

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilian-Universität-München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

## **Follikulogenese und Intermediärfilamente**

# **Eine immunhistochemische Studie am Ovar des Rindes mit Verweisen auf Laser-Mikrodissektion und anschließender quantitativer Reverse-Transkriptase PCR**

Inaugural -Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität  
München

von

Josef Reinhard Werner Erik Wendl

aus München

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Meinen Eltern und Reinhard Soltau

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Das Ovar des Rindes .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Follikulogenese .....</b>	<b>4</b>
2.1.	Primordialfollikel .....	4
2.2.	Verlauf der Follikelentwicklung .....	4
2.3.	Aktivierung der Primordialfollikel – Initiale Rekrutierung .....	5
2.4.	Präantrale Follikel .....	6
2.5.	Antrale Follikel - Rekrutierung - Selektion.....	6
<b>3.</b>	<b>Intermediärfilamente .....</b>	<b>12</b>
3.1.	Intermediärfilamentklassen .....	13
3.2.	Struktur von Intermediärfilament-Proteinen und Aufbau von Intermediärfilamenten .....	14
3.3.	Keratine .....	14
3.4.	Vimentin und Desmin .....	15
3.5.	Lamine.....	17
3.6.	Wirkungsweisen von Intermediärfilamenten bzw. Intermediärfilament - Proteinen.....	18
<b>4.</b>	<b>Laser-Mikrodissektion und quantitative Reverse-Transkriptase-PCR.. .....</b>	<b>19</b>
4.1.	Mengen- und Qualitätsbestimmung bei geringen RNA Mengen.....	19
4.2.	FFPE Material und Laser-Mikrodissektion.....	20
4.3.	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR .....	21
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
<b>V.</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>26</b>
<b>1.</b>	<b>Immunocytochemical Localization of Cytoplasmic and Nuclear Intermediate Filaments in the Bovine Ovary during Folliculogenesis</b>	<b>26</b>
<b>2.</b>	<b>Application of Laser-Assisted Microdissection for Gene Expression</b>	

---

	<b>Analysis of Mammalian Germ Cells.....</b>	<b>53</b>
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>68</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
	<b>GEBRAUCHSLÖSUNGEN .....</b>	<b>71</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>99</b>

## I. EINLEITUNG

Im Jahr 1827 wurde von Carl Ernst von Baer erstmals die Eizelle eines Säugetiers sicher identifiziert, nachdem ungefähr zwei Jahrhunderte früher, die viel größeren, sprungreifen Follikel im Ovar irrtümlicherweise für die Eizellen von Säugetieren gehalten wurden (NOWACKI, 1977). Seither hat man mit vielfältigen morphologischen Techniken die Struktur der Eizelle bei vielen Säugetierspezies untersucht, wobei aber nach wie vor noch viele Fragen über diese Zelle, die am Anfang der Entwicklung jedes Säugetiers steht, offen sind (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; AERTS & BOLS, 2010a, 2010b; BINELLI & MURPHY, 2010).

Während der Embryonalentwicklung wandern die Vorläufer der Geschlechtszellen, die Primordialkeimzellen, von der Dottersackwand über den Dottersackstiel, den primitiven Darm und das dorsale Mesenterium in die Keimleiste ein. Die männlichen (XY) und weiblichen (XX) Primordialkeimzellen wirken dort als Induktor für die Differenzierung der Gonadenanlagen. Hier entwickeln sich bei den weiblichen Tieren aus den Primordialkeimzellen über das Stadium der Oogonien die primären Oozyten, die zusammen mit den sie umgebenden Begleitzellen die Primordialfollikel bilden und während der weiteren pränatalen Entwicklung im Dictyotänstadium der Meiose 1 arretiert werden. In diesen Primordialfollikeln werden die Eizellen über die gesamte fertile Lebenszeit gespeichert und können in diesem Ruhestadium über einen jahrzehntelangen Zeitraum aktivierungsfähig bleiben (RÜSSE, 1998).

Beim Rind werden nach der Pubertät in jedem Zyklus immer mehrere dieser Primordialfollikel aktiviert und durchlaufen die Entwicklung über Primärfollikel und Sekundärfollikel zum Tertiärfollikel (BINELLI & MURPHY, 2010). Vor der Ovulation kommt es im sprungreifen Tertiärfollikel zur Wiederaufnahme der Meiose, die bis zur Metaphase der Meiose 2 fortgesetzt wird. Man spricht jetzt von einer sekundären Oozyte. Erst nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle wird die Meiose 2 zu Ende geführt wobei eine befruchtete Eizelle, die Zygote entsteht (RÜSSE, 1998).

Ein wichtiger und bisher noch relativ wenig verstandener Aspekt der aufgezeigten Eizellentwicklung liegt in der Aktivierung jeweils einiger weniger ruhender Primordialfollikel und das Heranwachsen zu präantralen bzw. frühen antralen Follikeln. Über die weitere Follikelentwicklung bis hin zur Ovulation weiß man besser Bescheid. Hier spielen vor allem die Gonadotropine Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) eine wichtige Rolle (BINELLI & MURPHY, 2010).

Die Aktivierung der Primordialfollikel und die Entwicklung bis zum frühen antralen Follikel sind Gonadotropin-unabhängig bzw. nur Gonadotropin-responsiv, das heißt nicht unbedingt von diesen Hormonen abhängig. Aus Untersuchungen an verschiedenen Spezies weiß man, dass in der frühen Follikelentwicklung vor allem lokale, von der Eizelle, den Granulosa-, Theca- und Stromazellen exprimierte Faktoren eine Rolle spielen (AERTS & BOLS, 2010a).

An der Regulierung der Follikulogenese sind eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren beteiligt (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; AERTS & BOLS, 2010a, 2010b; BINELLI & MURPHY, 2010). Untersuchungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass Intermediärfilament-Proteine bzw. Intermediärfilamente (IFs) neben ihrer strukturellen Bedeutung auch eine Rolle in der Signaltransduktion, Genregulation und der Apoptose spielen (PROKOCIMER et al., 2009; IWATSUKI & SUDA, 2010). Daher ist zu vermuten, dass Intermediärfilamente auch in der Regulation der Follikulogenese von Bedeutung sein könnten.

Intermediärfilamente sind neben Mikrofilamenten und Mikrotubuli ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts (IWATSUKI & SUDA, 2010). Über die Expression von Intermediärfilament-Proteinen beim Rind liegen lückenhafte Befunde oder widersprüchliche Ergebnisse vor (VAN DEN HURK et al., 1995; VAN WEZEL et al., 1999; ORTEGA et al., 2007; TOWNSON et al., 2010). Daher war das Ziel dieser Arbeit im Ovar vom Rind die Expression der wichtigsten Klassen von Intermediärfilament-Proteinen (Cytokeratine (CKs), Vimentin, Desmin, Lamin A und Lamin B1) mit immunhistochemischen Methoden genau zu erfassen.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Das Ovar des Rindes

Das Ovar des Rindes ist oval, seitlich abgeplattet und im Mittel etwa 40 mm lang, 20 mm hoch und 10-20 mm dick. Diese Maße können jedoch auch stark variieren (NICKEL, 2004). Im Ovar liegt im Inneren die lockere, gefäßreiche *Zona vasculosa* (*Medulla ovarii*, Mark). Nach außen schließt sich die dichter gefügte *Zona parenchymatosa* (*Cortex ovarii*, Rinde) an (NICKEL, 2004; KÖNIG, 2008). Das Ovar enthält als Grundgerüst ein Netzwerk aus lockerem Bindegewebe mit vielen elastischen Fasern (spinozelluläres Bindegewebe) (LIEBICH, 2009). Besonders bei Wiederkäuern fällt im Mark das *Rete ovarii* auf, ein labyrinthartiges Hohlraumsystem mit einschichtig hochprismatischer oder kubischer Epithelauskleidung (MOSIMANN, 1999). Auf die Rinde folgt eine derbe Bindegewebslage, die *Tunica albuginea*. Die äußere Hülle des Ovars bildet ein einschichtiges Epithel, das Keimdrüsenepithel (*Epithelium superficiale*) (NICKEL, 2004; KÖNIG, 2008). Die frühen Follikel liegen im peripheren Rindenbereich. Während der Antrumbildung verlagert sich der Tertiärfollikel in einen mehr markwärts gelegenen, besser durchbluteten Ovarbereich (HEES, 2000).

Bei der Follikelentwicklung im Ovar unterscheidet man (RÜSSE, 1998):

- Primordialfollikel: Dieser besteht aus der im Dictyotän der Meiose 1 arretierten Eizelle (primäre Oozyte) und einer sie umgebenden Schicht flacher Zellen, den Granulosazellen, die zum Teil auch als Prägranulosazellen bezeichnet werden (FORTUNE, 2003). Er wird gegen das ovarielle Stroma durch eine Basalmembran abgegrenzt.
- Primärfollikel: Die Granulosazellen werden isoprismatisch.
- Sekundärfollikel (präantraler Follikel): Die Granulosazellen vermehren sich und umgeben die Eizelle in mehreren Schichten. Die den Follikel umgebenden mesenchymalen Zellen ordnen sich parallel zur Follikeloberfläche an und bilden die Thecazellen.
- Tertiärfollikel (antraler Follikel): Durch Ausscheidung von Flüssigkeit in den Raum zwischen den Granulosazellen entsteht ein Lumen



(Antrum folliculi). Dabei wird die Eizelle an den Rand des Follikels verlagert.

## **2. Follikulogenese**

Im Folgendem wird auf die Abläufe bei und die Regulierung der Follikelentwicklung eingegangen.

### **2.1. Primordialfollikel**

Die Bildung der Primordialfollikel erfolgt bei Nagetieren erst nach der Geburt (SKINNER, 2005; PEPLING, 2006), bei anderen Säugern wie dem Rind (TANAKA et al., 2001), dem Schaf (MAULEON, 1974; SAWYER et al., 2002) und auch dem Menschen (BAKER, 1963) erfolgt sie bereits während der fetalen Entwicklung.

Die maximale Anzahl an Eizellen wird beim Rind mit ca. 2,7 Millionen schon während der pränatalen Entwicklung erreicht. Bei der Geburt sind davon noch ca. 135 000 erhalten, was einen Verlust von 95% darstellt (ERICKSON, 1966). Neuere Untersuchungen (JOHNSON et al., 2004) geben Hinweise auf eine Keimbahn-Stammzellpopulation. Die meisten neueren Arbeiten gehen allerdings davon aus, dass es postnatal keinen regenerativen Primordialfollikel-Pool gibt (FOXCROFT & HUNTER, 1985; ADASHI, 1994; LASS, 2001; SCHLESSINGER & VAN ZANT, 2001; DURLINGER et al., 2002; FORTUNE, 2003; VAN ZONNEVELD et al., 2003; MAYER et al., 2004; RAJKOVIC et al., 2004).

### **2.2. Verlauf der Follikelentwicklung**

Aus dem Pool der Primordialfollikel werden während jedes Zyklus kontinuierlich mehrere Primordialfollikel aktiviert, die sich zu Primärfollikeln entwickeln. Dieser Vorgang wird auch als initiale Rekrutierung (MCGEE & HSUEH, 2000) bezeichnet. Beim Rind wird zu bestimmten Zeitpunkten während der Lutealphase des Zyklus das schnelle Heranwachsen einer Gruppe (Kohorte) kleiner antraler Follikel (Durchmesser größer als 1 mm) auf eine Größe von 3-5 mm und größer beobachtet. Dieses Phänomen wird als Follikelwelle bezeichnet (ROCHE, 1998; IRELAND et al., 2000).

Während der folgenden ca. 3 Tage wachsen mehrere Follikel auf eine Größe von ca. 6 mm heran. Nur zwei oder drei davon erreichen eine Größe von etwa 7 bis 8 mm. Aus diesen wird einer zum dominanten Follikel, wächst über eine Größe von 8,5 mm hinaus und kann zur Ovulation gelangen (MIHM & EVANS, 2008).

### 2.3. Aktivierung der Primordialfollikel – Initiale Rekrutierung

Voraussetzung für eine Aktivierung der Primordialfollikel ist die Arretierung der Eizelle in der Meiose 1 (YANG & FORTUNE, 2008). Während der initialen Rekrutierung stimulieren intraovarielle und/oder andere Faktoren auf parakrinem Weg das Wachstum einiger Primordialfollikel wohingegen die übrigen Primordialfollikel im Ruhestadium verbleiben (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; AERTS & BOLS, 2010a). Diese Aktivierung ist FSH-unabhängig (MEDURI et al., 2002). Die genaue Regulation dieses Vorgangs ist aber noch unklar. Für eine ganze Reihe von Faktoren wird ein Einfluss auf die Follikelaktivierung angegeben:

GDF9 (Growth Differentiation Factor-9), Aktivin A, KL (Kit-Ligand), LIF (Leukemia Inhibiting Factor), Insulin, FGF2 (Fibroblast Growth Factor-2), NGF (Nerve Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), Wilms tumor protein (Gen: *WT1*), Steroidogenic factor 1 (SF1), Anti-Müllerian Hormone (AMH), PTEN (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase), Hamartin (Gen: *TSC1*), Tuberin (Gen: *TSC2*), mTOR (Serine/threonine-protein kinase mTOR), Foxo3a und Cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> (MCGEE & HSUEH, 2000; FORTUNE, 2003; SKINNER, 2005; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; WEBB et al., 2007; AERTS & BOLS, 2010a; BINELLI & MURPHY, 2010; REDDY et al., 2010).

Nach Braw-Tal (2002) kann die initiale Follikelaktivierung in zwei Phasen eingeteilt werden, die durch deutliche morphologische Veränderungen charakterisiert sind. In der ersten Phase erfolgt die Umwandlung von flachen zu isoprismatischen Follikelzellen, in der zweiten Phase proliferieren die Granulosazellen und die Eizelle gewinnt an Volumen. Nach Picton et al. (1998) und Fortune (2003) wird die erste Phase vor

allem über ein komplexes System von lokal exprimierten stimulierenden und hemmenden Faktoren gesteuert. In der zweiten Phase stellen die einzelnen Follikel ein autonomes System dar, das sich über die von Eizelle und Granulosazellen bereitgestellten Faktoren steuert.

#### **2.4. Präantrale Follikel**

Mit der Aktivierung der Primordialfollikel beginnt die Follikelreifung. Die Granulosazellen proliferieren und umgeben die wachsende Eizelle in mehreren Lagen. Die Bildung von diesen Sekundärfollikeln kann ohne den Einfluss von FSH erfolgen, erfolgt aber unter FSH-Einfluss effektiver. LH scheint in diesem Entwicklungsstadium aber von größerer Bedeutung zu sein, da es in den Thecazelle die Synthese von Androgenen stimuliert, welche wiederum die Bildung von FSH-Rezeptoren in den Granulosazellen fördern und somit möglicherweise die FSH-Effekte verstärken (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Weitere endokrine Faktoren die sich an dieser Stelle direkt oder indirekt positiv auf das Follikelwachstum auswirken sind Wachstumshormon (GH) und Insulin. Wie bereits erwähnt, ist die Entwicklung von Sekundärfollikeln auch ohne FSH Beteiligung möglich und so hat auch hier eine Vielzahl von lokal gebildeten Faktoren eine Rolle:

Nerve growth factors (NGFs), AMH, GDF9, BMP15 (Bone Morphogenetic Protein-15), KL, LIF, EGF, Transforming Growth Factors (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ ), CTGF (Connective Tissue Growth Factor), IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1), FGF2, FGF7 und Aktivin (MCGEE & HSUEH, 2000; KNIGHT & GLISTER, 2001; FORTUNE, 2003; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; WEBB et al., 2007; AERTS & BOLS, 2010a; BINELLI & MURPHY, 2010). Sicherlich sind noch nicht alle Faktoren bekannt, die an der Entwicklung von Sekundärfollikeln beteiligt sind.

#### **2.5. Antrale Follikel - Rekrutierung - Selektion**

Mit der Ausbildung der Follikelhöhle (Antrum folliculi) entsteht der Tertiärfollikel oder antrale Follikel. Die Mechanismen die zur Antrum-Bildung führen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise sind dabei FSH, LH, Aktivin, EGF, IGF1, IGF2 und KL von Bedeutung (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; BINELLI & MURPHY, 2010).

Die frühen antralen Follikel sind in der initialen Wachstumsphase gegenüber Gonadotropinen relativ unabhängig. Es ist wahrscheinlich, dass die oben genannten Faktoren, die bei der Entwicklung von Sekundärfollikeln eine Rolle spielen, auch für die initialen Wachstumsphase von antralen Follikeln verantwortlich sind (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; BINELLI & MURPHY, 2010).

Ab einer Größe von 0,2 (Maus), 1 (Schwein), 2 (Schaf, Primat), 4 (Rind) und 10 (Pferd) mm werden die antralen Follikel von Gonadotropinen abhängig und so werden, abhängig von der Spezies, eine unterschiedliche Zahl von Follikeln rekrutiert, die sich weiter entwickeln. Bei Schaf und Rind korreliert die Follikelgröße bei der Rekrutierung der Follikel mit der Expression von P450 Side chain-cleavage enzyme und P450 Aromatase im Ovar. Dadurch kann von den Thecazellen gebildetes Androgen in Östradiol umgewandelt werden, das für das Überleben der Follikel wichtig ist. Die Androgensynthese wird von LH gefördert. Diese kann durch Inhibin aus Granulosazellen verstärkt werden, wohingegen EGF aus Thecazellen und Activin aus Granulosazellen sie abschwächen. Die Östrogenproduktion wird durch FSH stimuliert und lokal durch IGF1, Activin und BMP2, 4 und 7 noch verstärkt; EGF hingegen verringert die Östrogenproduktion. Somit sind mit der Rekrutierung die Follikel von FSH abhängig (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Charakteristisch für das antrale Follikelwachstum beim Rind wie auch bei anderen monoovulatorischen Spezies ist, dass in der Regel nur ein einziger von den rekrutierten Follikeln selektiert wird und die endgültige Entwicklung zum ovulationsfähigen Follikel durchlaufen kann (MIHM & EVANS, 2008).

In verschiedenen in vivo Studien wurde beim Rind der Zeitpunkt der Selektion des dominanten Follikels durch Ultraschalluntersuchungen bestimmt, wobei hier die „Abweichung“ des Follikeldurchmessers des rasch wachsenden dominanten Follikel von dem größten untergeordneten, im Wachstum zurückbleibenden Follikel ermittelt wird. Als Kriterien für eine „Abweichung“ gelten eine Minimalgröße von 8,5 mm Durchmesser und eine minimale Durchmesserdifferenz von 1 mm zum größten untergeordneten Follikel (GINTHER et al., 1997b; MIHM et al., 1997;

MIHM & EVANS, 2008).

Während eines Zyklus treten 2 bis 3 Follikelwellen auf, wobei in jeder ein dominanter Follikel selektiert wird. Nur der dominante Follikel der letzten Wellen kommt zur Ovulation, alle anderen atresieren (SAVIO et al., 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989; DRIANCOURT, 2001; ADAMS et al., 1992)

Das Auftreten von Follikelwellen wird durch einen Anstieg der systemischen FSH-Konzentration bewirkt (AUSTIN et al., 2001). Mit abnehmender FSH-Konzentration nimmt auch die Anzahl der während einer Welle wachsender Follikel ab (ADAMS et al., 1992; SUNDERLAND et al., 1994; GIBBONS et al., 1997; BURNS et al., 2005).

Für die Selektion des dominanten Follikels ist sein Übergang von der FSH- zur LH-Abhängigkeit notwendig. Dies erst sichert das weitere Wachstum des dominanten Follikels (GINTHER et al., 2001).

Die Details der Steuerung dieses Vorgangs sind noch nicht bekannt. Sicher ist, dass dabei der fortschreitende Abfall der systemischen FSH-Konzentration und der Anstieg der LH-Konzentration eine Rolle spielen. Faktoren, die sich in der Follikelflüssigkeit finden und die Ausbildung der Dominanz fördern sind das IGF-System, Steroide, Inhibin A / Aktivin A, Gonadotropin-Rezeptoren sowie Angiogenese-fördernde Faktoren (ARMSTRONG & WEBB, 1997; BERISHA et al., 2004; IRELAND et al., 2004). Die einzigen Faktoren, die bisher zeitlich und funktionell relativ unmittelbar mit der Follikel-Selektion in Verbindung gebracht werden konnten, sind IGF1 und das damit zusammenhängende System, Östrogen und LH-Rezeptoren (BEG & GINTHER, 2006).

Für das der Selektion folgende, rasche Wachstum von einem Follikeldurchmesser von 8 bis 9 mm auf eine Größe von 15 bis 20 mm ist LH erforderlich (GASTAL et al., 1999; WEBB et al., 1999; DUFFY et al., 2000; CROWE et al., 2001; MIHM & BLEACH, 2003). Dies spiegelt sich auch in der entsprechenden Expression von Luteinisierendes Hormon Rezeptor (LHR) mRNA in Follikeln ab einer Größe von 8 mm wieder (IRELAND & ROCHE, 1983; XU et al., 1995; BAO et al., 1997; EVANS & FORTUNE, 1997; EVANS et al., 2004; MIHM et al., 2006). Zur Zeit ist

noch nicht klar, ob die erhöhte LHR Expression im dominanten Follikel Ursache oder Konsequenz des Selektionsprozesses ist (IRELAND & ROCHE, 1983; XU et al., 1995; BAO et al., 1997; EVANS & FORTUNE, 1997; EVANS et al., 2004; MIHM et al., 2006). Beg et al. (2001) konnten einen leichten Anstieg der LHR mRNA Expression in Granulosazellen des größten Follikels einige Stunden vor dem Zeitpunkt feststellen, bevor er sich morphologisch eindeutig vom zweitgrößten Follikel unterscheiden lässt. Möglicherweise ist eine erhöhte LHR Expression schon vor dem Auftreten anderer Unterschiede charakteristisch für jenen Follikel einer Kohorte, der einen entscheidenden Entwicklungsvorteil besitzt. Dieser wiederum könnte möglicherweise einer besseren Verfügbarkeit von IGF1 in diesem Follikel in Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien weisen darauf hin, dass das IGF System in der Ausbildung der Follikeldominanz eine wichtige Rolle spielt.

Bei Wachstumshormon-defizienten Rindern, die nur eine begrenzte IGF1 Produktion aufweisen, erreichen Follikel keinen größeren Durchmesser als 8 mm und die Ausbildung eines dominanten Follikels erfolgt nicht (CHASE et al., 1998). Zudem wurde bei Ratten gezeigt, dass IGF1 die FSH induzierte LHR Ausbildung fördert (HIRAKAWA et al., 1999). Beim Rind stimuliert IGF1 die Proliferation von Granulosazellen und wirkt synergistisch mit Gonadotropinen bei der Differenzierung von Follikelzellen (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). In vitro Versuche zeigten, dass IGF1 die Proliferation von Granulosazellen und die Östrogenproduktion erhöht (GLISTER et al., 2001), die Sensitivität von Granulosazellen gegenüber FSH steigert (MONGET & MONNIAUX, 1995; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995), die Sekretion von Inhibin A, Aktivin A und Follistatin aus Granulosazellen verstärkt (GLISTER et al., 2001) sowie in den Thecazellen die durch LH stimulierte Androgenproduktion stimuliert (STEWART et al., 1995).

Die Injektion von IGF1 in das ovarielle Stroma der Ovarien einen Tag nach der Ovulation erhöhte in kleinen Follikeln die Östrogenkonzentration (SPICER & CHAMBERLAIN, 2000). Die intrafollikuläre Injektion von rekombinantem humanen IGF1 in den zweitgrößten Follikel zum erwarteten Zeitpunkt der Follikelabweichung erhöhte die

Östrogenkonzentration in diesem innerhalb von 6 Stunden nach der Injektion (GINTHER et al., 2004).

Die Konzentration von freiem IGF1 in der Follikelflüssigkeit des größten Follikel ist bei seiner Dominanzentwicklung nicht erhöht, aber in den kleineren Follikeln nimmt die IGF1 Konzentration ab (BEG et al., 2002). Vergleichbares konnten Rivera und Fortune (2003a) zeigen.

Die Konzentration von freiem IGF1 hängt auch von der Konzentration der IGF Bindungsproteine (IGFBPs) ab. Beim Rind wurden 4 IGF Bindungsproteine (IGFBP 2 bis 5) in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen (ECHTERNKAMP et al., 1994; DE LA SOTA et al., 1996; MIHM et al., 2000; AUSTIN et al., 2001). IGFBP 2, 4 und 5 wurden im Zusammenhang mit der Follikelselektion untersucht (BEG et al., 2001; RIVERA & FORTUNE, 2003a). Die IGFBP4 und -5 Konzentrationen im größten Follikel nahmen während der Dominanzentwicklung ab (RIVERA & FORTUNE, 2003a). Bei IGFBP2 waren die Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit beim größten und zweitgrößten vor und während der Dominanzentwicklung annähernd gleich. Nach der Ausbildung eines dominanten Follikels stieg die Konzentration im zweitgrößten Follikel an (BEG et al., 2001).

Die Verfügbarkeit von IGFBP2, -4 und -5 wird unter anderem über ihre Proteolyse durch die Protease PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) gesteuert (MAZERBOURG et al., 2003; RIVERA & FORTUNE, 2003b). Weiter zeigten Armstrong et al. (1998) in Zellkultur, dass FSH die Expression von IGFBP2 mRNA in Granulosazellen reduziert (und LH die Expression von IGFBP4 mRNA in Thecazellen stimuliert).

Es deutet somit vieles darauf hin, dass das IGF-System bei der Selektion des dominanten Follikels eine wichtige Rolle spielt.

Östrogen wird von rekrutierten und dominanten Follikeln gebildet und bewirkt eine verringerte FSH-Freisetzung aus der Hypophyse. Beim Rind scheint Östrogen jedoch hinsichtlich des Abfalls der FSH-Sekretion neben dem notwendigen Inhibin A nur eine unterstützende Rolle zu spielen (MIHM et al., 1997; BLEACH et al., 2001).

Im Ovar selbst bewirkt Östrogen eine erhöhte Eigensynthese. Dies erfolgt zum einen über eine Steigerung der Androgenbildung in den Thecazellen (WRATHALL & KNIGHT, 1995), zum anderen über eine Steigerung der Pregnenolonsynthese in Granulosazellen. Dabei wird gleichzeitig die Verstoffwechslung zu Progesteron verhindert (FORTUNE, 1988).

Die Östrogenkonzentration in der Follikelflüssigkeit steigt beim größten und zweitgrößten Follikel zum Zeitpunkt der Dominanzentwicklung (GINTHER et al., 1997a; AUSTIN et al., 2001; BEG et al., 2001) bzw. kurz davor (MIHM et al., 2000; BEG et al., 2002; GINTHER et al., 2003) unterschiedlich stark an. Nach einer Behandlung mit Östrogen-Antikörpern sank die Wachstumsrate der beiden größten Follikel unabhängig von den FSH-Effekten (BEG et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass Östrogen bei der Follikelselektion beim Rind eine Rolle spielt.

Inhibin A wird wie Östrogen von rekrutierten und dominanten Follikeln gebildet (SUNDERLAND et al., 1996; BLEACH et al., 2001). Inhibin A reduziert die FSH Freisetzung aus der Hypophyse und scheint beim Rind der maßgebliche Faktor für die abnehmende FSH-Sekretion zu sein (GINTHER et al., 2000; GINTHER et al., 2001; MIHM & BLEACH, 2003), was wiederum für die Selektion des dominanten Follikel relevant ist.

Möglicherweise spielt auch das Aktivin- Inhibin- Follistatin-System bei der Entwicklung der Dominanz eine Rolle, wobei beim Rind diskutiert wird, ob Inhibin A und Aktivin A bei der Entstehung der Follikeldominanz wirklich wichtig sind. Weder die schweren noch die leichten Dimere von Inhibin und Aktivin zeigten in der Follikelflüssigkeit der drei größten Follikel während des Selektionsprozesses eine unterschiedliche Expression (AUSTIN et al., 2001). Es wird erwogen, dass das intrafollikuläre Verhältnis von Aktivin zu Follistatin und Aktivin zu Inhibin bei der Follikulogenese von Bedeutung sein könnte (GLISTER et al., 2001). Follistatin reduziert die Aktivinwirkung indem es Aktivin A bindet. Inhibin A wiederum wirkt den Effekten von Aktivin A entgegen. Somit reflektiert das Verhältnis von Aktivin A zu Follistatin und Aktivin A zu Inhibin A die Menge an tatsächlich verfügbarem Aktivin A. Glister et al. (2006) berichten beim Rind von einem starken Anstieg des intrafollikulären Aktivin A Tons in 3 bis 6 mm großen Follikeln. Die 30-fache Erhöhung der Aktivin A



Konzentration geht mit einem 6fachen Anstieg der Inhibin A Konzentration einher. Weiter wurde auch eine Abnahme der Follistatinkonzentration im größten Follikel während seiner Größenzunahme auf 5 bis 11 mm festgestellt (AUSTIN et al., 2001). FSH und IGF1 erhöhten im Granulosazellkulturmedium die verfügbare Aktivin A Konzentration (GLISTER et al., 2001).

### **3. Intermediärfilamente**

Eukaryonten-Zellen haben sehr unterschiedliche Formen und einen hohen inneren Organisationsgrad. Sie sind imstande, ihre Morphologie zu verändern, ihre inneren Organellen umzulagern und in bestimmten Fällen sich aktiv fortzubewegen. Die genannten Fähigkeiten beruhen auf komplexen Proteinfilament-Geflechten im Zytoplasma, die den Eukaryonten-Zellen als Zytoskelett dienen. Zwei besonders wichtige Komponenten des Zytoskeletts sind Actin-Filamente (Mikrofilamente) und Mikrotubuli. Beide sind aus kugelförmigen Protein-Untereinheiten aufgebaut, die sich in der Zelle schnell zusammenlagern und wieder trennen können. Ihrer Aggregation aus nichtpolymerisierten Untereinheiten im Zytoplasma wird durch empfindliche Kontrollmechanismen gesteuert. In den meisten tierischen Zellen findet man eine weitere Klasse von Proteinfilamenten, deren Durchmesser zwischen dem der Mikrofilamente (5-8 nm) und dem der Mikrotubuli (25 nm) liegt, und die daher als Intermediärfilamente (10-12 nm) bezeichnet werden. Sie bestehen aus fadenförmigen Protein-Untereinheiten und sind viel stabiler als Mikrofilamente und Mikrotubuli. Zusätzlich zu den drei Haupttypen von Proteinfilamenten enthält das Zytoskelett auch noch viele verschiedene Proteine, die spezialisierte Funktionen ausüben (ALBERTS et al., 2008; HYDER et al., 2008; QIN et al., 2010).

Intermediärfilamente (IFs) sind immer noch die am wenigsten erforschten Bestandteile des Zytoskeletts (HYDER et al., 2008). Ursprünglich wurden sie lediglich als mechanischer Bestandteil des Zytoskeletts gesehen (LAZARIDES, 1980), aber neuere Untersuchungen zeigen, dass IFs auch für viele andere zelluläre Vorgänge von Bedeutung sind (PALLARI &

ERIKSSON, 2006; KIM & COULOMBE, 2007; HYDER et al., 2008; PROKOCIMER et al., 2009).

### **3.1. Intermediärfilamentklassen**

Basierend auf Sequenz- und Expressionsmusterhomologien wird die große Familie der IF-Proteine in sechs Unterfamilien eingeteilt (STEWART, 1990; KIM & COULOMBE, 2007; IWATSUKI & SUDA, 2010).

Die größten Unterfamilien stellen die Cytokeratine (CK) dar, die in Typ I (saure, CK 9-28) und Typ II (basische, CK1-8 und CK 71-80) CKs unterteilt werden können. CKs werden vor allem in Zellen epidermalen Ursprungs und einfachen Epithelien gefunden. CKs bilden Heterodimere, die sich jeweils aus einem Typ I und einem Typ II CK zusammensetzen. Es gibt weitere Keratine, sog. „harte“ Keratine, die Bestandteile von Haaren, Wolle, Hufen, Nägeln und Federn sind. Hierzu gehören die Keratine 31-40 von den Typ I Keratinen und die Keratine 81-86 von den Typ II Keratinen. Die aktuelle Nomenklatur aller (Cyto)Keratine ist in Schweizer et al. (2006) zu finden, eine ausführliche Übersicht zu allen (Cyto)Keratinen in Bragulla und Homberger (2009).

Zu den Typ III IFs gehören Vimentin, Desmin, Glia Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Syncoilin und Peripherin (IWATSUKI & SUDA, 2010). Vimentin kommt in Zellen mesenchymalen Ursprungs vor, Desmin vor allem in Muskelgewebe, so auch Syncoilin. GFAP und Peripherin werden in Zellen des Nervensystems exprimiert (KIM & COULOMBE, 2007). Typ III IFs bilden in der Regel Homopolymere, es können aber auch gelegentlich Heteropolymere auftreten (HERRMANN & AEBI, 2000).

Die Typ IV IFs werden mit Ausnahme von Synemin, das in der Muskulatur vorkommt, im Nervensystem exprimiert und zu ihnen gehören die leichten, mittleren und schweren Neurofilamente (NF-L, NF-M und NF-H), Nestin und  $\alpha$ -Internexin.

Typ V IFs, die Lamine (Lamin A, Lamin C, Lamin B1 und B2), sind nicht wie die übrigen IFs im Zytoplasma sondern im Zellkern lokalisiert. Hier sind sie v. a. Bestandteil der Lamina, einem Intermediärfilament-Netzwerk unter der Kernmembran.

Phakinin und Filensin gehören zu den Typ VI IFs und werden nur in der Linse des Auges exprimiert (IWATSUKI & SUDA, 2010).

Aufgrund ihrer Eigenschaft (auch) Heteropolymere zu bilden kann man die IFs auch nach diesem Kriterium in verschiedene Gruppen einteilen. So bilden die Keratine eine Gruppe, die Typ III und IV IFs zusammen eine Gruppe und schließlich die Lamine eine weitere Gruppe (ERIKSSON et al., 2009).

### **3.2. Struktur von Intermediärfilament-Proteinen und Aufbau von Intermediärfilamenten**

Trotz ihrer großen Vielfalt besitzen alle IF-Proteine einen einheitlichen Aufbau. Sie weisen alle eine  $\alpha$ -helicale „rod“ Domäne auf. Diese wird, IF-Protein-spezifisch, von einer jeweils nicht- $\alpha$ -helicalen N-terminalen „Kopf“- und einer C-terminalen „Schwanz“- Domäne umgeben. Die „rod“ Domäne ist unter den IF-Proteinen hoch konserviert, allerdings unterscheiden sich zytoplasmatische und nucleäre IF-Proteine in einem Teil dieser „rod“ Domäne.

Zur Bildung von IFs winden sich zunächst zwei Polypeptidketten im Bereich der  $\alpha$ -helicalen „rod“ Domänen parallel umeinander und bilden in diesem Bereich eine sogenannte „Coiled Coil“. Diese „Coiled Coil“-Dimere sind die Grundeinheit zur Bildung von IFs. Zwei solche Dimere lagern sich antiparallel zu einem Tetramer zusammen. Aufgrund dieser antiparallelen Zusammenlagerung polarer Dimere entstehen apolare Tetramere, wodurch IFs im Gegensatz zu Mikrofilamenten und Mikrotubuli keine Polarität aufweisen. Acht dieser Tetramere lagern sich zu einer zylindrischen Struktur zusammen und bilden ein Unit-Length Filament (ULF). Durch Aneinanderreihung solcher ULFs entstehen dann die IFs, bei denen sich in einer radialen Verdichtungsphase, in der es zu molekularen Rearrangements kommt, die Filamentdurchmesser von anfangs ca. 17 nm auf den für Intermediärfilamente typischen von ca. 10 bis 12 nm verringern (HERRMANN et al., 2007; GOLDMAN et al., 2008; QIN et al., 2010).

### **3.3. Keratine**

Epitheliale Zellen in einfachen und mehrschichtigen Epithelien synthetisieren jeweils spezielle Keratine. In einfachen Epithelien werden

vorzugsweise CK8/18 IFs gebildet (PEKONY & LANE, 2007), in mehrschichtigen Epithelien CK5/14 IFs (MOLL et al., 1982). Diese Keratine werden auch primäre Keratine von epithelialen Zellen genannt. Neben oder auch statt dieser Keratine können auch andere Keratine, sogenannte sekundäre Keratine, in den Zellen gebildet werden. In einfachen Epithelien sind dies CK7 und CK19, in mehrschichtigen Epithelien CK6, CK15 und CK16 (BRAGULLA & HOMBERGER, 2009).

CK8 bildet Heterodimere mit CK18 oder CK19. CK8/18 IFs sind die ersten IFs, die in einfachen Epithelien während der Embryonalentwicklung nachgewiesen wurden (PEKONY & LANE, 2007). CK18 scheint in einigen, aber nicht allen Fällen CK14 ersetzen zu können (HUTTON et al., 1998).

Die Expression von CK14 und CK5 nimmt in embryonalen Epithelzellen in dem Maße zu, in dem sich ein geschichtetes Epithel ausbildet. CK5 wird in mitotisch aktiven Basalzellen von mehrschichtigen Epithelien gebildet, aber nicht in sich differenzierenden Epithelien (BYRNE et al., 1994). Nach Coulombe et al. (1989) korreliert die Expression von CK14 mit dem Grad der Pluripotenz der Basalzellen in mehrschichtigen Epithelien.

CK19 ist das kleinste CK (BADER et al., 1986) und das einzige „einfache“ CK, das auch in mehrschichtigen Epithelien vorkommt (BOSCH et al., 1988). CK19 kann mit CK8 (BADER et al., 1986; ECKERT, 1988; FRADETTE et al., 1998), CK5 (FRADETTE et al., 1998) und CK7 (ECKERT, 1988) IFs bilden.

#### **3.4. Vimentin und Desmin**

Vimentin ist das wichtigste IF-Protein in mesenchymalen Zellen und wird häufig als Zellentwicklungsmarker benutzt (IVASKA et al., 2007). Es war lange nicht klar welche Funktionen Vimentin hat. Dies hängt wohl damit zusammen, das Vimentin -/- Mäuse einen nur leicht geänderten Phenotyp aufweisen (COLUCCI-GUYON et al., 1994). Genauere Untersuchungen bei diesen Mäusen zeigten morphologische Veränderungen in Gliazellen (COLUCCI-GUYON et al., 1999), reduzierte Motilität von Fibroblasten bei der Wundheilung (ECKES et al., 1998; ECKES et al., 2000), ein gestörtes Homing von Leukozyten und Schäden an Gefäßendothelien (NIEMINEN et al., 2006).

Desmin war einer der ersten zellulären Marker für myogene Zellen (KAUFMAN & FOSTER, 1988; HERRMANN et al., 1989; KUISK et al., 1996; CAPETANAKI & MILNER, 1998). Ein wichtiger Entwicklungsschritt während der Myogenese ist die Fusion der einkernigen Myoblasten (WAKELAM, 1985). Aufgrund verschiedener Studien (KRIMPENFORT et al., 1988; CHOI et al., 1990; TAO & IP, 1991; LI et al., 1994; CAMARGO et al., 2003) wurde postuliert, dass zumindest in einer der beiden fusionierenden Zellen Desmin vorhanden sein muss. Desmin IFs spielen auch bei der Stabilisierung des Sarcolemmverbandes eine wichtige Rolle (GUNST & TANG, 2000; BORIEK et al., 2001; O'NEILL et al., 2002; HERRMANN et al., 2007). Studien an Desmin-defizienten Mäusen zeigten eine Verbindung zwischen dem Desmin-Netzwerk und der Lokalisation, Form und Funktion von Mitochondrien (MILNER et al., 2000; CAPETANAKI, 2002). Zusätzlich wird Desmin IFs und ihren assoziierten Proteine eine Rolle bei der Vesikel-Verteilung und der Organell-Bildung zugeschrieben (CAPETANAKI et al., 2007). Die Bedeutungen von IFs bei der Kraftgenerierung und -übertragung und für die Empfindlichkeit gegenüber der Schädigung von Muskelgewebe sind noch unklar. Aber die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass die Bedeutung von Desmin IFs bezüglich seitlicher Kraftübertragung oder Organellstruktur, -lokalisierung und -funktion weit über einen einfachen Schutz gegenüber mechanischer Einflüsse hinausgeht (LI et al., 1997a; LI et al., 1997b; MILNER et al., 2000; SAM et al., 2000; CAPETANAKI, 2002; HAUBOLD et al., 2003; CAPETANAKI et al., 2007).

Die glatte Muskulatur kann ihren Kontraktions/Relaxations-Status über die Neuorganisation ihres Aktin- und IF-Netzwerkes anpassen (GUNST & TANG, 2000; GERTHOFFER & GUNST, 2001; GUNST et al., 2003; GERTHOFFER, 2005; MARGANSKI et al., 2005; TANG et al., 2005; LI et al., 2006; WANG et al., 2006; WANG et al., 2007). Vimentin und Desmin sind die Hauptbestandteile des IF-Netzwerkes in der glatten Muskulatur (TANG, 2008). In der glatten Muskulatur von Gefäßen wird statt Desmin hauptsächlich Vimentin exprimiert. Desmin kommt vor allem in Arteriolen vor, wohingegen es in großen Arterien wie der Aorta kaum oder gar nicht nachgewiesen werden konnte (FRANK & WARREN, 1981; GABBIANI et

al., 1981; QUINLAN & FRANKE, 1983).

### 3.5. Lamine

Die Kernhülle besteht aus der äußeren und inneren Kernmembran und der Kern-Lamina, einem Proteingeflecht überwiegend aus Laminen, das über Verbindungsproteine mit der inneren Kernmembran in Verbindung steht (STARR, 2007; PROKOCIMER et al., 2009). Es gibt Hinweise auf ein im Inneren des Zellkern bestehendes Netzwerk von Proteinen (HOZAK et al., 1995; VLCEK et al., 2001; BARBORO et al., 2002), dass zusammen mit der Lamina ein Gerüst bildet und damit für die mechanische Stabilität des Kerns sorgt (ANDRES & GONZALEZ, 2009; WILSON & FOISNER, 2010). Hauptbestandteil dieses Gerüsts sind die Lamine (SHUMAKER et al., 2003). Lamine sind Typ V IFs und können aufgrund von Sequenzhomologien in A- und B-Typ Lamine eingeteilt werden (GOLDMAN et al., 2002; SHUMAKER et al., 2003; BROERS et al., 2006). Alle A-Typ Lamine werden von einem Gen (*LMNA*) kodiert. Lamin A und Lamin C entstehen durch alternatives Splicing dieses Gens. Dagegen werden Typ-B Lamine, Lamin B1 und Lamin B2, jeweils von einem eigenen Gen kodiert (*LMNB1* und *LMNB2*) (DECHAT et al., 2009). Mindestens eine Art von Laminprotein ist in jeder Zelle eines Vielzellers vorhanden (MELCER et al., 2007). In Säugetieren werden A- und B-Typ Lamine Zellart-spezifisch exprimiert (BROERS et al., 2006; VERSTRAETEN et al., 2007; DECHAT et al., 2008).

Es ist nicht bekannt ob die verschiedenen Lamine in vivo Heterodimere bilden, oder wie genau sie im Zellkern organisiert sind (GRUENBAUM et al., 2005). Barboro et al. (2010) haben aufgrund elektronenmikroskopischer Befunde ein Model für die Anordnung von Laminen in der Zellkernmatrix postuliert.

Laminen und ihren assoziierten Proteinen (WILSON & FOISNER, 2010) werden eine Beteiligung an verschiedenen wichtigen zellulären Funktionen zugeschrieben, wie zum Beispiel Chromatinorganisation (SULLIVAN et al., 1999; LIU et al., 2000; GUILLEMIN et al., 2001; LIU et al., 2003; PROKOCIMER et al., 2009), Platzierung von Kernporenkomplexen (LIU et al., 2000; SCHIRMER et al., 2001),

Zellkernpositionierung innerhalb der Zelle (STARR et al., 2001; STARR & HAN, 2002), Neubildung des Kerns nach der Mitose (LOPEZ-SOLER et al., 2001), DNA-Replikation und RNA-Polymerase II abhängige Genexpression (SPANN et al., 1997; SPANN et al., 2002; DECHAT et al., 2009; PROKOCIMER et al., 2009).

Außerdem sind Lamine und ihre assoziierten Proteine als Bestandteil der Kernhülle in die Regulation der Aktivität und/oder der Verfügbarkeit von Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege mit einbezogen, wie z. B. in den MAPK-, Wnt- $\beta$ -catenin-, TGF- $\beta$ - und Notch-Signalweg (GRUENBAUM et al., 2005; ANDRES & GONZALEZ, 2009; WILSON & FOISNER, 2010).

### **3.6. Wirkungsweisen von Intermediärfilamenten bzw.**

#### **Intermediärfilament - Proteinen**

IFs sind Bestandteil des Zytoskeletts. An der Zelloberfläche stehen sie mit Desmosomen, Hemidesmosomen und fokalen Adhensionspunkten sowie über verschiedene Verbindungsmoleküle mit der extrazellulären Matrix in Verbindung (CAPETANAKI et al., 2007; GREEN & SIMPSON, 2007; HERRMANN et al., 2007). IFs bilden im Zytoplasma ein Netzwerk, das sich bis zum Zellkern erstreckt und mit diesem in Verbindung tritt (IWATSUKI & SUDA, 2010). Dieses Netzwerk steht auch mit anderen Zellorganellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Vesikeln und den verschiedenen Bestandteilen des Zytoskeletts in direktem oder indirektem (über Verbindungsmoleküle) Kontakt (TOIVOLA et al., 2005; TZUR et al., 2006; HERRMANN et al., 2007) und spielt somit eine Rolle in der intrazellulären Organisation und möglicherweise auch in der Übertragung von mechanischen Reizen der Zellmembran auf den Zellkern. Damit kann die Zelle letztendlich auf äußere Einwirkungen über eine Anpassung der Proteinsynthese reagieren (QIN et al., 2010). Im Zellkern sind die Lamine vor allem der Hauptbestandteil der Lamina, die über verschiedene Linkerproteine mit der Kernmembran in Verbindung steht. Iwatsuki und Suda (2010) haben in polaren Zellen sieben verschiedene Arten von IF-Netzwerken beschrieben. IFs sind keine statischen Gebilde, sondern unterliegen Auf- und Abbauvorgängen, Phosphorylierung, Glykosylierung und Transglutaminierung (OMARY et al., 1998; MARCEAU et al., 2001;

HYDER et al., 2008). Auf diese Weise nehmen sie an vielen wichtigen physiologischen Zellfunktionen teil, wie z.B. Zellmigration, Zellteilung, Zellgröße, Zellwachstum, Apoptoseregulierung und anderen Signaltransduktionswegen (PALLARI & ERIKSSON, 2006). Die Mitwirkung an Signaltransduktionswegen erfolgt hauptsächlich über Wechselwirkungen mit und/oder Bindung von Signalmolekülen.

#### **4. Laser-Mikrodissektion und quantitative Reverse-Transkriptase-PCR**

Im Folgenden beschreibe ich, wie aus Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) Material, das mittels Laser-Mikrodissektion gewonnen wurde, RNA isoliert und mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) untersucht werden kann.

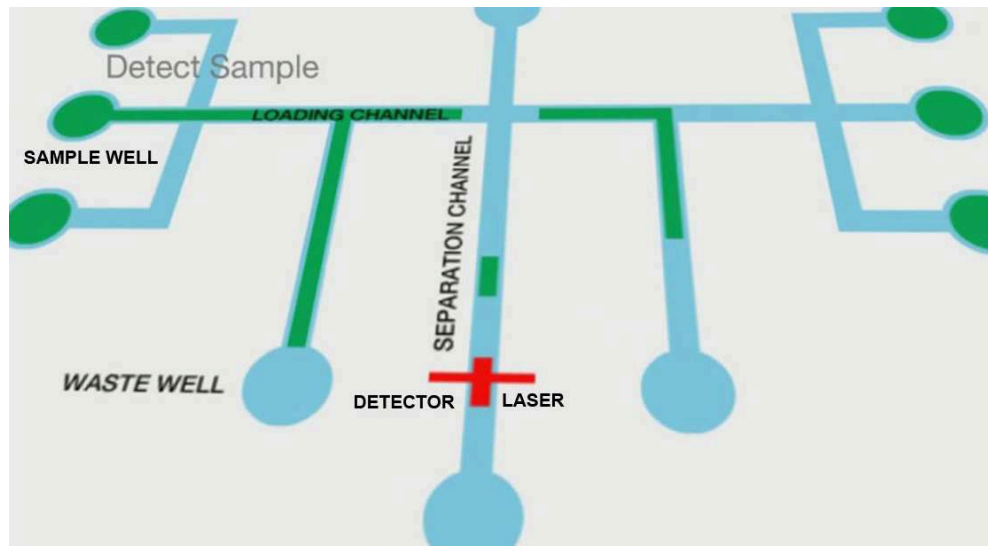
##### **4.1. Mengen- und Qualitätsbestimmung bei geringen RNA Mengen**

Mit der Entwicklung von automatisierten Elektrophorese-Systemen wie Experion (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) oder Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) wurde es möglich, Menge und Qualität von geringsten Mengen RNA zu bestimmen (Untergrenze ca. 200 pg/ $\mu$ l). Dabei wird die Elektrophorese in einem Mikrokanalsystem auf einem Chip durchgeführt (PFAFFL et al., 2008). Fluorophore, die in der RNA interkalieren, werden mittels Laser angeregt und die Emission gemessen. Nach Kalibrierung des Systems über eine der Probe zugesetzten RNA-Leiter (Fig. 1c in Abschnitt V 2), kann die Größe und Menge der RNA bestimmt werden (Abb. 1). Das Ergebnis wird als Elektropherogramm (Fig. 1d in Abschnitt V 2) und als virtuelles Gel dargestellt. Unter Einbeziehung verschiedener Parameter und deren Gewichtung, u. a. des 18S rRNA- und 28S rRNA-Peaks, wird aus den erhaltenen Messdaten ein Zahlenwert zwischen 1 und 10 berechnet, der die RNA-Qualität widerspiegelt. Dabei entspricht „1“ stark degradierter RNA und „10“ intakter RNA. Dieser Zahlenwert wird je nach verwendetem System als RNA Quality Indicator (RQI, Experion) (DENISOV, 2008) oder RNA Integrity Number (RIN, Agilent 2100



Bioanalytiker) bezeichnet (SCHROEDER et al., 2006).

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung einer Elektrophorese im Mikrokanalsystem auf einem Analyse-Chip (modifiziert nach BIO-RAD-LABORATORIES. Experion Video Tour CD)



#### 4.2. FFPE Material und Laser-Mikrodissektion

Bei der Fixierung von Gewebeproben mit Formalin treten RNA-Strangbrüche, Modifikationen der RNA mit Monomethylol-Gruppen sowie über diese Gruppen vermittelte Querverbindungen zu Proteinen auf. Bei der Isolierung der RNA können die beiden letzteren Vorgänge mittels spezieller Extraktionskits, die Protease K und Guanidin einsetzen, wieder rückgängig gemacht werden, die RNA-Fragmentierung bleibt jedoch bestehen (MEDEIROS et al., 2007). Die auf diese Weise gewonnene RNA kann mit den oben genannten automatisierten Elektrophorese Systemen analysiert werden.

Wie Kenngott et al. (2011) zeigten, können mittels Laser-Mikrodissektion genau definierte Zellgruppen aus FFPE Schnitten isoliert, die RNA isoliert und charakterisiert und die RNA-Expression mittels RT-qPCR quantifiziert werden.

Bei der Laser-Mikrodissektion an histologischen Schnitten werden in der Regel membranbeschichtete Objektträger verwendet. Mittels eines UV-

Lasers wird der gewünschte Bereich ausgeschnitten und dann, je nach verwendetem System, durch Schwerkraft (Leica LMD6500 und LMD7000) oder mit Hilfe eines einzelnen Laserkatapultimpulses (Palm MicroBeam, Zeiss) in den Deckel eines „Microtube“s befördert. Bei dem Laser-Mikrodissektionssystem von Zeiss können auch konventionelle Glasobjektträger verwendet werden. Dies ist von Vorteil, wenn zum Beispiel Archivmaterial verwendet werden muss, oder wenn sich aufgrund der Gewebebeschaffenheit die Schnitte auf membranbeschichteten Objektträgern trotz Verwendung eines „flüssigen Deckglases“ (LiquidCover Glass (D), Carl Zeiss MicroImaging GmbH Deutschland) an den Rändern aufrollen. Beim Einsatz von konventionellen Glassobjektträgern wird der markierte Bereich mit Hilfe vieler einzelner Laserkatapultimpulse in den Deckel des Microtubes befördert (Fig.1.a in Abschnitt V.2).

#### **4.3. Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR**

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR, real-time RT-PCR) ist eine Methode die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, wobei die RNA in cDNA umgeschrieben wird und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit gegeben ist (BUSTIN et al., 2009). Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende oder während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Zu Beginn einer PCR ist die DNA- beziehungsweise cDNA-Menge begrenzt (Startphase). Zum Schluss einer PCR ist die DNA-Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und so die PCR hemmen (Plateauphase). Zwischen Startphase und Plateauphase liegt die exponentielle Phase, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung benutzt (HOLZAPFEL, 2007).

In Publikationen der letzten Jahre führte eine uneinheitliche Nomenklatur und unterschiedliche Vorstellungen über die zu veröffentlichenden Details dieser Untersuchungen zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der

Ergebnisse. Dem wurde durch „The MIQE Guidelines“ (BUSTIN et al., 2009) entgegengewirkt. In der real-time PCR wird heute nicht mehr primär in DNA Produktmengen oder –konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der sogenannte  $C_q$  (= quantification cycle) Wert herangezogen (früher auch  $C_t$  oder  $C_p$  Wert). Dieser entspricht der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am  $C_q$  befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Im Falle einer 100% Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer  $C_q$  entspricht der doppelten Menge an eingesetzten cDNA, respektive mRNA Startmenge (PFAFFL, 2004).

Es stehen zwei generelle Quantifizierungsstrategien in der real-time RT-PCR zur Verfügung, die relative Quantifizierung und die absolute Quantifizierung.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres ubiquitär exprimiertes nicht reguliertes Referenz Gen oder auf einen Referenz-Gen-Index, der sich aus mehreren Referenz-Genen zusammensetzt, bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Die relative Quantifizierung lässt sich weiter optimieren, indem man die unterschiedlichen real-time PCR Effizienzen der untersuchten Faktoren mit berücksichtigt. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Ziel-Gen und das Referenz-Gen betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf (PFAFFL, 2004).

Die Gene für GAPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon Untereinheiten und  $\beta$ -Aktin sind wohl die geläufigsten Referenz-Gene die zur Normalisierung herangezogen werden. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Die

Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sogenannte  $\Delta\Delta\text{CP}$  Methode erfolgen oder besser über genauere Effizienz korrigierte Modelle erfolgen, da man bei der  $\Delta\Delta\text{CP}$  Methode von einer optimalen real-time PCR Effizienz (=2) in allen Proben ausgeht, was natürlich nicht der Praxis entspricht. Die „wahre real-time PCR Effizienz“ dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 bewegen. Geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen führen jedoch zu enormen Unterschieden in den Expressionsunterschieden. Die PCR-Effizienz eines bestimmten Faktors lässt sich durch verschiedenste Methoden bestimmen. Am häufigsten wird eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt, aus dessen Steigung die real-time PCR-Effizienz bestimmt werden kann. Allerdings überschätzt diese Methode die eigentliche real-time PCR-Effizienz. Nicht selten errechnen sich Effizienzen über 2,0 bis 2,2, was theoretisch nicht möglich ist (PFAFFL, 2004).

Während die relative Quantifizierung zwei verschiedene Gene miteinander vergleicht, wird die absolute Quantifizierung mit Standards des zu untersuchenden Gens durchgeführt. Es werden Standards des Ziel-Gens in verschiedenen Verdünnungen mitgeführt, die die Berechnung des Ziel-Gens aus den unbekanntenen Proben ermöglichen (HOLZAPFEL, 2007).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

Die Ausführungen zu Material und Methoden finden sich in der Publikation in Abschnitt V 1.

## **IV. ERGEBNISSE**

Die Ergebnisse sind in der Publikation in Abschnitt V 1 dargestellt.

## V. PUBLIKATIONEN

### 1. Immunocytochemical Localization of Cytoplasmic and Nuclear Intermediate Filaments in the Bovine Ovary during Folliculogenesis

Zur Veröffentlichung angenommen in: Anatomia Histologia Embryologia

#### **Immunocytochemical Localization of Cytoplasmic and Nuclear Intermediate Filaments in the Bovine Ovary during Folliculogenesis**

J. Wendl, K. Ebach, D. Rodler, R. A.-M. Kenngott\*

Addresses of authors: Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie, Department of Veterinary Sciences, LMU München, Veterinärstrasse 13, D-80539 Munich, Germany

\*Correspondence: e-mail: r.kenngott@anat.vetmed.uni-muenchen.de

With 3 figures and 4 tables

#### **Summary**

The cellular cytoskeleton is composed of three fibrillar systems, namely actin microfilaments, microtubules and intermediate filaments (IFs). It is not only a structural system, which mediates functional compartmentalisation, but also contributes to many cellular processes such as transport, mitosis, secretion, formation of cell extensions, intercellular communication and apoptosis. In our present study we have examined the distribution of four groups of intermediate filaments (cytokeratins (CKs), vimentin, desmin and lamins) in the somatic and germinal cells of the bovine ovary using RT-PCR and immunohistochemical techniques. Using RT-PCR specific transcripts for all intermediate proteins studied (CK8, CK18, desmin, vimentin, lamin A/C and lamin B1) were detected. A characteristic immunohistochemical staining pattern was observed for the different intermediate filaments within the ovary: In the present study, we used antibodies against Type I CK (acidic cytokeratins: CK14, CK18, CK19) and Type II CK (basic cytokeratins: CK5 and CK8). Among these, only antibodies against

CK18 gave a characteristic pattern of immunostaining in the ovary, which included the surface epithelium, the follicle cells, the endothelium of blood vessels and rete ovarii. Antibodies against all other CKs resulted in a weak staining of a limited number of cellular structures (CK5, CK19) or were completely negative (CK8, CK14, apart from the surface epithelium). Vimentin antibodies resulted occasionally in a weak staining of the granulosa cells of primary and secondary follicles. In late secondary follicles the basal and most apical follicle cells contacting the zona pellucida usually showed a marked immunostaining for vimentin. In antral follicles three different immunostaining patterns for vimentin were observed. Desmin immunostaining was confined to the smooth muscle cells of blood vessels. Although mRNA for lamin A/C and lamin B1 could be demonstrated using RT-PCR, no immunostaining was found for lamins, neither in the follicle cells nor in the oocytes.

### **Introduction**

Among the components of the cytoskeleton, the intermediate filaments (IFs) are regarded as the most versatile structures of mammalian cell architecture (Herrmann et al., 2007). Intermediate filaments are divided into six subtypes which are, at least in part, expressed in a cell type- (and differentiation)-dependent manner (Coulombe and Wong, 2004; Omary et al., 2006; Kim and Coulombe, 2007; Goldman et al., 2008). Apart from the lamin proteins, which are localized to the nucleus (Dahl et al., 2004; Mattout et al., 2006), all other types of IF proteins are distributed with the cytoplasm (Hesse et al., 2001). At the cell surface, these intermediate filaments interact with desmosomes, hemidesmosomes, focal adhesions and indirectly with the extracellular matrix via a variety of linker proteins (Capetanaki et al., 2007; Green and Simpson, 2007; Herrmann et al., 2007). Cytoplasmic IFs also associate with the outer nuclear membrane, which in turn is connected to components of the nuclear lamina, the lamins (Tzur et al., 2006; Herrmann et al., 2007). Besides the important role for the structural support in the cytoplasm and the nucleus (Iwatsuki and Suda, 2010; Qin et al., 2010), a number of additional roles, nonmechanical in nature, have been recently uncovered for intermediate filament proteins. These include the regulation of key signalling pathways that control cell survival, cell growth, vectorial processes including protein targeting in polarized cellular settings, and gene regulation (Perlson et al., 2005; Kim et al., 2006; Pallari and Eriksson, 2006; Kim and



Coulombe, 2007; Hyder et al., 2008; Parnaik, 2008). The expression of different IF proteins in the ovary has been examined in numerous species, such as mice, rat, giant rat, dog, pig, sheep, baboon and human (Czernobilsky et al., 1985; Gall et al., 1992; Gallicano et al., 1992; Santini et al., 1993; Gallicano et al., 1994; Bukovsky et al., 1995; Nilsson et al., 1995; Khan-Dawood et al., 1996; Appert et al., 1998; Pan and Auersperg, 1998; Loffler et al., 2000; Marettova and Maretta, 2002; Hafner et al., 2004; Akihara et al., 2007; Arnault et al., 2010; Gumus et al., 2010; Madekurozwa et al., 2010). For the bovine ovary there are studies on the expression of diverse intermediate filament proteins with emphasis on different structures in the ovary (Ricken et al., 1995; Van Den Hurk et al., 1995; van Wezel et al., 1999; Perez-Martinez et al., 2001; Ortega et al., 2007; Townson et al., 2010). In our study we examined the expression of CK5, CK8, CK14, CK18, CK19, vimentin, desmin, lamin A and lamin B1 in the bovine ovary, considering the different developmental follicle stages and various ovarian tissues including the surface epithelium, stroma cells, endothelium, smooth muscle cells and rete ovarii. The results of our study will add further information on changes of intermediate filament expression during follicle development and regression and lead to a better understanding of the role of intermediate filaments in the bovine ovary.

### **Materials and methods**

The twelve bovine ovaries used in this study were collected at the local Munich slaughterhouse within 15 min after slaughter. The stage of the oestrus cycle was determined by examining macroscopically the ovaries (follicles and corpora lutea) and the uterus (size, colour, consistency and mucus) as previously described (Berisha et al., 2000).

#### **Gene expression studies**

For gene expression studies small samples of six bovine ovaries were immersed in RNAlater (Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. RNA extraction from RNAlater® immersed tissue was performed using the Tri Reagent® isolation kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) according to manufacturer's protocol. Quality and quantity of isolated total RNA were evaluated using the microfluid based automated electrophoresis system

Experion (Bio-Rad, Munich, Germany). We used the Standard Sense analysis chip (Bio-Rad, Munich, Germany) following the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was carried out using iScript™cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's protocol applying 627ng total RNA for each probe with an iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany). Finally the cDNA was diluted with RNase free aqua dest. 1:8. mRNA sequences were downloaded from NCBI Locus Link at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/Locuslink>. Primer pairs (primers used see Table 1) were designed using NCBI/ Primer- BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). All primer pairs were designed in an intron flanking fashion to limit the possibility of amplifying genomic DNA. The primers were synthesized by MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). For PCR the concentration of the primer sets was adjusted to 1.2 pmol/μl. PCR reactions were performed using iCycler EvaGreen® protocol (Bio-Rad, Munich, Germany) in a 96-well plate. The PCR thermal cycling program was accomplished by a two-step temperature protocol with following conditions: (first phase) 95°C for 1.45 min for enzyme activation and (second phase) 45 cycles at 95°C for 15 s (denaturizing) and 60°C for 30 s (annealing and extension). To identify unspecific PCR products melt curve analysis was carried out immediately after the amplification protocol. To reduce effects of pipetting errors all samples were amplified in triplicates. Parallel reactions without templates (NTC) were used as negative controls. To identify and validate the different PCR amplification products we ran them in a 1.5% ethidium bromide stained agarose gel (Biozym Phor Agarose, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany). The position of the bands was compared with a DNA Sizer XII marker (Peqlab, Erlangen, Germany). Additionally the amplicons were sequenced by GENterprise (GENterprise GENOMIC, Mainz, Germany).

**Table 1.** Primers used in this study

Primers	Forward Primer	Reverse Primer	Product size	Gen-Bank Accession No.
CK8	GGCAACATGCAGGGGCTGG T Exon 5	CCAGGCGGGACTCCAGCTC T Exon 7	148	NM_00103361 0.1
CK18	TCATCGAGGACCTGAGGGCT CAGA Exon 1	GCGCATGGCCAGCTCTGTCT C Exon 3	131	NM_00119209 5.1
Desmin	GGGCGAGGAGAGCCGGATC A Exon 5 and 6	TCCCGTCCCGGGTCTCAAT G Exon 8	141	NM_00108157 5.1
Vimentin	AAGCCGAGAGCACTCTGCA GTCT Exon 2	GGGCCTGAAGCTCCTGGATT TCCT Exon 3	150	NM_173969.3
Lamin A/C	GAGCTGCATGACCTGCGGG G Exon 2	GGTCTGCAGCCGGTTCTCAG C Exon 3	117	NM_00103405 3.1
Lamin B1	GGATTTGGAGAATCGCTGTC Exon 3	GCGAGTTTCATGCTTCCTTC Exon 4	103	NM_00110329 5.1

### Immunohistochemistry and immunofluorescence

For immunohistochemical analysis, specimens were fixed in Bouin's fluid (picric acid 1500 ml, glacial acetic acid 100 ml, 37% formalin) for 24 h or in 3.8% buffered formalin (pH 7,4) for 48 h. After fixation, the formalin treated samples were washed in diethylpyrocarbonate (DEPC)-water for 2 h and then in 70% ethanol for 3 h and the samples fixed with Bouin's fluid were immersed in 70% ethanol (3 x 24 h) to wash out Bouin's fluid. Then each specimen was dehydrated in a graded series of alcohols and embedded in paraffin. Sections (5 µm thick) were cut with a MICROM microtome Type Cool Cut (MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) and collected on slides (SuperFrost Ultra Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany).

### Localisation of intermediate filaments using immunohistochemistry

For immunohistochemistry three blocs of each of the twelve bovine ovaries were used (four ovaries of prooestrus, oestrus and dioestrus respectively). Of each bloc ten sections (every fifth) were used. Paraffin sections were dewaxed and then washed three times for 5 min with phosphate buffered saline (pH 7.4). For some primary antibodies a pre-treatment was necessary (see Table 2). Endogenous

peroxidase activity was blocked with 7,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at room temperature for 10 min. Nonspecific antibody binding was blocked with Dako Protein Block Serum Free (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) for 10 min. Sections were incubated with the primary antibody overnight at 6°C (primary antibodies used see Table 2). Antigen localization was achieved using the avidin–biotin complex technique [ABC-technique (Hsu et al., 1981)]. The respective biotinylated secondary antibodies are listed in Table 3 (incubation for 30 min at room temperature). Then incubation with StreptABCComplex/HRP (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) was performed for 30 min at room temperature and treatment with 1 mg/ml 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB tablets, 10 mg; Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Germany) for 5 minutes. As negative control only Dako Antibody Diluent (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) with non-immunoserum from the respective species instead of the primary antibody was used. All incubations were performed in a humidified chamber. Sections were left unstained or counterstained in haematoxylin (20 s), dehydrated, and mounted with Eukitt quick-hardening mounting medium for microscopy (Fluka Analytical©, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Germany). As positive controls fetal bovine skin was used for the immunocytochemical demonstration of cytokeratins and vimentin. Positive control for desmin was the smooth muscle layer of the bovine duodenum.

**Table 2.** Primary antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence

Antigen	Primary antibody	Supplier	Dilution	Pretreatment
Vimentin	Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone Vim 3B4	DakoCytomation <sup>2</sup>	1:500	0,1% proteinase <sup>1</sup> for 10 minutes
Cytokeratin 5	Anti-Keratin K5, guinea pig polyclonal	Progen Biotechnik <sup>3</sup>	1:50	-
Cytokeratin 8	Monoclonal Mouse Anti-Cytokeratin 8, Clone C-51	Novus Biologicals <sup>4</sup>	1:500	0,1% proteinase <sup>1</sup> for 10 minutes
Cytokeratin 14	Anti-Keratin K14, guinea pig polyclonal	Progen Biotechnik <sup>3</sup>	1:100	-
Cytokeratin 18	Anti-Keratin K18, guinea pig polyclonal	Progen Biotechnik <sup>3</sup>	1:200	-
Cytokeratin 19	Anti-Keratin K19, guinea pig polyclonal	Progen Biotechnik <sup>3</sup>	1:200	-
Desmin	Monoclonal Mouse Anti-Desmin, Clone DE-U-10	GeneTex <sup>5</sup>	1:200	-
Lamin A	Monoclonal Mouse Anti-Lamin A (133A2)	SantaCruz Biotechnology <sup>6</sup>	1:750	-
Lamin B1	Monoclonal Mouse Anti-Lamin B1 (119D5-F1)	SantaCruz Biotechnology <sup>6</sup>	1:750	-

1: Proteinase, bacterial Type XXIV (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Germany); 2: Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany; 3: PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany; 4: Novus Biologicals, Cambridge, England; 5: GeneTex, Irvine, USA; 6: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany

#### Localisation of intermediate filaments using immunofluorescence

For immunofluorescence, samples from the same blocs as for immunohistochemistry were used. After incubation with the primary antibody overnight at 6°C (antibodies used see Table 2), a subsequent incubation for one hour at room temperature with the corresponding fluoresceinisothiocyanat (FITC) linked secondary antibodies (see Table 3) was performed. Then the sections were covered with VECTASHIELD© Mounting Medium containing 4', 6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, USA). As negative control only Dako Antibody Diluent with non-immunoserum from the respective species instead of the primary antibody was used. All incubations were performed in a humidified chamber.

**Table 3.** Secondary antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence

Secondary antibody	Supplier	Dilution	Label
Polyclonal Rabbit <b>Anti-Mouse</b> Immunoglobulins	DakoCytomation <sup>1</sup>	1.300	biotinylated
Polyclonal Rabbit <b>Anti-Mouse</b> Immunoglobulins	DakoCytomation <sup>1</sup>	1:20	FITC <sup>4</sup>
Goat <b>Anti-Guinea Pig</b> IgG (H+L)	Vector Laboratories <sup>2</sup>	1.300	biotinylated
Rabbit <b>Anti-Guinea Pig</b> IgG (H+L)	Invitrogen Corporation <sup>3</sup>	1:50	FITC <sup>4</sup>

1: Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany; 2: Vector Laboratories, Burlingame, USA; 3: Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany; 4: Fluoresceinisothiocyanat

## Results

### Expression of mRNA for intermediate filament proteins

The integrity of the extracted total mRNA from the bovine ovaries was confirmed with the microfluid based automated electrophoresis system Experion (BioRad, Munich, Germany). The RQI (RNA quality indicator) for the studied samples ranged from 7,1 to 8,9 proving a good mRNA quality. Using RT-PCR specific transcripts for all intermediate proteins studied (CK8, CK18, desmin, vimentin, lamin A/C and lamin B1) were detected during all stages of the estrus cycle (proestrus, oestrus, dioestrus). The PCR products showed 100% homology to the known bovine gene after sequencing. A representative example for intermediate filament RT-PCR is shown in Fig. 1.

**Fig.1:** Ethidium bromide stained gel of PCR amplification products

RT-PCR demonstrated the mRNA expression of all of the studied IFs in the bovine ovary. Lane 1: marker, lane 2: water, lane 3: CK8 (148 bp), lane 4: CK18 (131 base pairs, bp), lane 5: lamin A/C (117 bp), lane 6: lamin B1 (103 bp), lane 7: vimentin (150 bp), lane 8: desmin (141bp)

#### Immuno-localisation of intermediate filament proteins

The immuno-localisation of the intermediate filament proteins studied appeared to be very similar, irrespective of the method (immunohistochemistry or immunofluorescence) used. Fixation with Bouin's fluid gave consistently the best results and was therefore used for the subsequent evaluation of the staining intensity. After formalin fixation the intensity of the immunostaining was distinctly reduced, probably to the cross linking of proteinous antigens by formalin. The results are summarized in Table 4.

**Table 4.** Localisation of vimentin cytokeratin 5, 8, 14, 18, and 19 and desmin in the bovine ovary

	Vim	CK 5		CK 8, 14		CK 18		CK 19	Des
	IHC	IHC	IF	IHC	IF	IHC	IF	IHC	IF
Surface epithelium	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Stroma cells	+ / ++	-	-	-	-	-	-	-	-
Endothelium	++	+-	++	-	-	+ / +	++	-	-
Smooth muscle cells	-	+	++	-	-	-	-	-	++ / +++
Rete ovarii	-	-	-	-	-	++	++	++	-
Oocytes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Granulosa cells of									
Primordial follicles	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Primary follicles	+-	-	-	-	-	++	++	-	-
Secondary follicles	+ / ++ <sup>1</sup>	-	-	-	-	++ / +++	+++	-	-
Antral follicles	- up to +++ <sup>2</sup>	-	-	-	-	+ - up to +++ <sup>2</sup>	+ - up to +++ <sup>2</sup>	-	-
Theca cells	++	-	-	-	-	-	-	-	-

Intensities of immunostaining: -: negative; +-: weak; +: moderate; ++: distinct; +++: strong. Vim: vimentin; CK: cytokeratin; Des: desmin; IHC: immunohistochemistry; IF: immunofluorescence; 1: in late secondary follicles basal and luminal layer; 2: for detailed description see text.

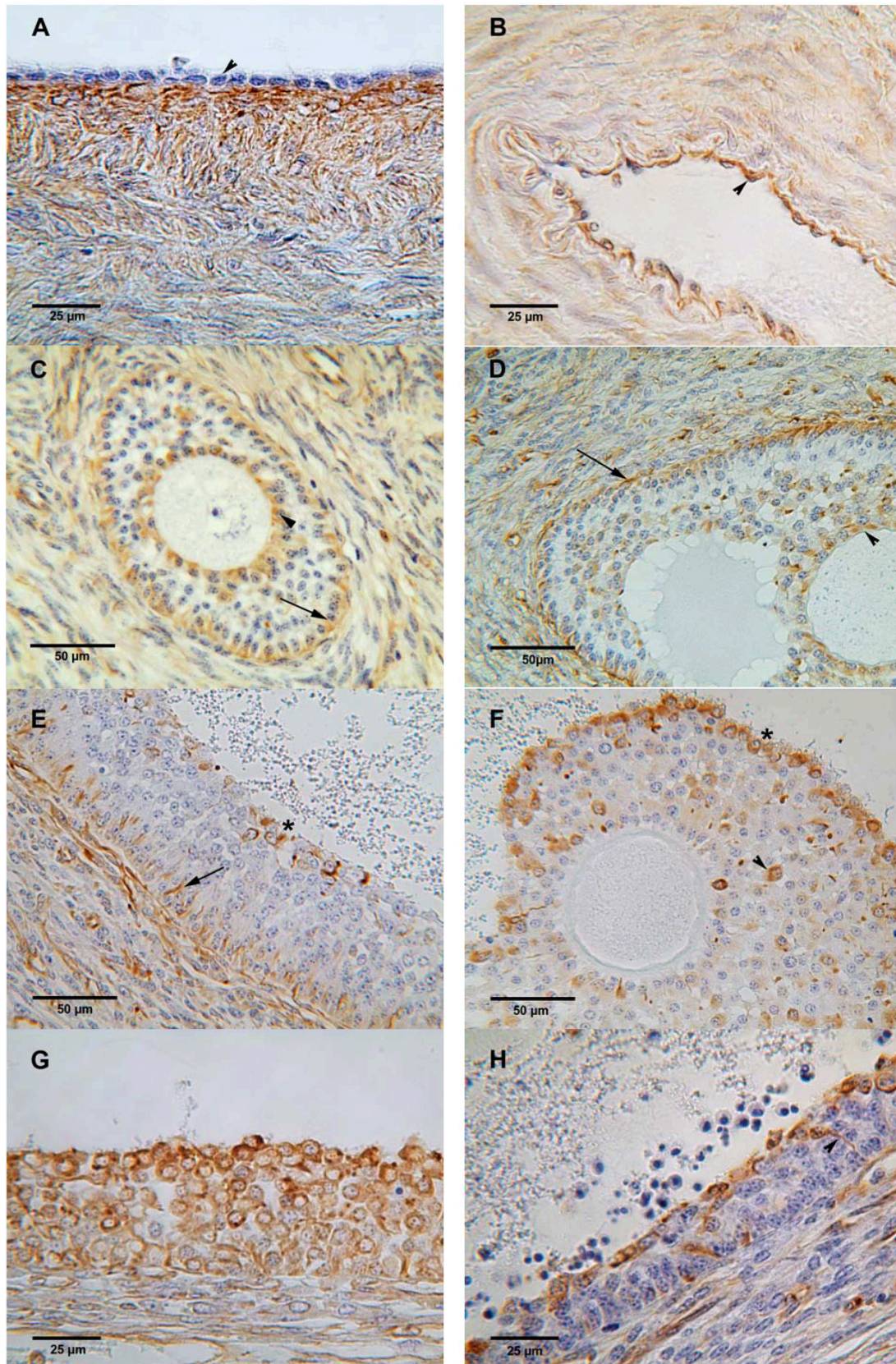
#### Immuno-localisation of vimentin

The ovarian surface epithelium was negative, but usually resting on a layer of distinctly positive stromal cells (Fig.2.A). Vimentin was also found in the endothelium (Fig.2.B) and in many fibroblasts of the ovarian stroma. Primordial follicles were negative and in primary and secondary follicles granulosa cells gave occasionally a weak positive staining for vimentin. In late secondary follicles the basal and most apical layer (which is in contact with the zona pellucida) usually showed a marked immunostaining for vimentin, whereas in the intermediate layers of the follicles only scattered granulosa cells were positive (Fig.2.C). Early antral follicles gave a similar pattern of vimentin immunoreactivity with a distinct



infranuclear staining in the cytoplasm of the basal granulosa cell layer and in the cells of the corona radiata with cytoplasmic staining localised towards the zona pellucida (Fig.2.D). In larger antral follicles different patterns of immunostaining for vimentin were observed. Basal and luminal cells were positive and basal cells showed cytoplasmic staining, which concentrated above the nuclei (Fig.2.E). In the intermediate layers of the follicles nearly all cells were negative. In the cumulus oöphorus scattered cells were positive, but there was no positive immunoreaction in all corona radiata cells as seen in early antral follicles (Fig.2.F). In several larger antral follicles nearly all granulosa cells showed a very strong immunostaining for vimentin (Fig.2.G). A third type of antral follicles displayed a positive immunoreaction of luminal cells; a small number of positive cells were scattered within the other layers of the membrana granulosa. The cytoplasm of several of these vimentin positive luminal cells appeared to reach the basal lamina of the follicles (Fig.2.H).

The theca interna and theca externa contained a variable number of distinctly vimentin positive fibroblasts. The oocytes of all follicle stages, from primordial to antral follicles, were negative after incubation with antibodies against vimentin.

**Fig. 2:** Immunostaining for vimentin in the bovine ovary

A: The ovarian surface epithelium (arrowhead) is resting on a layer of distinctly positive stromal cells. B: Blood vessel with positive endothelium (arrowhead). C: Late secondary follicle with a distinctly positive basal (arrow) and luminal

(arrowhead) granulosa cell layer. Within the intermediate layers of the follicle wall only scattered granulosa cells are immunopositive. D: Early antral follicle with a distinct infranuclear staining within the cytoplasm of the basal granulosa cell layer (arrow) and a cytoplasmic staining directed towards the zona pellucida in the corona radiata cells (arrowhead). E-H: Large antral follicles with different staining patterns. E, F: Positive basal cells showing cytoplasmic staining that concentrates above the nuclei (arrow). Luminal cells (asterisk) and scattered cells of the cumulus oöphorus (arrowhead) show a positive immunostaining. G: Nearly all granulosa cells show a very strong immunostaining for vimentin. H: Atretic follicle with immunostaining in luminal cells and a small number of cells scattered in the remaining layers of the membrana granulosa. Arrowhead: Antral cell that extends to the basal lamina of the follicle.

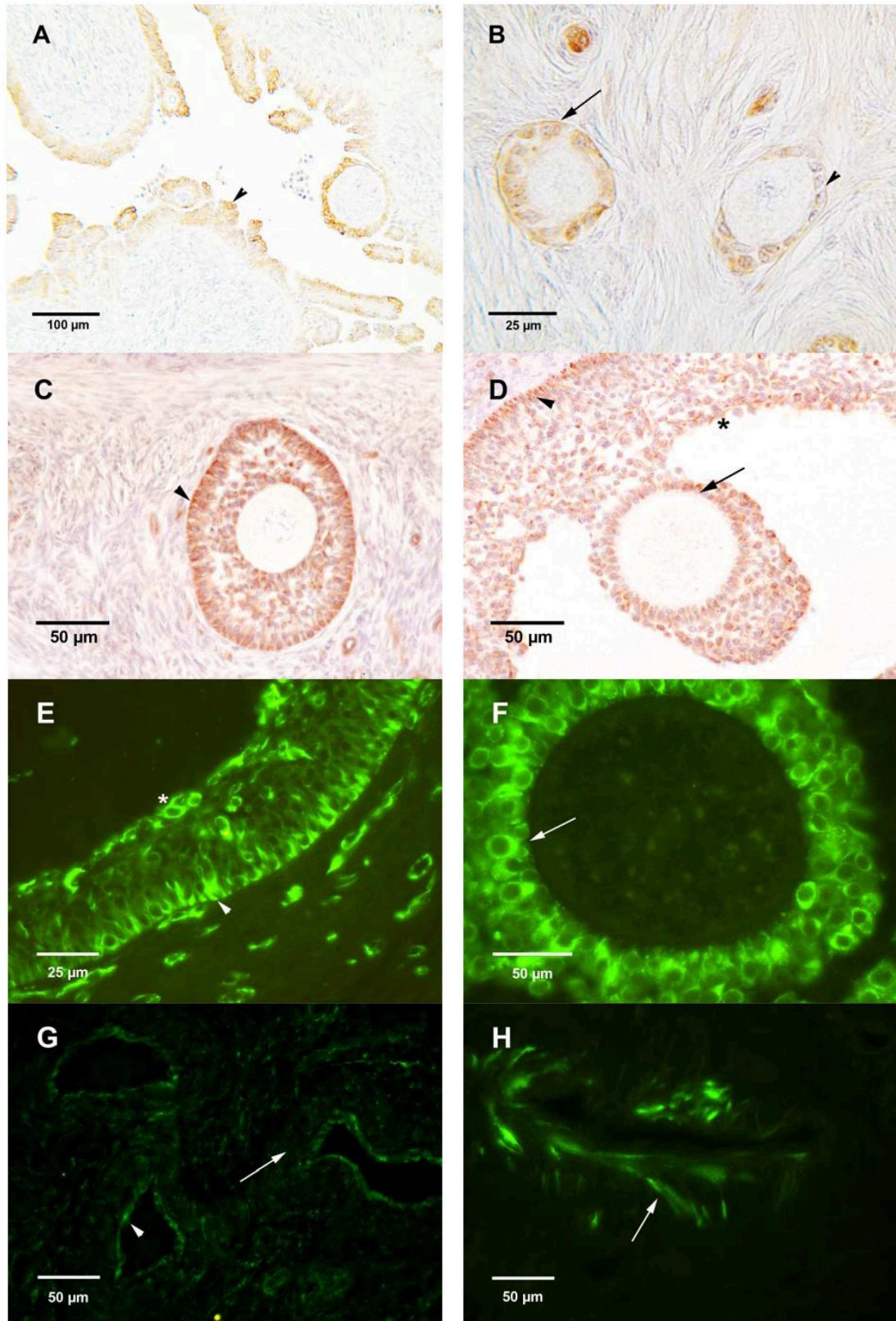
#### Immuno-localisation of cytokeratins (CK5, CK8, CK18, CK19)

In the present study the localisation of five different cytokeratins was investigated, i.e. two basic (CK5, CK8) and three acidic (CK14, CK18, CK19) cytokeratins. The ovarian surface epithelium displayed a strong cytoplasmic immunostaining along the whole periphery of the organ for all cytokeratins investigated. The epithelium lining the rete ovarii was consistently immunopositive for CK18 and CK19 (Fig.3.A). An interesting pattern of immunostaining for CK18 was seen in the different classes of follicles. The oocyte did not stain positively for CK18 at any stage of follicular development. In primordial follicles, the flat follicular cells also remained negative, whereas most of the cuboidal follicle cells of primary follicles appeared distinctly CK18 positive (Fig.3.B). Most follicle cells of the multilayered secondary follicles showed a distinct to strong immunostaining for CK18. In the basal cell layer (directed towards the theca interna) the CK18 positive material completely occupied the infranuclear area of the follicle cells, whereas in the apical cell layer (directed towards the forming zona pellucida) immunopositive staining appeared focused supernuclearly. The cells of the intermediate layers, which were also mostly CK18 positive within their cytoplasm showed varying shapes and therefore also a varying localisation of the CK18 positive material (Fig. 3.C). In tertiary follicles a similar pattern was seen. Basal

and luminal cells as well as apical cells surrounding the oocyte displayed a distinct to strong immunostaining for CK18, whereas in the intermediate cell layers only scattered cells appeared strongly positive (Fig.3.D-F). The theca interna and theca externa contained few distinctly CK18 positive fibroblasts. CK5 only displayed immunostaining in the endothelium and tunica media of blood vessels (Fig.3.G).

#### Immuno-localisation of desmin

Desmin immunoreactivity was demonstrated in the smooth muscle cells of the tunica media of the blood vessels (Fig.3.H). All cells of the follicles (follicle and granulosa cells and oocytes), as well as the other cellular structures of the ovary (surface epithelium, stroma cells, rete cells, endothelia), were consistently negative after incubation with desmin antibodies.

**Fig. 3:** Immunostaining for cytokeratins and desmin in the bovine ovary

A: CK19 positive cells of the rete ovarii (arrowhead). B-F: Immunostaining of CK18. B: Primordial follicle with negative flat follicular cells (arrowhead) and a primary follicle with distinctly CK18 positive cuboidal follicle cells (arrow). C: Secondary follicle with a distinct to strong immunostaining for CK18. In the basal cells directed towards the theca interna the positive staining completely occupies

the infranuclear area of the follicle cells (arrowhead). D-F: Antral follicles with basal (arrowhead) and luminal (asterisk) and corona radiata cells surrounding the oocyte (arrow) show a distinct to strong immunostaining for CK 18, whereas in the intermediate cell layers only scattered cells appear strongly positive. G: Distinct CK5 immunofluorescence in the endothelium (arrowhead) and tunica media (arrow) of blood vessels. H: Strong desmin immunofluorescence in smooth muscle cells of the tunica media (arrow) of a blood vessel.

#### Immuno-localisation of lamin A and lamin B1

No specific staining for lamin A or lamin B1 could be obtained with the antibodies used in this study, both with and without pre-treatment using a permeabilization solution (citrate buffer) in a microwave. A distinct immunostaining was found in the cytoplasm of granulosa cells of antral follicles, which was confined to the cytoplasm of the cells (and not, as expected, to the lamina of the nuclei) and was therefore considered as unspecific.

#### **Discussion**

The cellular cytoskeleton is not only a structural element which mediates functional compartmentalization, but also contributes to many cellular processes such as transport, mitosis, secretion, formation of cell extensions, intercellular communication and apoptosis (Chang and Goldman, 2004; Marceau et al., 2007; Goldman et al., 2008). IFs are the most stable component of the cytoskeleton in the cells under physiological conditions. They have a long half-life, which is roughly equivalent to the cell generation time, whereas the half-life of the corresponding mRNAs are very short (Coleman and Lazarides, 1992). Therefore it was assumed for a long time that the main role of IFs is to maintain a fixed cellular architecture that protects cells against mechanical stress. Recently, it has become obvious that IFs are highly dynamic and reorganize by phosphorylation, glycosylation and transglutamination (Omary et al., 2006; Hyder et al., 2008). Several new studies suggest that the IF network is therefore involved in many important physiological functions, such as signal transduction, cell polarity and

gene regulation (Kim et al., 2006; Pallari and Eriksson, 2006; Kim and Coulombe, 2007; Kim et al., 2007; Hyder et al., 2008; Iwatsuki and Suda, 2010). We have examined the distribution of four groups of intermediate filaments (cytokeratins, vimentin, desmin and lamins) in the somatic and germinal cells of the bovine ovary. Whereas the first three groups of IF proteins (cytokeratins, vimentin, desmin) form a characteristic network in the cytoplasm of the cells, lamins build an intranuclear IF network, the nuclear lamina, lying underneath the inner nuclear membrane.

The expression of several classes of cytoplasmic IFs in the ovary has been described for several mammalian species (Czernobilsky et al., 1985; Gall et al., 1992; Gallicano et al., 1992; Santini et al., 1993; Gallicano et al., 1994; Bukovsky et al., 1995; Nilsson et al., 1995; Ricken et al., 1995; Van Den Hurk et al., 1995; Khan-Dawood et al., 1996; Appert et al., 1998; Pan and Auersperg, 1998; van Wezel et al., 1999; Loffler et al., 2000; Perez-Martinez et al., 2001; Marettova and Maretta, 2002; Hafner et al., 2004; Akihara et al., 2007; Ortega et al., 2007; Arnault et al., 2010; Townson et al., 2010) and has elucidated origins of certain ovarian cell types during prenatal development. In several of the above cited studies, vimentin and cytokeratins were detected within granulosa cells of follicles at various stages of growth and atresia, in luteal cells of the corpus luteum throughout the luteal phase, and in oocytes from both fetal and adult ovaries. Nuclear intermediate filaments, called lamins, so far, have been only found in the oocytes of *Xenopus* (Gall et al., 1989) and in mammalian germ cells only in the oocyte of the mouse (Arnault et al., 2010).

Van Den Hurk et al. (1995) used an antibody against human skin keratin and described in nine month old cattle a positive reaction only in the ovarian surface epithelium and the rete ovarii. They observed desmin immunoreactivity only in smooth muscle cells of vessels. For vimentin they described a positive reaction in a few granulosa cells of primary follicles and in granulosa cells of secondary and small antral follicles near the basal lamina and the oocyte. In large antral follicles they observed immunostaining for vimentin only in granulosa cells near to the oocyte. Van Wezel et al. (1999) got similar results for vimentin expression.

In the bovine ovary Perez-Martinez et al. (2001) described a positive reaction for CK 6, 7, 8/18 and 14 in the surface epithelium and for CK 6, 7, 8/18 and 14 and vimentin in the rete ovarii. CK 1, 5, 10 and 13 were negative in both structures.

The expression in follicle cells was not examined in their study.

Ortega et al. (2007) were interested in cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease and therefore examined antral follicles bigger than five mm in diameter and used desmin and vimentin antibodies and one antibody detecting several cytokeratins. They described a positive desmin reaction predominantly in smooth muscle cells of the tunica media layer of blood vessels and in a small number of cells in the theca externa of antral follicles. They observed vimentin immunoreactivity in the granulosa cell layer of healthy, atretic and cystic follicles with significant higher intensity in atretic and cystic follicles than in antral follicles. Also, they described a larger intensity of vimentin immunostaining in theca externa cells of atretic and cystic follicles. Ortega et al. (2007) reported also a positive vimentin reaction in the endothelial-cell lining of blood capillaries. For cytokeratins these authors showed a weak immunostaining in the theca layers and in the granulosa cells of antral follicles and a higher staining intensity in atretic and cystic follicles of these cells. Townson et al. (2010) reported of the expression and distribution of CK 8/18 IFs in bovine antral follicles and corpus luteum. Our results, using a much broader set of antibodies to IF-filaments show some marked differences to these earlier studies. Contrary to Townson et al. (2010) we were able to demonstrate a positive CK18 immunostaining already in primary follicles. The expression pattern in antral follicles in our study differed also from that reported by Van Den Hurk et al. (1995). The observed differences may be due to different antibodies used in earlier studies, where the specificity to bovine IFs has not been evaluated, and to different protocols of fixation.

In the present study, we used antibodies against Type I CK (acidic cytokeratins: CK14, CK18, CK19) and Type II CK (basic cytokeratins: CK5 and CK8). Among these, only antibodies against CK18 gave a characteristic pattern of immunostaining in a number of ovarian tissues, which included the surface epithelium, the follicle cells, the endothelium of blood vessels and rete ovarii. Antibodies against all other CKs resulted in a weak staining of a limited number of cellular structures (CK5, CK19) or were completely negative (CK8, CK14 - apart from the surface epithelium). Interestingly, the expression pattern of CKs in the follicle cells is distinctly different from that of the ovarian surface epithelium. This finding does not support the hypothesis that follicle cells are derived from



the ovarian surface epithelium. On the other hand, it can not be completely ruled out that surface epithelium derived follicular cells change the expression of CKs, with only CK18-filaments regularly found in the cytoplasm of follicle cells from the beginning of follicle activation in primary follicles up to the Graaf follicle. This could be interpreted as an adaption of the cellular cytoskeleton of the follicle cells to their new role as supporting cells of the growing oocyte. Different to our results, Spanel-Borowski (2011) only found an expression of cytokeratin positive cells in preovulatory follicles. From her data, she forwarded the hypothesis that the reappearance of cytokeratin positive cells in the basal area of antral follicles can be explained by upcoming danger signals (Spanel-Borowski, 2011) indicating an increasing oxidative stress for the follicle, which would finally lead to ovulation. Our results do not support this assumption, as we found already an expression of CK18 in growing primary, secondary and early antral follicles, which is certainly not related to the events of ovulation.

Our immunohistochemical study also revealed a characteristic pattern of vimentin immunoreactivity in the bovine ovary. In fetal bovine skin used as positive control tissue, mesenchymal cells of the dermis and the endothelium of blood vessels were intensely stained. Vimentin was found in many but not all fibroblasts of the ovarian stroma. Whereas the oocytes consistently remained negative after immunostaining for vimentin, the follicle cells contained vimentin positive cells during late preantral and antral stages of follicular development as Ortega et al. (2007) described as well, but no vimentin positive cellular protrusions of follicle cells appeared to penetrate the zona pellucida as described by Van Den Hurk (1995). Similar to Towson et al. (2010) for cytokeratins, we are critical of findings that homogeneous vimentin reactivity is predominantly present in atretic follicles as we regularly found atretic follicles with only few vimentin positive granulosa cells (Fig.2.H). The theca surrounding the membrana granulosa always contained a various number of distinctly vimentin positive fibroblasts.

Investigations of the cytoskeleton of oocytes mostly focussed on changes of the microtubular system and actin filaments during oocyte growth and maturation (Ferreira et al., 2009). The microfilaments and microtubules of the cytoskeleton promote the movement of various cellular organelles, such as mitochondria, ribosomes and Golgi cisternae within the cytoplasm during oocyte maturation and act on chromosome segregation. Very few data on the other hand are available on

the intermediary filament system of mammalian oocytes or even vertebrate oocytes. In domestic animals, cytokeratin has so far only been described in several older studies in sheep oocytes (Gall et al., 1989; Gall et al., 1992). Our data suggest that no or only a very limited expression of cytoplasmic intermediate filament proteins (CKs and vimentin) occurs during bovine oocyte development, which could be under the detection limits of immunohistochemistry and immunofluorescence. We assume that the establishment of a pronounced intermediate filament network occurs only after the blastocyst has formed. In *in vitro* cultured bovine oocytes nuclear A-type lamins and lamin B2 were immunohistochemically detected (Kelly et al., 2010), but in fixed sections we were not able to detect lamins immunohistochemically in bovine oocyte nuclei. However, using RT-PCR the expression of lamin A/C- and lamin B1- mRNA in the bovine ovary was shown.

Certainly of great interest is the co-expression of CK18 and vimentin in the granulosa cells of bovine follicles. It has been hypothesized (van Wezel et al., 1999; Rodgers and Irving-Rodgers, 2010), that the fate of granulosa cells of antral follicles is either redifferentiation at the time of ovulation or forming a non-epithelial cell type, the granulosa lutein cells, or death and destruction of the membrana granulosa in follicular atresia. As the cells of the basal zone of the membrana granulosa express LH receptors (Amsterdam et al., 1975) and steroidogenic enzymes (Zoller and Weisz, 1978; Zoller and Weisz, 1979; Tabarowski and Szoltys, 1987), the idea has been put forward that these cells are the most differentiated cells of the follicle epithelium (Amsterdam and Rotmensch, 1987). In our opinion, the issue of whether cells of the different layers of the membrana granulosa are in different stages of differentiation is more complex. Clearly, there is a characteristic staining pattern for both IF proteins CK18 and vimentin in the multilayered membrana granulosa of the antral follicles, with the most distinct staining in its basal and antral zone. Van Wezel et al. (1999) reported that involucrin, a keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in the middle layer of the membrana granulosa. They postulate that replication of follicle cells take place in the middle zone of the membrana granulosa and then migrate in opposite directions, towards the basal lamina and the antrum. In our present study we consistently found vimentin positive cells extending from the basal lamina up to the antrum, implying that the

cellular architecture of the membrana granulosa is more complex than the conventional model of a multilayered follicular epithelium. In our opinion additional studies are needed to convincingly prove the role of the middle zone of the membrana granulosa as the replication zone of granulosa cells in antral follicles, as has been hypothesized by Rodgers and Irving-Rodgers (2010).

### **Acknowledgement**

We are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, GRK1029) for supporting this study. The skilful technical assistance of Gabi Rußmeier is gratefully acknowledged.

### **References**

- Akihara, Y., Shimoyama, Y., Kawasako, K., Komine, M., Hirayama, K., Terasawa, A., Ohmachi, T., Matsuda, K., Okamoto, M., and Taniyama, H., 2007: Histological and immunohistochemical evaluation of canine ovary. *Reprod. Domest. Anim.* **42**, 495-501.
- Albers, K., and Fuchs, E., 1992: The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cytol.* **134**, 243-79.
- Amsterdam, A., Koch, Y., Lieberman, M. E., and Lindner, H. R., 1975: Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.* **67**, 894-900.
- Amsterdam, A., and Rotmensch, S., 1987: Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr. Rev.* **8**, 309-37.
- Appert, A., Fridmacher, V., Locquet, O., and Magre, S., 1998: Patterns of keratins 8, 18 and 19 during gonadal differentiation in the mouse: sex- and time-dependent expression of keratin 19. *Differentiation* **63**, 273-84.
- Arnault, E., Doussau, M., Pesty, A., Lefevre, B., and Courtot, A. M., 2010: Review: Lamin A/C, caspase-6, and chromatin configuration during meiosis resumption in the mouse oocyte. *Reprod Sci* **17**, 102-15.
- Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W., and Einspanier, R.,

- 2000: Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* **63**, 1106-14.
- Bukovsky, A., Keenan, J. A., Caudle, M. R., Wimalasena, J., Upadhyaya, N. B., and Van Meter, S. E., 1995: Immunohistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immune and epithelial factors to folliculogenesis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **33**, 323-40.
- Capetanaki, Y., Bloch, R. J., Kouloumenta, A., Mavroidis, M., and Psarras, S., 2007: Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp. Cell Res.* **313**, 2063-76.
- Chang, L., and Goldman, R. D., 2004: Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 601-13.
- Coleman, T. R., and Lazarides, E., 1992: Continuous growth of vimentin filaments in mouse fibroblasts. *J. Cell Sci.* **103 ( Pt 3)**, 689-98.
- Coulombe, P. A., and Wong, P., 2004: Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat. Cell Biol.* **6**, 699-706.
- Czernobilsky, B., Moll, R., Levy, R., and Franke, W. W., 1985: Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur. J. Cell Biol.* **37**, 175-90.
- Dahl, K. N., Kahn, S. M., Wilson, K. L., and Discher, D. E., 2004: The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J. Cell Sci.* **117**, 4779-86.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., and Navarro, P. A., 2009: Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**, 836-48.
- Gall, L., Le Guen, P., and Huneau, D., 1989: Cytokeratin-like proteins in the sheep oocyte. *Cell Differ. Dev.* **28**, 95-104.
- Gall, L., Smedt, V., and Ruffini, S., 1992: Co-Expression of Cytokeratins and Vimentin in Sheep Cumulus-Oocyte Complexes. Alteration of

- Intermediate Filament Distribution by Acrylamide. *Dev. Growth Differ.* **34**, 579-587.
- Gallicano, G. I., Larabell, C. A., Mcgaughey, R. W., and Capco, D. G., 1994: Novel cytoskeletal elements in mammalian eggs are composed of a unique arrangement of intermediate filaments. *Mech. Dev.* **45**, 211-26.
- Gallicano, G. I., Mcgaughey, R. W., and Capco, D. G., 1992: Cytoskeletal sheets appear as universal components of mammalian eggs. *J. Exp. Zool.* **263**, 194-203.
- Goldman, R. D., Grin, B., Mendez, M. G., and Kuczmariski, E. R., 2008: Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 28-34.
- Green, K. J., and Simpson, C. L., 2007: Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2499-515.
- Gumuz, E., H.E. Bulut, and Kaloglu C., 2010: Cytoskeletal changes in oocytes and early embryos during in vitro fertilization process in Mice. *Anat. Histol. Embryol.* **39**, 51-58.
- Hafner, M., Wenk, J., Nenci, A., Pasparakis, M., Scharffetter-Kochanek, K., Smyth, N., Peters, T., Kess, D., Holtkotter, O., Shephard, P., Kudlow, J. E., Smola, H., Haase, I., Schippers, A., Krieg, T., and Muller, W., 2004: Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis* **38**, 176-81.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., and Aebi, U., 2007: Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 562-73.
- Hesse, M., Magin, T. M., and Weber, K., 2001: Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J. Cell Sci.* **114**, 2569-75.
- Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H., 1981: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*

**29**, 577-80.

- Hyder, C. L., Pallari, H. M., Kochin, V., and Eriksson, J. E., 2008: Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett.* **582**, 2140-8.
- Iwatsuki, H., and Suda, M., 2010: Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function. *Acta Histochem Cytochem* **43**, 19-31.
- Kelly, R. D., Alberio, R., and Campbell, K. H., 2010: A-type lamin dynamics in bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 956-65.
- Khan-Dawood, F. S., Yusoff Dawood, M., and Tabibzadeh, S., 1996: Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. *Biol. Reprod.* **54**, 734-42.
- Kim, S., and Coulombe, P. A., 2007: Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* **21**, 1581-97.
- Kim, S., Kellner, J., Lee, C. H., and Coulombe, P. A., 2007: Interaction between the keratin cytoskeleton and eEF1Bgamma affects protein synthesis in epithelial cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 982-3.
- Kim, S., Wong, P., and Coulombe, P. A., 2006: A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* **441**, 362-5.
- Loffler, S., Horn, L. C., Weber, W., and Spanel-Borowski, K., 2000: The transient disappearance of cytokeratin in human fetal and adult ovaries. *Anat. Embryol. (Berl.)* **201**, 207-15.
- Madekurozwa, M.-C., B.O. Oke, and A.K. Akinloye, 2010: The immunohistochemical localization of desmin and smooth muscle actin in the ovary of the African Giant Rat (*Cricetomys gambianus*) during the oestrus cycle. *Anat. Histol. Embryol.* **39**, 81-86.
- Marceau, N., Schutte, B., Gilbert, S., Loranger, A., Henfling, M. E., Broers, J. L., Mathew, J., and Ramaekers, F. C., 2007: Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp. Cell Res.* **313**, 2265-81.

- Marettova, E., and Marett, M., 2002: Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary. *Acta Histochem.* **104**, 431-4.
- Mattout, A., Dechat, T., Adam, S. A., Goldman, R. D., and Gruenbaum, Y., 2006: Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 335-41.
- Nilsson, I., Mattsson, M. O., and Selstam, G., 1995: Presence of the intermediate filaments cytokeratins and vimentin in the rat corpus luteum during luteal life-span. *Histochem. Cell Biol.* **103**, 237-42.
- Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M., and Liao, J., 2006: "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 383-94.
- Ortega, H. H., Salvetti, N. R., Muller, L. A., Amable, P., Lorente, J. A., Barbeito, C. G., and Gimeno, E. J., 2007: Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *J. Comp. Pathol.* **136**, 222-30.
- Pallari, H. M., and Eriksson, J. E., 2006: Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci. STKE* **2006**, pe53.
- Pan, J., and Auersperg, N., 1998: Spatiotemporal changes in cytokeratin expression in the neonatal rat ovary. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 27-35.
- Pang, Y. Y., Schermer, A., Yu, J., and Sun, T. T., 1993: Suprabasal change and subsequent formation of disulfide-stabilized homo- and hetero-dimers of keratins during esophageal epithelial differentiation. *J. Cell Sci.* **104** ( Pt 3), 727-40.
- Parnaik, V. K., 2008: Role of nuclear lamins in nuclear organization, cellular signaling, and inherited diseases. *Int Rev Cell Mol Biol* **266**, 157-206.
- Perez-Martinez, C., Garcia-Fernandez, R. A., Escudero, A., Ferreras, M. C., and Garcia-Iglesias, M. J., 2001: Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract. *J. Comp. Pathol.* **124**, 70-8.
- Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., and Fainzilber, M., 2005: Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* **45**, 715-26.

- Qin, Z., Buehler, M. J., and Kreplak, L., 2010: A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *J. Biomech.* **43**, 15-22.
- Ricken, A. M., Spanel-Borowski, K., Saxer, M., and Huber, P. R., 1995: Cytokeratin expression in bovine corpora lutea. *Histochem. Cell Biol.* **103**, 345-54.
- Rodgers, R. J., and Irving-Rodgers, H. F., 2010: Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction* **139**, 309-18.
- Santini, D., Ceccarelli, C., Mazzoleni, G., Pasquinelli, G., Jasonni, V. M., and Martinelli, G. N., 1993: Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry* **99**, 311-9.
- Spanel-Borowski, K., 2011: Footmarks of innate immunity in the ovary and cytokeratin-positive cells as potential dendritic cells. *Adv. Anat. Histol. Cell Biol.* **209**. 1- 110.
- Tabarowski, Z., and Szoltys, M., 1987: Histochemical localization of delta 5-3 beta-HSDH activity in preovulatory rat follicles. *Folia Histochem. Cytobiol.* **25**, 149-53.
- Townson, D. H., Putnam, A. N., Sullivan, B. T., Guo, L., and Irving-Rodgers, H. F., 2010: Expression and distribution of cytokeratin 8/18 intermediate filaments in bovine antral follicles and corpus luteum: an intrinsic mechanism of resistance to apoptosis? *Histol. Histopathol.* **25**, 889-900.
- Tzur, Y. B., Wilson, K. L., and Gruenbaum, Y., 2006: SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 782-8.
- Van Den Hurk, R., Dijkstra, G., Van Mil, F. N., Hulshof, S. C., and Van Den Ingh, T. S., 1995: Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 459-67.
- Van Wezel, I. L., Krupa, M., and Rodgers, R. J., 1999: Development of the membrana granulosa of bovine antral follicles: structure, location of



mitosis and pyknosis, and immunolocalization of involucrin and vimentin. *Reprod. Fertil. Dev.* **11**, 37-48.

Zoller, L. C., and Weisz, J., 1978: Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle, using quantitative cytochemistry. *Endocrinology* **103**, 310-3.

Zoller, L. C., and Weisz, J., 1979: A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry* **62**, 125-35.

## 2. Application of Laser-Assisted Microdissection for Gene Expression Analysis of Mammalian Germ Cells

ORIGINAL ARTICLE

### Application of Laser-Assisted Microdissection for Gene Expression Analysis of Mammalian Germ Cells

R. Kenngott<sup>1</sup>, A. AL-Banaw<sup>2</sup>, M. Vermehren<sup>1</sup>, J. Wendl<sup>1</sup> and F. Sinowatz<sup>1,\*</sup>

Addresses of authors: <sup>1</sup> Lehrstuhl für Tieranatomie II, Department of Veterinary Sciences, LMU München, Veterinarstrasse 13, D-80539 Munich, Germany;

<sup>2</sup> Medical Laboratory Sciences Department, Faculty of Allied Health, Kuwait University, PO Box 31470, Sulaibekhat, 90805, Kuwait

**\*Correspondence:**

e-mail: f.sinowatz@anat.vetmed.uni-muenchen.de

With 1 figure and 2 tables

Received June 2009; accepted for publication February 2010

doi: 10.1111/j.1439-0264.2010.00997.x

#### Summary

Laser-assisted microdissection (LAM) is an important method to provide new significant insights into many embryological processes. To understand these processes, it is important to obtain specific populations of cells from complex tissue in an efficient and precise manner and to combine with many different molecular biological methods. During the last few years, the sophistication of the techniques of LAM has increased significantly and made the procedure easy to use. New micro-extraction protocols for DNA, RNA and proteins now allow broad downstream applications in the fields of genomics, transcriptomics and proteomics. In this review, we give a short overview of the application of LAM in combination with quantitative qPCR for the analysis of gene expression in mammalian germ cells.

#### Introduction

Morphological characterization and identification of cell differentiation within heterogeneous tissues are the basis for the assessment of developmental processes during embryogenesis. The use of homogenates of whole tissue samples for quantitative measurements by molecular methods like RT-qPCR (Bustin et al., 2009) usually results in average values only, determined by the varying contribution of all the heterogeneous cellular elements of the sample, whose proportions are unknown (Finke et al., 2006; Pinzani et al., 2006). During the last years, laser-assisted microdissection (LAM) techniques were developed that allow the precise and rapid procurement of capture microdissection and laser cutting microdissection (Murray, 2007). Together with qPCR techniques and microarrays, it is now feasible to study gene expression in a defined cell population from complex normal and diseased tissues (Pinzani et al., 2006; Chinge et al., 2007). Recent innovations have at least partly overcome many of the earlier problems of LAM including poor visualization of cell morphology in the absence of a cover slip, the extremely small sample size obtained for DNA, RNA and protein analysis (Erickson et al., 2007; De Spiegelaere et al., 2008), and of several preparatory steps such as

formalin fixation and paraffin embedding of the material (Cox et al., 2008). The laser capture microdissection system has been developed by Emmert-Buck and colleagues (Emmert-Buck et al., 1996). This system uses a thermo-plastic membrane attached to a plastic cap that overlies the cells to be procured. A small area of the plastic membrane is briefly melted by a low power, infrared laser focussed on the cells of interest. The cells become attached to the molten plastic and can be lifted free from the remaining tissue. This procedure can be repeated many times, allowing the capture of multiple cells of interest on a membrane. After completion of the microdissection, the membrane with the procured attached cells can be removed from the supporting plastic cap and used for molecular analysis of interest. Laser cutting microdissection utilizes a narrow beam of an ultraviolet laser to mark and cut out the cells of interest from the surrounding tissue (Murray, 2007). The microdissected cells are captured into a collection tube, depending on the specific design and configuration of the laser cutting system. The Zeiss systems Palm MicroBeam (Zeiss, München, Germany) uses a UV-A-laser to microdissect and catapult the cells of interest into an overlying cap of a microtube (laser capture pressure catapulting). In the Leica systems (Leica LMD6500 and LMD7000), the isolated cells drop

by gravity into an underlying microtube. All these laser cutting systems operate completely contact free. Thus, the possibility of contamination from cells that are not specifically adhering to a plastic membrane, which could be a problem in laser capture microdissection systems, is completely avoided (Murray, 2007).

Accordingly, the use of LAM has been increased exponentially in several fields like pathology or oncology, but its application for developmental studies, however, is still very limited. In this study, we provide an overview of several successful applications of LAM in combinations with molecular techniques to study gene expression in mammalian germ cells.

### Application of LAM to Study Gene Expression in Male Germ Cells

The seminiferous epithelium with its subdivisions of defined spermatogenic stages (e.g. 14 in the rat, eight in bull and boar, eight in tomcat and dog) is extremely complex (Clermont and Lebond, 1955). Characteristic molecular and cytological events take place during spermatogenesis, when germ cells differentiate from their stem cells to spermatozoa (Sluka et al., 2008.)

Prior to the introduction of LAM techniques, expression studies in the seminiferous epithelium have been limited to the use of whole tissue approaches, such as Northern blots and qPCR (Fiszler and Kurpisz, 1998; Lalancette et al., 2006) or straight forward morphological techniques, such as immunocytochemistry and *in situ* hybridization, which are not really quantifiable (Sluka

et al., 2008). Additionally, gene expression studies of somatic and germ cell populations from the testis have been performed after *in vitro* culture. A significant disadvantage of this approach is that germ cells of a specific stage of their development cannot be isolated, as cell-specific markers that distinguish the cells from the other stages are lacking. In addition, it is very difficult to procure and culture certain cell types from the seminiferous epithelium, when they occur only in small numbers (such as spermatogonia) or adhere strongly to other cells by different types of adhesion junctions, as seen in the adhesion of differentiating spermatids to Sertoli cells.

Recent studies have shown that LAM in combination with qPCR can circumvent many of the problems encountered with previous techniques to study gene expression in the testis. The number of publications dealing with the use of LAM to study spermatogenesis and certain defined cell types of the mature and developing testis is still comparatively small, but the amount of information has increased significantly during the last years. A list of publications that have applied LAM to the mammalian testis is shown in Table 1. LAM isolated spermatogenic cells have been subjected to almost any available transcriptomic method, including real-time PCR and gene microarrays. The great advantage for transcriptomic studies compared with proteomic studies of the testis is that RNA can be easily amplified, and the tiny amount of material collected by LAM is usually sufficient for precise quantitative evaluation of gene expression. In addition to using the microdissected cells in DNA and RNA studies, it has been also proven that the small number of cells

Table 1. Publications that have applied LAM to study RNA in male germ cells of mammals

Title of publication	References
Germ cell-specific expression of c-kit in the human fetal gonad	Robinson et al. (2001)
Number, distribution pattern and identification of macrophages in the testis of infertile men	Frungeri et al. (2002a,b)
Stage-specific expression of genes associated with rat spermatogenesis: characterization by laser capture microdissection and real-time polymerase chain reaction	Sluka et al. (2002)
Protamin-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins	Steger et al. (2002)
Differential expression of two oestrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy	Gaskell et al. (2003)
Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptor	Geigerseder et al. (2003)
Expression of oestrogen receptor alpha and beta in the fetal baboon testis	Albrecht et al. (2004)
Identification of differentially expressed genes of primary spermatocyte against round spermatid isolated from human testis using the laser capture microdissection technique	Liang et al. (2004)
Increased expression of oestrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration	Tirado et al. (2004)
Characterization of hTAKR, a novel gene product in the aldo-keto-reductase family specifically expressed in human testis	Azuma et al. (2004)
CREM activator and receptor isoform expression in human male germ cells	Blocher et al. (2005)
Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm	Nakamura et al. (2008)
Application of laser capture microdissection in the analysis of gene expression in the testis	Sluka et al. (2008)

obtained by this technique can also be used for proteomic analysis (Mustafa et al., 2008). Combining laser capture microdissection and different types of mass spectrometers, proteins can be identified that are specific for various cell types, tissues and their pathological alterations (Mustafa et al., 2008).

The successful use of LAM to procure cells from the testis can be technically demanding and depends on numerous variables, such as fixation, embedding, staining procedure and RNA isolation (Goldsworthy et al., 1999). Sluka et al. (2008) investigated the influence of several fixatives (ethanol, methanol, acetone, methacarn, Bouin's fluid and formaldehyde) on tissue morphology and RNA yield of material isolated from frozen testicular section by LAM. From the three solvent fixatives (ethanol, methanol and acetone) studied, all three resulted in a similar yield and quality of RNA, but acetone gave the best morphology. The use of aqueous based fixatives (formaldehyde, Bouin's fluid) on frozen sections appeared to be very negative, and the morphology of the tissue was more or less destroyed. On the other hand, in wax-embedded sections, testicular morphology was best maintained after fixation in Bouin's fluid, formol or methacarn. Unfortunately, these fixatives resulted in a poor quality of the isolated mRNA after LAM, which probably would have caused severe problems for many downstream applications (Castiglione et al., 2007). In contrast to the results of Sluka et al. (2008) in the testis, it has been shown by other authors (Kim et al., 2003) using different fixatives (70% and 100% ethanol, isopropanol (50% and 100%), Carnoy's solution, methacarn) in a panel of several mouse embryonic and adult tissues (but not gonads) that methacarn appears to be the optimal fixative for obtaining good quality RNA from paraffin-embedded material. Contrary to formalin, methacarn does not cause cross-linkage between nucleic acids and proteins (Finke et al., 2006; Buesa, 2008) and does not covalently modify RNA by the addition of monomethylol groups to the bases, making subsequent RNA extraction, reverse transcription and quantification problematic. The negative effects of formalin fixation due to monomethylol additions to the nucleic acid bases can be partly overcome by simply incubating the RNA in formalin-free buffer (Tris, pH 8.5) at 70°C. This results in more 'free' RNA, which could act as template in reverse transcription or PCR (Farragher et al., 2008). Extended incubation of the sample in proteinase K can also improve the quality of the extracted RNA, possibly by the augmented removal of monomethylol groups (Jackson et al., 1990).

It has also been shown that staining of the tissue sections can influence the quality of RNA recovered after LAM. A light haematoxylin staining is usually recommended for most tissues (Pirzani et al., 2006) to limit the

exposure to inhibitory factors and contaminations. On the other hand, Ehrig et al. (2001) report no significant influence of the staining method on real-time PCR results of DNA amplification when tissue samples were isolated by LAM. The authors suggest that the tissue samples procured with LAM are too small to cause a significant carryover of dye substances into the proteinase K digestion solution or the PCR reaction tubes. Inhibitory factors, which may be found in haematoxylin or enhancing factors, like methyl green, are present in a too low concentration to produce any significant effect on tissue digestion or DNA amplification (Gassmann, 2003).

The influence of different staining procedures on RNA quality of LAM dissected material has also been thoroughly investigated by Murray (2007). He found that for all staining procedures, tissue sections should be exposed to the dye solution for the briefest period of time. Further single step histological staining methods are preferred which includes no differentiation steps. This decreases the loss of poorly fixed molecules from the tissue sections and reduces also the risk of chemical modification. For example, a single step cresyl blue stain can be used prior to laser microdissection (Lawire et al., 2001).

Total RNA yield and quality after LAM play a decisive role in the generation of accurate quantitative results from gene expression analysis experiments (Bustin and Nolan, 2004; Fleige and Pfaffl, 2006; Denisov et al., 2008). cDNA made from RNA that has been degraded is usually not amplified or labelled to the same degree as cDNA from intact RNA. However, for many studies, the isolation of high-quality RNA is not possible, for instance, from clinical samples or from paraffin sections of archival tissue. The exact determination of RNA quality is therefore of utmost importance during the quantitative gene expression analysis workflow (Gingrich et al., 2006). Until recently, the traditional approach of determining RNA quality was agarose gel electrophoresis. This approach is usually not possible for LAM procured tissue, as it requires relatively large amounts (5–10 mg) of RNA. During the last years, automated electrophoresis systems (Agilent 2100 Bioanalyzer from Agilent, Böblingen, Germany; Experion from BioRAD, Munich, Germany, LabChip, Caliper Life Sciences GmbH, Rüsselsheim, Germany) have been developed that provide an effective method for determining both quantity and quality of total RNA – several hundred times less than that required for gel electrophoresis (Gingrich et al., 2006). For the Experion system (Bio-Rad, Munich, Germany), two different chips exist for measuring the total RNA quality and quantity depending on the amount of RNA: the Standard Sense Chip (5–500 ng/μl) versus the High Sense chip (100–5000 pg/μl). The High Sense Chip is regarded especially suitable for application with LAM samples.

### Application of LAM to Study Gene Expression in Female Germ Cells

Using molecular techniques on manually isolated germ cells or *in vitro* matured oocytes, a rough framework on gene expression during the prenatal and postnatal gene expression in female germ cells has been established during the last few years (Sirard, 2001). In female mammals, meiosis proceeds in two steps, called first and second meiotic division. The first starts in most species during fetal life or around birth (dog and cat) and the second in the pre-ovulatory period. Preceding meiosis, the DNA content of the early female germ cells becomes tetraploid and then they enter into the prophase of the first meiotic division. The chromosomes become then partially condensed and rearranged by the process of crossing over to create chromosomal diversity in the next generation. The prophase progresses until a stage called diplotene phase, where it becomes arrested. The chromatin of the female germ cells shows a special conformation that is intermediate between full chromatin condensation and interphase. During this special prophase period, which may last for many years in large animals and up to 40 years in humans, the oocyte appears inactive and the chromosome appearance changes little.

When a primary oocyte starts to grow in the primordial follicle, the uncondensed loops of chromatin in the diplotene state ensure the transcription of the requested proteins (Sirard, 2001). The mRNA produced during the growth phase of the oocyte is either translated immediately or stored under special conditions, which assure that the mRNA can be used at a later stage. Whereas mRNA in somatic cells is normally processed in a matter of hours after its synthesis; in oocytes some mRNA can be accumulated for weeks before being used. The growth phase of the oocytes varies significantly among mammals and usually occurs faster in small animals such as the mouse (20 days) compared with large animals (6 months in the cow). During the growth phase, specific genes are expressed, like the genes which code for some of the zona pellucida proteins, for sperm receptors or cortical

granule proteins or other products that are required for fertilization and early embryonic development. During the initial stage of the oocyte growth phase, the female germ cell acquires the ability to fully condense its chromosomes, when it later enters into meiosis. This requires the expression of the gene for maturation promotion factor. The oocyte then gets the capacity to form a metaphase I plate and a functional spindle. The changes in the gene expression, which cause these events, are in general unknown, as well as for the next step, the formation of metaphase plate II and the extrusion of the polar body. The last characteristic morphological phase of meiosis is metaphase II, which is known to require functional cytoskeletal factor. From this time onwards, the oocyte needs an activating spermatozoon before resuming its endogenous developing programme (Gilchrist et al., 2008).

It appears obvious that throughout oocyte development, follicle cell support is fundamental to provide the germ cells with growth regulators and nutrients to ensure progression through their protracted growth phase and significantly influence gene expression in the growing oocyte (Gilchrist et al., 2008). Conversely, the oocytes actively promote growth and differentiation of the granulosa cells, and they control to a certain extent many processes of folliculogenesis by paracrine mechanisms. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early embryonic development (Eichenlaub-Ritter and Peschke, 2002).

Most studies on gene expression in developing oocytes have been performed either on isolated oocytes matured *in vitro*, where the physiological cell association between oocyte and granulosa cells has been abandoned, or on follicles which have been cultured for some time. It appeared to be very difficult to grow early follicle stages into maturing follicles *in vitro* (Picton et al., 2003). Replication of the normal follicular development from the primordial to Graafian follicle stages with their variations in trophic and hormonal requirements makes it unlikely that normal gene expression in the germ cells is not profoundly influenced by these procedures.

Table 2. Publications that have applied LAM to study RNA in female germ cells of mammals

Title of publication	Reference
Synaptosome-associated protein of 25 kDa in oocytes and steroid producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins	Grosse et al. (2000)
Identification of genes expressed in primate primordial oocytes	Arraztoa et al. (2005)
Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-primary follicle transition in the mouse ovary	Park et al. (2005)
New approach to in situ quantification of ovarian gene expression in rat using a laser microdissection technique: relationship between follicle type and regulation of inhibin-alpha and cytochrome P450 aromatase genes in rat ovary	Sakurada et al. (2006)
Oocytes of baboon fetal primordial ovarian follicles express oestrogen receptor beta mRNA	Bocca et al. (2008)

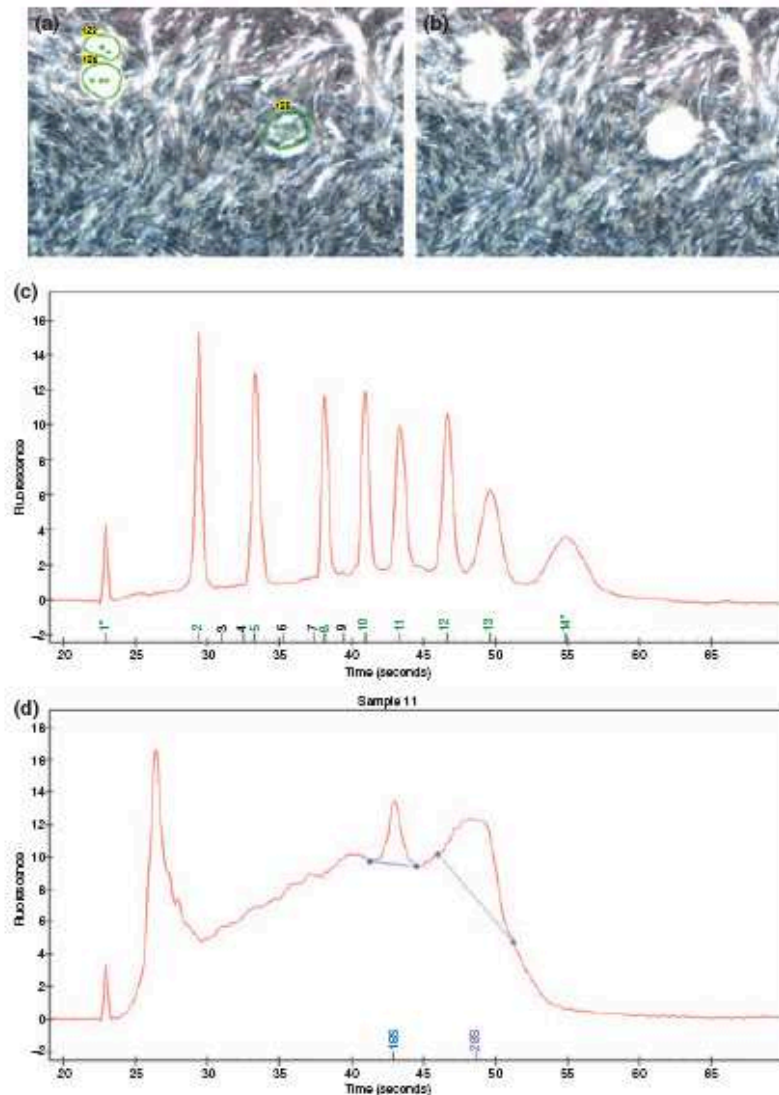


Fig. 1. (a, b) Laser-assisted microdissection (LAM) of a formalin-fixed, paraffin-embedded and haematoxylin and eosin-stained section from a bovine ovary mounted on a glass slide. (a) Green marked oocyte (125) of a primordial follicle and 124: already dissected oocytes. The green circle shows the cutting line of the laser and the green dots show the position of the laser pressure catapulting pulse. (b) The same section as shown in (a) after laser microdissection and pressure catapulting. The oocytes have been procured in the cap of an Eppendorf tube. (c, d) Quality and quantity determination of total RNA extracted from formalin fixed and paraffin embedded sections using Experion, an automated electrophoresis system. (c) Electropherogram of the Experion RNA ladder, illustrating relative positions of the lower marker (first peak, needed for calibration) and RNA peak of defined sizes (the following eight peaks). The RNA ladder is used to determine the size of RNA fragments and total RNA concentration. (d) Electropherogram of a total RNA sample from formalin fixed and paraffin embedded tissue of a bovine ovary. The first small peak is the lower marker; the next prominent peak represents small RNA fragments. The left secant (blue) marks the 18S rRNA peak, the right secant (violet) the 28S peak. The corresponding RNA Quality Indicator (RQI) value was 7.8. The RQI is a number between 1 (completely degraded RNA) and 10 (intact RNA) describing the quality of the isolated total RNA.

Recently, the application of laser microdissection in combination with molecular techniques, such as RT-PCR or microarrays has provided a major technological advance to study the cell-specific gene expression in oocytes during different stages of their growth, when they

progressively attain their competence. The laser microdissection technique allows for the first time to study the mRNA expression of specific cell types, including oocytes in a normal microenvironment (Sirivatanauskorn et al., 1999; Bocca et al., 2008).

Up to now, laser microdissection techniques have been mainly applied to selectively procure oocytes from primordial follicles (Table 2). Primordial oocytes are in a 'quiescent state'. They appear to be in a stage of arrested development, suspended in the diplotene phase of prophase of the first meiotic division. To elucidate the pathways and signals involved in primordial oocyte development and survival, it is important to identify the genes which are expressed during these events. Arraztoa et al. (2005) used LAM to selectively harvest primordial germ cell population from primate (rhesus monkey) ovarian tissue sections and characterized the differentially expressed genes using high-density cDNA microarrays. They could demonstrate the expression of 95 genes *in situ* in these normal oocytes. The expression of 84 of these genes has not previously been described in rhesus monkeys and for the first time the LAM technique allowed the study of mRNA expression of primordial oocytes in a normal cellular microenvironment. Functional analysis of the array data showed that most of the highly expressed primordial oocyte genes encode cell cycle-related proteins (14%), transporters (13%), signal transduction proteins (10%), structural proteins (7%), transcription factors (5%), immune response- (5%), apoptosis-related (5%) and RNA-processing proteins (5%) (Arraztoa et al., 2005). Interestingly, many of the genes detected by combining LAM and microarray matched the results obtained by serial analysis of gene expression (SAGE)-PCR of germinal vesicle stage human oocytes.

An important challenge is to compare gene expression levels of primordial oocytes and pre-granulosa cells with those of ensuing developmental stages, to better understand which cellular events take place in oocytes during important functional steps such as oocyte selection during the cycle and how oocytes obtain developmental competence. We have therefore recently started to isolate oocytes from primordial bovine follicles from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material (Fig. 1).

In this study, we collected and prepared bovine ovary samples from fetus with a crown-rump length of 10.2–94.0 cm within less than 5 min after slaughter. To optimize recovery of RNA, particular attention to initial tissue processing as post-mortem stability, fixative and duration of fixation time is required. Best fixation regarding preservation of morphology for microdissection and retrieval of RNA from the FFPE oviductal materials was obtained with 3.7% buffered formalin (pH 7.4) and a fixation time of 24 h. After processing and embedding, the bovine ovary tissue was sectioned at the desired thickness using a rotary microtome HM 340 E (Microm, Munich, Germany). Polyethylene naphthalate membrane-covered glass slides (PALM membrane slides; PALM Microlaser Technologies, Zeiss, Germany) were exposed to ultraviolet

light for 30 min before use to obtain better adherence and to cross-link any contaminating DNA sources. We tested different sections with thickness from 5 to 80  $\mu\text{m}$ . For working with bovine ovary sections, we decide for 15  $\mu\text{m}$  because we allow a specific morphology and later a high yield of extracted total RNA of the different cell populations. In this study, we chose a light haematoxylin and eosin stain with RNA-free reagent and an incubation time of 30 s, which allows the selection of the target cell populations and a good cell nuclei and cytoplasmic feature identification. A total of 350–400 oocytes were collected using a MicroBeam System for each approach (Zeiss, Munich, Germany). Total RNA was extracted using a RNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany). First results obtained from adult bovine ovaries clearly showed that the quality of mRNA derived from paraffin embedded material after LAM (RQI: 7–8) and quantity (229.59 pg/ml) is sufficient for advanced downstream applications such as RT-qPCR.

In conclusion, LAM techniques in combination with downstream applications such as RT-qPCR techniques and microarrays now provide a unique opportunity to study gene expression in germ cells of the testis and ovary at the cellular level without disturbing influences from neighbouring tissues. This will allow a much better understanding of the complex process regulating the differentiation of male and female germ cells during prenatal and postnatal development.

## References

- Albrecht, E. D., R. B. Billiar, G. W. Aberdeen, J. S. Babischkin, and G. J. Pepe, 2004: Expression of estrogen receptors alpha and beta in the fetal baboon testis and epididymis. *Biol. Reprod.* **70**, 1106–1113.
- Arraztoa, J. A., J. Zhou, D. Marcu, C. Cheng, R. Bonner, M. Chen, C. Xiang, M. Brownstein, K. Maisey, M. Imarai, and C. Bondy, 2005: Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. *Hum. Reprod.* **20**, 476–483.
- Azuma, Y., T. Nishinaka, S. Ushijima, J. Soh, M. Katsuyama, H. P. Lu, M. Kawata, C. Yabe-Nishimura, and T. Miki, 2004: Characterization of htAKR, a novel gene product in the aldo-keto reductase family specifically expressed in human testis. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 527–533.
- Blocher, S., L. Fink, R. M. Bohle, M. Bergmann, and K. Steger, 2005: CREM activator and repressor isoform expression in human male germ cells. *Int. J. Androl.* **28**, 215–223.
- Bocca, S. M., R. B. Billiar, E. D. Albrecht, and G. J. Pepe, 2008: Oocytes of baboon fetal primordial ovarian follicles express estrogen receptor beta mRNA. *Endocrine* **33**, 254–260.
- Buesa, R. J., 2008: Histology without formalin? *Ann. Diagn. Pathol.* **12**, 387–396.

- Bustin, S. A., and T. Nolan, 2004: Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* **15**, 155–166.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Twitter, 2009: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622.
- Castiglione, F., D. R. Degl'Innocenti, A. Taddei, F. Garbini, A. M. Buccoliero, M. R. Raspollini, M. Pepi, M. Paglierani, G. Asirelli, G. Freschi, P. Bechi, and G. L. Taddei, 2007: Real-time PCR analysis of RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues: effects of fixation on outcome reliability. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morph.* **15**, 338–342.
- Chimge, N. O., F. Ruddle, and D. Bayarsaihan, 2007: Laser-assisted microdissection (LAM) in developmental biology. *J. Exp. Zool. B (Mol. Dev. Evol.)* **308**, 113–118.
- Clermont, Y., and C. P. Lebond, 1955: Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid Schiff technique. *Am. J. Anat.* **96**, 229–250.
- Cox, M. L., S. M. Eddy, Z. S. Stewart, M. R. Kennel, M. Z. Man, J. D. Paulauskis, and R. W. Dunstan, 2008: Investigating fixative-induced changes in RNA quality and utility by microarray analysis. *Exp. Mol. Pathol.* **84**, 156–172.
- De Spiegdaere, W., T. Erksens, J. De Craene, C. Burvenich, L. Peelman, and W. Van den Broeck, 2008: Elimination of amplification artifacts in real-time reverse transcription PCR using laser captures microdissection samples. *Anal. Biochem.* **382**, 72–74.
- Denisov, V., W. Strong, M. Walder, J. Gingrich, and H. Wintz, 2008: Development and Validation of RQE: An RNA Quality Indicator for the Experion Automated Electrophoresis System. *Bio-Rad Bulletin 5761*, Rev A. Hercules, USA: Bio-Rad laboratories, Inc.
- Ehrig, T., S. A. Abdulkadir, S. M. Dintzis, J. Milbrandt, and M. A. Watson, 2001: Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. *J. Mol. Diagn.* **3**, 22–25.
- Eichenlaub-Ritter, U., and M. Peschke, 2002: Expression in vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation at the translational level. *Hum. Reprod. Update* **8**, 21–41.
- Emmert-Buck, M. R., R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, and L. A. Liotta, 1996: Laser capture microdissection. *Science* **274**, 998–1001.
- Erickson, H. S., P. S. Albert, J. W. Gillespie, B. S. Wallis, J. Rodrigues-Canales, W. M. Linehan, S. Gonzales, A. Velasco, R. F. Chuaqui, and M. R. Emmert-Buck, 2007: Assessment of normalization strategies for quantitative RT-PCR using microdissected tissue samples. *Lab. Invest.* **87**, 951–962.
- Farragher, S. M., A. Tanney, R. D. Kennedy, and P. Harkin, 2008: RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 435–445.
- Finke, L., G. Kwapiszewksa, J. Wilhelm, and R. M. Bohle, 2006: Laser-microdissection for cell type and compartment-specific analyses on genomic and proteomic level. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**, 25–29.
- Fiszer, D., and M. Kurpisz, 1998: Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells. A review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **40**, 172–176.
- Fleige, S., and M. W. Pfaffl, 2006: RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**, 126–139.
- Frungieri, M. B., K. Zitta, O. P. Pignataro, S. I. Gonzalez-Calvar, and R. S. Calandra, 2002a: Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology* **76**, 35–46.
- Frungieri, M. B., R. S. Calandra, L. Lustig, V. Meineke, F. M. Kohn, H. J. Vogt, and A. Mayerhofer, 2002b: Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* **78**, 298–306.
- Gaskell, T. L., L. L. Robinson, N. P. Groome, R. A. Anderson, and P. T. Saunders, 2003: Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 424–432.
- Gassmann, M., 2003: Quality Assurance of RNA Derived from Laser Microdissected Tissue Samples Obtained by the Palm MicBeam System Using the RNA 6000 Pico Labchip Kit. A. Agilent Publication No. 5988-9128EN Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
- Geigerseder, C., R. Doepner, A. Thalhammer, M. B. Frungieri, K. Gamel-Diddeon, R. S. Calandra, F. M. Kohn, and A. Mayerhofer, 2003: Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* **77**, 314–323.
- Gilchrist, R. B., M. Lane, and J. G. Thompson, 2008: Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod.* **14**, 159–177.
- Gingrich, J., T. Rubio, and C. Karlak, 2006: Effect of RNA Degradation on Data Quality in Quantitative PCR and Microarray Experiments. *Bio-Rad Bulletin 5452*. Hercules, USA: Bio-Rad laboratories, Inc.
- Goldsworthy, S. M., P. S. Stockton, C. S. Trempus, J. F. Foley, and R. R. Maronpot, 1999: Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol. Carcinog.* **25**, 86–91.
- Grosse, J., A. Builing, C. Brucker, U. Berger, A. Amsterdam, A. Mayerhofer, and M. Gratzl, 2000: Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins. *Biol. Reprod.* **63**, 643–650.
- Jackson, D. P., F. A. Lewis, G. R. Taylor, A. W. Boylson, and P. Quirke, 1990: Tissue extraction of DNA and RNA analysis by the the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* **43**, 499–504.



- Kim, J. O., H. N. Kim, M. H. Hwang, H. I. Shing, S. Y. Kim, R. W. Park, E. Y. Park, I. S. Kim, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, J. L. Stein, J. B. Lian, G. S. Stein, and J. Y. Choi, 2003: Differential gene expression analysis using paraffin-embedded tissues after laser microdissection. *J. Cell. Biochem.* **90**, 998–1006.
- Lalancette, C., L. J. Bordeau, R. L. Faure, and P. Leclerc, 2006: Bull testicular haploid germ cells express a messenger encoding for a truncated form of the protein tyrosine kinase HCK. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 520–530.
- Lawrie, L. C., S. Curran, H. L. McLeod, J. E. Fothergill, and G. I. Murray 2001: Applications of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer. *Mol. Biol.* **54**, 253–258.
- Liang, G., X. D. Zhang, L. J. Wang, Y. S. Sha, J. C. Zhang, S. Y. Miao, S. D. Zong, L. F. Wang, and S. S. Koide, 2004: Identification of differentially expressed genes of primary spermatocyte against round spermatid isolated from human testis using the laser capture microdissection technique. *Cell Res.* **14**, 507–512.
- Murray, G. I., 2007: An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem.* **109**, 171–176.
- Mustafa, D., J. M. Kros, and T. Luider, 2008: Combining laser capture microdissection and proteomics techniques. *Methods Mol. Biol.* **428**, 159–178.
- Nakamura, N., H. Shibata, D. A. O'Brien, C. Mori, and E. M. Eddy, 2008: Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 632–640.
- Park, C. E., K. Y. Cha, K. Kim, and K. A. Lee, 2005: Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-primary follicle transition in the mouse ovary. *Fertil. Steril.* **83**, 410–418.
- Picton, H. M., M. A. Danfour, S. E. Harris, E. L. Chambers, and J. Huntriss, 2003: Growth and maturation of oocytes in vitro. *Reprod. Suppl.* **61**, 445–462.
- Pinzani, P., C. Orlando, and M. Pazzagli, 2006: Laser-assisted microdissection for real-time PCR sample preparation. *Mol. Aspects Med.* **27**, 140–159.
- Robinson, L. L., T. L. Gaskell, P. T. Saunders, and R. A. Anderson, 2001: Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 845–852.
- Sakurada, Y., M. Shirota, K. Inoue, N. Uchida, and K. Shirota, 2006: New approach to in situ quantification of ovarian gene expression in rat using a laser microdissection technique: relationship between follicle types and regulation of inhibin-alpha and cytochrome P450aromatase genes in the rat ovary. *Histochem. Cell Biol.* **126**, 735–741.
- Sirard, M. A., 2001: Resumption of meiosis: mechanisms involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* **55**, 1241–1254.
- Srivatanauskorn, Y., R. Drury, T. Crnogorac-Jurcic, V. Srivatanakorn, and N. R. Lemoine, 1999: Laser assisted microdissection: applications in molecular pathology. *J. Pathol.* **189**, 150–154.
- Sluka, P., L. O'Donnell, and P. G. Stanton, 2002: Stage-specific expression of genes associated with rat spermatogenesis: characterization by laser-capture microdissection and real-time polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.* **67**, 820–828.
- Sluka, P., L. O'Donnell, R. I. MacLachlan, and P. G. Stanton, 2008: Application of laser-capture microdissection to analysis of gene expression in the testis. *Prog. Histochem. Cytochem.* **42**, 173–201.
- Steger, K., L. Fink, T. Klonisch, R. M. Bohle, and M. Bergmann, 2002: Protamine-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins. *Histochem. Cell Biol.* **117**, 227–234.
- Tirado, O. M., D. M. Selva, N. Toran, C. A. Suarez-Quian, M. Jansen, D. P. McDonnell, J. Reventos, and F. Munell, 2004: Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J. Androl.* **25**, 84–94.

## VI. DISKUSSION

In meiner Dissertation wurde die Expression von IF-Proteinen im Ovar des adulten Rindes mit Hilfe von immunzytochemischen Methoden untersucht. Dies waren im Einzelnen CK5, CK8, CK14, CK18, CK19, Vimentin, Desmin und die im Zellkern vorkommenden IFs Lamin A und Lamin B1. Die Auswahl der untersuchten CKs begründet sich zum einen auf ihrer Bedeutung als primäre (CK5, 8, 14, 18) bzw. sekundäre (CK19) CKs, zum anderen darauf, dass CK 8, 18 und 19 in der Eizelle des Menschen nachgewiesen wurden (SANTINI et al., 1993) und CK14 in der Eizelle der Maus (HAFNER et al., 2004).

Vimentin wurde als typisches IF mesenchymaler Zellen und auf Grund des bereits nachgewiesenen Vorkommens im Ovar bei einigen anderen Spezies ausgewählt. Bei den bereits vorliegenden Untersuchungen beim Rind handelt es sich um eine ältere Arbeit an neun Monate alten Rindern, die alle Follikelstadien berücksichtigt (VAN DEN HURK et al., 1995). Zwei andere Arbeiten berichten nur über die Vimentin-Lokalisation in antralen Follikeln (VAN WEZEL et al., 1999; ORTEGA et al., 2007). Die Resultate dieser Arbeiten waren in einigen Punkten unterschiedlich zu meinen Ergebnissen (siehe Seite 63).

Desmin kommt vor allem in der glatten Muskulatur vor, wurde aber auch im Keimdrüsenepithel des Pavians (KHAN-DAWOOD et al., 1996) und des Hundes (AKIHARA et al., 2007) nachgewiesen und deshalb mit in diese Arbeit aufgenommen.

Lamine sind IFs, die nur im Zellkern vorkommen. Immunhistologisch wurde ihre Expression in der bovinen Eizelle bzw. allgemein im Ovar des Rindes noch nicht untersucht. Wegen ihrer Eigenschaft nicht nur als Strukturgeber zu dienen, wurde versucht das Expressionsmuster von Laminen im Rinderovar nachzuweisen. Arnault et al. (2010) wiesen mit Anti-Lamin A/C Antikörpern bei der Maus in allen Follikelstadien eine deutlich positive Reaktion an der Kernhülle von Eizellen nach. Zudem beobachteten sie eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma der Eizellen. Dies zeigt, dass Lamine in der Eizelle der Maus die ihnen

zugeschriebenen Aufgaben erfüllen können. Mit den in meinen Untersuchungen verwendeten Lamin-Antikörpern (Monoklonale Maus Anti-Lamin A (133A2) und Monoklonale Maus Anti-Lamin B1 (119D5-F1) Antikörper, beide von SantaCruz Biotechnology) konnte in den Eizellen des Rindes keine positive Reaktion beobachtet werden. Dagegen reagierte das Zytoplasma der Follikelzellen in vielen Fällen deutlich positiv. Da sich in keinem Fall die Zellkerne der Follikelzellen positiv anfärbten, nehme ich an, dass es sich dabei um eine unspezifische Reaktion mit einem noch nicht näher bekannten Antigen handelt.

Immunhistochemisch ließen sich im Ovar des Rindes die CKs 5, 8, 14, 18 und 19 im Keimdrüsenepithel nachweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen am Ovar anderer Spezies (Ratte, Schwein, Hund, Pavian, Mensch) erhalten (CZERNOBILSKY et al., 1985; SANTINI et al., 1993; VAN DEN HURK et al., 1995; KHAN-DAWOOD et al., 1996; PEREZ-MARTINEZ et al., 2001; AKIHARA et al., 2007; TOWNSON et al., 2010). Vimentin zeigte keine positive Reaktion im Keimdrüsenepithel. Zu diesem Ergebnis kamen auch van den Hurk et al. (1995) und Perez-Martinez et al. (2001) beim Rind und Czernobilsky et al. (1985) beim Schwein. Bei Mensch, Pavian und Hund wurde im Keimdrüsenepithel jedoch Vimentin nachgewiesen (CZERNOBILSKY et al., 1985; SANTINI et al., 1993; KHAN-DAWOOD et al., 1996; AKIHARA et al., 2007). Wie bereits erwähnt, kommt bei Pavian und Hund auch Desmin im Keimdrüsenepithel vor. Dies ist interessant, da Vimentin und Desmin Heteropolymere bilden können. Eine positive Reaktion mit Desminantikörpern zeigten in meiner Arbeit lediglich glatte Muskelzellen. Entsprechendes wurde im Ovar des Rindes von Ortega et al. (2007) und van den Hurk et al. (1995), im Schafovar von Marettova and Maretta (2002) beobachtet.

Auffällig ist die Coexpression von Vimentin und CK 18 in den Granulosazellen von Primär- und Sekundärfollikeln sowie antralen Follikeln. Andererseits fehlt in diesen Zellen CK 8, das in der Regel Heteropolymere mit CK 18 bildet. Dies kann jedoch daran liegen, dass der verwendete Antikörper gegen CK 8, dieses nicht erkennen kann, wenn es in Form von Heteropolymeren als CK8/18 Filament vorliegt.

Die Ergebnisse meiner Arbeit unterscheiden sich zum Teil von früheren Arbeiten anderer Autoren, die ebenfalls die Expression von IFs beim Rind untersucht haben. Darauf möchte ich im Folgenden kurz eingehen.

Im Gegensatz zu Townson et al. (2010) konnte ich bereits in Primärfollikeln eine positive Reaktion mit CK18-Antikörpern beobachten. In antralen Follikeln stellte ich eine deutlich positive Reaktion in basalen, luminalen und die Eizelle direkt umgebenden Granulosazellen fest. Townson et al. (2010) beschreiben jedoch nur eine deutliche positive Reaktion in den basalen Granulosazellen. Nach Townson et al. (2010) kommt eine deutliche Reaktion in luminalen Granulosazellen nur in atretischen Follikeln vor. Abgesehen von diesen Abweichungen stimmen die Ergebnisse von Townson et al. (2010) jedoch hinsichtlich CK18 mit meinen Resultaten überein.

Perez-Martinez et al. (2001) verwendeten einen Antikörper der gegen das Heteropolymer CK8,18 gerichtet ist. Dieser zeigte im Keimdrüsenepithel eine deutlich, im Rete ovarii dagegen nur eine sehr schwach positive Reaktion. Die von mir verwendeten Antikörper gegen CK8 bzw. CK18 zeigten im Keimdrüsenepithel beide eine deutliche positive Reaktion, im Rete ovarii bindet jedoch nur der CK18-Antikörper. Berücksichtigt man, dass der von mir verwendete CK8 Antikörper möglicherweise CK8 in CK8/18 Intermediärfilamenten nicht nachweisen kann, deutet dies darauf hin, dass der von Perez-Martinez et al. (2001) verwendete Antikörper eher mit CK8 als mit CK18 reagierte. Die Follikel selbst wurden von Perez-Martinez et al. (2001) nicht untersucht.

Van den Hurk et al. (1995) benutzten einen Antikörper gegen „Hautkeratin“ vom Menschen und konnten außer im Keimdrüsenepithel und Rete ovarii bei 9 Monate alten Rindern keine positive Reaktion beobachten. In fetalen Ovarien zeigten Keimbahnstränge eine positive Reaktion. Die Granulosazellen von Primordial- und Primärfollikeln waren schwach positiv, die anderen Follikelstadien waren negativ gegenüber diesem CK-Antikörper.

Hinsichtlich Vimentin kamen van den Hurk et al. (1995) bei neun Monate alten Rindern zu insgesamt ähnliche Ergebnisse wie ich in meinen

Untersuchungen an Rindern, die zwischen 3 und 5 Jahre alt waren. Im Unterschied zu van den Hurk et al. (1995) konnte ich in den Sekundärfollikeln nur eine sehr schwache Reaktion feststellen. Bei antralen Follikeln beschreiben van den Hurk et al. (1995) eine positive Reaktion in den Corona radiata Zellen, während die basalen Granulosazellen negativ waren. Es wurden also keines der drei verschiedenen Expressionsmuster für Vimentin, wie sie in meiner Arbeit beobachtet wurden, beschrieben. Desweiteren konnte ich keine positive Reaktion in Zellfortsätzen der Corona radiata Zellen, die die Zona pelucida durchziehen (VAN DEN HURK et al., 1995) nachweisen.

Ortega et al. (2007) fanden beim immunzytochemischen Nachweis von Vimentin eine positive Reaktion in den Granulosazellen von FSH-abhängigen Follikeln, wobei die Intensität in degenerierenden Follikeln um etwa das sechs-fache höher war. Van Wezel et al. (1999) beschreiben in antralen Follikeln zwei der drei von mir dargestellten Muster der Vimentinexpression. Die Follikel, in denen alle Granulosazellen eine positive Reaktion zeigen, wurden als atretische Follikel klassifiziert.

Die Beurteilung der Follikel als atretisch erfolgte in den beiden zuletzt genannten Studien aufgrund morphologischer Kriterien. Danach sind auch die durchgehend Vimentin-positiven Follikel in dieser Studie atretisch. Nach meinen Befunden sind aber eher die Follikel als atretisch zu bezeichnen, die nur unregelmäßig vereinzelte Vimentin-positive Zellen aufweisen (Fig. 2H in Abschnitt V 1).

Loffler et al. (2000) zeigten beim Menschen, dass CKs nur in Granulosazellen von Primordial- und Primärfollikeln exprimiert werden. Lediglich in vereinzelten atretischen antralen Follikeln konnten sie CKs nachweisen. Dies steht im deutlichen Widerspruch zu Ergebnissen von Czernobilsky et al. (1985), die CKs im humanen Ovar auch in Granulosazellen von präantralen und antralen Follikeln nachweisen konnten. Auch Santini et al. (1993) zeigten beim Menschen in Granulosazellen aller Follikelklassen eine einheitliche positive Reaktion für CK8, 18; CK19 wurde in Granulosazellen in zwei von fünf Fällen fokal in Primordial- bzw. Primärfollikeln und vereinzelt in reifen Follikeln beobachtet. In Granulosazellkulturen vom Menschen zeigte eine

Behandlung mit LH, FSH und FK (Forskolin, Zellstimulans) eine verringerte Expression von CK18 mRNA (SASSON et al., 2004). Beim Schwein, Pavian und bei der Ratte konnten keine CKs in den Granulosazellen aller Follikelstadien nachgewiesen werden (CZERNOBILSKY et al., 1985; KHAN-DAWOOD et al., 1996).

Bei Mensch und Schwein wurde Vimentin in den Granulosazellen von Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln immunzytochemisch nachgewiesen (CZERNOBILSKY et al., 1985; SANTINI et al., 1993), ebenso beim Schaf (MARETTOVA & MARETTA, 2002). Zudem zeigte das Schaf, ebenso wie das Rind in meiner Arbeit, auch eine positive Vimentin-Reaktion in Thecazellen sowie in Gefäßendothelien. Beim Pavian waren hingegen die Granulosazellen aller Follikelklassen für Vimentin negativ. Eine positive Reaktion zeigten jedoch Thecazellen und in atretischen Follikeln die Granulosazellen (KHAN-DAWOOD et al., 1996). Akihara et al. (2007) wiesen beim Hund eine positive Vimentinreaktion im Keimdrüsenepithel, in der Tunica albuginea, in Stroma Zellen und im Rete ovarii nach. Die Follikel wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Gallicano et al. (1992) haben elektronenmikroskopisch in Eizellen von Mensch, Maus, Rind, Schwein, Ratte und Hamster sog. „zytoskelettäre Sheets“ beobachtet, die aus IFs bestehen. Dabei werden zwei verschiedene Formen unterschieden: „fibrilläre Sheets“ bei Mensch, Maus, Rind und Schwein und „glatte Sheets“ bei Ratte und Hamster. 1994 haben Gallicano et al. (1994) dann in ovulierten nicht befruchteten Eizellen von Mäusen mittels Westernblotanalysen CK 5, 6, 8 und 16 nachgewiesen und gezeigt, dass diese CKs Bestandteile der „Sheets“ sind. In diesen „Sheets“ sind nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen Filamente mit einem Durchmesser von ca. 10 nm über Brücken seitlich miteinander verbunden. Zudem wurde von „speziellem Material“ berichtet, das mit den „Sheets“ verbunden ist. Dies kann durch Behandlung mit verschiedenen Detergentien von diesen gelöst werden (GALLICANO et al., 1994). Auf die spezielle Struktur der „Sheets“ und das „spezielle Material“ führen Gallicano et al. (1994) auch zurück, dass bei Untersuchungen anderer Autoren in Eizellen - abgesehen vom *Xenopus* (FRANZ et al., 1983) - keine CKs nachgewiesen werden konnten. Santini et al. (1993) haben in

der Eizelle des Menschen in unterschiedlichem Ausmaß CK8, 18 und 19 immunzytochemisch lokalisiert. Hafner et al. (2004) wiesen CK14 in der Eizelle von präantralen (aber nicht primordialen) und antralen Follikeln von Mäusen nach. Die Immunreaktivität war auf einen schmalen Bereich unter der Eizellmembran beschränkt. Beim Rind konnten in der Eizelle bisher noch keine CKs nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, woraus dann die von Gallicano et al. (1992) beschriebenen „Sheets“ bestehen, die sich in ihrer Morphologie nicht von denen bei der Maus und beim Menschen unterscheiden. Möglicherweise sind CKs und andere IFs in der Eizelle vorhanden, die Antigene aber so maskiert, dass sie immunzytochemisch und über Western-Blot nicht dargestellt werden können.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz intensiver Forschung sind viele Details der Oogenese und Follikuloogenese des Rindes erst wenig verstanden. So ist nicht klar, wie es zur gezielten Aktivierung einer bestimmten Zahl von Primordialfollikel pro Zyklus kommt. Sicher ist aber, dass die Aktivierung der Primordialfollikel auf parakrine und autokrine Weise über ein komplexes System von lokal exprimierten stimulierenden und hemmenden Faktoren erfolgt.

Intermediärfilamente sind einer der drei Hauptbestandteile des Zytoskeletts und somit zunächst für die mechanischen Eigenschaften von Zellen verantwortlich. Wie in den letzten Jahren aber gezeigt wurde, spielen Intermediärfilament-Proteine bzw. Intermediärfilamente auch eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionswegen und bei der Genregulation.

Ein sehr interessantes Ergebnis meiner Arbeit ist die Coexpression von Vimentin und Cytokeratin 18 in Granulosazellen von Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln, wohingegen Cytokeratin 8 in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Vimentin zeigte in antralen Follikeln drei verschiedene Expressionsmuster, die wahrscheinlich mit der Atresie von Follikeln in Zusammenhang stehen. In der Eizelle des Rindes konnten keine Intermediärfilamente nachgewiesen werden, was möglicherweise auf die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zurückzuführen ist. Das Keimdrüsenepithel zeigte für alle Cytokeratine eine positive Reaktion, wohingegen dies für Vimentin und Desmin nicht der Fall war. Im Rete ovarii konnten nur Cytokeratin 18 und 19 nachgewiesen werden.



## VIII. SUMMARY

Although oogenesis and folliculogenesis have been intensively studied in the bovine, many questions concerning these highly complex and finely tuned processes remain open. For instance, the mechanisms of activation of a certain number of primordial follicles in each cycle is still unknown. It is assumed that activation of primordial follicles is influenced via paracrine and autocrine mechanisms of locally expressed stimulating and inhibiting factors.

Intermediate filaments are one of the main constituents of the cytoskeleton and therefore also of primary importance for the mechanical stability of cells. As shown recently, intermediate filament proteins and intermediate filaments may also play an important role in cell signalling and gene regulation.

A very interesting result of my study is the co-expression of vimentin and cytokeratin 18 in the granulosa cells of primary, secondary and antral follicles and the lacking of cytokeratin 8 expression in these cells. For vimentin, three different expression patterns in antral follicles were observed, which are probably correlated to follicular atresia. No intermediate filaments could be demonstrated in the bovine oocyte, which may be due to the antibodies used in this study. Immunostaining for all cytokeratins was present in the surface epithelium, whereas vimentin and desmin showed no positive reaction. In the rete ovarii, only cytokeratin 18 and 19 were immunohistochemically detected.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AMH	Anti-Muellerian Hormone
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CK	Cytokeratin
C <sub>p</sub>	Crossing Point
C <sub>q</sub>	Quantification Cycle
C <sub>t</sub>	Threshold Cycle
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
FGF	Fibroblast Growth Factor
FK	Forskolin
Foxo3a	Forkhead box protein O3 a
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF9	Growth Differentiation Factor-9
GFAP	Glia Fibrillary Acidic Protein
GH	Growth hormone
IF	Intermediärfilament
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
KL	Kit-Ligand

---

LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	Luteinisierendes Hormon Receptor
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
mTOR	Serine/threonine-protein kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin)
mTORC1	mTOR Complex 1
NF-H	schwere Neurofilamente
NF-L	leichte Neurofilamente
NF-M	mittelschwere Neurofilamente
NGF	Nerve Growth Factor
PAPP-A	Pregnancy-associated Plasma Protein-A
PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3 phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic Acid
RQI	RNA Quality Indicator
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT-qPCR	quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SF1	Steroidogenic factor 1
TGF	Transforming Growth Factor
ULF	Unit-Length Filament

## GEBRAUCHSLÖSUNGEN

### Bouin-Lösung:

Pikrinsäure (gesättigt und filtriert) 1500 ml

Formaldehyd 37% 500 ml

Eisessig 100 ml

Formalin: 3,7%, pH 7,4

### Eosin:

Stammlösung: Eosin 2 g, Aqua dest 198 ml, Einige Tropfen Formol zur Haltbarkeit

Gebrauchslösung: Eosin-Stammlösung 60ml, Eisessig 8 Tropfen, Aqua dest. 600 ml

### Hämalaun:

Aqua dest. 2000 ml, Hämatoxylin 2 g, Natriumjodat 100 g, Kalialaun 100 g, Chloralhydrat 100 g, kristalline Zitronensäure 2 g

PBS-Puffer (Phosphat buffered saline) pH 7,4-7,6:

Natriumchlorid 42,5 g, Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat 6,35 g, Natriumhydrogenphosphat-monohydrat 1,95 g, Aqua dest. 5l

### DEPC-Wasser:

Diethylpyrocarbonat 1,5 ml, Aqua dest. ad 2 L danach autoklavieren

## LITERATURVERZEICHNIS

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992; 94: 177-88.

Adashi EY. Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction* 1994; 9: 815-27.

Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals* 2010a; 45: 171-9.

Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals* 2010b; 45: 180-7.

Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasako K, Komine M, Hirayama K, Terasawa A, Ohmachi T, Matsuda K, Okamoto M, Taniyama H. Histological and immunohistochemical evaluation of canine ovary. *Reproduction in Domestic Animals* 2007; 42: 495-501.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular biology of the cell*, 5 edn. Taylor & Francis, New York

Andres V, Gonzalez JM. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *Journal of Cell Biology* 2009; 187: 945-57.

Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction* 1997; 2: 139-46.

Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell

BK, Bramley TA, Webb R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 1998; 139: 2146-54.

Arnault E, Doussau M, Pesty A, Lefevre B, Courtot AM. Review: Lamin A/C, caspase-6, and chromatin configuration during meiosis resumption in the mouse oocyte. *Reproductive sciences* 2010; 17: 102-15.

Austin EJ, Mihm M, Evans AC, Knight PG, Ireland JL, Ireland JJ, Roche JF. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 839-48.

Bader BL, Magin TM, Hatzfeld M, Franke WW. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *EMBO Journal* 1986; 5: 1865-75.

Baker TG. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 1963; 158: 417-33.

Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 1997; 56: 1158-68.

Barboro P, D'Arrigo C, Diaspro A, Mormino M, Alberti I, Parodi S, Patrone E, Balbi C. Unraveling the organization of the internal nuclear matrix: RNA-dependent anchoring of NuMA to a lamin scaffold. *Experimental Cell Research* 2002; 279: 202-18.

Barboro P, D'Arrigo C, Repaci E, Patrone E, Balbi C. Organization of the

lamin scaffold in the internal nuclear matrix of normal and transformed hepatocytes. *Experimental Cell Research* 2010; 316: 992-1001.

Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 432-41.

Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 120-6.

Beg MA, Meira C, Bergfelt DR, Ginther OJ. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. *Reproduction* 2003; 125: 847-54.

Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 2006; 132: 365-77.

Berisha B, Sinowatz F, Schams D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development* 2004; 67: 162-71.

Binelli M, Murphy BD. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reproduction, Fertility, and Development* 2010; 22: 1-12.

Bio-Rad-Laboratories. Experion Video Tour CD. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), Life Science Research, Literaturindex, Electrophoresis Automated, Tech Notes, Bulletin-Nr. 3184 2004;

Bleach EC, Glencross RG, Feist SA, Groome NP, Knight PG. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular

fluid. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 743-52.

Boriek AM, Capetanaki Y, Hwang W, Officer T, Badshah M, Rodarte J, Tidball JG. Desmin integrates the three-dimensional mechanical properties of muscles. *American journal of physiology. Cell physiology.* 2001; 280: C46-52.

Bosch FX, Leube RE, Achtstatter T, Moll R, Franke WW. Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. *Journal of Cell Biology* 1988; 106: 1635-48.

Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 2009; 214: 516-59.

Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 187: 11-8.

Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological Reviews* 2006; 86: 967-1008.

Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction* 2005; 73: 54-62.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 611-22.



Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 1994; 120: 2369-83.

Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature Medicine* 2003; 9: 1520-7.

Capetanaki Y, Milner DJ. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. *Sub-Cellular Biochemistry* 1998; 31: 463-95.

Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2002; 12: 339-48.

Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Experimental Cell Research* 2007; 313: 2063-76.

Chase CC, Jr., Kirby CJ, Hammond AC, Olson TA, Lucy MC. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 212-9.

Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 7988-92.

Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 1994; 79: 679-94.

Colucci-Guyon E, Gimenez YRM, Maurice T, Babinet C, Privat A.

Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia* 1999; 25: 33-43.

Coulombe PA, Kopan R, Fuchs E. Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. *Journal of Cell Biology* 1989; 109: 2295-312.

Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 368-74.

Czernobilsky B, Moll R, Levy R, Franke WW. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *European Journal of Cell Biology* 1985; 37: 175-90.

de la Sota RL, Simmen FA, Diaz T, Thatcher WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biology of Reproduction* 1996; 55: 803-12.

Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes and Development* 2008; 22: 832-53.

Dechat T, Adam SA, Goldman RD. Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function. *Advances in Enzyme Regulation* 2009; 49: 157-66.

Denisov V, Strong, W., Walder, M., Gingrich, J., Wintz, H. Development and Validation of RQI: An RNA Quality Indicator for the Experion™ Automated Electrophoresis System. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), Life Science Research, Literaturindex, Electrophoresis Automated, 2008; Tech Notes,

## Bulletin-Nr. 5761

Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001; 55: 1211-39.

Duffy P, Crowe MA, Boland MP, Roche JF. Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 118: 9-17.

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002; 124: 601-9.

Echternkamp SE, Howard HJ, Roberts AJ, Grizzle J, Wise T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biology of Reproduction* 1994; 51: 971-81.

Eckert RL. Sequence of the human 40-kDa keratin reveals an unusual structure with very high sequence identity to the corresponding bovine keratin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 1114-8.

Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A, Koteliansky V, Babinet C, Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *Journal of Cell Science* 1998; 111 ( Pt 13): 1897-907.

Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *Journal of Cell Science* 2000; 113 ( Pt 13): 2455-62.

Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 1966; 25: 800-5.

Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 1763-71.

Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997; 138: 2963-71.

Evans AC, Ireland JL, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 1475-84.

Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 2003; 78: 135-63.

Fortune JE, Quirk, S. M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science* 1988; Suppl 2: 1-8.

Foxcroft GR, Hunter MG. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 1985; 33: 1-19.

Fradette J, Germain L, Seshiah P, Coulombe PA. The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 35176-84.

Frank ED, Warren L. Aortic smooth muscle cells contain vimentin instead of desmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78: 3020-4.

Franz JK, Gall L, Williams MA, Picheral B, Franke WW. Intermediate-size filaments in a germ cell: Expression of cytokeratins in oocytes and eggs of the frog *Xenopus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80: 6254-8.

Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78: 298-302.

Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DG. Cytoskeletal sheets appear as universal components of mammalian eggs. *Journal of Experimental Zoology* 1992; 263: 194-203.

Gallicano GI, Larabell CA, McGaughey RW, Capco DG. Novel cytoskeletal elements in mammalian eggs are composed of a unique arrangement of intermediate filaments. *Mechanisms of Development* 1994; 45: 211-26.

Gastal EL, Bergfelt DR, Nogueira GP, Gastal MO, Ginther OJ. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 1492-8.

Gerthoffer WT, Gunst SJ. Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology* 2001; 91: 963-72.

Gerthoffer WT. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle contraction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 83: 851-6.

Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction* 1997; 57: 1066-73.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* 1989; 87: 223-30.

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. *Journal of Reproduction and Fertility* 1997a; 109: 181-6.

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 1997b; 48: 75-87.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 383-9.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 638-47.

Ginther OJ, Beg MA, Kot K, Meira C, Bergfelt DR. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 524-9.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 99-105.

Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 1020-8.

Glister C, Groome NP, Knight PG. Bovine follicle development is

associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology* 2006; 188: 215-25.

Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK, Spann TP. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes and Development* 2002; 16: 533-47.

Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarowski ER. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Current Opinion in Cell Biology* 2008; 20: 28-34.

Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: new perspectives on a classic. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 2499-515.

Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2005; 6: 21-31.

Guillemin K, Williams T, Krasnow MA. A nuclear lamin is required for cytoplasmic organization and egg polarity in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* 2001; 3: 848-51.

Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *European Respiratory Journal* 2000; 15: 600-16.

Gunst SJ, Tang DD, Opazo Saez A. Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2003; 137: 151-68.

Hafner M, Wenk J, Nenci A, Pasparakis M, Scharffetter-Kochanek K, Smyth N, Peters T, Kess D, Holtkotter O, Shephard P, Kudlow JE, Smola H, Haase I, Schippers A, Krieg T, Muller W. Keratin 14 Cre transgenic

mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis* 2004; 38: 176-81.

Haubold KW, Allen DL, Capetanaki Y, Leinwand LA. Loss of desmin leads to impaired voluntary wheel running and treadmill exercise performance. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95: 1617-22.

Hees H, Sinowatz, F. (2000) *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, 3 edn. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln. 496

Herrmann H, Fouquet B, Franke WW. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin. *Development* 1989; 105: 279-98.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12: 79-90.

Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2007; 8: 562-73.

Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Ibuki Y, Miyamoto K. A role of insulin-like growth factor I in luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4965-71.

Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 2007; 37: 120-6.

Hozak P, Sasseville AM, Raymond Y, Cook PR. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Science* 1995; 108 ( Pt 2): 635-44.



Hutton E, Paladini RD, Yu QC, Yen M, Coulombe PA, Fuchs E. Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. *Journal of Cell Biology* 1998; 143: 487-99.

Hyder CL, Pallari HM, Kochin V, Eriksson JE. Providing cellular signposts-post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Letters* 2008; 582: 2140-8.

Ireland JJ, Roche JF. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 1983; 112: 150-6.

Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science* 2000; 83: 1648-58.

Ireland JL, Jimenez-Krassel F, Winn ME, Burns DS, Ireland JJ. Evidence for autocrine or paracrine roles of alpha2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. *Endocrinology* 2004; 145: 2784-94.

Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research* 2007; 313: 2050-62.

Iwatsuki H, Suda M. Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function. *Acta histochemica et cytochemica*. 2010; 43: 19-31.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145-50.

Kaufman SJ, Foster RF. Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 9606-10.

Kenngott RA, Vermehren M, Sauer U, Ebach K, Sinowatz F. Cellular Expression and Localization of Estrogen Receptor {alpha} and Progesterone Receptor mRNA in the Bovine Oviduct Combining Laser-Assisted Microdissection, Quantitative PCR, and In Situ Hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2011; 59: 312-27.

Khan-Dawood FS, Yusoff Dawood M, Tabibzadeh S. Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. *Biology of Reproduction* 1996; 54: 734-42.

Kim S, Coulombe PA. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes and Development* 2007; 21: 1581-97.

Knight PG, Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 2001; 121: 503-12.

König HE, Liebich, H. G. (2008) *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*, 4 edn. Schattauer, Stuttgart. 783

Krimpenfort PJ, Schaart G, Pieper FR, Ramaekers FC, Cuypers HT, van den Heuvel RM, Vree Egberts WT, van Eys GJ, Berns A, Bloemendal H. Tissue-specific expression of a vimentin--desmin hybrid gene in transgenic mice. *EMBO Journal* 1988; 7: 941-7.

Kuisk IR, Li H, Tran D, Capetanaki Y. A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Developments in Biologicals* 1996; 174: 1-13.

Lass A. Assessment of ovarian reserve - is there a role for ovarian biopsy? *Human Reproduction* 2001; 16: 1055-7.

Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980; 283: 249-56.

Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *Journal of Cell Biology* 1994; 124: 827-41.

Li Q, Muragaki Y, Ueno H, Ooshima A. Stretch-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells and a possible involvement of local renin-angiotensin system and platelet-derived growth factor (PDGF). *Hypertension Research* 1997a; 20: 217-23.

Li QF, Spinelli AM, Wang R, Anfinogenova Y, Singer HA, Tang DD. Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in vimentin cytoskeleton signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 34716-24.

Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE, Babinet C, Paulin D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 1997b; 139: 129-44.

Liebich HG (2009) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, 5. edn. Schattauer, Stuttgart - New York. 462

Liu J, Rolef Ben-Shahar T, Riemer D, Treinin M, Spann P, Weber K, Fire A, Gruenbaum Y. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Molecular Biology of the Cell* 2000; 11: 3937-47.

Liu J, Lee KK, Segura-Totten M, Neufeld E, Wilson KL, Gruenbaum Y. MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 4598-603.

Loffler S, Horn LC, Weber W, Spanel-Borowski K. The transient disappearance of cytokeratin in human fetal and adult ovaries. *Anatomy and Embryology* 2000; 201: 207-15.

Lopez-Soler RI, Moir RD, Spann TP, Stick R, Goldman RD. A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Biology* 2001; 154: 61-70.

Marceau N, Loranger A, Gilbert S, Daigle N, Champetier S. Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. *Biochemistry and Cell Biology* 2001; 79: 543-55.

Marettova E, Marett M. Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary. *Acta Histochemica* 2002; 104: 431-4.

Marganski WA, Gangopadhyay SS, Je HD, Gallant C, Morgan KG. Targeting of a novel  $Ca^{+2}$ /calmodulin-dependent protein kinase II is essential for extracellular signal-regulated kinase-mediated signaling in differentiated smooth muscle cells. *Circulation Research* 2005; 97: 541-9.

Mauleon P. The establishment of the primordial follicle reserve in the sheep embryo studied by labelling of oocytes with tritiated thymidine. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 1974; 4: S133-9.

Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 130-8.

Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reproduction in Domestic Animals* 2003; 38: 247-58.

McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 200-14.

Medeiros F, Rigl CT, Anderson GG, Becker SH, Halling KC. Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2007; 131: 1805-16.

Meduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 2266-76.

Melcer S, Gruenbaum Y, Krohne G. Invertebrate lamins. *Experimental Cell Research* 2007; 313: 2157-66.

Mihm M, Good TE, Ireland JL, Ireland JJ, Knight PG, Roche JF. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biology of Reproduction* 1997; 57: 1328-37.

Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 811-9.

Mihm M, Bleach EC. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* 2003; 78: 217-37.

Mihm M, Baker PJ, Ireland JL, Smith GW, Coussens PM, Evans AC,

Ireland JJ. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of Reproduction* 2006; 74: 1051-9.

Mihm M, Evans AC. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; 43 Suppl 2: 48-56.

Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *Journal of Cell Biology* 2000; 150: 1283-98.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.

Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 1995; 49: 321-33.

Mosimann W, Kohler, T., Abou-Elmagd, A., Friess, A. E., Goller, H. (1999) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 342

Nickel R, Schummer, A., Seiferle, E. (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Bd.2 Eingeweide, 9 edn*. Parey Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart, Stuttgart. 482

Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nature Cell Biology* 2006; 8: 156-62.

Nowacki R. [Current picture of the mature ovarian follicle of mammals]. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 1977; 6: 217-39.

O'Neill A, Williams MW, Resneck WG, Milner DJ, Capetanaki Y, Bloch RJ. Sarcolemmal organization in skeletal muscle lacking desmin: evidence for cytokeratins associated with the membrane skeleton at costameres. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13: 2347-59.

Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Sub-Cellular Biochemistry* 1998; 31: 105-40.

Ortega HH, Salvetti NR, Muller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *Journal of Comparative Pathology* 2007; 136: 222-30.

Pallari HM, Eriksson JE. Intermediate filaments as signaling platforms. *Science's STKE* 2006; 2006: pe53.

Pekny M, Lane EB. Intermediate filaments and stress. *Experimental Cell Research* 2007; 313: 2244-54.

Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 2006; 44: 622-32.

Perez-Martinez C, Garcia-Fernandez RA, Escudero A, Ferreras MC, Garcia-Iglesias MJ. Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract. *Journal of Comparative Pathology* 2001; 124: 70-8.

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; 1: 92-5.

Pfaffl MW, Fleige S, Riedmaier I. Validation of lab-on-chip capillary electrophoresis systems for total RNA quality and quantity control. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2008; 22: 829-34.

Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 145: 27-37.

Prokocimer M, Davidovich M, Nissim-Rafinia M, Wiesel-Motiuk N, Bar DZ, Barkan R, Meshorer E, Gruenbaum Y. Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13: 1059-85.

Qin Z, Buehler MJ, Kreplak L. A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *Journal of Biomechanics* 2010; 43: 15-22.

Quinlan RA, Franke WW. Molecular interactions in intermediate-sized filaments revealed by chemical cross-linking. Heteropolymers of vimentin and glial filament protein in cultured human glioma cells. *European Journal of Biochemistry* 1983; 132: 477-84.

Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; 305: 1157-9.

Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 96-103.

Rivera GM, Fortune JE. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 2003a; 144: 2977-87.



Rivera GM, Fortune JE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 2003b; 144: 437-46.

Roche JF, Mihm, M., Diskin, M. G., Ireland, J. J. A Review of Regulation of Follicle Growth in Cattle. *Journal of Animal Science* 1998; Suppl 3: 16-29.

Rüsse I, Sinowatz, F. (1998) *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, 2 edn. Parey Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart, Stuttgart

Sam M, Shah S, Friden J, Milner DJ, Capetanaki Y, Lieber RL. Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles. *American journal of physiology. Cell physiology.* 2000; 279: C1116-22.

Santini D, Ceccarelli C, Mazzoleni G, Pasquinelli G, Jasonni VM, Martinelli GN. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry* 1993; 99: 311-9.

Sasson R, Rimon E, Dantes A, Cohen T, Shinder V, Land-Bracha A, Amsterdam A. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10: 299-311.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988; 83: 663-71.

Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 1134-50.

Schirmer EC, Guan T, Gerace L. Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *Journal of Cell Biology* 2001; 153: 479-89.

Schlessinger D, Van Zant G. Does functional depletion of stem cells drive aging? *Mechanisms of Ageing and Development* 2001; 122: 1537-53.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 2006; 7: 3.

Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology* 2006; 174: 169-74.

Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 358-66.

Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* 1988; 39: 308-17.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update* 2005; 11: 461-71.

Spann TP, Moir RD, Goldman AE, Stick R, Goldman RD. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *Journal of Cell Biology* 1997; 136: 1201-12.

Spann TP, Goldman AE, Wang C, Huang S, Goldman RD. Alteration of

nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Biology* 2002; 156: 603-8.

Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 1995; 12: 223-45.

Spicer LJ, Chamberlain CS. Production of insulin-like growth factor-I by granulosa cells but not thecal cells is hormonally responsive in cattle. *Journal of Animal Science* 2000; 78: 2919-26.

Starr DA, Hermann GJ, Malone CJ, Fixsen W, Priess JR, Horvitz HR, Han M. unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development* 2001; 128: 5039-50.

Starr DA, Han M. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* 2002; 298: 406-9.

Starr DA. Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. *Molecular Biosystems* 2007; 3: 583-9.

Stewart M. Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 1990; 2: 91-100.

Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *Journal of Animal Science* 1995; 73: 3719-31.

Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *Journal of Cell*

Biology 1999; 147: 913-20.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 101: 547-55.

Sunderland SJ, Knight PG, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction* 1996; 54: 453-62.

Tanaka Y, Nakada K, Moriyoshi M, Sawamukai Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction* 2001; 121: 777-82.

Tang DD, Bai Y, Gunst SJ. Silencing of p21-activated kinase attenuates vimentin phosphorylation on Ser-56 and reorientation of the vimentin network during stimulation of smooth muscle cells by 5-hydroxytryptamine. *Biochemical Journal* 2005; 388: 773-83.

Tang DD. Intermediate filaments in smooth muscle. *American journal of physiology. Cell physiology.* 2008; 294: C869-78.

Tao JX, Ip W. Site-specific antibodies block kinase A phosphorylation of desmin in vitro and inhibit incorporation of myoblasts into myotubes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1991; 19: 109-20.

Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in Cell Biology* 2005; 15: 608-17.

Townson DH, Putnam AN, Sullivan BT, Guo L, Irving-Rodgers HF. Expression and distribution of cytokeratin 8/18 intermediate filaments in

bovine antral follicles and corpus luteum: an intrinsic mechanism of resistance to apoptosis? *Histology and Histopathology* 2010; 25: 889-900.

Tzur YB, Wilson KL, Gruenbaum Y. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2006; 7: 782-8.

van den Hurk R, Dijkstra G, van Mil FN, Hulshof SC, van den Ingh TS. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Molecular Reproduction and Development* 1995; 41: 459-67.

van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005; 63: 1717-51.

van Wezel IL, Krupa M, Rodgers RJ. Development of the membrana granulosa of bovine antral follicles: structure, location of mitosis and pyknosis, and immunolocalization of involucrin and vimentin. *Reproduction, Fertility, and Development* 1999; 11: 37-48.

van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJ, Blankenstein MA, de Jong FH, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. *Human Reproduction* 2003; 18: 495-501.

Verstraeten VL, Broers JL, Ramaekers FC, van Steensel MA. The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 1231-48.

Vlcek S, Dechat T, Foisner R. Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2001; 58: 1758-65.

Wakelam MJ. The fusion of myoblasts. *Biochemical Journal* 1985; 228: 1-12.

Wang R, Li Q, Tang DD. Role of vimentin in smooth muscle force development. *American journal of physiology. Cell physiology.* 2006; 291: C483-9.

Wang R, Li QF, Anfinogenova Y, Tang DD. Dissociation of Crk-associated substrate from the vimentin network is regulated by p21-activated kinase on ACh activation of airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2007; 292: L240-8.

Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 1999; 54: 33-48.

Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 2007; 68 Suppl 1: S22-9.

Wilson KL, Foisner R. Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010; 2: a000554.

Wrathall JH, Knight PG. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *Journal of Endocrinology* 1995; 145: 491-500.

Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 951-7.

Yang MY, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine

---

ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biology of Reproduction* 2008; 78: 1153-61.

## **DANKSAGUNG**

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Beratung, die jederzeit gewährte, freundliche und engagierte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und sein Entgegenkommen und Verständnis.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie für die fachliche und technisch stets freundliche Unterstützung. Besonders gilt hier mein Dank Frau Dr. K. Ebach und Frau Dr. R. Kenngott, die mir neben dem fachlichen Bereich auch in persönlichen Dingen eine große Hilfe waren.

Mein Dank richtet sich auch an das Graduiertenkolleg 1029 der DFG für die Unterstützung dieser Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir immer für mich da waren bzw. sind und mir stets den Rücken gestärkt haben.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meinem Onkel Reinhard Soltau bedanken. Er war und ist für mich ein ganz besonderer Rückhalt.