetzt und zwischen Kathode und Anode wird ein elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern durch das elektrische Feld von der Kathode zur Anode und werden auf der PVDF-Membran gebunden. Die Übertragung erfolgte bei 150 mA über 1 h.

Nach dem Blotting wurden die Proteine mit Ponceau-S, das reversibel alle Proteine anfärbt, sichtbar gemacht, um zu überprüfen, ob auf jeder Spur genug Protein vorhanden war (Salinovich und Montelaro 1986). Der Farbstoff wird zuerst mit Wasser abgespült, dann wird die Membran dreimal für je 5 min in TBS-T unter ständiger Bewegung gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wird die Membran für eine Stunde in 5 % Magermilchpulver in TBS-T (Blocklösung, vergl. 2.1.8) geblockt. Anschließend wird die Membran dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen. Danach erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem entsprechenden, in Blocklösung verdünnten Primärantikörper, wobei der VASA-Antikörper in der Verdünnung 1:2000 und der B-ACTIN-Antikörper in der Verdünnung 1:5000 eingesetzt wurde. Anschließend erfolgt nach weiteren drei Waschschritten von jeweils 10 min in TBS-T für 1 h die Inkubation mit dem entsprechenden, in Blocklösung verdünnten Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper. Es folgten wiederum drei Waschschrritte in TBS-T für jeweils 10 min.

Um die Bindung von Sekundärantikörpern zu detektieren, wurden „Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents“ verwendet. Hierbei erfolgt eine Peroxidase-katalysierte Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und eine gleichzeitige Oxidation von Luminol, was eine Licht-Emission der Wellenlänge $\lambda=428$ nm zur Folge hat. Die Membran wurde in Klarsichtfolie gelegt und mit den vorher im Verhältnis 1:1 vermischten ECLTM Lösungen 1 und 2 für 1 min inkubiert. Die Licht-Emission wurde mit Hilfe des Chemolumineszenzsystems „ChemoCam Imager“ detektiert und dokumentiert.

Um die Menge an aufgetragenem Protein zu dokumentieren, wurde anschließend eine irreversible Gesamtproteinfärbung mit Amidoschwarz-Färbelösung vorgenommen. Die PVDF-Membran wird hierfür für ca. 5 min mit Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt und danach mit Amidoschwarz-Entfärbelösung gespült, um überschüssigen Farbstoff abzuwaschen. Die Proteinverteilung wurde durch Einscannen der angefärbten Membran dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischen Färbungen

3.1.1 Vergleich verschiedener VASA-Antikörper auf Hodengewebe

Da derzeit kommerziell nur VASA-Antikörper verfügbar sind, die für die Verwendung in Maus und Mensch generiert wurden, wurden zunächst verschiedene Antikörper auf ihre Verwendbarkeit in *C. jacchus* getestet. Das typische Färbemuster von VASA im Hoden entspricht einer Färbung in den Spermatogonien, in den Spermatozyten sowie in den runden Spermatiden (Castrillon et al. 2000). Ein Antikörper wurde daher als verwendbar angesehen, wenn er in Hodengewebe von *C. jacchus* dieses Färbemuster erzeugte. Es wurde jeweils Hodengewebe von adultem Weißbüschelaffen, Maus und Mensch mit jeweils drei verschiedenen VASA-Antikörpern untersucht. Die Antikörper werden im Folgenden nach der Herstellerfirma benannt. Es wurde jeweils ein Antikörper von abcam, Millipore und R&D verwendet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

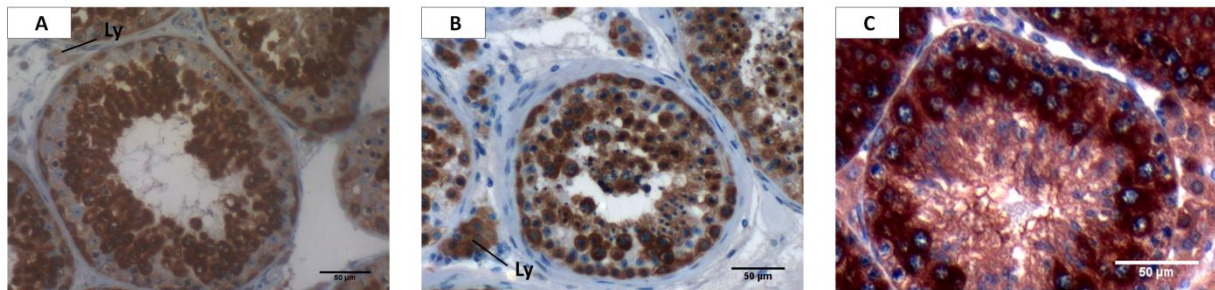


Abb. 3-1 Immunhistochemische Detektion von VASA im Hoden von Weißbüschelaffen, Mensch und Maus mit VASA-Antikörper R&D

Der VASA-Antikörper R&D wurde in Hodengewebe von adultem *C. jacchus* (A), Mensch (B) und CD1 - Maus (C) getestet. In allen drei Spezies konnte das spezifische Färbemuster für VASA detektiert werden. In *C. jacchus* (A) und Mensch (B) wurden zudem Färbungen in den Leydig-Zellen (Ly) detektiert.

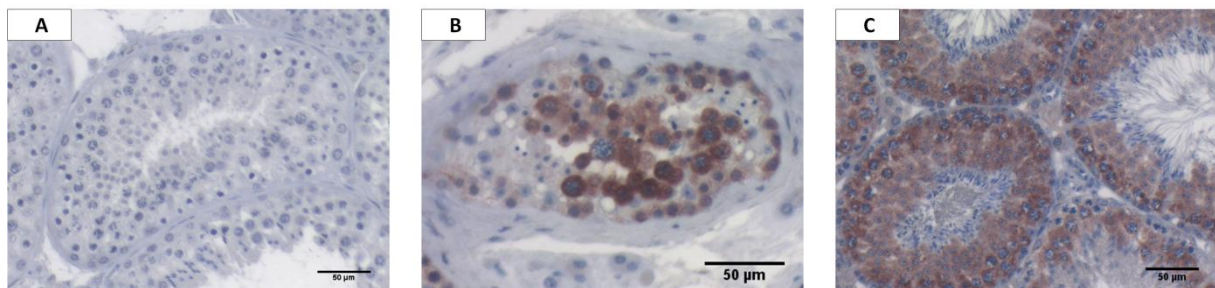


Abb. 3-2 Immunhistochemische Detektion von VASA im Hoden von *C. jacchus*, Mensch und Maus mit VASA-Antikörper abcam

Der VASA-Antikörper abcam wurde in Hodengewebe von adultem *C. jacchus* (A), Mensch (B) und Maus (C) getestet. In Mensch und Maus konnte das spezifische Färbemuster für VASA detektiert werden. In *C. jacchus* wurde keine Färbung detektiert, wobei der Versuch mehrere Male mit Geweben von unterschiedlichen Individuen und verschiedenen Lot-Nummern des Antikörpers wiederholt wurde.

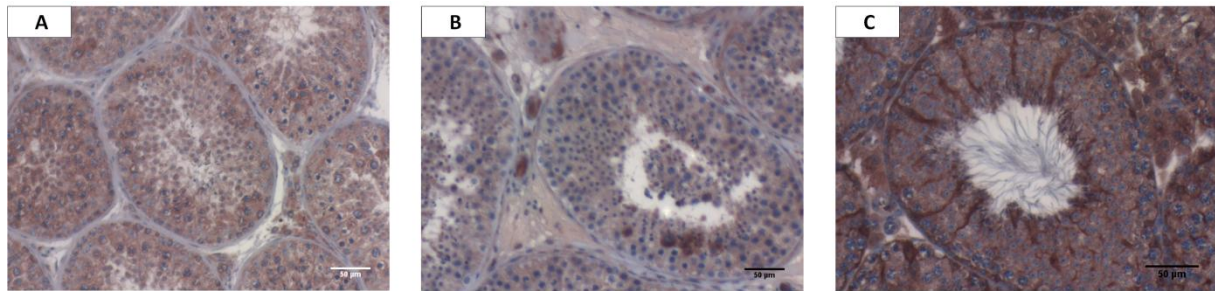


Abb. 3-3 Immunhistochemische Detektion von VASA im Hoden von *C. jacchus*, Mensch und Maus mit VASA-Antikörper Millipore

Mit dem VASA-Antikörper Millipore zeigte sich in *C. jacchus* (A) und Mensch (B) keine klare Färbung in den Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden. Bei der Maus (C) scheinen die Zytoplasmaausläufer der Sertoli-Zellen die stärkste Färbung aufzuweisen.

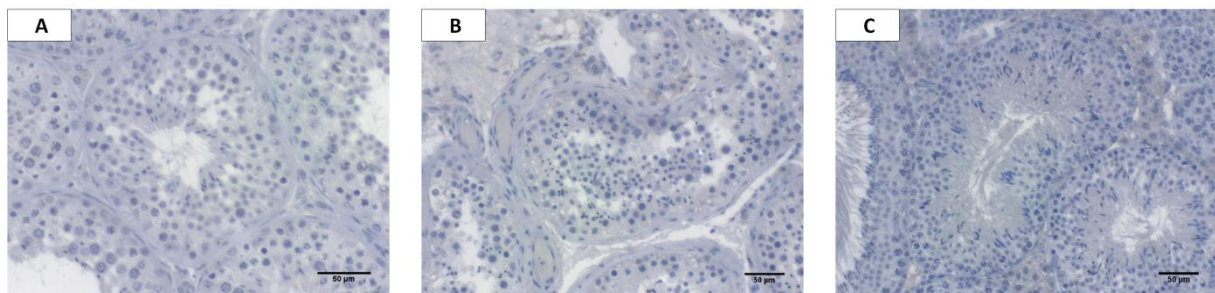


Abb. 3-4 Negativkontrollen im Hoden von *C. jacchus*, Mensch und Maus

Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers war in dem verwendeten Hodengewebe von adultem *C. jacchus* (A), Mensch (B) und Maus (C) signalfrei.

Die Inkubation mit dem VASA-Antikörper der Firma R&D (vergl. **Abb. 3-1**) ergab bei allen drei untersuchten Spezies jeweils eine Färbung in den pachytänen Spermatozyten sowie in den runden Spermatiden. Dies entspricht dem erwarteten Färbemuster für VASA (Castrillon et al. 2000). Zusätzlich wurden in den Präparaten aus *C. jacchus* (A) und Mensch (B) die Leydig-Zellen angefärbt. Das Präparat aus Maus (C) zeigte eine intensive Hintergrundfärbung, die nicht von einer eventuellen Färbung der Leydig-Zellen abgegrenzt werden konnte.

In den Schnitten, die mit dem VASA-Antikörper der Firma abcam inkubiert wurden (vergl. **Abb. 3-2**), wurde das typische VASA Färbemuster im Hodengewebe von Mensch (B) und Maus (C) detektiert. Im Hodengewebe von *C. jacchus* (A) wurde keine Färbung detektiert.

Nach Inkubation mit dem VASA-Antikörper der Firma Millipore (vergl. **Abb. 3-3**) zeigte sich weder im Hodengewebe von *C. jacchus* (A), noch in dem von Mensch (B) und Maus (C) eine klare Färbung in den Spermatogonien, den Spermatozyten sowie den runden Spermatiden. In der Maus wurde das stärkste Signal in den Sertolizellen statt in den Keimzellen detektiert. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers (vergl. **Abb. 3-4**) war im Hodengewebe von *C. jacchus* (A), Mensch (B) und Maus (C) jeweils signalfrei.

Da nur der Antikörper der Firma R&D in allen drei Spezies das typische VASA Färbemuster zeigte, wurde er in den folgenden Organfärbungen angewandt.

3.1.2 Immunhistochemische Detektion von VASA in Gewebeschnitten von *C. jacchus*

Um die VASA-Expression im Weißbüschelaffen zu untersuchen, wurden in insgesamt elf verschiedenen Organen von jeweils drei neugeborenen und drei adulten Tieren Färbungen mit VASA-Antikörper durchgeführt. Als Kontrollen dienten jeweils eine Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers sowie eine Kontrolle mit einer unspezifischen IgG-Fraktion aus der Ziege (im Weiteren als IgG Ziege bezeichnet) anstelle des Primärantikörpers. Auf Grundlage der initialen Färbungsergebnisse sowie der Vorergebnisse von Selma Drallé wurden fünf Organe, in denen spezifisch scheinende Färbungen detektiert worden waren, für weitere Analysen ausgewählt. Für diese Organe wurde eine zusätzliche Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid durchgeführt. Die ausgewählten Organe waren Magen, Niere, Leber, Pankreas und Haut. Als Positivkontrollen dienten zusätzlich Ovar und Hoden aus adulten Tieren. Es wurden jeweils Organe aus einem neugeborenen und einem adulten Tier untersucht. Die Ergebnisse der in den fünf ausgewählten Organen durchgeführten immunhistochemischen Färbungen sowie die Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid sind in einer Tabelle zusammengefasst dargestellt und werden im Folgenden anhand von Bildern im Detail beschrieben. Im Bildmaterial ist, soweit es keine morphologischen Unterschiede gibt, immer exemplarisch das erste Bild eines Bilderblocks beschriftet. Diese Beschriftungen gelten auch für alle anderen Bilder des Blocks.

Die Ergebnisse der weiteren sechs Organe, die mittels VASA-Antikörper untersucht wurden, sind dem Anhang zu entnehmen.

Organ		VASA-Antikörper	Negativkontrolle	Kontrolle mit IgG-Ziege	Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid
Hoden	Adult	Spermatogonien, Spermatozyten, runde Spermatisden	-	-	-
	NB	Spermatogonien	-	-	
Ovar	Adult	Zytoplasmata der Oozyten	-	-	-
	NB	Zytoplasmata der Oozyten	-	-	-
Magen	Adult	Drüsengründe der Magendrüsen, Muskulatur	-	-	-
	NB	Belegzellen, Muskulatur	-	-	(+) Muskulatur
Pankreas	Adult	Lumina der exokrinen Drüsenabschnitte	-	-	-
	NB	Lumina der exokrinen Drüsenabschnitte	-	-	-
Leber	Adult	Um Gefäße liegende Hepatozyten: Zytoplasmata und z.T. Nuclei	-	-	(+)
	NB	Alle Hepatozyten	+	+	+
Niere	Adult	Sammelrohre	-	(+)	+
	NB	Proximale Tubuli, Sammelrohre	-	(+) Sammelrohre	+ Sammelrohre
Haut	Adult	Keratinocyten, Haarfollikel, Talgdrüsen, Muskulatur	-	(+) Keratinocyten, Talgdrüsen	-
	NB	Keratinocyten, Haarfollikel, Talgdrüsen, Muskulatur	-	-	-

Tabelle 2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Die Tabelle fasst die im Folgenden detailliert dargestellten Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zusammen. Von jedem Organ werden die Ergebnisse der Färbungen im adulten und neugeborenen (NB) *C. jacchus* dargestellt. In der ersten Spalte werden die durch den VASA-Antikörper angefärbten Strukturen aufgeführt. In den folgenden Spalten zeigt ein Minuszeichen an, dass in der entsprechenden Kontrolle keine Färbung detektiert wurde, hingegen ein Pluszeichen, dass Färbung detektiert wurde. War die detektierte Färbung deutlich schwächer als die Positivfärbung, ist das Pluszeichen in Klammern gesetzt. Wenn der VASA-Antikörper mehrere Strukturen in einem Organ anfärbte, in einer Kontrolle aber nur bestimmte Strukturen ein Signal zeigten, sind die entsprechenden Strukturen in der jeweiligen Spalte hinter dem Pluszeichen aufgeführt.

3.1.2.1 IHC-Färbungen des Hodens

Das Hodengewebe besteht aus den Hodentubuli, in deren Keimzellepithel die Spermatogenese stattfindet, und dem umgebenden Binde- und vaskulären Gewebe, in dem inselartig verteilt die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen liegen. Die Spermatogenese umfasst die Vermehrung (mitotische Teilungen), die Reifung (Meiose) und die Differenzierung. Aus Spermatogonien werden hierbei über Spermatozyten I und Spermatozyten II reife Spermatisden. Die vorliegenden Präparate zeigen die quer angeschnittenen Hodentubuli.

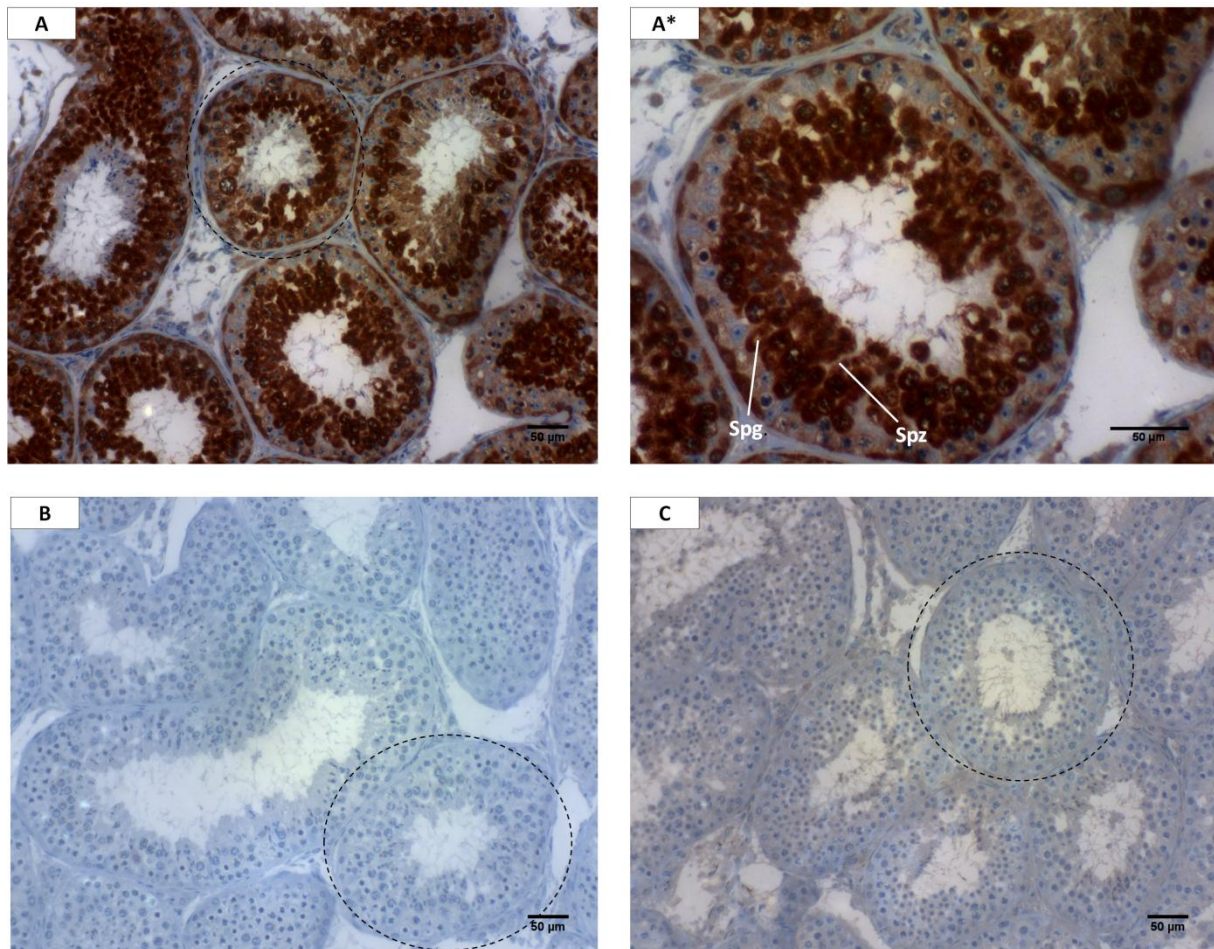


Abb. 3-5 Immunhistochemische Detektion von VASA im Hoden des adulten Weißbüschalaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A, A*) zeigte das spezifische Färbemuster für VASA mit positivem Signal in den Spermatogonien (Spg), in den Spermatozyten (Sp.) sowie in den runden Spermatisden der Hodentubuli, von denen jeweils eines im Bild exemplarisch umrandet ist. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (nicht gezeigt) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (B) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal in den Hodentubuli konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (C) vollständig geblockt werden.

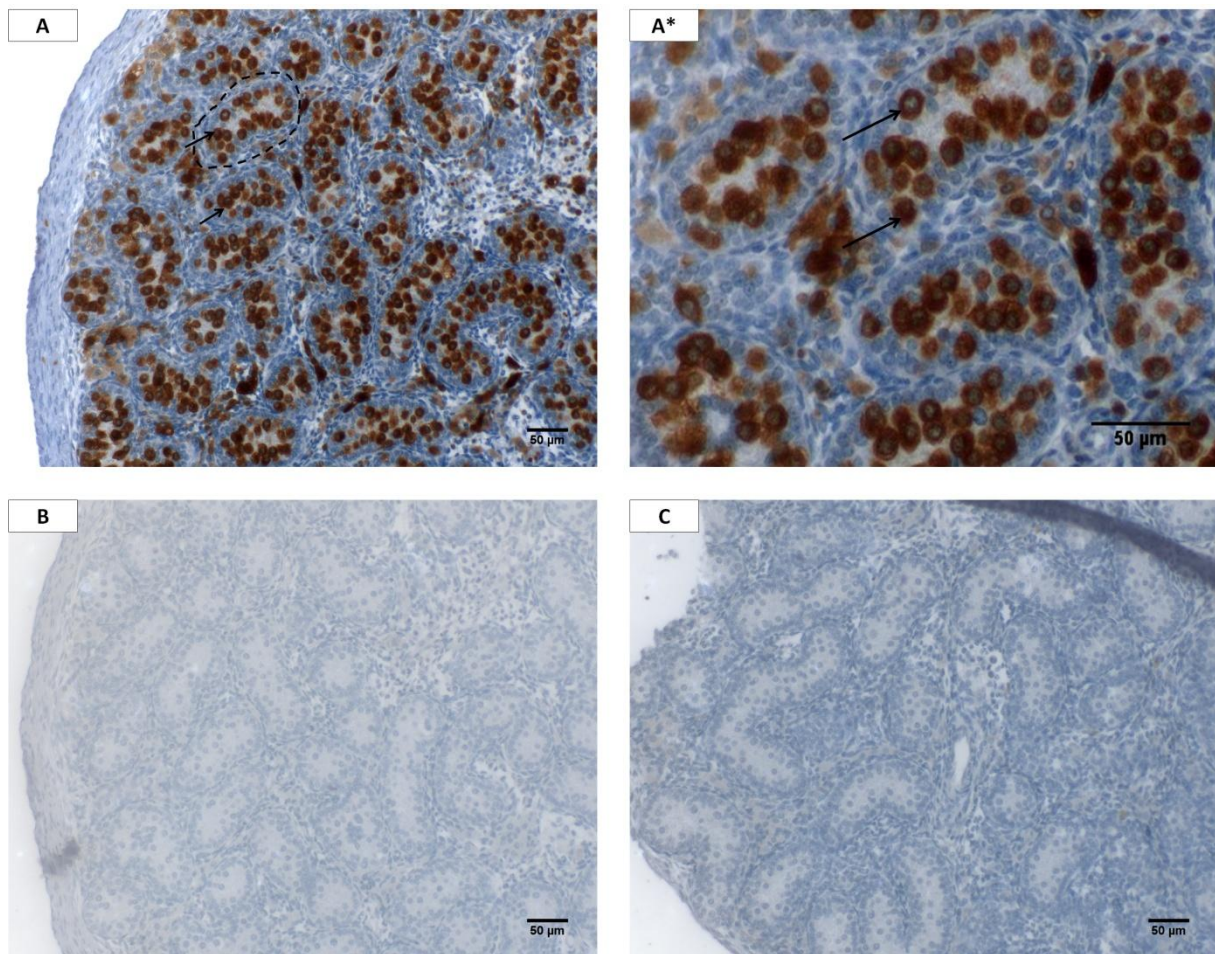


Abb. 3-6 Immunhistochemische Detektion von VASA im Hoden des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A, A*) zeigte ein deutlich positives Signal in den Spermatogonien bzw. Gonozyten (→) der Hodentubuli, von denen eines im Bild exemplarisch umrandet ist. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) waren signalfrei.

Adulte und neonatale Hoden des Weißbüschelaffen zeigten nach Inkubation mit dem VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) jeweils ein kräftiges VASA-typisches Färbemuster: Im adulten Gewebe wurden die Spermatogonien, die Spermatozyten und die runden Spermatischen angefärbt (vergl. Abb. 3-5), im Hoden des Neugeborenen zeigten entsprechend die Spermatogonien und die noch vorhandenen Gonozyten ein Signal (vergl. Abb. 3-6).

Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärintikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) waren jeweils signalfrei. Im Hodengewebe des adulten *C. jacchus* wurde eine Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid durchgeführt, wobei das Signal in den Keimzellen vollständig geblockt wurde.

3.1.2.2 IHC-Färbungen des Ovars

Das Ovar eines adulten *C. jacchus* ist von außen nach innen aufgebaut aus dem Peritonealepithel, der Tunica albuginea – einer schmalen Bindegewebsschicht –, dem Rindenstroma und dem Mark, das aus lockerem Bindegewebe besteht und in das viele Blutgefäße, Nerven und endokrine Zellen eingebettet sind. Das Rindenstroma, das den größten Teil des Ovars ausmacht, besteht aus spinozellulärem Bindegewebe, in das die Follikel in verschiedenen Reifestadien eingelagert sind. Ein Follikel reift vom Primordialfollikel über Primärfollikel und Sekundärfollikel zum Tertiärfollikel, aus dem sich bei der Ovulation die Oozyte löst. Im Primärfollikel vergrößert sich die Oozyte. Das Follikelepithel ist kubisch bis zylindrisch. Im Sekundärfollikel vergrößert sich die Oozyte weiter und das Follikelepithel erweitert sich zum mehrschichtigen Stratum granulosum. Die Zona pellucida bildet sich aus, und die umgebenden Stromazellen ordnen sich zirkulär um den Follikel zur Theca folliculi an. Im Tertiärfollikel entstehen im Epithel flüssigkeitsgefüllte Spalten, die sich zum Antrum folliculare vereinigen. Die Oozyte bleibt randständig an einem Pol des Follikels, und es entsteht der Cumulus oophoricus, der Eihügel. Um die Oozyte bildet sich die Corona radiata. Die Theca folliculi unterteilt man ab diesem Stadium in Theca interna und Theca externa. Bei der Ovulation reißt der Follikel auf und die Oozyte wird mitsamt der umgebenden Corona radiata aus dem Ovar entlassen und in die Tuba uterina aufgenommen. Beim Mensch finden sich im Ovar des Neugeborenen ausschließlich Primordialfollikel, da eine weitere Reifung der Follikel erst ab der Pubertät einsetzt. Im Weißbüschelaffen konnte kürzlich gezeigt werden, dass in den Ovarien neugeborener Tiere zusätzlich auch noch reichlich Oogonien vorhanden sind (Fereydouni et al. 2014). Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im Ovar des adulten und des neugeborenen *C. jacchus* dargestellt.

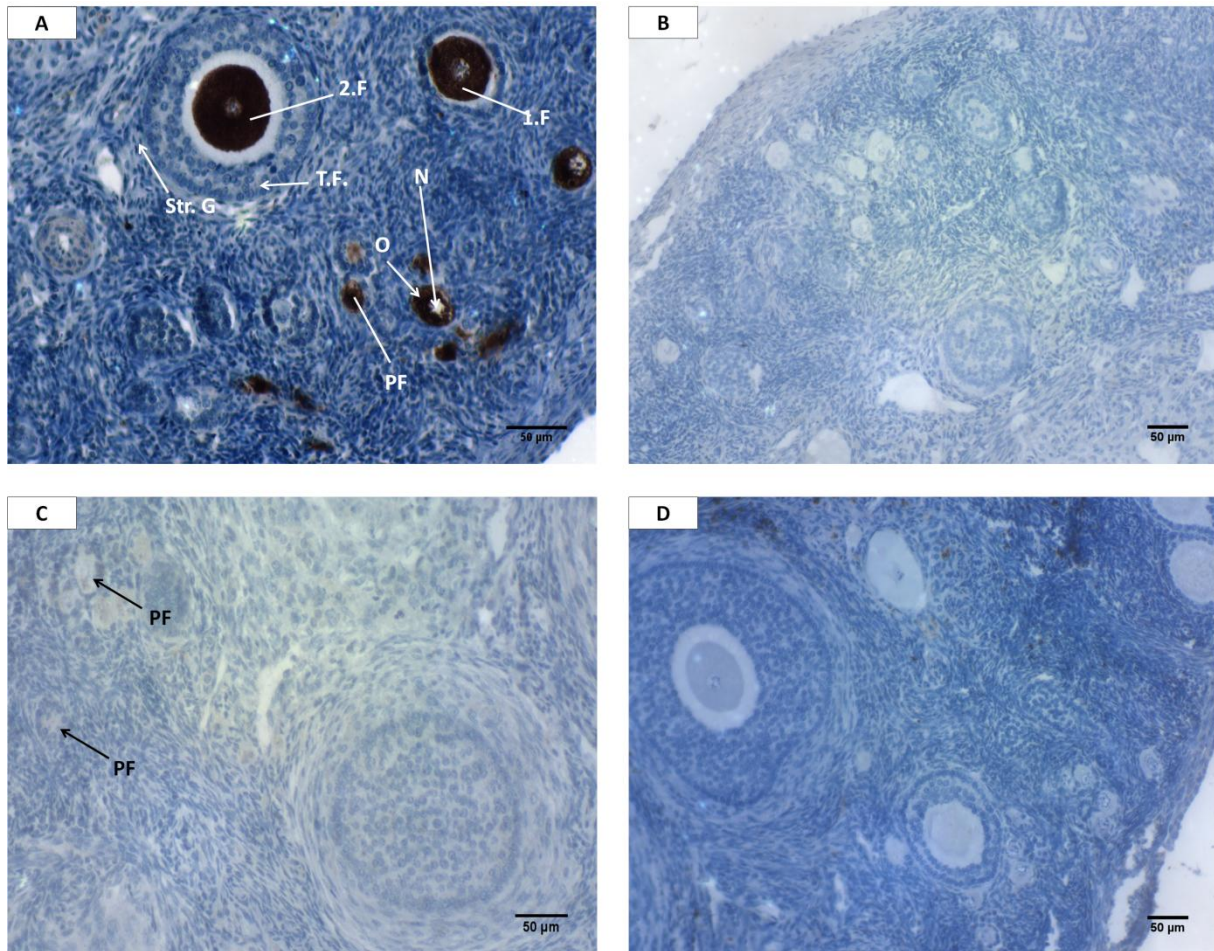


Abb. 3-7 Immunhistochemische Detektion von VASA im Ovar des adulten Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) zeigte ein positives Signal in allen Follikelstadien: Die Primordialfollikel (PF), Primärfollikel (1.F) sowie die Sekundär- (2.F) und Tertiärfollikel (nicht im Bildausschnitt gezeigt) zeigten Signal im Zytoplasma der Oozyten (O). Der Nucleus (N) blieb signalfrei. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal in den Follikeln konnte durch VASA-Blocking-Peptid (D) vollständig geblockt werden.

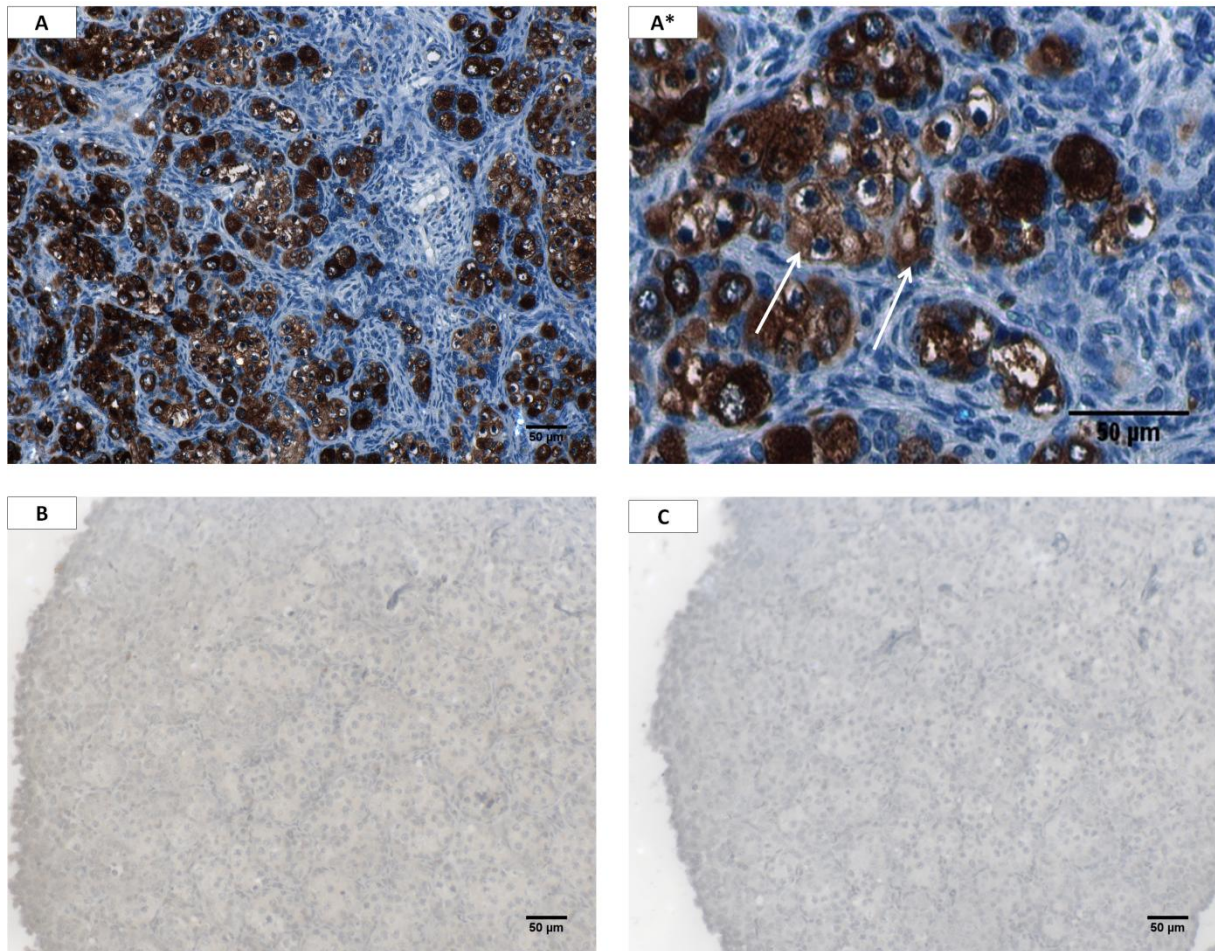


Abb. 3-8 Immunhistochemische Detektion von VASA im Ovar des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) zeigte ein positives Signal in den Primordialfollikeln (→). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) waren signalfrei.

Im Ovarialgewebe des adulten sowie des neugeborenen *C. jacchus* ergab sich nach der Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) ein für das Ovar typische VASA-Färbemuster (vergl. Castrillon et al. 2000) in den Zytoplasmata der Oozyten in allen Reifestadien der Follikel (vergl. Abb. 3-7, Abb. 3-8). Die umgebenden Strukturen waren im Ovar des neugeborenen sowie des adulten *C. jacchus* jeweils signalfrei.

Die Negativkontrollen unter Weglassung des Primärintikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) zeigten kein Signal. Mit dem Ovarialgewebe des adulten *C. jacchus* wurde eine Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid durchgeführt (D), durch die das detektierte Signal vollständig geblockt wurde.

3.1.2.3 IHC-Färbungen des Magens

Der Magen weist als Verdauungsorgan den gemeinsamen histologischen Wandaufbau des Gastrointestinaltraktes auf. Von innen nach außen gliedert er sich in Tunica mucosa, mit Lamina epithelialis, Lamina propria und Lamina muscularis mucosa, Tela submucosa, die aus lockerem Bindegewebe besteht, Tunica muscularis mit den zirkulär und längs verlaufenden Muskelsträngen, Subserosa und Serosa.

Die einschichtige Lamina epithelialis senkt sich in die Magengrübchen (Foveolae) ein. Diese setzen sich in die Magendrüsen fort, in denen Zellen liegen, die für die Funktion des Magens essentiell sind. Die gezeigten Präparate stammen aus dem Magencorpus, in dem die sogenannten Hauptdrüsen liegen, die Schleim produzierende Nebenzellen, Protonen sezernierende Belegzellen, und Hauptzellen, die Pepsin sekretieren, enthalten.

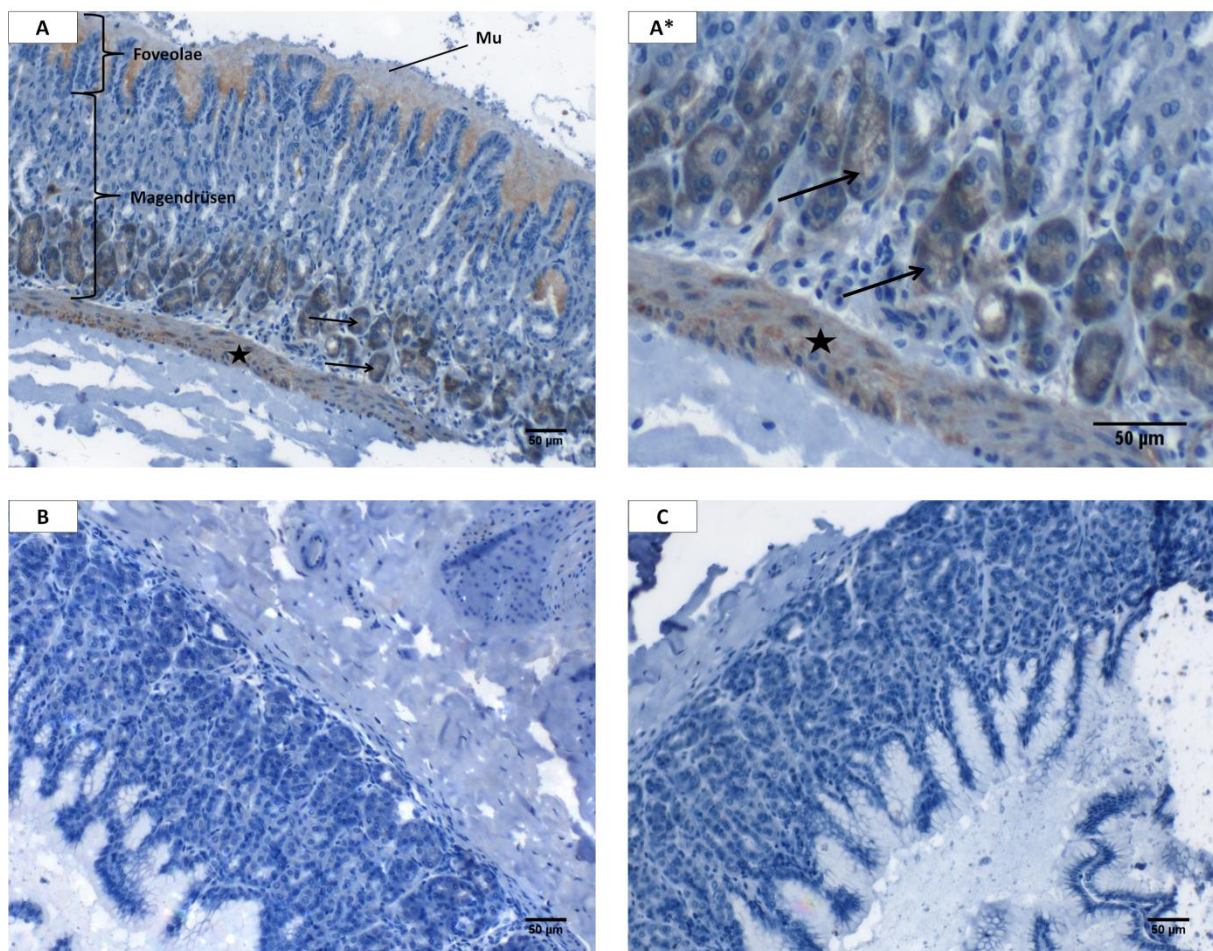


Abb. 3-9 Immunhistochemische Detektion von VASA im Magen des adulten Weißbüschelaffen

Nach der Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (**A,A***) zeigte sich ein Signal in den glatten Muskelzellen (★) sowie in den Drüsengründen (→) der Magendrüsen. Des weiteren zeigte die abgelagerte Muzinschicht (Mu) ein Signal. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (nicht gezeigt) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (**B**) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (**C**) vollständig geblockt werden.

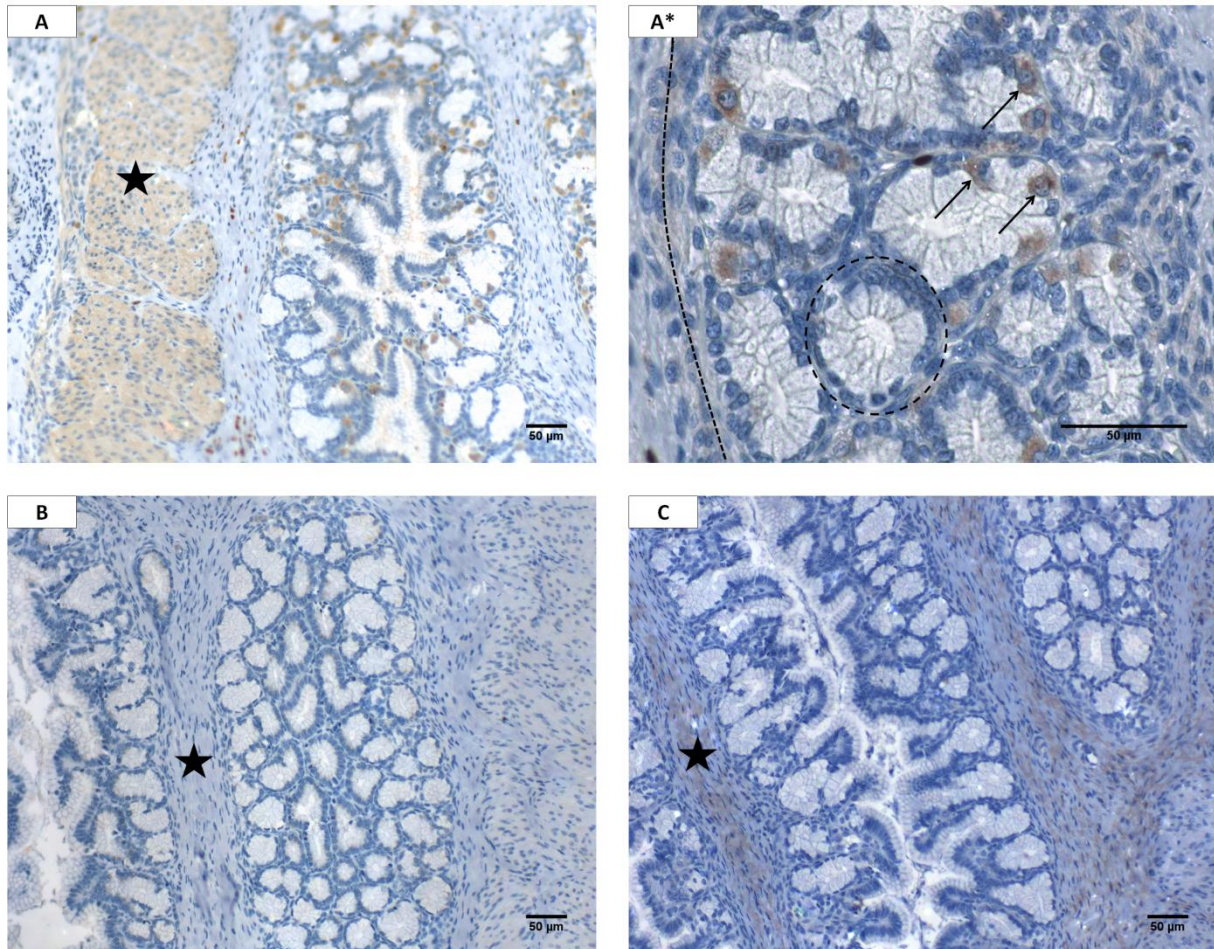


Abb. 3-10 Immunhistochemische Detektion von VASA im Magen des neugeborenen Weißbüschelaffen

Nach der Inkubation mit VASA-Antikörper als Primäntikörper (A,A*) wurde ein Signal in der Tunica muscularis (★) und der Muscularis mucosae (...) detektiert, sowie in einzelnen Zellen (→) der Magendrüsen (exemplarisch umrandet in A*). Aufgrund der Morphologie handelt es sich hierbei vermutlich um Belegzellen. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (nicht gezeigt) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primäntikörpers (B) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal in den Magendrüsen konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (C) vollständig geblockt werden, das Signal in der glatten Muskulatur wurde abgeschwächt.

Im Magen von *C. jacchus* zeigte sich nach der Inkubation mit VASA-Antikörper als Primäntikörper (A, A*) ein Signal in den glatten Muskelzellen der Tunica muscularis und der Muscularis Mucosa sowie in Magendrüsen. Im adulten *C. jacchus* beschränkte sich die Färbung auf die Endstücke der Magendrüsen (vergl. Abb. 3-9), wobei es sich von der Morphologie und Lage her vermutlich um Hauptzellen handelt. Im Neugeborenen waren einzelne Zellen in den Drüsen angefärbt, die aufgrund ihrer Lage und Morphologie als Belegzellen identifiziert wurden (vergl. Abb. 3-10). Die Negativkontrollen unter Weglassung des Primäntikörpers (nicht im Bildmaterial gezeigt) sowie die Kontrollen mit IgG Ziege anstelle des Primäntikörpers (B) waren jeweils signalfrei. Das im Magen des adulten *C. jacchus* detektierte Signal wurde unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (C) vollständig geblockt. Im Magen des Neugeborenen wies die Tunica muscularis trotz

Blocking-Peptid immer noch ein Signal auf, das allerdings schwächer als in der Positivfärbung ausfiel. Zusammenfassend wiesen sowohl im Magen des neugeborenen als auch des adulten *Callitrix jacchus* einzelne Zelltypen eine deutliche und gegenüber dem umliegenden Gewebe klar abgegrenzte Färbung auf.

3.1.2.4 IHC-Färbungen des Pankreas

Das Pankreas setzt sich aus einem exokrinen Anteil und einem endokrinen Anteil, den sogenannten Langerhans'schen Inseln, zusammen. Die exokrinen Drüsenzellen produzieren nukleinsäure-, eiweiß- und fettspaltende Enzyme, die über einen Ausführungsgang ins Duodenum geleitet werden und für die Verdauung von Nährstoffen essentiell sind. In den Langerhans'schen Inseln werden verschiedene Hormone, u.a. Insulin, produziert.

Die vorliegenden Präparate zeigen Anschnitte der exokrinen Drüsen und der Langerhans'schen Inseln.

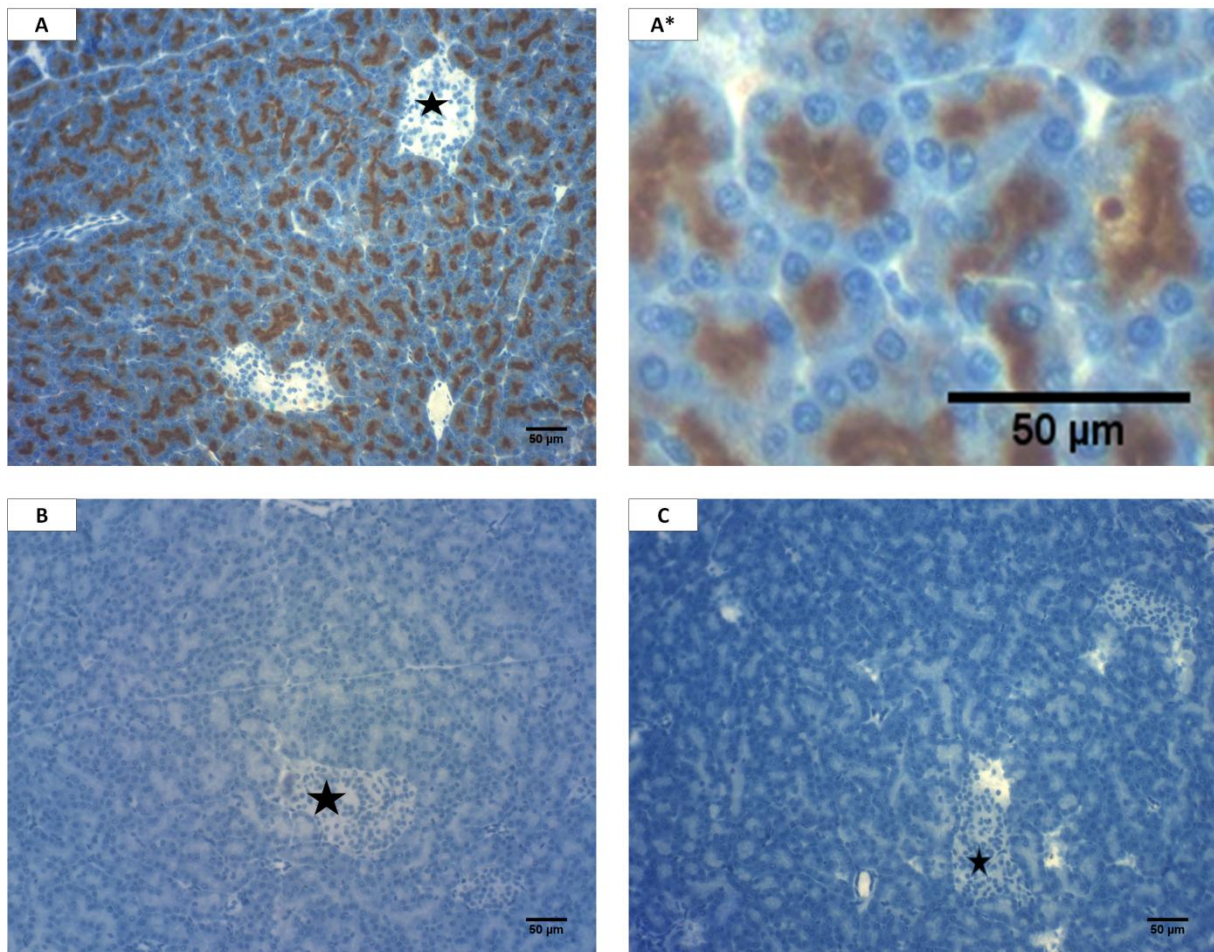


Abb. 3-11 Immunhistochemische Detektion von VASA im Pankreas des adulten Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primäranantikörper (A,A*) zeigte ein positives Signal in den Lumina (*) bzw. im apikalen Zelltytoplasma der exokrinen Drüsenabschnitte. Die Langerhans'schen Inseln waren signalfrei. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (nicht gezeigt) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primäranantikörpers (B) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal in den exokrinen Pankreasdrüsen konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (C) vollständig geblockt werden.

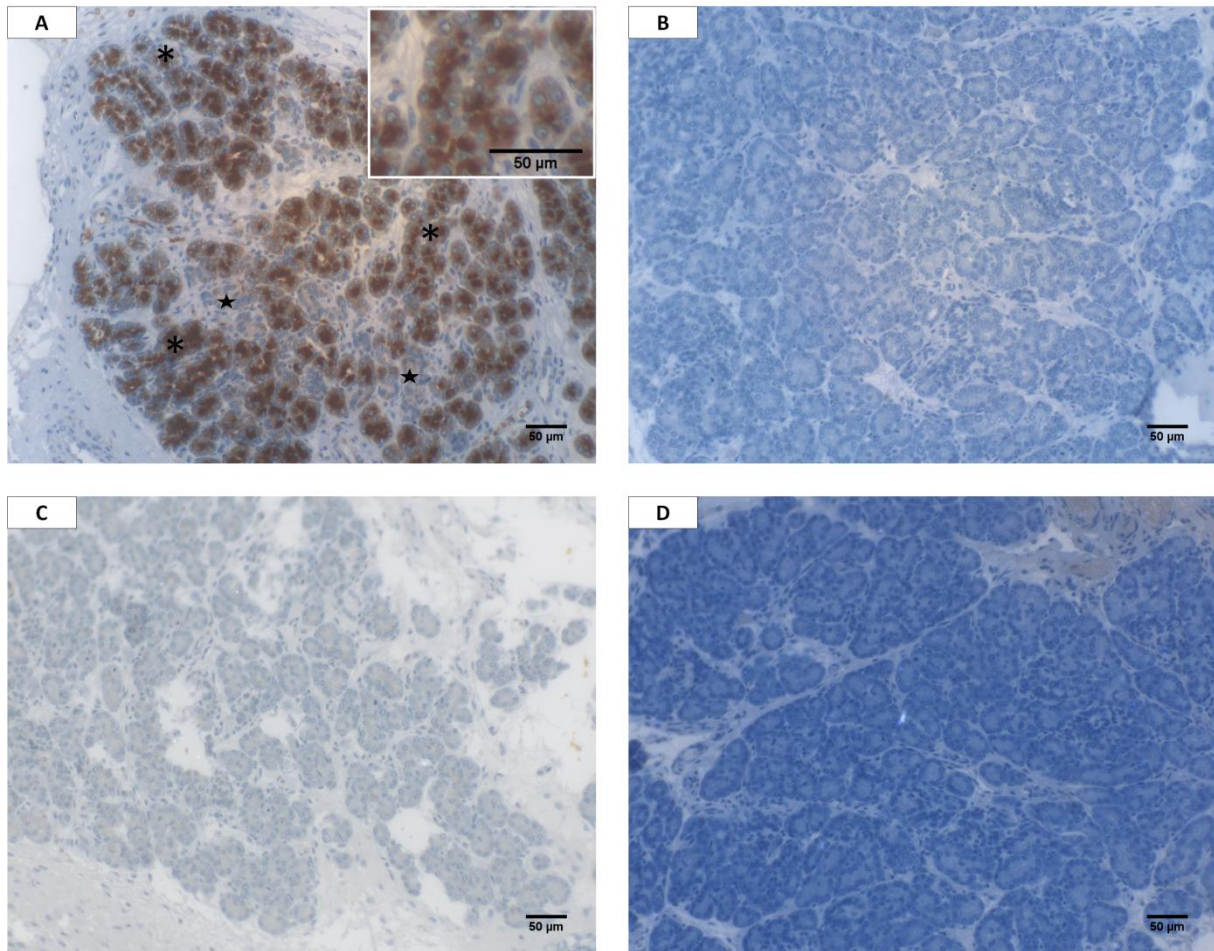


Abb. 3-12 Immunhistochemische Detektion von VASA im Pankreas des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A) zeigte ein positives Signal in den exokrinen Drüsenabschnitten (*) des Pankreas. Die Langerhans'schen Inseln (★) zeigen ein sehr schwaches Signal. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (C) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal in den exokrinen Pankreasdrüsen konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) vollständig geblockt werden.

Im Pankreas wurde nach Inkubation mit dem VASA-Antikörper als Primärantikörper (A) sowohl im neugeborenen (vergl. Abb. 3-12) als auch im adulten *C. jacchus* (vergl. Abb. 3-11) ein deutliches Signal in den Drüsenlumina des exokrinen Pankreas detektiert. Im Pankreas des adulten *C. jacchus* waren die Lumina angefärbt, sowie möglicherweise das apikale Zellzytoplasma, wobei sich das Signal schwer abgrenzen ließ. Im Pankreas des Neugeborenen waren die Lumina kräftig und die Drüsenzellen schwach angefärbt. Die Langerhans'schen Inseln waren im Pankreas des adulten *C. jacchus* signalfrei, im Pankreas des Neugeborenen wurde ein sehr schwaches Signal detektiert. Die Negativkontrollen unter Weglassung des Primärantikörpers (B) (in Abb. 3-11 nicht im Bildmaterial enthalten) sowie die Kontrollen mit IgG Ziege (vergl. Abb. 3-11 B bzw. Abb. 3-12 C) zeigten jeweils keine Färbung. Das detektierte Signal im Pankreas wurde jeweils unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (vergl. Abb. 3-11 C bzw. Abb. 3-12 D) vollständig geblockt.

3.1.2.5 IHC-Färbungen der Leber

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan und die größte Drüse des Körpers. Ihre Funktionen umfassen unter anderem Produktion der Galle, Metabolisierung von Nährstoffen und Entgiftung. Um ihre vielen Aufgaben zu erfüllen, nimmt die Leber das mit Nährstoffen angereicherte, aus dem Kapillarnetz der unpaaren Bauchorgane kommende Blut über die Pfortader auf. In der Leber durchfließt es ein zweites Kapillarnetz und gelangt schließlich über die Lebervenen in die V. cava inferior. Die Leber wird histologisch in vieleckige Leberläppchen unterteilt, in deren Zentrum eine Zentralvene liegt, um die sich die Hepatozyten balkenartig anordnen. Zwischen den Leberläppchen liegen die in Bindegewebe eingebetteten Periportalfelder, die die Glisson-Trias – zusammengesetzt aus jeweils einer Arterie, einer Vene und einem Gallengang – enthalten. Die folgenden Präparate zeigen Periportalfelder mit umgebenden Hepatozyten.

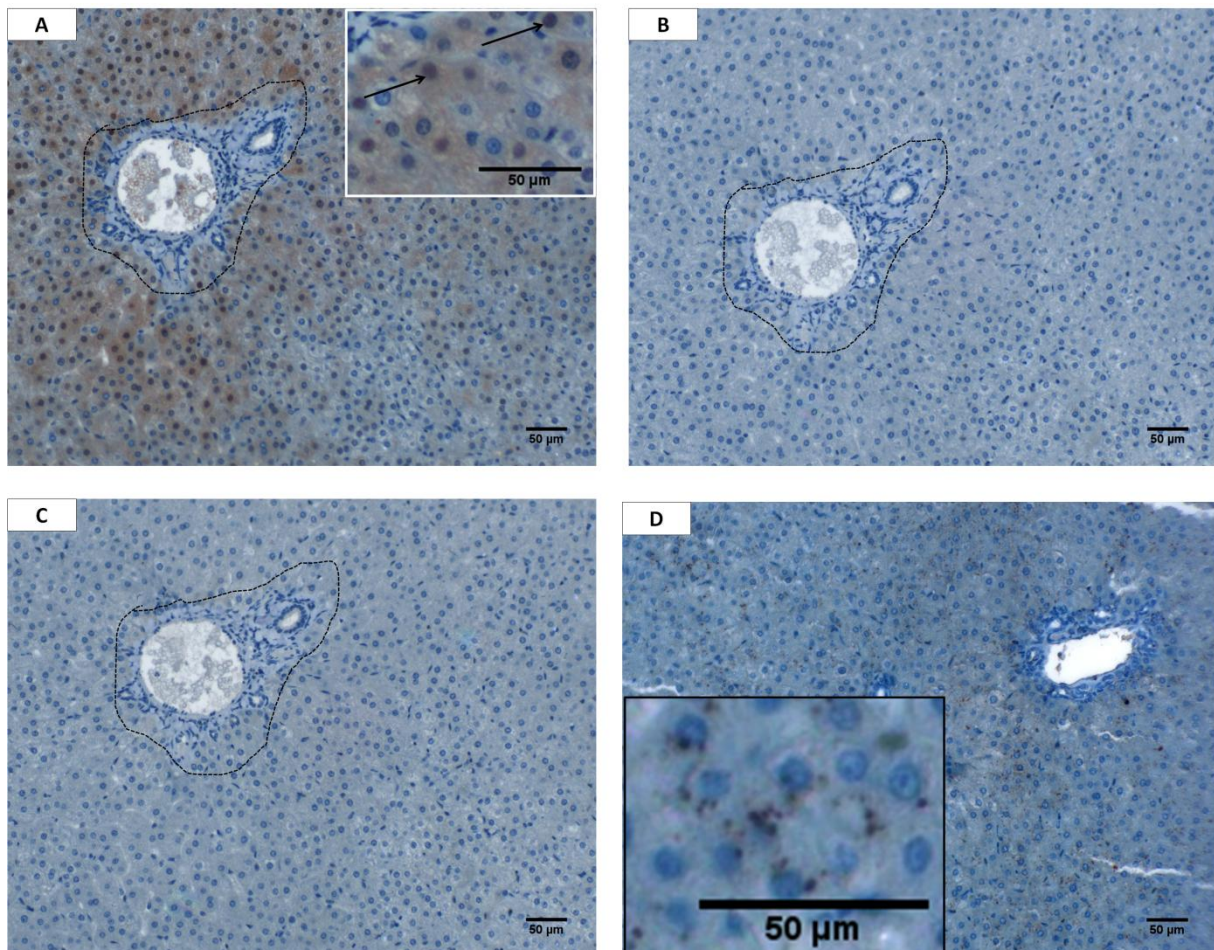


Abb. 3-13 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Leber des adulten Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A) zeigte um die Zentralvenen (nicht im Bildausschnitt gezeigt) und Periportalfelder herum ein positives zytoplasmatisches Signal in den Hepatozyten (→). Die Nuclei waren zum Teil ebenfalls angefärbt. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (C) waren signalfrei. Das nachgewiesene Signal in den Hepatozyten konnte unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) stark reduziert werden.

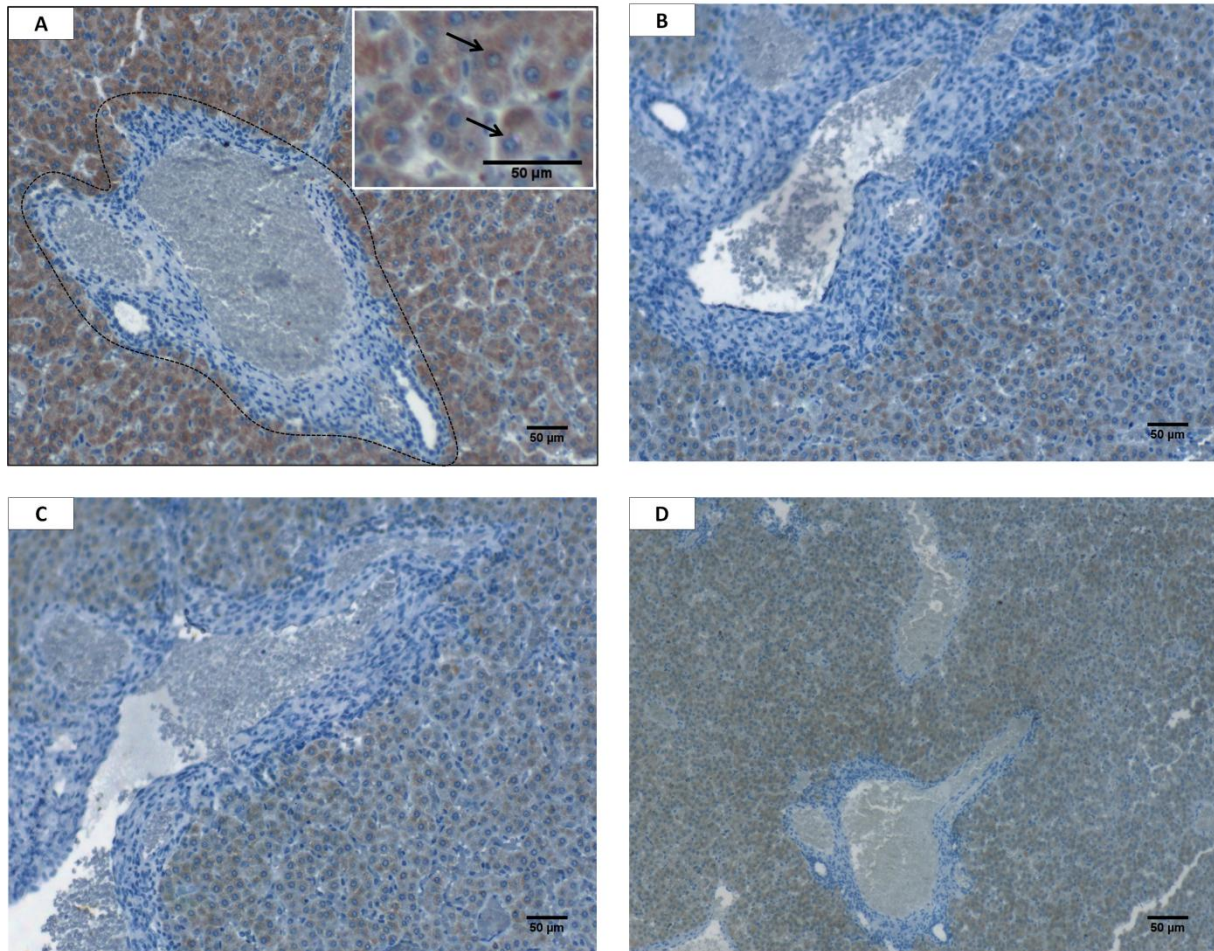


Abb. 3-14 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Leber des neugeborenen Weißbüschelaffen
 Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primäntikörper (A) zeigte ein positives zytoplasmatisches Signal in den Hepatozyten (→). Die Nuclei waren ungefärbt. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primäntikörpers (C) zeigten ebenfalls ein Signal in den Hepatozyten, das allerdings im Vergleich zur Positivfärbung (A) schwächer war. Das nachgewiesene Signal in den Hepatozyten konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) nicht vollständig geblockt werden.

In der Leber wurde nach Inkubation mit VASA-Antikörper ein Signal in den Hepatozyten detektiert. In der Leber des adulten *C. jacchus* (vergl. Abb. 3-13) waren die Hepatozyten, die in Nachbarschaft der Periportalfelder und Zentralvenen lagen, schwach angefärbt. Die Färbung war hauptsächlich zytoplasmatisch, in einigen Zellen waren auch die Nuclei angefärbt. Im Lebergewebe des Neugeborenen (vergl. Abb. 3-14) waren alle Hepatozyten stark zytoplasmatisch angefärbt. Die Nuclei waren signalfrei. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primäntikörpers (C) sowie die Kontrolle mit IgG als Primäntikörper (D) waren in der Leber des adulten *C. jacchus* signalfrei, in der Leber des Neugeborenen zeigten sie ein Signal im Zytoplasma der Hepatozyten, das allerdings schwächer als die Positivfärbung ausfiel. Auch die Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid (D) zeigte im Lebergewebe von neugeborenen und adulten Tieren unterschiedliche Ergebnisse: In der Leber des adulten *C. jacchus* wurde das detektierte Signal teilweise weggeblockt, in den Hepatozyten waren jedoch noch schwache bräunliche Signale zu sehen (Vergrößerung, D). In

der Leber des Neugeborenen wurde das Signal in den Hepatozyten durch das Blocking-Peptid ebenfalls reduziert.

3.1.2.6 IHC-Färbungen der Niere

Die Niere setzt sich zusammen aus der Nierenrinde, dem Nierenmark und dem Nierenbecken. In der Nierenrinde liegen die Glomeruli und Teile der Henle-Schleife, in denen der Harn produziert und konzentriert wird. In den Glomeruli wird der Primärharn aus Kapillarschlingen abgepresst und durch den glomerulären Filter weiter in den proximalen Tubulus geleitet. Von dort wird er weiter über den intermediären Tubulus und den distalen Tubulus in Sammelrohre geleitet. Auf seinem Weg wird die Konzentration und Zusammensetzung des Primärharns geändert. Der Harn, der jetzt als Endharn bezeichnet wird, fließt über die Sammelrohre durchs Nierenmark ins Nierenbecken, von wo aus er über die ableitenden Harnwege aus dem Körper geleitet wird. Der proximale Tubulus ist aus einschichtig isoprismatischem Epithel aufgebaut, das einen hohen Bürstensaum (Mikrovilli) trägt und dessen Zellen eng miteinander verzahnt sind. Der intermediäre Tubulus ist aus einschichtig plattem Epithel mit ins Lumen vorspringenden linsenförmigen Kernen aufgebaut. Er zeigt morphologisch eine hohe Ähnlichkeit zu Kapillaren. Der distale Tubulus besteht aus im Vergleich zum proximalen Tubulus etwas niedrigerem einschichtig isoprismatischem Epithel. Ein Bürstensaum ist nicht vorhanden. Das Epithel der Sammelrohre ist ebenfalls einschichtig isoprismatisch, wobei sich die Epithelzellen teilweise ins Lumen vorwölben. Die Epithelzellen gliedern sich in Hauptzellen sowie Schaltzellen, die organellenreich sind und kurze Mikrovilli tragen. Die dargestellten Präparate zeigen Anschnitte aus Nierenmark bzw. Nierenrinde in unterschiedlichen Vergrößerungen.

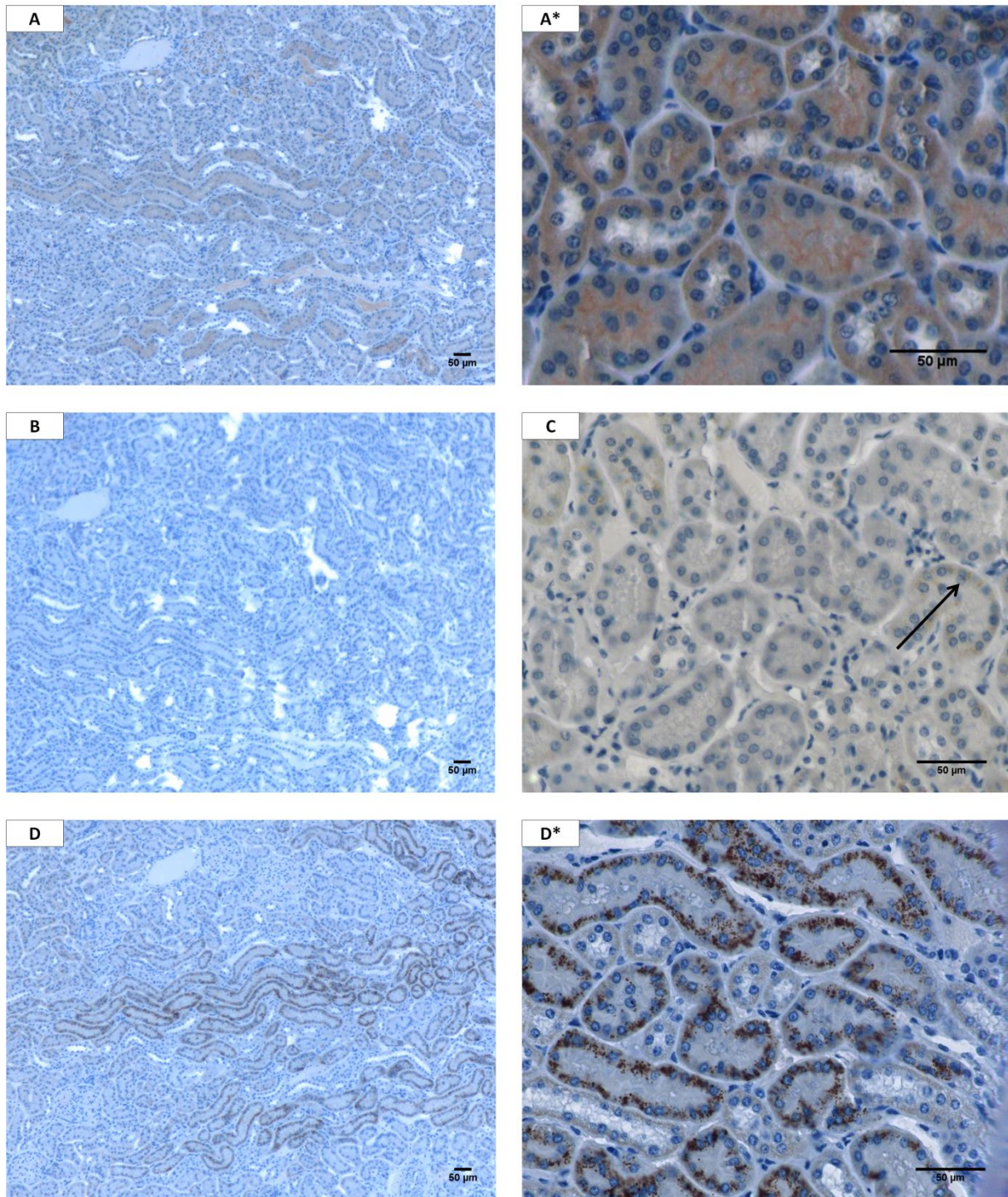


Abb. 3-15 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Niere des adulten Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A,A*) zeigte ein positives Signal in den Zellen der Sammelrohre des Nierenmarks. Die Glomeruli zeigten kein Signal. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (C) zeigte ein schwaches Signal in den Sammelrohren (→). Das Signal in den Sammelrohren konnte unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D,D*) nicht geblockt werden.

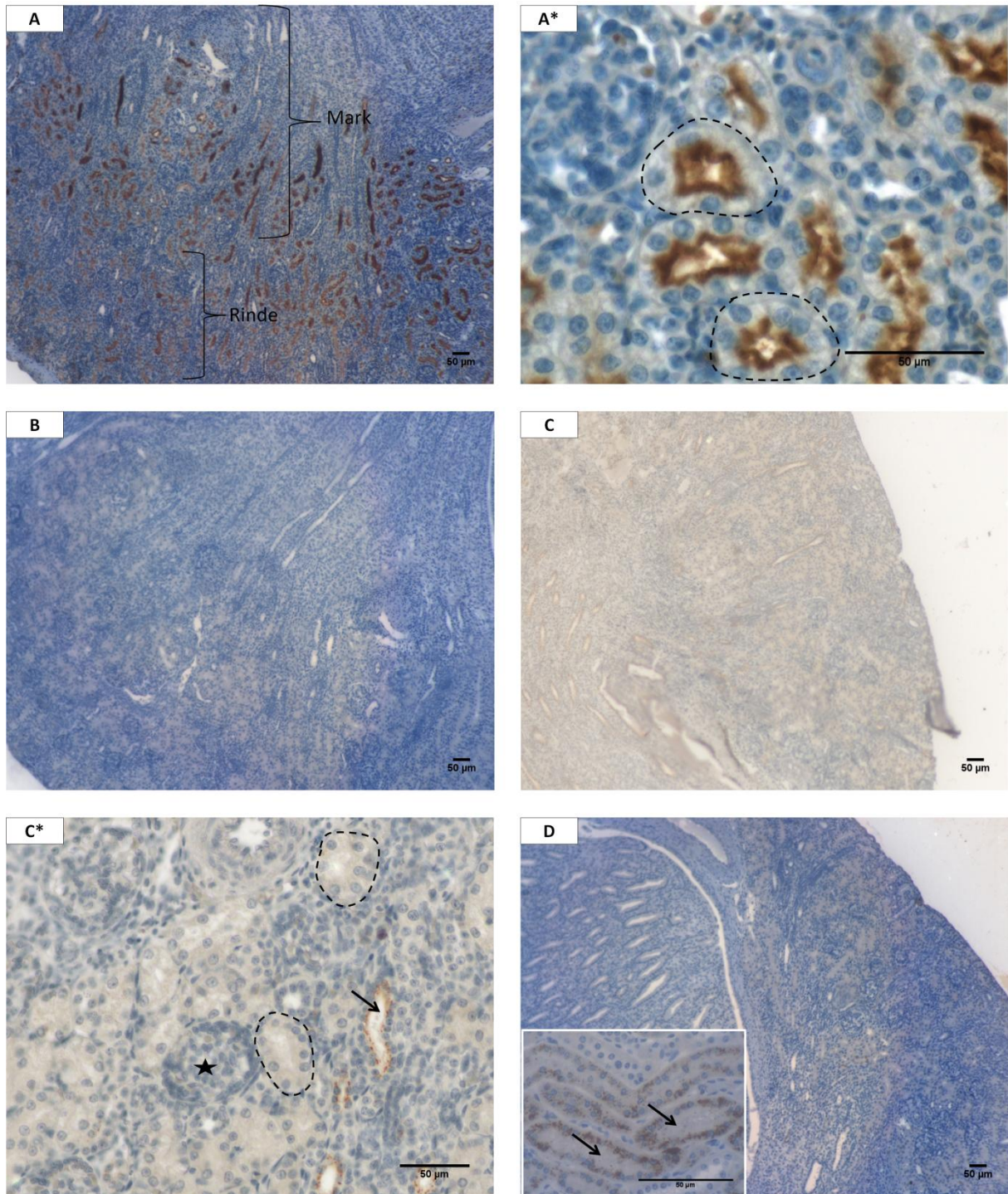


Abb. 3-16 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Niere des neugeborenen Weißbüschelaffen:

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A,A*) zeigte ein positives Signal in den proximalen Tubuli der Nierenrinde (---), sowie in den Sammelrohren des Nierenmarks. Die Glomeruli zeigten kein Signal. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (C, C*) zeigte ein schwaches Signal in den Sammelrohren (→). Das nachgewiesene Signal konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) in den proximalen Tubuli geblockt werden, die Sammelrohre wiesen weiterhin ein Signal auf (→).

In der Niere wurde nach Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A,A*) in Gewebe vom neugeborenen und vom adulten *C. jacchus* (vergl. Abb. 3-15, Abb. 3-16) ein schwaches Signal in den Zellen der Sammelrohre detektiert. In der Niere des Neugeborenen

waren zusätzlich die in der Nierenrinde lokalisierten proximalen Tubuli lumenwärts kräftig angefärbt, wobei die Färbung sich auf die Bürstensäume zu beschränken schien. Die Negativkontrollen unter Weglassung des Primärantikörpers (B) waren jeweils signalfrei. In den Kontrollfärbungen mit IgG Ziege (C,C*) wurde ein schwaches Signal in den Sammelrohren detektiert. Die proximalen Tubuli waren signalfrei. Unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D,D*) konnte das Signal in den Sammelrohren im Nierengewebe des neugeborenen und des adulten *C. jacchus* nicht weggeblockt werden, jedoch wurde in der Niere des Neugeborenen das detektierte Signal in den proximalen Tubuli vollständig geblockt.

3.1.2.7 IHC-Färbungen der Haut

Die Haut setzt sich zusammen aus der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Die zur Verfügung stehenden Präparate bestanden nur aus der Epidermis und der Dermis. Das subkutane Fettgewebe wurde bei Sektionen nicht mit entnommen. In der Epidermis bilden die Keratinozyten ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel. In der basalen Schicht des Epithels liegen die Melanozyten, die Melanin synthetisieren und es dann an die Keratinozyten weitergeben. Die Dermis besteht aus Bindegewebe. In den Präparaten sind vereinzelt Haarfollikel angeschnitten, die eine zylindrische Epidermiseinstülpung darstellen, die in die Dermis herunterreicht und aus der die Haare hervorgehen. Jedem Haarfollikel sind eine Talgdrüse und ein M. erector pili zugeordnet.

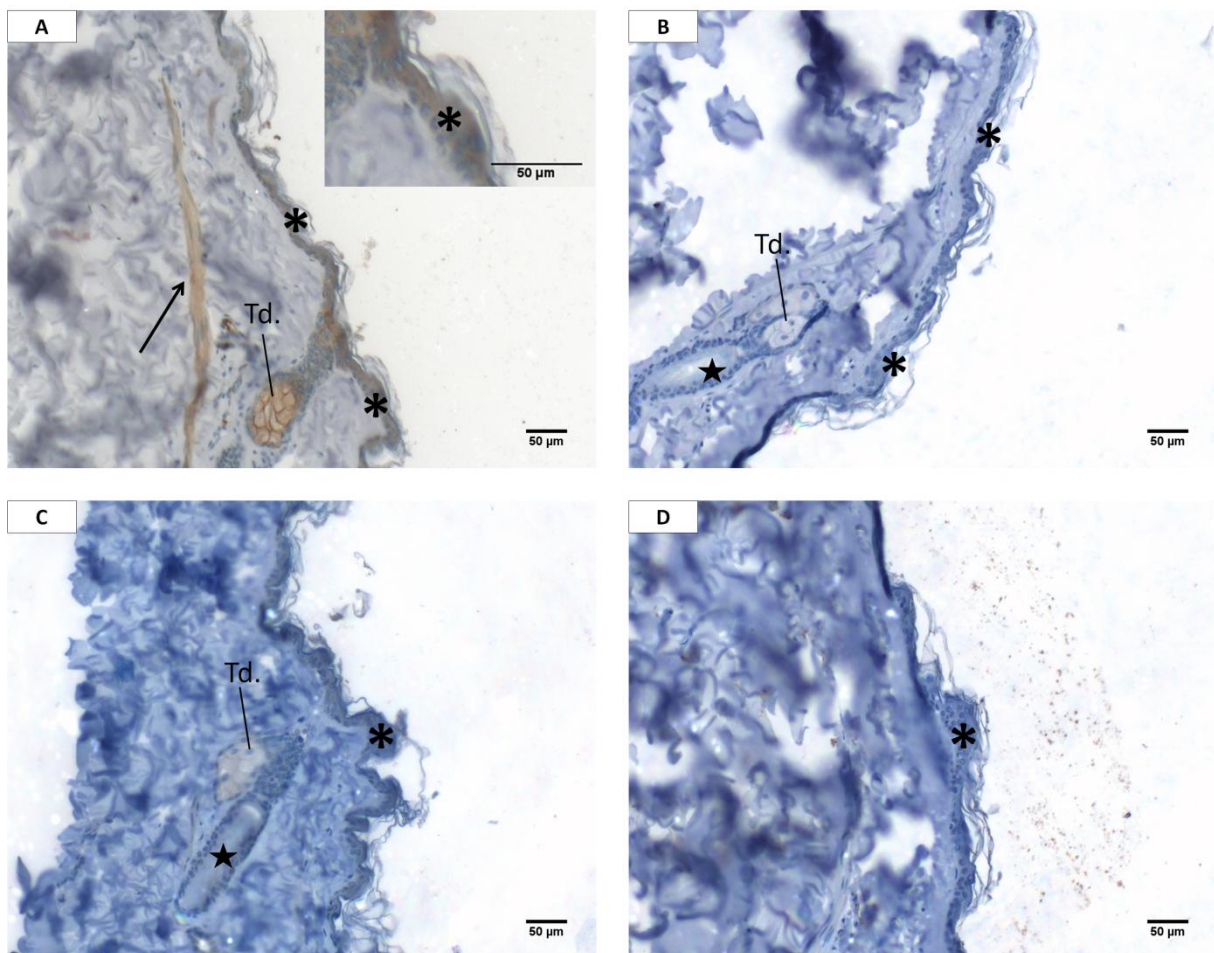


Abb. 3-17 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Haut des adulten Weißbüchelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A) zeigte ein positives Signal in der Epithelschicht der Haut (*), in den Haarfollikeln (★) sowie in den Talgdrüsen (Td) und in den Mm erectores pili (→). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (C) zeigte ein sehr schwaches Signal in den Keratinozyten sowie in den Talgdrüsen. Das nachgewiesene Signal in den Keratinozyten, in den Talgdrüsen und in den Muskelzellen konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) vollständig geblockt werden.

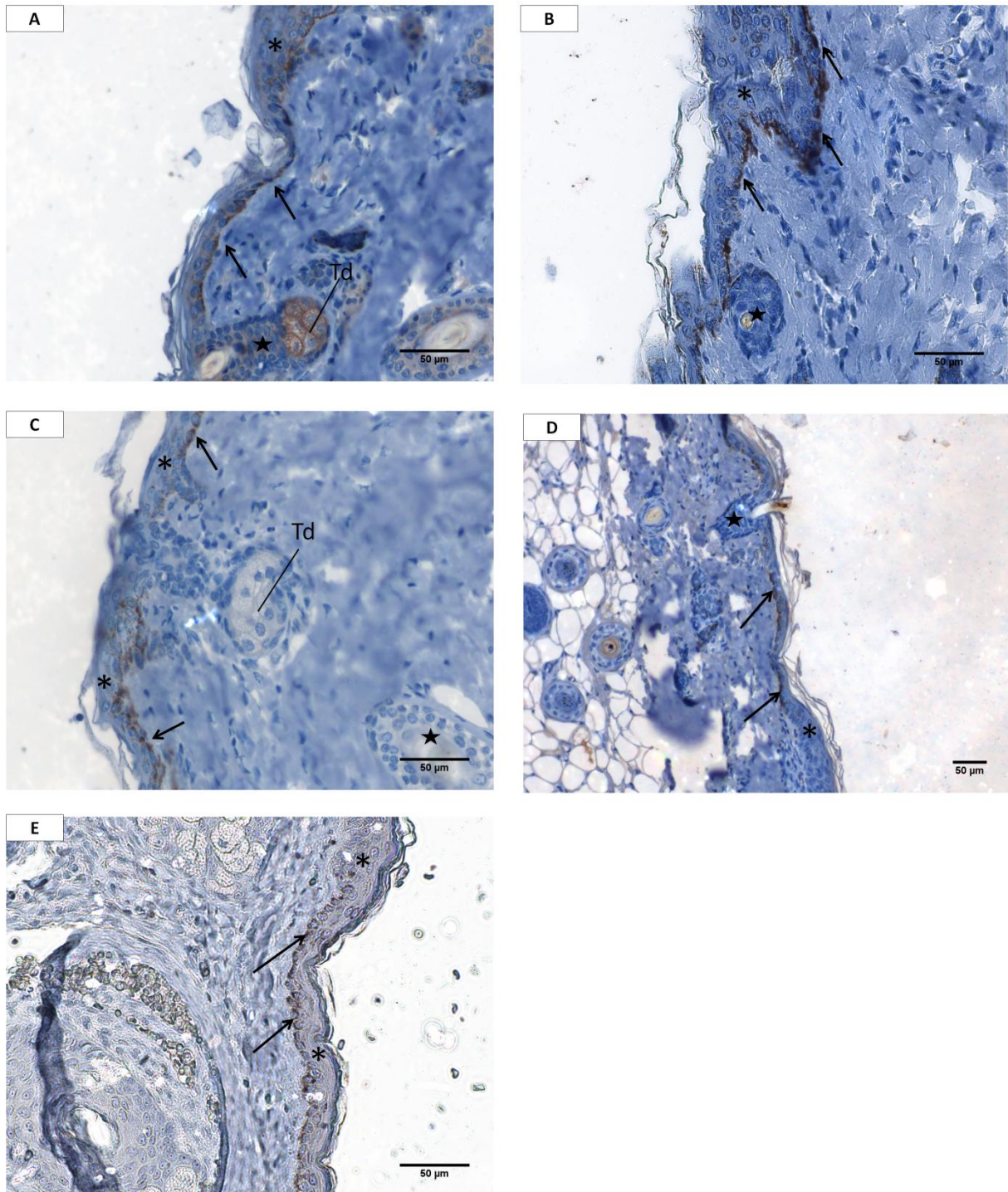


Abb. 3-18 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Haut des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) zeigte ein positives Signal in der Epithelschicht der Haut (*), in den Haarfollikeln (★) und den Talgdrüsen (Td) sowie kräftige braune Ablagerungen in der untersten Zellreihe des Epithels (→). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (B), die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C), der mit VASA-Blocking-Peptid behandelte Organschnitt (D) sowie eine Hämalaungegenfärbung (E) zeigten ebenfalls braune Ablagerungen in der untersten Zellreihe, sonst jedoch kein weiteres Signal. Das durch den Antikörper erzeugte Signal konnte durch Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) vollständig geblockt werden.

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) zeigte in den untersuchten Präparaten aus der Haut von neugeborenen und adulten Weißbüschelaffen eine deutliche Anfärbung der Keratinozyten sowie der Haarfollikel. Die Talgdrüsen und die Mm. erectores

pili waren ebenfalls angefärbt (vergl. **Abb. 3-17**, **Abb. 3-18**). Das Bindegewebe war signalfrei. Die Negativkontrollen unter Weglassung des Primärantikörpers (B) zeigten kein Signal. In den Kontrollfärbungen mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (C) wurde in der Haut des adulten *C. jacchus* ein schwaches Signal in den Keratinozyten sowie in den Talgdrüsen der Haarfollikel detektiert. In den Hautpräparaten vom Neugeborenen war die Kontrolle signalfrei. Das durch den Antikörper entstandene Färbemuster konnte unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid (D) vollständig geblockt werden. In der Haut des Neugeborenen sah man in der basalen Zellschicht des Epithels braune Ablagerungen, die auch in allen Kontrollen und in einer Hämalaungegenfärbung (E) zu sehen waren. Aufgrund der Lage der betreffenden Zellen wurden sie als Melanozyten mit enthaltenen Melanindepots identifiziert.

3.2 Immunologischer Nachweis von VASA mittels Western Blotting

Auf Grundlage der Vorarbeiten von Selma Drallé (Drallé, Selma Irina 2009) und der Ergebnisse der in 3.1 durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden fünf Organe ausgewählt, aus denen Protein isoliert wurde, das mit Hilfe von Western Blotting immunologisch auf VASA untersucht wurde (vergl. 2.2.4). Es wurden für jedes Organ jeweils Proben aus zwei neugeborenen und zwei adulten Tieren untersucht. Hoden und Ovar von adulten Tieren dienten als Positivkontrollen.

Es wurden Blots mit B-ACTIN bzw. mit VASA-Antikörper inkubiert. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen durchgeführt: eine Kontrolle erfolgte unter Weglassung des Primäntikörpers, für die zweite Kontrolle wurde VASA-Blocking-Peptid eingesetzt. Die Versuche wurden jeweils doppelt durchgeführt. Da der Hersteller das verwendete VASA-Blocking-Peptid nur in einer sehr geringen Menge zur Verfügung stellen konnte, wurde die Anzahl der zu untersuchenden Organe auf fünf beschränkt. Es wurde bei jedem Blot eine Färbung mit Amidoschwarz durchgeführt, um sicherzustellen, dass jede Spur genügend Protein enthielt. Zusätzlich wurde eine Coomassie-Gelfärbung durchgeführt.

3.2.1 Coomassie-Gelfärbung

Um zu kontrollieren, ob genügend Protein für einen immunologischen Nachweis in den verwendeten Proben enthalten war, und um eine Degradation der Proteine auszuschließen, wurde eine Coomassie-Gelfärbung, wie in 2.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Abb. 3-19 zeigt das Ergebnis der Färbung.

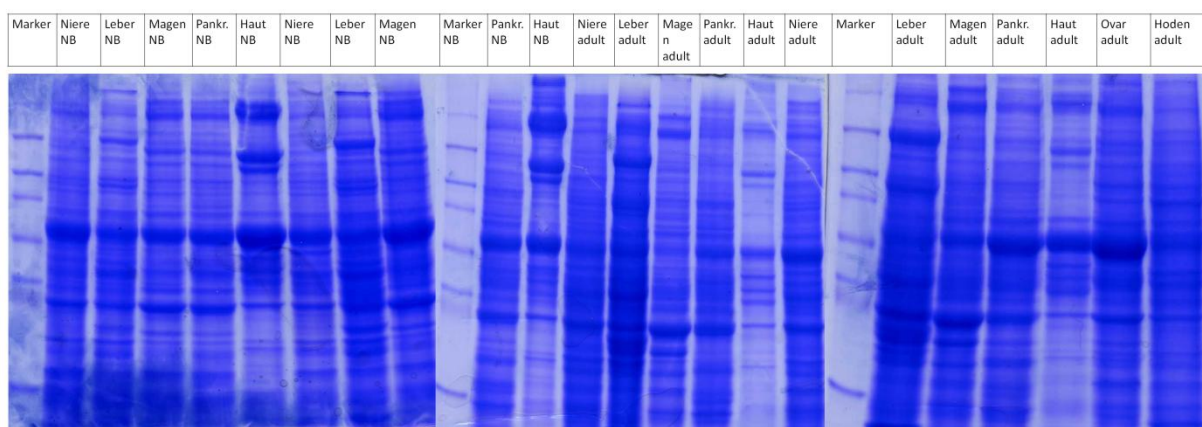


Abb. 3-19 Coomassie-Gelfärbung

Die Coomassie-Gelfärbung zeigte in allen Spuren eine ausreichende Menge an nicht degradiertem Protein.

Durch die unspezifische Färbung aller in den Proben enthaltenen Proteine entstand ein jeweils organspezifisches Bandenmuster. In jeder Spur wurde eine ausreichende Menge nicht

degradierten Proteins detektiert, sodass die Proben im Folgenden für Western Blots verwendet werden konnten.

3.2.2 Western Blotting und immunhistochemischer Nachweis

Die folgende Abbildung zeigt eine Zusammenstellung der durchgeführten Western Blots. Sie ist der Übersichtlichkeit halber im Querformat dargestellt.

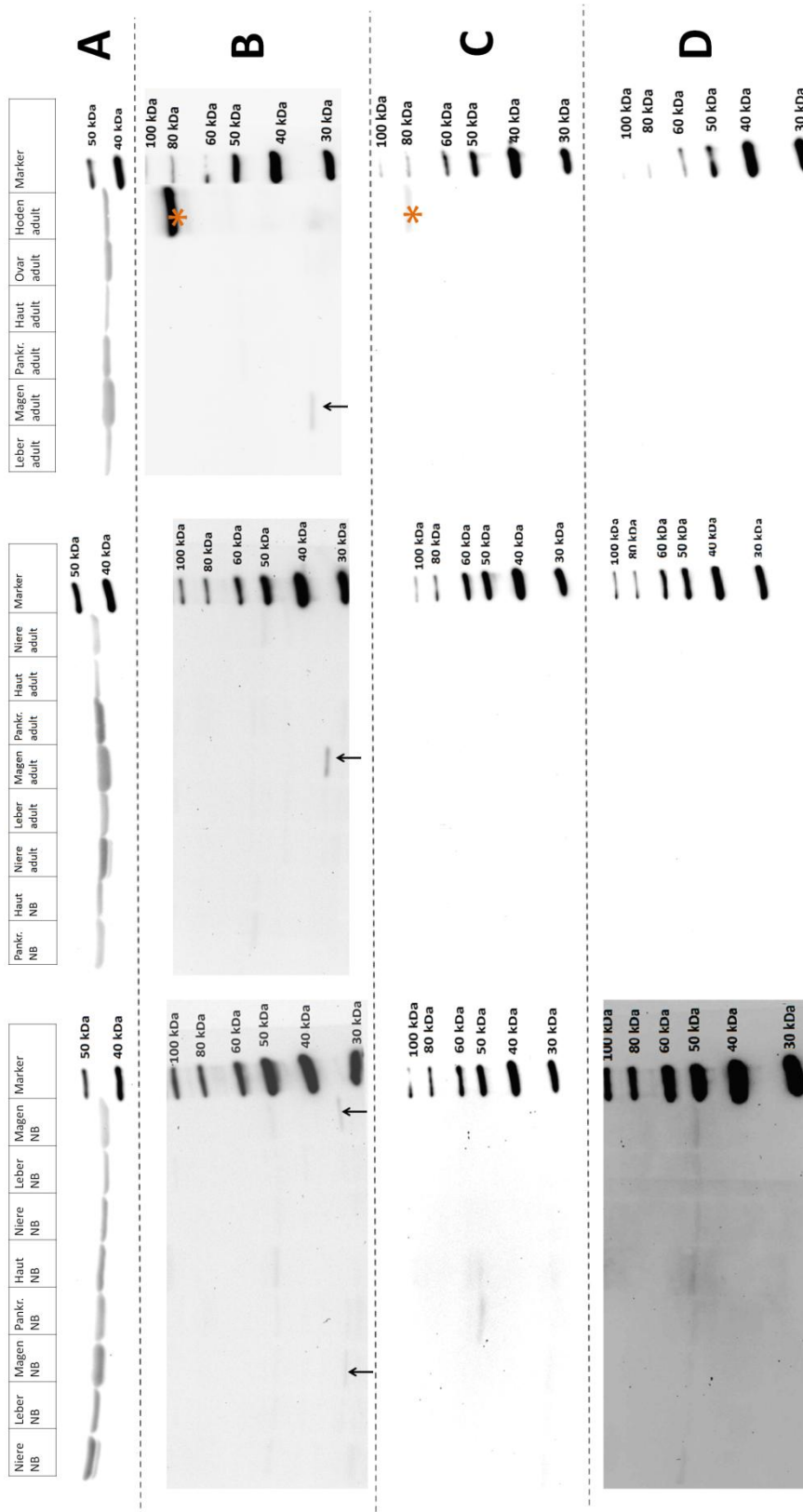


Abb. 3-20 immunologischer Nachweis von VASA mittels Western Blotting:

Für alle Aufnahmen wurde die gleiche Belichtungszeit verwendet. Der Kontrast wurde an der Intensität der Markerbanden geeicht. Alle verwendeten Proben zeigten nach der Inkubation mit B-ACTIN Antikörper (A) eine deutliche Bande bei ca. 42 kDa. Die Inkubation mit VASA-Antikörper (B) ergab eine deutliche Bande für Hoden bei ca. 80 kDa(*), was der kalkulierten Masse von VASA entspricht. Die Bande war nach Inkubation des VASA-Antikörpers mit Blocking-Peptid (C) in ihrer Intensität stark vermindert. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärintikörpers (D) war bei 80 kDa signalfrei. Die Proben aus anderen Organen zeigten bei 80 kDa kein Signal. In den Proben aus Magen des neugeborenen und des adulten *C. jacchus* wurden jeweils schwache Banden bei ca. 33 kDa detektiert (→). Die Banden konnten in der Negativkontrolle (D) nicht detektiert werden und wurden durch VASA-Blocking-Peptid (C) vollständig geblockt. Weitere Banden, die nach Inkubation mit VASA-Antikörper detektiert wurden, waren nur bei starker Kontrastierung zu sehen und wurden auf gleicher Höhe in der Negativkontrolle (D) detektiert.

Die **Abb. 3-20** zeigt die Ergebnisse des immunologischen Nachweises von VASA mittels Western Blotting. Um eine quantitative Angleichung der Proteinmengen pro Spur zu erreichen, wurde im Vorfeld ein Western Blot mit jeweils 20 µl Probenmaterial pro Spur durchgeführt und ein immunologischer Nachweis von B-ACTIN vorgenommen. Anhand des Ergebnisses wurde die Menge des verwendeten Probenmaterials für jede Probe einzeln festgelegt. Die Daten sind dem Anhang zu entnehmen (vergl. S. 79). Jeder Blot wurde als zusätzliche Kontrolle jeweils reversibel mit Ponceau gefärbt, um sicherzustellen, dass auf jeder Spur genug Probenmaterial gebunden war. Für alle Blots wurde die gleiche Belichtungszeit verwendet. Der Kontrast der erzeugten Bilder wurde auf die Intensität der Markerbanden abgestimmt.

Alle verwendeten Proben zeigten nach Inkubation mit B-ACTIN Antikörper jeweils eine deutliche Bande bei 42 kDa, was der kalkulierten Masse von B-ACTIN entspricht.

Nach Inkubation mit VASA-Antikörper (B) wurde für Hoden eine deutliche Bande bei ca. 80 kDa detektiert, was der kalkulierten Masse von VASA entspricht. Die Bande wurde in der Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers (D) nicht detektiert und wurde bei Primärinkubation des VASA-Antikörpers mit dem Blocking-Peptid (C) in ihrer Intensität stark vermindert. In den Proben aus neugeborenem und adultem Magen wurden nach Inkubation mit VASA-Antikörper (B) jeweils in beiden Organproben Banden bei ca. 33 kDa detektiert. Die Banden konnten in der Negativkontrolle (D) und bei Primärinkubation des VASA-Antikörpers mit dem Blocking-Peptid (C) nicht detektiert werden. Weitere Banden, die nach Inkubation mit VASA-Antikörper detektiert werden konnten, waren nur bei maximaler Kontrastierung zu sehen und wurden auf gleicher Höhe in der Negativkontrolle (D) detektiert.

3.3 Nachweis von VASA-mRNA mittels RT-PCR

Die aus den Organen isolierte RNA (vergl. 2.2.3.1) wurde mittels Reverser Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben (vergl. 2.2.3.2). Es wurden pro Probe jeweils 2 µg RNA eingesetzt. Zur Überprüfung auf mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA oder Plasmiden wurde zu jedem Ansatz ein zweiter Ansatz mitgeführt, dem keine Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde und der als Negativkontrolle diente.

Die so erhaltene cDNA wurde zunächst in einer *B-ACTIN*-PCR mit anschließender Gelelektrophorese quantitativ und qualitativ getestet. Anhand der Intensität der entstandenen Banden in der sich anschließenden Gelelektrophorese wurde eine Angleichung der Proben vorgenommen, indem die Menge an eingesetzter cDNA je nach Intensität der entstandenen Banden erhöht oder erniedrigt wurde. Es wurden gemäß der Ergebnisse der *B-ACTIN*-PCR cDNA-Volumina zwischen 0,5 µl und 2 µl eingesetzt. Im Anschluss an die quantitative Angleichung wurde direkt vor der PCR mit *VASA*-Primern nochmals als Positivkontrolle eine *B-ACTIN*-PCR aller Proben mit anschließender Gelelektrophorese im QIAxcell vorgenommen.

Für die *VASA*-PCR wurden spezifische Primer für das *VASA*-Gen eingesetzt, deren Spezifität durch Sequenzierung ihrer PCR-Fragmente in Vorarbeiten von Dr. rer. nat. Katja Eildermann getestet worden waren (Eildermann et al. 2012).

Für jede PCR wurden Organe aus jeweils zwei unterschiedlichen neugeborenen und adulten Tieren verwendet. Die Produkte der *B-ACTIN*-PCRs sowie der PCRs mit den Primerpaaren 2, 3 und 4 wurden jeweils im QIAxcel elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Die Produkte der PCR mit dem Primerpaar 1 (*open reading frame*; 2280bp) wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, da die im QIAxcel verwendete Kartusche für derart große Fragmente nicht geeignet war.

Ergebnisse der *B-ACTIN* -PCR

Um den Erfolg der cDNA-Synthese zu überprüfen, wurde mit allen verwendeten Proben eine *B-ACTIN* -PCR durchgeführt. Da *B-ACTIN* in allen Zellen synthetisiert wird, ist der Nachweis von *B-ACTIN* mRNA als Positivkontrolle geeignet.

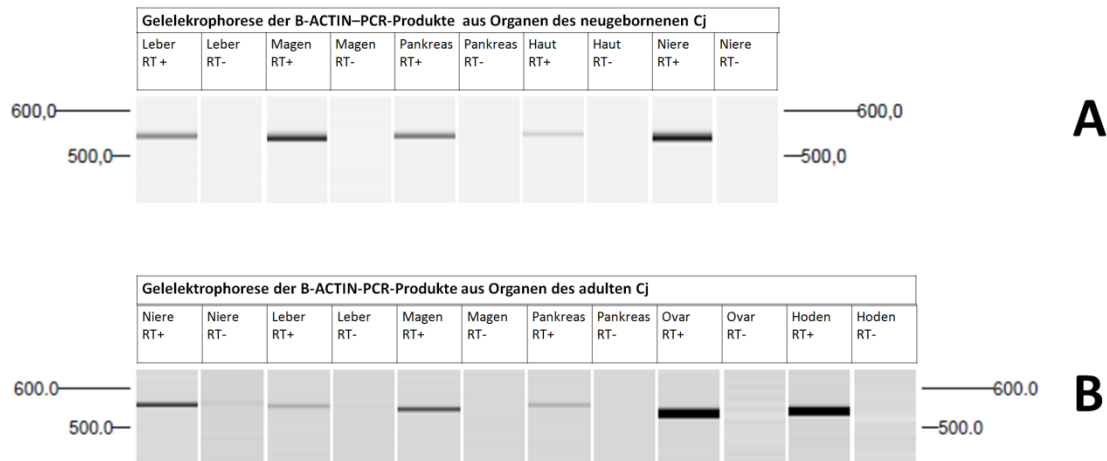


Abb. 3-21 *B-ACTIN* -PCR aus Gewebeproben des neugeborenen und des adulten Weißbüschelaffen

Die Gelelektrophorese der *B-ACTIN* -PCR-Produkte aus Geweben von neugeborenen (A) und adulten (B) Tieren zeigte für alle Proben Banden in der erwarteten Größe von 562 bp. In den Negativkontrollen waren keine Banden zu sehen. Die verwendeten Mengen an Template (Tp) wurden mit zuvor durchgeführten β -Actin-PCRs durch Angleichung festgelegt.

Die PCR mit dem *B-ACTIN*-Primer ergab in der im QiaxCell durchgeführten Gelelektrophorese in allen Proben, denen während der Reversen Transkriptasereaktion Reverse Transkriptase (RT) zugesetzt worden war, Banden in der erwarteten Größe von 562 bp. Die Negativkontrollen, die keine Reverse Transkriptase enthielten (RT-), zeigten keine Banden. Die Mengen an jeweils verwendetem Template (Tp) sind **Abb. 3-21** zu entnehmen. Die Volumina an eingesetztem Probenmaterial wurden in vorangestellten *B-ACTIN* -PCRs mittels Angleichung ermittelt.

Ergebnisse der VASA-PCRs aus Gewebeproben des adulten Weißbüschelaffen

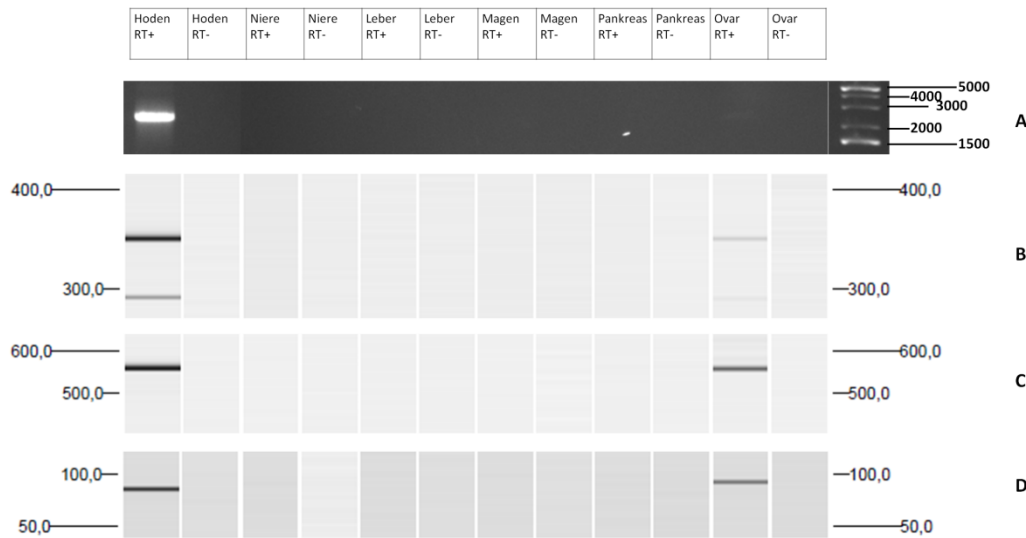


Abb. 3-22 VASA-PCR aus Gewebeproben des adulten Weißbüschelaffen:

Die mit den Primerpaaren 1 (A), 2 (B), 3 (C) und 4 (D) durchgeführten PCRs ergaben jeweils für Hoden und Ovar Banden in der erwarteten Größe, wobei die Banden in den Proben aus Ovarialgewebe deutlich schwächer waren. In den PCR-Produkten des Primerpaares 2 (B) ergab sich außerdem eine zweite Bande für Hoden sowie für Ovar.

Für die PCR-Produkte der übrigen verwendeten Organe (Niere, Leber, Magen, Pankreas) ergaben sich keine Banden. In den Negativkontrollen aller verwendeten Proben wurden keine Banden detektiert.

Die Positionen der Primerpaare sind in **Abb. 1-1** dargestellt.

Die Produkte der PCRs mit den Primerpaaren 1, 2, 3 und 4 ergaben in der Gelelektrophorese jeweils für Hoden und Ovar Banden in den erwarteten Größen. Die PCR mit dem Primerpaar 1 (*open reading frame*; (A)) zeigte in der konventionellen Gelelektrophorese für Hoden eine deutliche Bande bei 2280 bp. Für das Ovar wurde eine Bande in der gleichen Größe detektiert, die allerdings eine sehr schwache Intensität aufwies. Die PCR-Produkte der PCR mit dem Primerpaar 2 (B) ergaben für Hoden eine deutliche Bande bei 370 bp und eine schwächere Bande bei ca. 300 bp. Für Ovar wurden deutlich schwächere Banden in den gleichen Größen detektiert. Unter Verwendung des Primerpaares 3 (C) wurde für Hoden eine deutliche Bande und für Ovar eine schwächere Bande bei 555 bp detektiert. Die Verwendung des Primerpaares 4 (D) ergab für Hoden eine deutliche Bande bei 78 bp und für Ovar eine etwas schwächere Bande in der gleichen Größe. In den PCR-Produkten aus Niere, Leber, Magen und Pankreas wurden mit keinem der Primerpaare Banden detektiert. Die Negativkontrollen aller verwendeten Proben zeigten keine spezifischen Banden.

Ergebnisse der VASA-PCRs aus Gewebeproben des neugeborenen Weißbüschelaffen

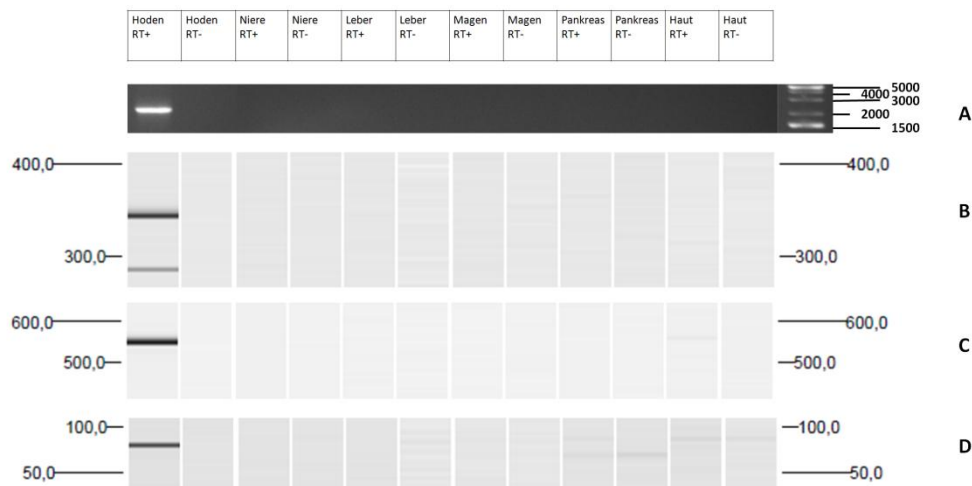


Abb. 3-23 VASA-PCR aus Gewebeproben des neugeborenen Weißbüschelaffen:

Die mit den Primerpaaren 1 (A), 2 (B), 3 (C) und 4 (D) durchgeführten PCRs ergaben jeweils für die Positivkontrolle aus adultem Hoden Banden in der erwarteten Größe. In den PCR-Produkten des Primerpaares 2 (B) ergab sich außerdem eine zweite Bande für Hoden.

Für Haut ergab sich in der dargestellten Probe unter Verwendung des Primerpaares 3 (C) eine Bande in der erwarteten Größe von 555 bp. Das Signal konnte in der zweiten Probe (nicht dargestellt) nicht detektiert werden. Die mit den übrigen Primern durchgeführten PCRs ergaben für Haut keine spezifischen Banden.

Für die PCR-Produkte der übrigen verwendeten Organe (Niere, Leber, Magen, Pankreas) konnten keine Banden detektiert werden. Die Negativkontrollen aller verwendeten Proben zeigten keine spezifischen Banden

Die Produkte der PCRs mit den Primerpaaren 1, 2, 3 und 4 ergaben in der Gelelektrophorese jeweils für die Positivkontrolle aus adultem Hoden Banden in den erwarteten Größen. Die PCR mit dem Primerpaar 1 (*open reading frame*; (A)) zeigte in der Gelelektrophorese für Hoden eine deutliche Bande bei 2280 bp. Die Produkte der PCR mit dem Primerpaar 2 (B) ergaben für Hoden eine deutliche Bande bei 370 bp und eine schwächere Bande knapp unter 300 bp. Unter Verwendung des Primerpaares 3 (C) wurde für Hoden eine deutliche Bande bei 555 bp detektiert. Die Verwendung des Primerpaares 4 (D) ergab für Hoden eine deutliche Bande bei 78 bp. Eine verwendete Hautprobe zeigte unter Verwendung des Primerpaares 3 (C) eine schwache Bande in der erwarteten Größe von 555 bp. In der zweiten Hautprobe (nicht gezeigt) wurde keine Bande detektiert. Die mit den übrigen Primern durchgeführten PCRs (A, B, D) ergaben keine spezifischen Banden. In den PCR-Produkten aus Niere, Leber, Magen und Pankreas wurden keine Banden detektiert. Die Negativkontrollen aller verwendeten Proben zeigten keine spezifischen Banden.

3.4 Verifizierung der PCR-Produkte

Um die Identität der entstandenen PCR-Produkte zu überprüfen, wurden die nicht erwartete Doppelbande, die in Hoden und Ovar unter Verwendung des Primerpaares 2 detektiert wurde (vergl. **Abb. 3-22**), sowie die Bande in neugeborener Haut, die im PCR-Produkt des Primerpaares 3 zu sehen war (vergl. **Abb. 3-23**), wie in 2.2.3.5 beschrieben, ausgeschnitten, sequenziert und mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA und den Sequenzen der einzelnen Exone (vergl. Anhang) verglichen.

Sequenzierung der mit cDNA aus Hoden generierten Doppelbande

Die Sequenz des Fragments, das bei ca. 370 bp detektiert wurde, entsprach dem entsprechenden Abschnitt im *VASA*-Gen, das durch die PCR vervielfältigt werden sollte (vergl. **Abb. 1-1**).

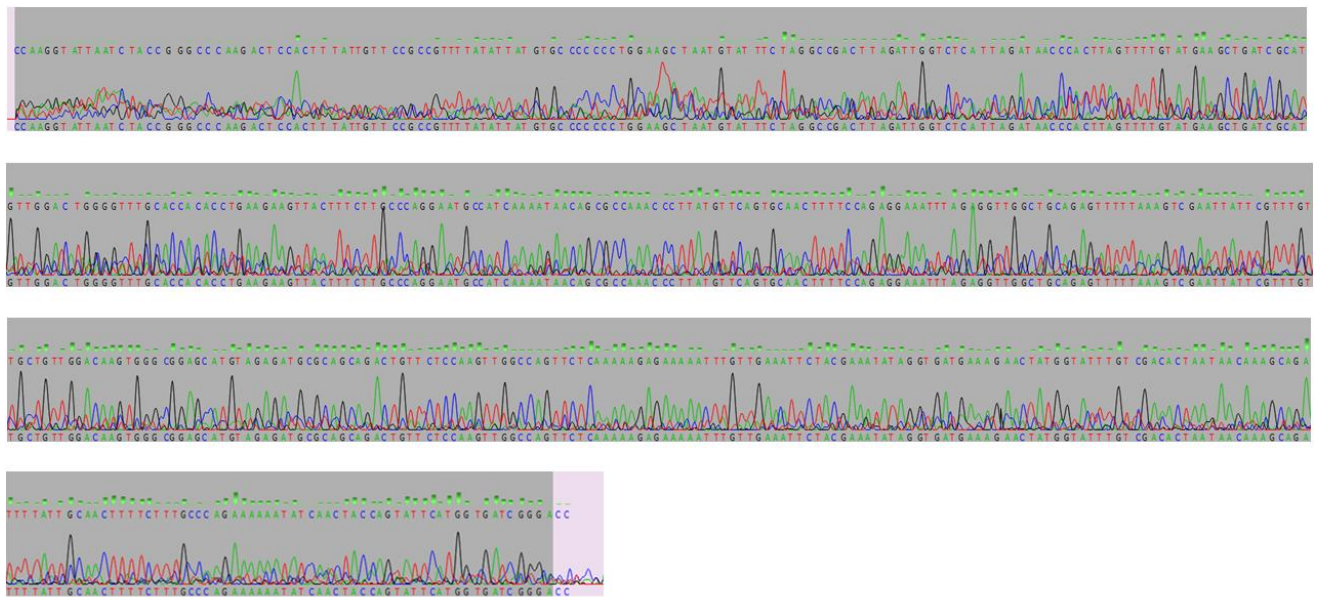
Die Sequenzierung des Fragments, das bei ca. 300 bp detektiert wurde, entsprach dem entsprechenden, von den Primern umschlossenen Abschnitt im *Vasa*-Gen, wobei aber die Sequenz eine Lücke von 60 bp aufwies, die genau zwischen Exon 6 und Exon 8 lag. Die Länge der Lücke entsprach mit 60 bp der in *ensembl.org* angegebenen Länge von Exon 7.

Sequenzierung der mit cDNA aus Haut vom neugeborenen *C. jacchus* generierten Bande

Die Sequenzierung des entsprechenden Fragments konnte nicht zufriedenstellend ausgewertet werden, weil sich im Chromatogramm mehrere Sequenzen überlagerten. Es wurde die dominante Sequenz aus dem Chromatogramm entnommen und mit der Sequenz von *VASA* verglichen. Die Sequenzierung, die mit dem forward primer (PP3_fw) durchgeführt wurde, war fehlgeschlagen und konnte deshalb nicht ausgewertet werden. In der Sequenzierung, die mit dem reverse primer (PP3_re) durchgeführt wurde, zeigte sich über eine Länge von 331 bp eine >96 %ige Übereinstimmung der Sequenz mit dem entsprechenden Abschnitt im *VASA*-Gen.

Abb. 3-24 Ergebnis der Sequenzierung des PCR-Produkts aus der Haut des neugeborenen Weißbüschelaffen:

Das dargestellte Chromatogramm stammt aus der Sequenzierung des PCR-Produkts aus der Haut des neugeborenen Weißbüschelaffen. Es zeigen sich starke Überlagerungen mehrerer Sequenzen. Die dominante Sequenz wurde entnommen und für ein Alignment verwendet.



4 Diskussion

VASA gilt in Säugetieren als spezifischer Keimzellmarker (Castrillon et al. 2000), wohingegen in unkonventionellen Tiermodellen wie *Hydractinia echinata*, *Pilobrachia Pileus* und *Planaria* Daten zu einer VASA-Expression in außerhalb der Keimbahn liegenden Zellen vorliegen (Pfister et al. 2008; Rebscher et al. 2008; Alié et al. 2011). In diesen Zellen scheint VASA als Stammzellofaktor zu agieren (Raz 2000). Vergleichbare Daten für Säugetiere existieren jedoch noch nicht, weswegen VASA in dieser Tierklasse weiterhin als keimzellspezifisch angesehen und als Marker für Keimzellen eingesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsanalyse im Weißbüschelaffen durchgeführt, um die Keimzellspezifität von VASA in dieser Spezies zu überprüfen. Zu diesem Zwecke wurden immunhistochemische Färbungen, ein immunologischer Nachweis mittels Western Blotting und ein Nachweis von VASA-mRNA mittels PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen werden im Folgenden zusammengefasst und diskutiert. Da es sich bei der PCR um die sensitivste Nachweismethode handelt, werden die Ergebnisse dieser Methode zuerst diskutiert. Anschließend wird auf die Befunde aus den Western Blots und den immunhistochemischen Färbungen näher eingegangen werden.

4.1 Nachweis von VASA-mRNA

Um die Expression von VASA auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden vier verschiedene Primerpaare verwendet, die durch ihre Lage alle Bereiche des kodierenden Gens abdecken (vergl. **Abb. 1-1**). Die Spezifität der verwendeten Primer war in Vorarbeiten von Dr. rer. nat. Katja Eildermann mittels Sequenzierung der jeweils detektierten PCR-Fragmente überprüft worden. In den Positivkontrollen unter Verwendung von RNA aus Ovar und Hoden wurden jeweils Banden in der erwarteten Größe detektiert. In den Proben aus Magen, Leber, Niere und Pankreas des adulten und des neugeborenen *C. jacchus* wurde jeweils keine spezifische Bande detektiert. Darum ist davon auszugehen, dass in den Zellen dieser Organe im Weißbüschelaffen keine VASA-Expression stattfindet. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen aus anderen Säugetieren wie Maus, Mensch und Tamar-Wallaby, die in diesen Organen ebenfalls keine VASA-Expression zeigen (Fujiwara et al. 1994; Castrillon et al. 2000; Hickford et al. 2011), wobei jedoch bedacht werden muss, dass bei den erwähnten Studien zum Teil andere Untersuchungsmethoden mit abweichender Sensitivität eingesetzt wurden. So wurde die VASA-Expression im Menschen mittels Northern Blotting untersucht, das im Vergleich zur PCR eine deutlich geringere Sensitivität aufweist. In der Maus wurden

Northern Blotting und in situ Hybridisierung verwendet und im Tammar-Wallaby kamen Northern Blotting, Western Blotting und PCR zum Einsatz.

Interessanterweise wurde unter Verwendung des Primerpaars 3 eine Bande in einer der beiden Hautproben vom neugeborenen Weißbüschelaffen in der erwarteten Größe von 555 bp detektiert. Dieser Befund deutet auf eine VASA-Expression in Hautzellen des neugeborenen Weißbüschelaffen hin. Eine VASA-Expression in Hautzellen eines Säugetieres wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Die Befunde aus der Haut sollen in Abschnitt 4.4 ausführlich diskutiert werden.

4.2 Nachweis von VASA mittels Western Blotting

Im immunologischen Nachweis von VASA mittels Western Blotting wurde im als Positivkontrolle dienenden Hodengewebe nur eine spezifische Bande detektiert, die bei ca. 80 kDa lag und damit der erwarteten Größe von VASA entsprach (Castrillon et al. 2000; Saotome et al. 2010). In der Negativkontrolle wurde kein Signal detektiert. Die detektierte Bande wurde unter Verwendung von VASA-Blocking-Peptid zwar nicht vollständig geblockt, aber in ihrer Intensität stark vermindert. Dies sowie die Ergebnisse der Negativkontrolle sprechen für die Spezifität des detektierten Signals. In den Proben aus Magen, Leber, Niere und Pankreas von adultem und neugeborenem Weißbüschelaffen wurden bei ca. 80kDa keine Banden detektiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der PCR, die in diesen Organen ebenfalls keine VASA-Expression zeigte.

Interessanterweise wurde zusätzlich in den Proben aus Magengewebe des adulten und des neugeborenen Weißbüschelaffen durch den VASA-Antikörper jeweils eine Bande bei ca. 35 kDa detektiert. Die Ergebnisse der durchgeführten Kontrollen mit Sekundärantikörper und VASA-Blocking-Peptid sprechen für eine spezifische Bindung des Antikörpers im Magen, allerdings wurde in der PCR, die die sensitivere Methode darstellt, mit keinem der verwendeten Primer ein VASA-Fragment in diesem Organ detektiert. Der verwendete Antikörper ist polykonal, wobei bei der Herstellung als Immunogen aus E.coli-Zellen gewonnenes rekombinantes menschliches VASA verwendet wurde. Der Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren Met1 bis Tyr145 am N-Terminus des Proteins. Um vom anti-VASA-Antikörper spezifisch gebunden zu werden, müsste ein Protein also diesen Abschnitt enthalten. Entsprechend müsste in den Zellen auch RNA vorhanden sein, die für diesen Bereich kodiert. Im VASA-Gen codieren die Exone 1 bis 6 für diesen Proteinabschnitt. In der PCR amplifizierten zwei verschiedene Primerpaare in diesem Bereich, mit RNA aus dem Magen wurde jedoch mit keinem Primerpaar ein VASA-Fragment amplifiziert. Es ist daher wahrscheinlich, dass der verwendete Antikörper mit seinen Bindestellen nicht an eine Splice-Variante von VASA

sondern an ein anderes Protein bindet, das eine Größe von ca. 35kDa aufweist. Mittels BLAST wurde die den Antikörper bindende Sequenz des VASA-Proteins mit dem gesamten Genom des Weißbüschelaffen verglichen, um zu überprüfen ob Sequenzähnlichkeiten mit anderen Proteinen bestehen, die zu einer Bindung des Antikörpers geführt haben könnten. Sehr geringe Sequenzähnlichkeiten ergaben sich für ein RNA-Bindeprotein, eine Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 3, sowie ein eine Calponinhomologie-Domäne enthaltendes, leucinreiches nicht näher spezifiziertes Protein (Zugangsnummer bei NCBI: XP_002763218.1). Dieses Protein kommt in großen Mengen in der glatten Muskulatur vor. Der Magen besteht zu großen Anteilen aus glatten Muskelzellen. Somit könnte eine spezifische Bindung des Antikörpers an dieses Protein das detektierte Signal im Magen erklären. Jedoch wiesen die verglichenen Sequenzen nur eine äußerst geringe Ähnlichkeit auf, mit einem *e-value* von 5,2; daher ist es unwahrscheinlich, dass der verwendete VASA-Antikörper aufgrund von Sequenzähnlichkeiten an dieses Protein bindet.

Im Ovar konnte mittels Western Blot kein VASA detektiert werden, obwohl die PCR in diesem Organ positiv ausfiel. Für PCR und Western Blotting wurden jedoch Organproben aus unterschiedlichen Tieren verwendet. Die Anzahl der Keimzellen im Ovar vermindert sich mit zunehmendem Alter. Hieraus ergeben sich große Unterschiede bei der Größe des Keimzellpools zwischen jungen und alten Tieren. Da es sich bei dem im Western Blot verwendeten Ovar um Archivmaterial handelte, konnte das Alter des entsprechenden Tieres nicht rückverfolgt werden, jedoch ist davon auszugehen, dass es sich um ein älteres Tier handelte. Somit wäre der Befund, dass VASA im Ovar mittels Western Blot nicht detektierbar war, vermutlich auf eine bereits zu geringe VASA-Konzentration im entsprechenden Proteinhomogenat zurückzuführen

In der Haut wurde, konträr zu den Ergebnissen der PCR, mit dem VASA-Antikörper keine Bande detektiert. Auf diese Ergebnisse wird im Abschnitt 4.4 näher eingegangen werden.

4.3 Nachweis von VASA mittels immunhistochemischer Färbungen

Um die Expression von VASA in verschiedenen Organen des Weißbüschelaffen Zell-spezifisch zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Da kommerziell keine VASA-Antikörper, die gegen Weißbüschelaffen-VASA generiert wurden, erhältlich sind, wurden im Vorfeld verschiedene Antikörper, die von den jeweiligen Firmen für die Verwendung in Mensch und Maus ausgewiesen sind, in Hodengewebe von Maus, Mensch und Weißbüschelaffen getestet, um sie auf ihre Verwendbarkeit im Weißbüschelaffen zu untersuchen. Das typische Färbemuster von VASA im Hoden zeigt eine Färbung der Spermatogonien, der Spermatozyten und der runden Spermatiden (Castrillon et al. 2000). Im

Gegensatz zu den übrigen verwendeten Antikörpern zeigte der VASA-Antikörper von R&D das erwartete Färbemuster in den Keimzellen aller drei Spezies, während die umliegenden Sertoli- und Peritubulärzellen nicht angefärbt wurden. Daher wurde dieser Antikörper im Folgenden eingesetzt. Die beiden anderen getesteten Antikörper zeigten sich nicht kompatibel für die Verwendung im Weißbüschelaffen. Es wurden insgesamt 11 verschiedene Organe mit dem VASA-Antikörper inkubiert, wobei jeweils eine Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers aus dem Standardprotokoll durchgeführt wurde. Als weitere Kontrolle wurden die entsprechenden Schnitte statt mit dem spezifischen, gegen VASA gerichteten Primär-Antikörper mit unspezifischen Immunglobulinen G aus der Ziege inkubiert. Zusätzlich zu dem erwarteten VASA-Färbemuster wurde im Hoden vom adulten Menschen sowie vom adulten Weißbüschelaffen ein deutliches Signal in den Leydig-Zellen detektiert, worauf in Abschnitt 4.6 näher eingegangen werden soll.

Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität des VASA-Antikörpers wurde in fünf ausgewählten Organen eine Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid durchgeführt, wobei Hoden und Ovar aus adulten Tieren als Kontrollen dienten. Die Auswahl der Organe erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und der Ergebnisse von Drallé. Bei der Kontrolle mit Blocking-Peptid wird, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen, der Antikörper vor der Färbung mit dem Peptid, gegen das er generiert wurde, inkubiert, um seine spezifischen Bindestellen abzusättigen. Die ausgewählten Organe waren Leber, Niere, Pankreas, Magen und Haut.

In unterschiedlichen Spezies wurden im Zuge von Expressionsanalysen in verschiedenen Arbeiten Leber, Niere und Pankreas auf eine VASA-Expression untersucht (Fujiwara et al. 1994; Castrillon et al. 2000; Tsunekawa et al. 2000; Saotome et al. 2010; Hickford et al. 2011). Diese Daten sowie die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen bzw. die Vorarbeiten von Drallé machten eine weitere Untersuchung dieser Organe auch im Weißbüschelaffen interessant, weswegen Leber, Niere und Pankreas für weitere Analysen ausgewählt wurden.

In *Hydractinia echinata* wurde über eine Vasa-Expression in Stammzellen im Gastrointestinaltrakt berichtet (Rebscher et al. 2008), weshalb ein Organ aus dem Gastrointestinaltrakt für weitere Analysen vorgesehen wurde. Als Vertreter des Gastrointestinaltraktes wurde der Magen ausgewählt, da sowohl im neugeborenen als auch im adulten Tier deutliche Färbungen in der glatten Muskulatur und in bestimmten Zellen der Magendrüsen detektiert worden waren.

Auch in der Haut wurden Färbungen detektiert, die aufgrund der Ergebnisse der Kontrollen spezifisch wirkten. Zusätzlich zeigten Untersuchungen in *Hydractinia echinata* eine VASA-Expression in ektodermalen epithelialen Zellen (Mochizuki et al. 2001). Daher wurden weitere Untersuchungen bezüglich einer VASA-Expression in der Haut des Weißbüschelaffen als erfolgsversprechend angesehen.

In Magen, Leber, Niere und Pankreas wurden mittels Western Blotting und PCR keine Hinweise auf eine VASA-Expression detektiert. Diese Ergebnisse verhielten sich konträr zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen, in denen nach der Inkubation mit dem VASA-Antikörper Signale in Zellen aller fünf Organe detektiert wurden. Möglicherweise entstanden die detektierten Signale durch Bindungen des Antikörpers an andere Proteine bzw. an extrazelluläre Strukturen.

Wenn der verwendete Antikörper außer an VASA auch an weitere Proteine bindet, müssten theoretisch auch im Western Blot diese Proteine durch den VASA-Antikörper angefärbt werden und als Banden zu sehen sein. Allerdings wurde nur in den Proben aus Magen eine Bande detektiert. Wenn diese Bande beispielsweise dem im BLAST detektierten, eine Calponinhomologie-Domäne enthaltenden, leucinreichen Protein entspräche (vergl. 4.2), würde dies die in der IHC-Färbung detektierten positiven Signale in der glatten Muskulatur erklären. Die Zellen, die in den Magendrüsen angefärbt wurden, waren in ihrer Gesamtzahl sehr gering, sodass das Protein, das hier vermutlich unspezifisch gefärbt wurde, im Western Blot unter der Nachweisgrenze gelegen haben könnte.

Im Pankreas wurde im gesamten exokrinen Anteil durch den VASA-Antikörper ein Signal detektiert, im Blot jedoch waren alle Proben aus Pankreas signalfrei. Wäre das Signal spezifisch durch ein zelluläres Protein ausgelöst worden, hätte aufgrund der Quantität des Signals auch eine deutlich Bande im Western Blot zu sehen sein müssen (zumal die exokrinen Drüsen den Hauptanteil des Pankreas ausmachen). Allerdings schienen in den Pankreaspräparaten des adulten *C. jacchus* nicht die Zellen selbst, sondern die Lumina der Drüsen durch den Antikörper angefärbt worden zu sein. Zusätzlich schienen auch die apikalen Anteile des Zellzytoplasmas gefärbt worden zu sein, wobei sich dies nicht zum Drüsenlumen abgrenzen ließ. Auch im Pankreas des neugeborenen Weißbüschelaffen erschienen zwar die Drüsenzellen schwach zytoplasmatisch gefärbt, aber ein weit deutlicheres Signal wurde in den Lumina der Drüsen detektiert. In den exokrinen Drüsen wird das Pankreassekret sezerniert. Die Färbung des Sekretes entstand möglicherweise durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers, der am Sekret gleichsam „kleben bleibt“. Über unspezifische

Antikörperbindungen im exokrinen Pankreas wird häufig berichtet (Ge et al. 2006; Goland et al. 2009). Im Pankreas setzt aufgrund der fett-, nukleinsäuren- und eiweißspaltenden Enzyme, die in den exokrinen Drüsenzellen produziert werden, postmortal eine sehr rasche Autolyse ein. Dies führt leicht zu unspezifischen Antikörperbindungen (Ge et al. 2006). Schon wenige Minuten nach dem Tod eines Tieres lässt sich eine Degradierung der Proteine pankreatischer Zellen nachweisen (Scholz et al. 2011). Möglicherweise hatte bei den histologischen Präparaten eine Autolyse schon teilweise eingesetzt und die Zellmembranen zerstört, sodass ein scheinbar zytoplasmatisches Signal erzeugt wurde.

Eine ähnliche Situation ist auch in den proximalen Tubuli der neugeborenen Niere denkbar, in denen durch den VASA-Antikörper ein Signal detektiert werden konnte. Es waren hier nicht die Zellen selbst, sondern die Bürstensäume der Zellen angefärbt. Eventuell kam es hier zu einer Bindung des Antikörpers an Konkrement, das sich in den Bürstensäumen postmortal abgelagert hatte. Warum diese Färbung nur in der Niere vom neugeborenen Weißbüschelaffen und nicht in der adulten Niere auftrat, ließ sich im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht klären. Die in den Sammelrohren detektierten Signale sind als unspezifisch anzusehen, da sowohl in der Kontrolle mit IgG Ziege als auch in der Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid die gleichen Zellen ein Signal zeigten.

Das Signal in den Hepatozyten der neugeborenen Leber wurde eindeutig als unspezifisch identifiziert, da in allen Kontrollen das gleiche Färbemuster auftrat. Da das Signal auch in der Negativkontrolle detektiert wurde, wurde es möglicherweise durch eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers erzeugt. Dafür spricht, dass im Western Blot andere Sekundärantikörper verwendet werden und dort keine Bande in den Protein-Proben aus der Leber des Neugeborenen detektiert wurde.

In der Leber des adulten *C. jacchus* wurde in den Hepatozyten, die in Nachbarschaft der großen Gefäße liegen, ein VASA-positives Signal detektiert, das allerdings schwach auch in der Kontrolle mit VASA-Blocking-Peptid auftrat. In der Leber bildet sich zwischen den Periportalfeldern und den Zentralvenen ein Gradient in der Sauerstoffversorgung aus, nach dem die Hepatozyten in funktionelle Zonen eingeteilt werden. Jede Zone hat unterschiedliche Aufgaben, und unterschiedliche Proteine werden in ihr exprimiert. Da sowohl um die Periportalfelder als auch um die Zentralvenen Hepatozyten angefärbt wurden, konnte das Färbemuster keiner funktionellen Zone zugeordnet werden.

In der Haut wurden durch den VASA-Antikörper Signale in den Keratinozyten, den Mm. erectores pili, den Harffollikeln sowie den mit ihnen assoziierten Talgdrüsen detektiert. Die Färbungen der Haut sollen im folgenden Abschnitt ausführlicher besprochen werden.

4.4 Vasa-Expression in der Haut des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die PCR mit dem Primerpaar 3 ergab mit cDNA aus einer Hautprobe des neugeborenen Weißbüschelaffen eine Bande geringer Intensität mit der erwarteten Größe von 555 bp. Mittels Sequenzierung wurde eine hohe Übereinstimmung der Sequenz des detektierten Fragmentes mit dem entsprechenden Abschnitt im VASA-Gen gezeigt. Diese Ergebnisse sprechen für eine tatsächliche VASA-Expression in der Haut vom neugeborenen Weißbüschelaffen.

Die Zellen, in denen aufgrund der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen VASA vermutet wurde, liegen ausschließlich in der Epidermis. Die verwendeten Biopsien bestanden jedoch aus Epidermis und Dermis, sodass die relative Anzahl an VASA-positiven Zellen, bezogen auf das gesamte Zellmaterial in den Biopsien, als gering einzuschätzen ist. Da die VASA-positiven Zellen direkt unter der Keratinschicht liegen, wurden sie durch diese während der mechanischen Lysierung des Gewebes geschützt: Daher vermutlich wiesen die durch die RNA-Isolation gewonnenen Proben eine sehr geringe RNA-Konzentration auf, die gerade ausreichte, um eine cDNA-Synthese durchzuführen. Aus den Proben der Haut vom adulten Weißbüschelaffen, die bereits eine wesentlich dickere Keratinschicht als die Haut vom neugeborenen Weißbüschelaffen aufweist, gelang es daher nicht, RNA in einer für die cDNA-Synthese ausreichenden Konzentration zu gewinnen. Zusätzlich ist aufgrund des hohen Kollagenanteils und der schützenden Keratinschicht die Präparation von RNA aus der Haut mit hohen Schwierigkeiten verbunden (Trost et al. 2007; Clemmensen et al. 2009; Bruning et al. 2011). Dies könnte erklären, warum der Nachweis einer VASA-Expression in der zweiten Hautprobe nicht gelang.

Für weitere Versuche würde sich für die RNA-Isolation aus Haut ein modifiziertes Protokoll, z.B. durch die Anwendung des RNeasy fibrous tissue kit von Qiagen, empfehlen. Da die VASA-positiven Zellen in der Epidermis lagen, wäre es außerdem möglich bei der Entnahme von Biopsien entweder manuell oder z.B. durch Inkubation mit Ammoniumthiocyanat (Clemmensen et al. 2009) die Epidermis von der Dermis abzubereiten und so den Gehalt an VASA-exprimierenden Zellen in den Proben zu erhöhen.

Dieselben Ursachen, die Probleme bei der Isolierung von RNA bereiteten, treffen auch für den immunologischen Nachweis von VASA mittels Western Blotting zu und erklären, warum im Western Blot in den untersuchten Hautproben aus adulten und neugeborenen Tieren keine Bande detektiert wurde: Vermutlich enthielten die getesteten Proteinproben anteilig zu wenig Protein aus den VASA-positiven Zellen, sodass die Menge an enthaltenem VASA-Protein unter der Nachweisgrenze lag. Die Problematik einer effizienten Probengewinnung aus der

Haut deckt sich mit den Ergebnissen der Färbungen mit Ponceau und Amidoschwarz, in denen die Spuren, die Hautproteine enthielten, wesentlich schwächer angefärbt wurden als die Spuren, die Proteine aus anderen Organen enthielten. Dies deutet auf einen insgesamt niedrigeren Proteingehalt in den Hautproben hin.

Die Epidermis der Haut ist ein sehr regeneratives Gewebe mit einer hohen Zellteilungsrate. VASA wurde in unkonventionellen Modellorganismen vor allem in Geweben mit hohem Regenerationsvermögen gefunden (Gustafson und Wessel 2010b; Alié et al. 2011). Zudem wurde in *Hydra* eine VASA-Expression in ektodermalen epithelialen Zellen detektiert (Mochizuki et al. 2001), die für Stammzellen gehalten werden (Bosch 2009; Bosch et al. 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass VASA im neugeborenen Weißbüschelaffen im regenerativen Gewebe der Haut und damit außerhalb der Keimbahn exprimiert wird. Ob diese Ergebnisse auch auf die Haut des adulten Weißbüschelaffen übertragbar sind, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Eine Expression von VASA außerhalb der Keimbahn wurde in Säugetieren bisher noch nicht dokumentiert. In verschiedenen Säugern wie Maus und Mensch wurde die Keimzellspezifität von VASA in verschiedenen Organen untersucht, Hautproben wurden allerdings nicht in die Versuchsreihen aufgenommen (Fujiwara et al. 1994; Castrillon et al. 2000; Tsunekawa et al. 2000). Es ist möglich, dass VASA nicht nur im Weißbüschelaffen, sondern auch bei anderen Säugern in der Haut vorkommt. Um diese These zu untermauern, wäre eine vergleichende Untersuchung der Vasa-Expression, z.B. mittels PCR in Hautproben aus unterschiedlichen Säugetieren, wegweisend.

Viele Signale, die mit immunhistochemischen Färbungen in unterschiedlichen Organen detektiert wurden, konnten mittels PCR und Western Blotting nicht bestätigt werden, darum kann die VASA-Expression anhand der immunhistochemischen Färbungen bisher nicht zuverlässig einem bestimmten Zelltyp in der Haut zugeordnet werden. Auf Basis der immunhistochemischen Färbungen ist eine VASA-Expression in den Keratinozyten, den Haarfollikeln und den Talgdrüsen denkbar. Da im Magen, der hauptsächlich aus glatter Muskulatur besteht, mittels PCR keine VASA-Expression nachgewiesen wurde, ist eine VASA-Expression in den Mm. erectores pilii unwahrscheinlich. Eine genauere Lokalisation der VASA-exprimierenden Zellen wäre z.B. mittels in situ Hybridisierung möglich. Mit dieser Methode wurden beispielsweise erfolgreich VASA-positive Zellen außerhalb der Keimbahn in der Seestachelbeere identifiziert (Alié et al. 2011). Die Expression von Vasa in besonders regenerativen Geweben wurde in unkonventionellen Tiermodellen beobachtet (Gustafson und

Wessel 2010a; Alié et al. 2011), was die Vermutung nahelegt, dass VASA in der Haut als Faktor in der Zellregeneration eine Rolle spielen könnte. Verschiedene neuere Studien zeigen, dass VASA in unkonventionellen Tiermodellen wie Plattwurm oder Nesseltier eine Funktion als Stammzellfaktor zu haben scheint (Gustafson und Wessel 2010a). Die Haut enthält als regeneratives Organ verschiedene Populationen von Stammzellen, unter anderem in der Basalschicht der Epidermis, im Bulbus des Haarfollikels sowie auch in den dem Haarfollikel zugeordneten Talgdrüsen. In allen diesen Strukturen wurden in den immunhistochemischen Färbungen VASA-positive Signale detektiert, jedoch waren nicht einzelne spezifische Zellen angefärbt sondern komplette Zellschichten. So zeigte beispielsweise das gesamte Epithel der Haut ein schwaches zytoplasmatisches Signal, wohingegen epitheliale Stammzellen in der Basalschicht des Hautepithels lokalisiert sind. Die Ergebnisse der Färbungen konnten somit keinen Aufschluss darüber geben, ob das in der PCR detektierte VASA-positive Signal auf eine VASA-Produktion in dermalen Stammzellen oder in anderen Zellpopulationen zurückzuführen ist.

Obwohl eine mögliche Expression von VASA in den Zellen der adulten Haut in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, geben die Ergebnisse aus dem neugeborenen Weißbüschelaffen sowie die Daten aus der Literatur Grund zu der Annahme, dass auch in der Haut des adulten Weißbüschelaffen VASA exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, sollten weitere Untersuchungen erfolgen.

4.5 Splice-Variante von VASA in Hoden und Ovar

In der PCR mit dem Primerpaar 2 wurde in den Proben aus Hoden und Ovar eine Doppelbande gefunden. Mittels Sequenzierung konnte die obere Bande (370bp) dem auf *ensembl.org* veröffentlichten VASA-Transkript zugeordnet werden, das im Hoden und im Ovar des Weißbüschelaffen vorkommt. Das Fragment, das die unteren Bande repräsentierte, entsprach prinzipiell demselben Abschnitt des VASA-Gens, jedoch ergab sich beim Alignment mit der VASA-cDNA eine Lücke im Fragment, die in Länge und Position exakt dem Exon 7 entsprach. Das Fragment wurde nur unter Verwendung des Primerpaares 2 detektiert. Auch im PCR-Produkt des Primerpaares 1 ergab sich keine Doppelbande. Da es sich bei Primerpaar 1 um einen *open reading frame*-Primer handelt, bindet dieser jeweils am 5'- und 3'-Ende des VASA-Gens. Da im PCR-Produkt dieses Primerpaares keine Doppelbande detektiert wurde, deutet dies darauf hin, dass auch Anfang und Ende des Proteins modifiziert sind und so die Primer nicht binden konnten. Für VASA sind bereits viele Splice-Varianten in verschiedenen

Spezies beschrieben worden. Im Menschen ist beispielsweise eine Splice-Variante von VASA gefunden worden, die ein neues Exon 1 und damit einen veränderten N-Terminus aufweist (Hickford et al. 2011). In der Datenbank *ensembl* werden für Weißbüschelaffen drei Splice-Varianten angegeben. Zwei Splice-Varianten bestehen aus 22 Exonen (ENSCJAT00000003827, ENSCJAT000000059781), wobei jeweils Exon 7 bzw. Exon 8 fehlt, eine Splice-Variante besteht aus 15 Exonen (ENSCJAT000000052636), wobei die Exone 1 bis 8 fehlen. Eine Variante, in der Exon 7 fehlt und die zudem einen veränderten oder verkürzten N-Terminus bzw. C-Terminus aufweist, wurde im Weißbüschelaffen jedoch noch nicht dokumentiert. Im Menschen existiert ebenfalls eine Splice-Variante, in der das Exon 7 fehlt (Hickford et al. 2011). Über die Funktion von Exon 7 bzw. der Splice-Variante ist bisher allerdings noch nichts bekannt (Hickford et al. 2011). In Mensch und Maus wird in den ovariellen Stammzellen eine VASA-Variante auf der Zelloberfläche exprimiert, die sich bei der Differenzierung zur Oozyte ins Zytoplasma verlagert (Zou et al. 2009; White et al. 2012). Diese Splice-Variante weist einen veränderten N-Terminus auf, ihre Funktion ist allerdings noch nicht geklärt (White et al. 2012). Die detektierte Splice-Variante im Weißbüschelaffen könnte eventuell das Korrelat dieses Proteins darstellen, sofern es tatsächlich einen veränderten oder verkürzten N-Terminus aufweist.

Um dies genauer zu untersuchen, würde es sich beispielsweise empfehlen, weitere Primer zu designen, die kürzere Abschnitte des Gens abdecken, um so die exakte Länge und Sequenz der Splice-Variante zu bestimmen und so eventuell eine modifizierte Funktion des Proteins abzuleiten. Um die gesamte Struktur der Splice-Variante feststellen zu können, würde es sich zudem anbieten, eine RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) durchzuführen. Beim 3' RACE Verfahren wird ein Primerpaar verwendet, das an eine bekannte Sequenz im Gen sowie an den poly(A)-Schwanz der zu untersuchenden mRNA bindet. Durch dieses Verfahren kann der bisher unbekannte Abschnitt, der zwischen den Primern liegt transkribiert und sequenziert werden.

4.6 VASA-positives Signal in den Leydig-Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der VASA-Antikörper der Firma R&D im Hoden bei immunhistochemischen Färbungen nicht nur das typische VASA-Färbemuster, sondern zusätzlich auch ein deutliches Signal in den Leydig-Zellen des Hodens von Mensch und Weißbüschelaffen erzeugt. Um bei der Arbeit mit Keimzellen möglichst reine Populationen für Zellkulturen zu erhalten, werden VASA-Antikörper verwendet, um die Zellen zu markieren und anzureichern (Zou et al. 2009; White et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit

zeigen jedoch, dass bei dieser Methode eine hohe Verwechslungsgefahr zwischen Keimzellen und Leydig-Zellen besteht. Somit kann dieser Antikörper in Zellkulturen zur Identifizierung von Keimzellen nicht singular eingesetzt werden. Ob die Färbung der Leydig-Zellen auf einem unspezifischen Signal beruht oder ob Leydig-Zellen VASA exprimieren, konnte mit den verwendeten Verfahren nicht weiter untersucht werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Kontrollen, in denen jeweils kein Signal in den Leydig-Zellen detektiert wurde, deuten jedoch auf eine spezifische Färbung durch den verwendeten Antikörper hin. Unter Verwendung des gleichen Antikörpers wurden VASA-positive Signale in den Leydig-Zellen auch in Hodenpräparaten des Tupaia-Belangeri-Spitzhörnchens beobachtet. Hierbei zeigten die Leydig-Zellen in der immunhistochemischen Färbung sogar ein deutlich stärkeres Signal als in den Keimzellen (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. rer. nat. R. Behr). Auch dies deutet auf eine spezifische Färbung durch den verwendeten Antikörper hin. Um eindeutig zu klären, ob das Signal auf eine tatsächliche VASA-Expression der Leydig-Zellen zurückzuführen ist, könnte man Leydig-Zellen durch einen enzymatischen Verdau mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation mittels Kieselerde isolieren. Entsprechende Protokolle existieren bereits für verschiedene Spezies wie Meerschweinchen, Dsungarischer Zwerghamster und Mensch (Kukucka und Misra 1994; Niedziela und Lerchl 1999; Sun et al. 2005). Um zu belegen, dass es sich bei den in der Immunhistochemie detektierten Zellen tatsächlich um Leydig-Zellen handelt, wäre eine Doppelmarkierung mit VASA und einem Leydigzell-spezifischem Marker wie z.B. Insulin-like 3 (Ivell et al. 1997; Bamberger et al. 1999) wegweisend. Sollte VASA auch in den Leydig-Zellen exprimiert werden, würde dies bedeuten, dass VASA noch wesentlich vielseitigere Funktionen außerhalb der Keimbahn übernimmt, als bisher angenommen.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten deutliche Hinweise dafür erarbeitet werden, dass im Weißbüschelaffen VASA nicht nur in den Keimzellen, sondern auch in der Haut des Neugeborenen exprimiert wird. Dies wurde bisher für kein Säugetier gezeigt und widerspricht der These, dass VASA in allen Säugetieren keimzellspezifisch ist (Castrillon et al. 2000; Gustafson und Wessel 2010a; Alié et al. 2011). Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse erscheint es möglich, dass VASA im Weißbüschelaffen noch weitere Funktionen im Organismus innehat, die über die Funktionen des Proteins in der Keimbahn hinausgehen. Möglicherweise trifft dies auch auf andere Säugetiere zu. Um diese Hypothese zu überprüfen,

sollten vergleichende Untersuchungen einer VASA-Expression in der Haut von verschiedenen Säugern durchgeführt werden. Wenn sich die Befunde einer VASA-Expression in der Haut für die Maus bestätigen ließen, wäre die *VASA-knockout*-Maus ein gutes Modell, um VASA funktionell in der Epidermis zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Splice-Variante von VASA im Hoden und im Ovar des Weißbüschelaffen gefunden, die für den Weißbüschelaffen bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Diese Splice-Variante weist ein fehlendes Exon 7 auf sowie möglicherweise modifizierte N- und C-Termini. Mehrere Splice-Varianten im Menschen und im Weißbüschelaffen, denen das Exon 7 fehlt, sind in der Datenbank *ensembl.org* verzeichnet. Exon 7 scheint demnach eine Funktion zu haben, die für einige VASA-Isoformen nicht benötigt wird. Über die Funktion dieses Exons ist allerdings bisher noch nichts bekannt. Eine genauere Analyse, in welchem Zellkompartiment welche Splice-Variante aktiv ist und unter welchen Bedingungen das jeweilige Protein exprimiert wird, könnte Rückschlüsse auf die Funktion von Exon 7 und seine Bedeutung im VASA-Protein erlauben.

Aufgrund der aktuellen Befundlage ist die Frage, ob VASA ein spezifischer Keimzellmarker im Weißbüschelaffen ist, noch nicht abschließend geklärt. Die Befunde zu Haut und zu den Leydig-Zellen sollten jedoch ein Grund zur Vorsicht sein, bis die Datenlage eine klare Aussage zulässt. Dies gilt insbesondere für Experimente, bei denen Hodenzellen kultiviert werden und Zellen aufgrund einer Markierung mit VASA-Antikörper als Keimzellen angesehen werden.

5 Zusammenfassung

VASA ist ein DEAD-Box-Protein, das in der Keimbahn vorkommt und dem eine essentielle Rolle in der Entstehung und Erhaltung von Keimzellen zugeschrieben wird (Yajima und Wessel 2011a). VASA wurde in jedem bisher untersuchten Organismus in der Keimbahn gefunden (Raz 2000) und ist, da es in Säugetieren als keimzellspezifisch gilt (Castrillon et al. 2000), einer der derzeit meist genutzten Keimzellmarker. Allerdings zeigen neuere Daten aus unkonventionellen Modellorganismen sowie aus *Drosophila*, dass VASA in diesen Organismen, zusätzlich zu seinen Funktionen in der Keimbahn, noch weitere Funktionen außerhalb der Keimbahn übernimmt. Bisher existieren allerdings keine vergleichbaren Daten, die die Keimzellspezifität von VASA in Säugetieren widerlegen, weshalb VASA hier weiterhin als spezifischer Keimzellmarker gilt (Alié et al. 2011). Vorarbeiten von Selma Drallé, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. R. Behr durchgeführt wurden, ergaben jedoch Hinweise auf eine VASA-Expression in somatischen Zellen des Weißbüschelaffen.

In Weiterführung dieser Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit eine systematische Expressionsanalyse von VASA in unterschiedlichen Organen des adulten und neugeborenen Weißbüschelaffen durchgeführt. Die Arbeitshypothese hierbei war, dass VASA im Weißbüschelaffen nicht keimzellspezifisch exprimiert wird. Die Untersuchungen erfolgten mittels immunohistochemischer Färbungen, Western Blotting sowie PCR, wobei aufgrund präliminärer Hinweise jeweils Niere, Magen, Leber, Haut und Pankreas des neugeborenen und des adulten Weißbüschelaffen detailliert auf eine VASA-Expression untersucht wurden. Ovar und Hoden adulter Weißbüschelaffen dienten als Positivkontrollen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten stark auf eine Expression von VASA in der Haut des neugeborenen Weißbüschelaffen hin. Dieser Befund legt nahe, dass VASA im neugeborenen Weißbüschelaffen nicht keimzellspezifisch ist und über seine Funktionen in der Keimbahn hinaus noch weitere extragonadale Funktionen innehaben könnte. In den weiteren untersuchten Organen wurde keine VASA-Expression festgestellt; einzelne Befunde, die auf eine VASA-Expression hinwiesen, erwiesen sich als falsch-positiv.

In dieser Arbeit wurde zudem eine für *C. jacchus* noch nicht in der Literatur beschriebene Splice-Variante von VASA im Ovar und im Hoden vom adulten Weißbüschelaffen gefunden, der das Exon 7 fehlt und die zudem modifizierte N- und/oder C-Termini aufweisen könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass VASA im Weißbüschelaffen auch außerhalb der Keimbahn exprimiert wird und somit in dieser Spezies kein spezifischer Keimzellmarker ist. Um diese Frage jedoch abschließend zu klären, sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, um die in dieser Arbeit gezeigten Befunde zu untermauern.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott DH, Barnett DK, Colman RJ, Yamamoto ME, Schultz-Darken NJ (2003): Aspects of Common Marmoset Basic Biology and Life History Important for Biomedical Research. *Comparative Medicine* 53, 339–350
- Aeckerle N, Eildermann K, Drummer C, Ehmcke J, Schweyer S, Lerchl A, Bergmann M, Kliesch S, Gromoll J, Schlatt S, Behr R (2012): The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod* 18, 477–488
- Agata K, Nakajima E, Funayama N, Shibata N, Saito Y, Umesono Y (2006): Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. *Semin Cell Dev Biol* 17, 503–509
- Alié A, Leclère L, Jager M, Dayraud C, Chang P, Le Guyader H, Quéinnec E, Manuel M (2011): Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore: ancient association of „germline genes“ with stemness. *Dev Biol* 350, 183–197
- Bamberger AM, Ivell R, Balvers M, Kelp B, Bamberger CM, Riethdorf L, Löning T (1999): Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for Leydig cells in the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 18, 163–168
- Bosch TCG (2009): Hydra and the evolution of stem cells. *Bioessays* 31, 478–486
- Bosch TCG, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Khalturin K (2010): The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Dev Growth Differ* 52, 15–25
- Bruning O, Rodenburg W, Radonic T, Zwinderman AH, de Vries A, Breit TM, de Jong M (2011): RNA isolation for transcriptomics of human and mouse small skin biopsies. *BMC Res Notes* 4, 438
- Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP (2000): The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9585–9590
- Clemmensen A, Thomassen M, Clemmensen O, Tan Q, Kruse TA, Petersen TK, Andersen F, Andersen KE (2009): Extraction of high-quality epidermal RNA after ammonium thiocyanate-induced dermo-epidermal separation of 4 mm human skin biopsies. *Exp Dermatol* 18, 979–984
- Drallé, Selma Irina (2009): Analyse der Expression des Keimzellmarkers VASA in verschiedenen Organen des neugeborenen und adulten Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*). Unveröffentlichte Diplomarbeit
- Eildermann K, Gromoll J, Behr R (2012): Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. *Hum Reprod* 27, 1754–1767
- Eslamboli A (2005): Marmoset monkey models of Parkinson's disease: which model, when and why? *Brain Res Bull* 68, 140–149

- Fereydouni B, Drummer C, Aeckerle N, Schlatt S, Behr R (2014): The neonatal marmoset monkey ovary is very primitive exhibiting many oogonia. *Reproduction*
- Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M, Noce T (1994): Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12258–12262
- Ge S, Crooks GM, McNamara G, Wang X (2006): Fluorescent Immunohistochemistry and In Situ Hybridization Analysis of Mouse Pancreas Using Low-Power Antigen-Retrieval Technique. *J Histochem Cytochem* 54, 843–847
- Goland R, Freeby M, Parsey R, Saisho Y, Kumar D, Simpson N, Hirsch J, Prince M, Maffei A, Mann JJ, et al. (2009): ¹¹C-dihydrotetrabenazine PET of the pancreas in subjects with long-standing type 1 diabetes and in healthy controls. *J Nucl Med* 50, 382–389
- Gustafson EA, Wessel GM (2010a): Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays* 32, 626–637
- Gustafson EA, Wessel GM (2010b): Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays* 32, 626–637
- Hay B, Jan LY, Jan YN (1988): A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55, 577–587
- Hickford DE, Frankenberg S, Pask AJ, Shaw G, Renfree MB (2011): DDX4 (VASA) is conserved in germ cell development in marsupials and monotremes. *Biol Reprod* 85, 733–743
- Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, Schulze W (1997): Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod* 3, 459–466
- Janic A, Mendizabal L, Llamazares S, Rossell D, Gonzalez C (2010): Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in *Drosophila*. *Science* 330, 1824–1827
- Johnstone O, Lasko P (2004): Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development* 131, 4167–4178
- Kendall AL, David F, Rayment G, Torres EM, Annett LE, Dunnett SB (2000): The influence of excitotoxic basal ganglia lesions on motor performance in the common marmoset. *Brain* 123 (Pt 7), 1442–1458
- Kukucka MA, Misra HP (1994): Isolation and culture of highly enriched populations of Leydig cells from guinea-pig (*Cavia porcellus*) testes. *Andrologia* 26, 217–224
- Lasko PF, Ashburner M (1988): The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335, 611–617
- Linder P (2006): Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* 34, 4168–4180

- Mansfield KG, Tardif SD, Eichler, E.E. (2004): White Paper for Complete Sequencing of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) genome.
- Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T (2001): Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in Hydra. *Dev Genes Evol* 211, 299–308
- Niedziela M, Lerchl A (1999): Isolation method of Leydig cells from mature male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) and their steroidogenic activity in vitro. *Andrologia* 31, 157–161
- Okano H, Hikishima K, Iriki A, Sasaki E (2012): The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *Semin Fetal Neonatal Med* 17, 336–340
- Orsi A, Rees D, Andreini I, Venturella S, Cinelli S, Oberto G (2011): Overview of the marmoset as a model in nonclinical development of pharmaceutical products. *Regul Toxicol Pharmacol* 59, 19–27
- Pek JW, Kai T (2011): A role for vasa in regulating mitotic chromosome condensation in *Drosophila*. *Curr Biol* 21, 39–44
- Pfister D, De Mulder K, Hartenstein V, Kualess G, Borgonie G, Marx F, Morris J, Ladurner P (2008): Flatworm stem cells and the germ line: Developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano*. *Developmental Biology* 319, 146–159
- Raz E (2000): The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol* 1, REVIEWS1017
- Rebscher N, Volk C, Teo R, Plickert G (2008): The germ plasm component Vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian *Hydractinia echinata*. *Dev Dyn* 237, 1736–1745
- Ross CN, French JA, Ortí G (2007): Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6278–6282
- Salinovich O, Montelaro RC (1986): Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156, 341–347
- Saotome K, Hayashi K, Adachi N, Nakamura Y, Nakamura M (2010): Isolation and characterization of Vasa in the frog *Rana rugosa*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313, 452–459
- SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risk) (2009): The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices.
http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_110.pdf. Zugriff am 24.08.2014

- Scholz B, Sköld K, Kultima K, Fernandez C, Waldemarson S, Savitski MM, Söderquist M, Borén M, Stella R, Andrén P, et al. (2011): Impact of Temperature Dependent Sampling Procedures in Proteomics and Peptidomics – A Characterization of the Liver and Pancreas Post Mortem Degradome. *Mol Cell Proteomics* 10, <http://www.mcponline.org/content/10/3/M900229-MCP200> [14.04.2012]
- Sun X-Z, Deng C-H, Guo H-B, Liu J-Z (2005): [Culture and identification of human adult Leydig cells]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 11, 356–358
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T (2000): The Mouse Homolog of Drosophila Vasa Is Required for the Development of Male Germ Cells. *Genes Dev* 14, 841–853
- Trost A, Bauer JW, Lanschützer C, Laimer M, Emberger M, Hintner H, Onder K (2007): Rapid, high-quality and epidermal-specific isolation of RNA from human skin. *Exp Dermatol* 16, 185–190
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T (2000): Isolation of Chicken Vasa Homolog Gene and Tracing the Origin of Primordial Germ Cells. *Development* 127, 2741–2750
- White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL (2012): Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 18, 413–421
- Yajima M, Wessel GM (2011a): The DEAD-box RNA helicase Vasa functions in embryonic mitotic progression in the sea urchin. *Development* 138, 2217–2222
- Yajima M, Wessel GM (2011b): The multiple hats of Vasa: its functions in the germline and in cell cycle progression. *Mol Reprod Dev* 78, 861–867
- Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, Xiang J, Shi L, Yu Q, Zhang Y, et al. (2009): Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 11, 631–636

Anhang

Immunhistochemische Färbungen

IHC-Färbung im Colon des Weißbüschelaffen

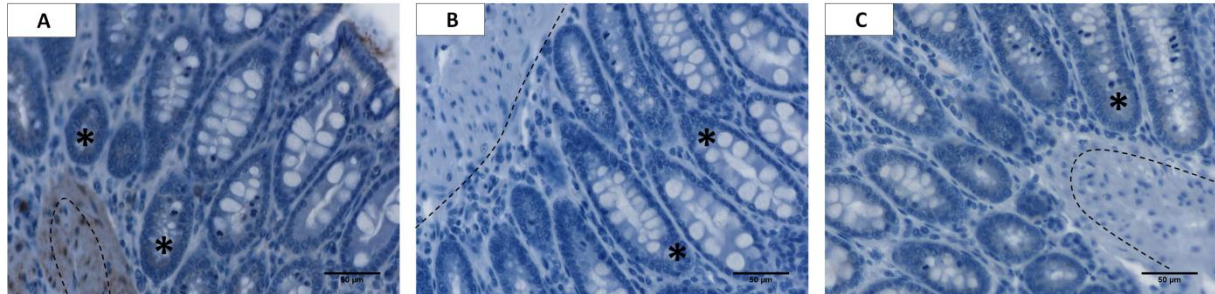


Abb. 4-1 Immunhistochemische Detektion von VASA im Colon des adulten Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit dem Vasa-Antikörper als Primärantikörper (A) zeigte ein positives Signal in der Muskularis mucosae (+), in der Muscularis propria sowie ein schwaches positives Signal in den Enterozyten der Darmschleimhaut (*). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrollfärbung mit Anti-Goat IgG (C) zeigte ein schwaches Signal in den Enterozyten.

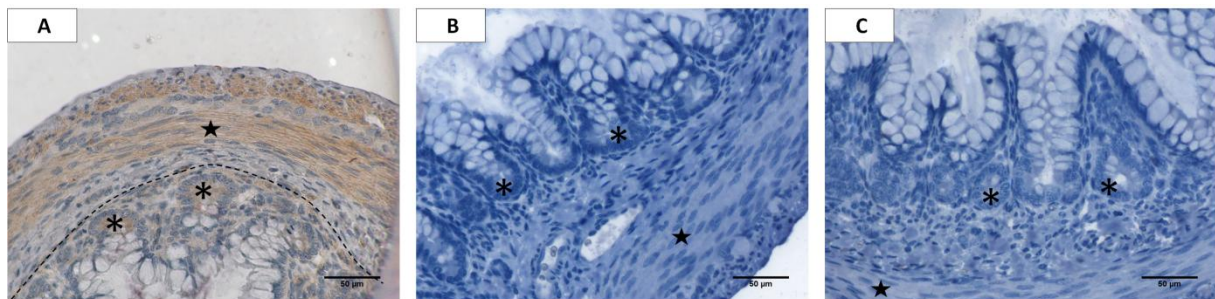


Abb. 4-2 Immunhistochemische Detektion von VASA im Colon des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit dem Vasa-Antikörper als Primärantikörper (A) zeigte ein positives Signal in der Tunica muscularis (★), in der Muskularis mucosae (+) sowie ein schwaches positives Signal in den Enterozyten der Darmschleimhaut (*). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers (B) und die Kontrollfärbung mit Anti-Goat IgG (C) waren signalfrei.

IHC-Färbungen auf VASA im Dünndarm des Weißbüschelaffen

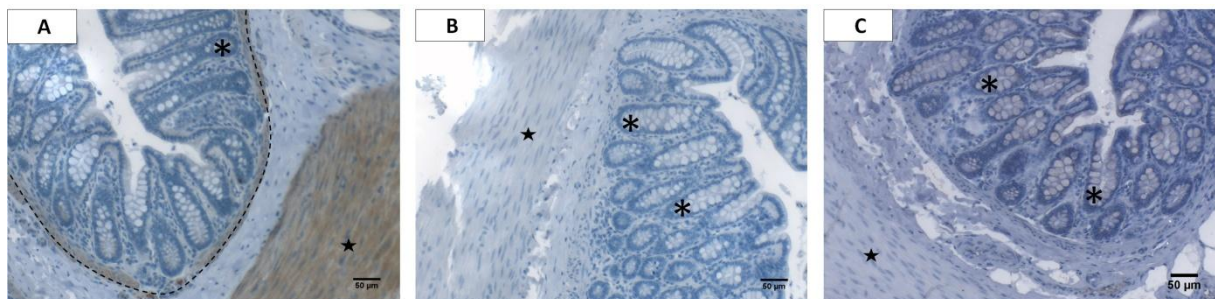


Abb. 4-3 Immunhistochemische Detektion von VASA im Dünndarm vom adulten *C. jacchus*

Die Inkubation mit dem Vasa-Antikörper als Primärantikörper (A) zeigte ein positives Signal in der Tunica muscularis (★), in der Muskularis mucosae (+) und ein sehr schwaches positives Signal in kyrptal gelegenen Enterozyten (*). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrollfärbung mit IgG Ziege (C) zeigte ein schwaches Signal in den Enterozyten

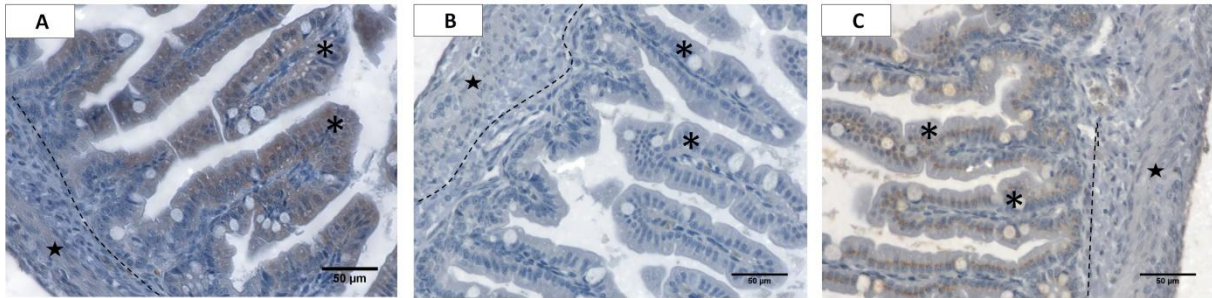


Abb. 4-4 Immunhistochemische Detektion von VASA im Dünndarm des neugeborenen Weißbüschelaffen
Die Inkubation mit dem Vasa-Antikörper als Primärintikörper (A) zeigte ein positives Signal in der Tunica muscularis (★), in der Muskularis mucosae (+) sowie ein positives Signal in den Enterozyten (*). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärintikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrollfärbung mit IgG Ziege (C) zeigte eine Färbung in den Enterozyten, die jedoch schwächer war, als in der Positivfärbung.

Immunhistochemische Detektion von VASA in der Milz

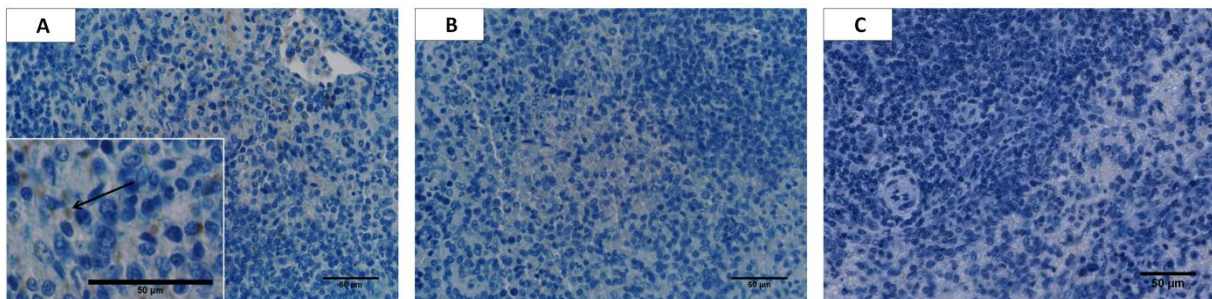


Abb. 4-5 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Milz des adulten Weißbüschelaffen
Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) ergab ein Signal in den Erythrozyten (→). Die organeigenen Strukturen der Milz waren signalfrei. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärintikörpers (B) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) waren signalfrei.

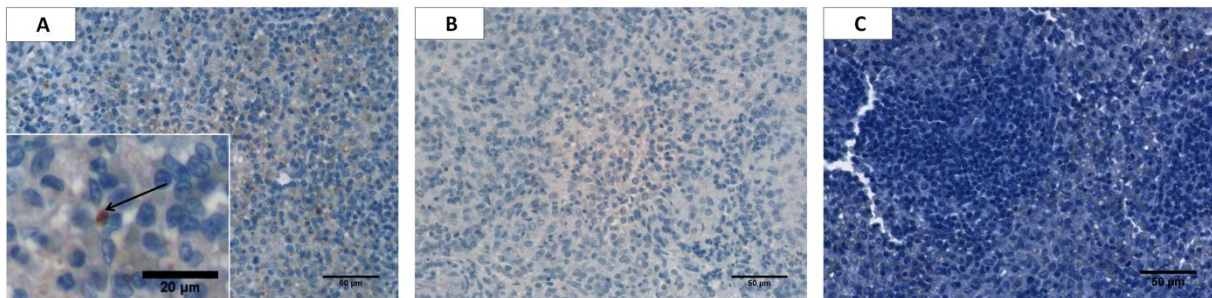


Abb. 4-6 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Milz des neugeborenen Weißbüschelaffen
Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärintikörper (A) ergab ein Signal in den Erythrozyten (→) sowie eine schwach bräunliche Hintergrundfärbung des retikulären Bindegewebes. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärintikörpers (B) war signalfrei. Die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärintikörpers (C) ergab eine schwach bräunliche Hintergrundfärbung des retikulären Bindegewebes.

4.1.10 IHC-Färbungen auf VASA in der Lunge des Weißbüschelaffen

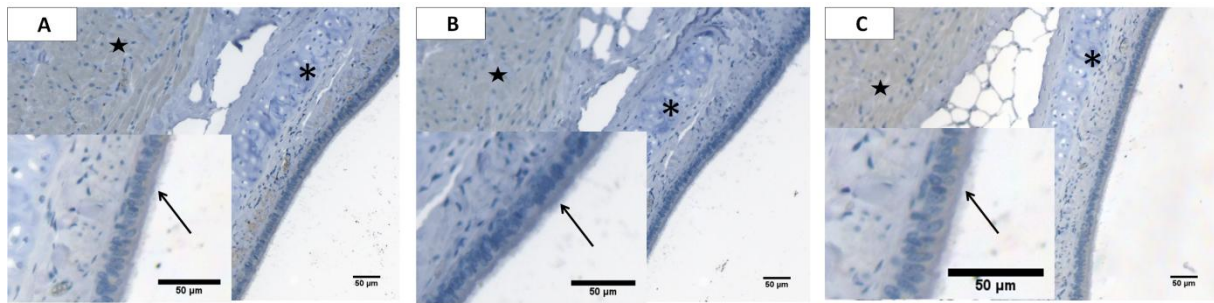


Abb. 4-7 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Lunge des adulten Weißbüschelaffen, Anschnitt eines Bronchus

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A,B) zeigte ein schwaches positives Signal in den Zellen des respiratorisches Flimmerepithels (→) sowie in der glatten Muskulatur (★). Die Negativkontrolle unter Weglassung des Primärantikörpers (C,D) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (E,F) zeigten ebenfalls ein Signal im Flimmerepithel sowie eine Färbung in der glatten Muskulatur, die allerdings im Vergleich zur Positivfärbung etwas schwächer war.

Die Alveolen (nicht gezeigt) waren in allen Schnitten signalfrei.

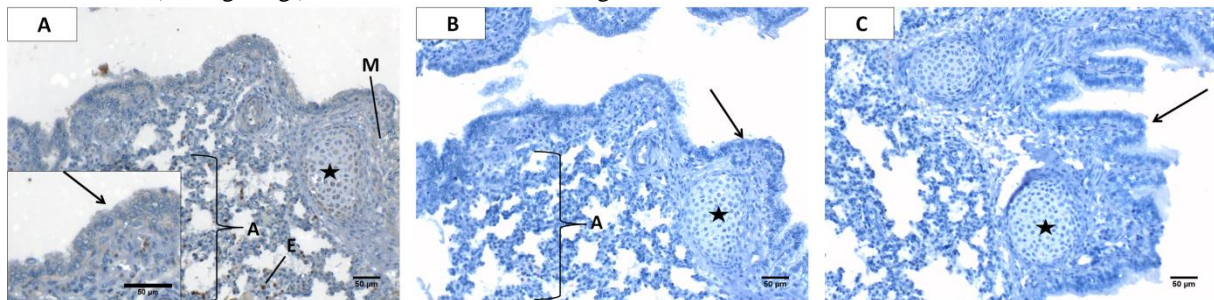


Abb. 4-8 Immunhistochemische Detektion von VASA in der Lunge des neugeborenen Weißbüschelaffen

Die Inkubation mit VASA-Antikörper als Primärantikörper (A,B) zeigte ein schwaches positives Signal in den Zellen des respiratorisches Flimmerepithels (→) und schwache Signale in der glatten, die Bronchien umgebende Muskulatur (M). In den Alveolen (A) waren Erythrozyten (E) angefärbt. Im hyalinen Knorpel (★) waren die Chondrozyten teilweise angefärbt. Die Negativkontrolle unter Weglassung des Antikörpers (C) sowie die Kontrolle mit IgG Ziege anstelle des Primärantikörpers (D) waren signalfrei.

Tabelle 3: Daten zu den Proben, die für die PCR verwendet wurden

Die Tabelle zeigt die Daten zu den für die PCR verwendeten Organen aus neugeborenen und adulten Tieren. Es sind jeweils die entsprechenden Tierdaten, die Konzentration der isolierten RNA sowie die Menge an cDNA, die für die PCRs eingesetzt wurde, eingetragen. Bei einigen Proben handelte es sich um Archivmaterial, bei denen das Geschlecht und das genaue Alter der jeweiligen Tiere unbekannt war.

Organ	Tier	Konzentration der RNA	Menge an eingesetzter cDNA
Niere	NB, ♂, *27.08.2011, †28.08.2011	1,520 µg/µl	0,5 µl
Niere	NB, ♂, *06.09.2011, †07.09.2011	0,318 µg/µl	0,5 µl
Niere	Adult, Archivmaterial	0,394 µg/µl	1 µl
Niere	Adult, ♀, *02.04.2004, †26.09.2011	0,236 µg/µl	1 µl
Leber	NB, ♂, *27.08.2011, †28.08.2011	1,492 µg/µl	0,5 µl
Leber	NB, ♂, *06.09.2011, †07.09.2011	0,416 µg/µl	0,5 µl
Leber	Adult, Archivmaterial	0,262 µg/µl	1 µl
Leber	Adult, Archivmaterial	0,444 µg/µl	2 µl
Magen	NB, ♂, *27.08.2011, †28.08.2011	1,214 µg/µl	0,5 µl
Magen	NB, ♂, *06.09.2011, †07.09.2011	0,231 µg/µl	0,5 µl
Magen	Adult, Archivmaterial	0,398 µg/µl	1 µl
Magen	Adult, Archivmaterial	0,161 µg/µl	1 µl
Pankreas	NB, Archivmaterial	0,256 µg/µl	1 µl
Pankreas	NB, ♂, *06.09.2011, †07.09.2011	0,968 µg/µl	1 µl
Pankreas	Adult, ♀, *02.04.2004, †26.09.2011	0,652 µg/µl	1 µl
Pankreas	Adult, ♀, *06.04.2007, †26.09.2011	0,124 µg/µl	1 µl
Haut	NB, ♂, *27.08.2011, †28.08.2011	0,220 µg/µl	2 µl
Haut	NB, ♂, *06.09.2011, †07.09.2011	0,233 µg/µl	2 µl
Hoden	Adult, Lex, *30.05.2007, †06.03.2007	0,754 µg/µl	0,5 µl
Ovar	Adult, Archivmaterial	0,232 µg/µl	1 µl

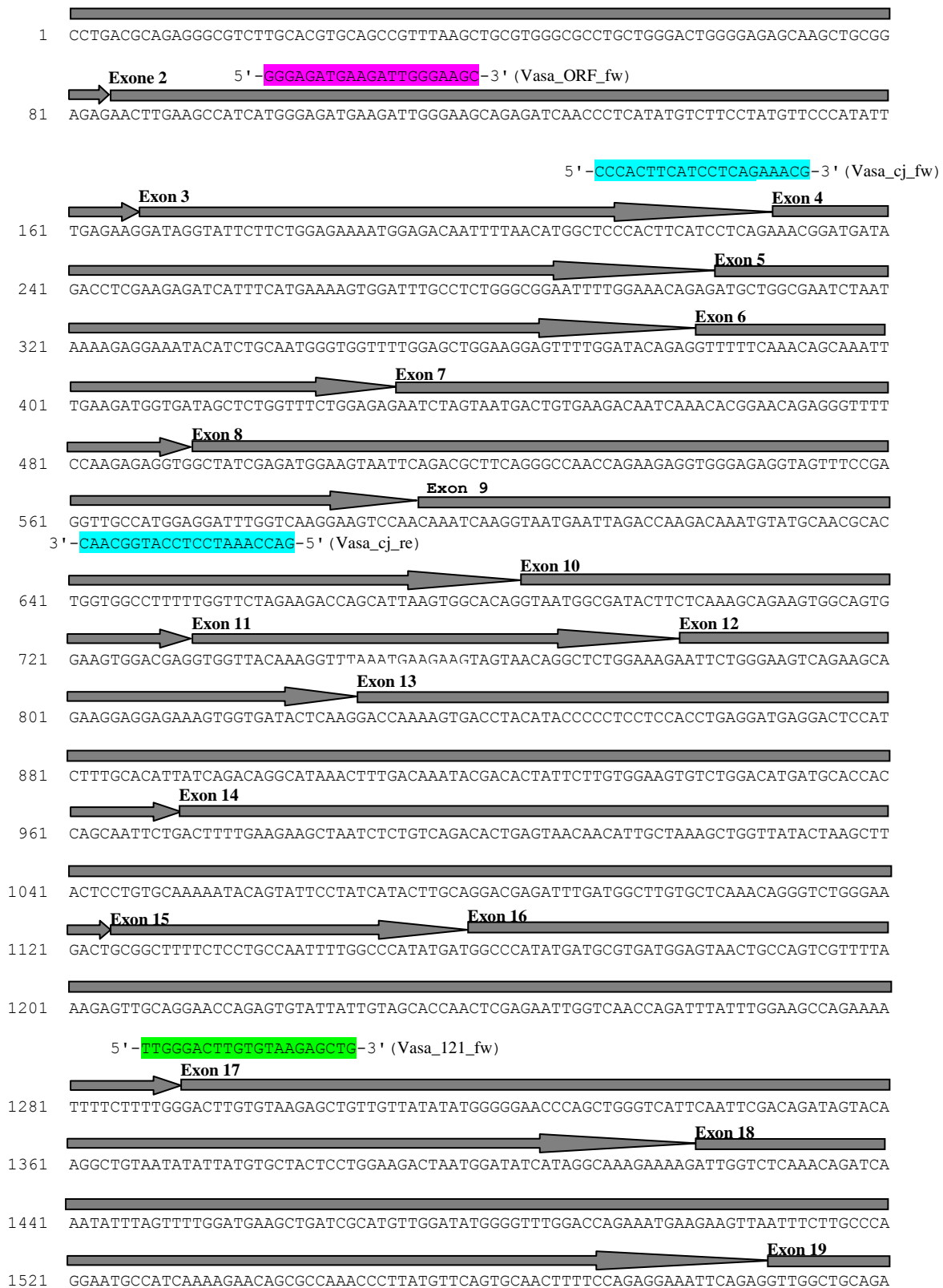
Tabelle 4: Daten zu den Proben, die für die Western Blots verwendet wurden

Die Tabelle zeigt die Daten zu den für die Western Blots verwendeten Organen aus neugeborenen und adulten Tieren. Es sind jeweils die entsprechenden Tierdaten sowie die Menge an eingesetztem Probenmaterial eingetragen. Bei einigen Proben handelte es sich um Archivmaterial, bei denen das Geschlecht und das genaue Alter der jeweiligen Tiere unbekannt war.

Organ	Tier	Menge an eingesetztem Probenmaterial
Niere	NB, ♂, *19.04.2011, † 20.04.2011	20 µl
Niere	NB, ♂, *06.09.2011, † 07.09.2011	25 µl
Niere	Adult, ♀, *06.04.2007, †26.09.2011	20 µl
Niere	Adult, ♀, *11.11.2003, †15.09.2011	20 µl
Leber	NB, ♂, *19.04.2011, † 20.04.2011	25 µl
Leber	NB, ♂, *06.09.2011, † 07.09.2011	25 µl
Leber	Adult, ♀, *06.04.2007, †26.09.2011	20 µl
Leber	Adult, ♀, *11.11.2003, †15.09.2011	20 µl
Magen	NB, ♂, *19.04.2011, † 20.04.2011	25 µl
Magen	NB, ♂, *06.09.2011, † 07.09.2011	25 µl
Magen	Adult, ♀, *06.04.2007, †26.09.2011	15 µl
Magen	Adult, ♀, *11.11.2003, †15.09.2011	20 µl
Pankreas	NB, ♂, *19.04.2011, † 20.04.2011	20 µl
Pankreas	NB, ♂, *06.09.2011, † 07.09.2011	30 µl
Pankreas	Adult, ♀, *06.04.2007, †26.09.2011	20 µl
Pankreas	Adult, ♀, *11.11.2003, †15.09.2011	20 µl
Haut	NB, ♂, *19.04.2011, † 20.04.2011	25 µl
Haut	NB, ♂, *06.09.2011, † 07.09.2011	30 µl
Haut	Adult, ♀, *06.04.2007, †26.09.2011	30 µl
Haut	Adult, ♀, *11.11.2003, †15.09.2011	30 µl
Hoden	Adult, Archivmaterial	20 µl
Ovar	Adult, Archivmaterial	25 µl

Vasa-Sequenz sowie Sequenzen und Lage der verwendeten Primer

Die Abbildung zeigt die aus *ensembl* entnommene Vasa-Sequenz, die in dieser Arbeit verwendet wurde, sowie die Lage der Exone und die Lage und Sequenzen der verwendeten Primer. Die Verläufe der Exone sind durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet, die Sequenzen der Primerpaare sind farbig unterlegt und gemäß ihrer Position eingezeichnet. Die Bezeichnungen der Primer entsprechen den Bezeichnungen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.



1601 GTTTTTAAAGTCGAATTATTTGTTTGTGCTGTTGGACAAGTGGGTGGAGCATGTAGAGATGTGCAGCAGACTGTTCTCC

1681 AAGTTGGCCAGTTCTCAAAAAGAGAAAAAATTGTTGAAATTCACGAAATATAGGTGATGAAAGAACTATGGTATTTGTT

1761 GAAACTAAGAAGAAAGCAGATTTTATTGCAACTTTTCTTTGTCAAGAAAAAATATCAACTACAAGTATTCATGGTGATCG
3' - **GTTTCATAAGTACCCTAGC**

1841 GGAACAGAGAGAGCGGGAGCAAGCTCTTGAGATTTTCGAGTGGAAAGTGCCAGTTCCTGTTGCTACTTCAGTAGCTG
CC-5' (Vasa_122_re)

1921 CCAGAGGGCTAGATATTGAAAATGTACAGCATGTTATCAATTTTGATCTTCCTTCTACCATTGATGAATATGTTTCATCGA

2001 ATTGGGCGTACTGGTCGTTGTGGGAATACTGGCAGAGCAATTTCTTTTTTGATCCTGAATCGGATAACCATTTAGCACAA

5' - **AAGTATTAACAGATGCTCAACAGGATG** - 3' (Vasa_ms_fw)

2081 GCCTCTAATAAAAAGTATTAACAGATGCTCAACAGGATGTTCTCGCATGGCTGGAAGAAATGCCTTTAGTGCATACATTC
3' - **ATCACGTATGTAAG**

2161 CTGGCTTCAGTGGTAGTACAAGAGGAAGTGTATTTGCATCAGTTGATACTAGAAAGGGCAAGAGCACTTTGAACACAGCA
GACCGAAGT-5' (Vasa_ms_re)

2241 GGATTTTCTTCTTCAAAAATGTCCAATCCAGTAGATGATGAGTCATGGGATTA AAACTGAAACATCCTTCAAGTCTGTAG

2321 TTTTGCTGCAGAGAAGAAAATAGTTTTTCATTTTTGAGTTTTTAACAGAAGTATAAAACCTGACATGTGCATAGCTCCTGT
3' - **GAGGACA**

2401 CCTTGTGTTCTCTCTCCTACACTTAAAAAGAAATACATACTGACTAGTTATGTGAGATGTAAAAGTTACAACATTGCAG
GGAACACAAGAGAG-5' (Vasa_ORF_re)

2481 TTACTGATACAAAATGGTGTAACTAGAAATATTAAGCATCTAAAGTCTTCTTATTTCTCATATATCTTCAGGGGGT

2561 TTAGATATGTTTAAATGTTTAAATGCCAAGCTTACTATAGTGTATTATTGATCTTATAAAAACAAGTATCTAGGATATGATA

2641 CACTTTTGGTCAAAAATTACTGGGTCTCATTTTTACTTGAGCCTTTAAGACAGTAGTGTGCTACTATAATGTGATAGCAT

2721 GATCTTTAAGAAACAGTAGAAGACTTAAGCCTTTCAAAGTGATTTTGATTTTATAGATCATCAGATGTATGATGAAAATGG

2801 TTAAATGTTTGTGACATGAGCGTTGTACTCAATGGCATAACAATGTTTGTTTTTATAATATACACTCTTTCCTTGAATA

2881 AAGGAAGAAACACTTTTCCTTA

Lebenslauf

Mein Name ist Lucia Dorothee Lewerich und ich wurde am 26.10.1988 in Heidelberg geboren.

Meine Schulausbildung habe ich am 11.09.1995 an der Grundschule Schlierbach in Heidelberg begonnen. Von 1999 bis 2002 besuchte ich das Kurfürst-Friedrich-Gymnasium in Heidelberg, von wo aus ich 2002 an das St. Raphael-Gymnasium Heidelberg wechselte. Im Jahre 2006 wechselte ich erneut die Schule und besuchte von 2006 bis 2007 das Canisius-Kolleg in Berlin, welches ich mit Erreichen der allgemeinen Hochschulreife am 23. Juni 2007 verließ.

Von August 2007 bis Juli 2008 absolvierte ich einen Freiwilligendienst in Dar es Salaam, Tansania, zunächst in einer Grundschule, ab Januar 2008 auf der Pädiatrie des Ocean Road Cancer Institut.

Von Oktober 2008 bis November 2014 war ich Studentin der Humanmedizin an der Universität Göttingen. Am 19. November 2014 beendete ich mein Medizinstudium erfolgreich mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Im Juni 2011 begann ich meine Dissertation bei Prof. Dr. rer. nat. R. Behr in der Abteilung Stammzellbiologie des Deutschen Primatenzentrums zum Thema „Ist DEAD box-protein 4 (DDX4) ein spezifischer Keimzellmarker? Expressionsanalyse im Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*).“