

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. H. Kaltner

**Vorkommen von Galektinen in den Gonaden der Maus – Untersuchungen
unter Einbeziehung eines funktionellen
Knock-out Modells für Galektin-3**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Michaela Lohr

aus

München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Kaltner

Korreferent: Prof. Dr. M. El-Matbouli

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
2. Literaturübersicht	13
2.1 Tierische Lektine	13
2.1.1 Überblick über die wichtigsten Proteinfamilien der Lektine und ihre Funktionen	13
2.1.2 Galektine	17
2.2 Vorkommen von Galektinen im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt	19
2.3 Physiologische Vorgänge am Ovar	24
2.4 Physiologische Vorgänge am Hoden und Nebenhoden	30
3. Zielsetzung	34
4. Material und Methoden	35
4.1 Tiere und Tierhaltung	35
4.2 Zucht der Mäuse des Stammes C57BL/6NCrI	35
4.3 Material	36
4.3.1 DNA-Präparation für Schwanzspitzen-PCR	36
4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
4.3.3 Agarosegelelektrophorese	37
4.3.4 Auswahl und Vorbehandlung der Tiere	38
4.3.5 Probenentnahme	38
4.3.6 Total RNA-Präparation	40
4.3.7 Reverse Transkriptase	41
4.3.8 PCR für Klonierungen und Galektin-Screening	41

4.3.9	Klonierung in pETBlue-1 Acceptor Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung	43
4.3.10	Klonierung in pGem [®] -4Z-Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung der Plasmide für RNA-Sonden	45
4.3.11	Herstellen einer Digoxigenin-markierten Sonde	46
4.3.12	Northern Blot	49
4.3.13	<i>In situ</i> Hybridisierung	52
4.3.14	Histologie	54
4.3.14.1	Einbetten der Organe und Anfertigen histologischer Schnitte am Mikrotom	54
4.3.14.2	Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin (HE, nach Romeis, 1989)	54
4.3.14.3	Färbung nach Papanicolaou (nach Romeis, 1989)	55
4.3.15	Immunhistochemie	55
4.3.15.1	Vorbehandlungen	55
4.3.15.2	Alternative Vorbehandlungen	56
4.3.15.3	Immunhistochemie am Paraffinschnitt und am Gefrierschnitt	56
4.3.15.4	Negativkontrollen	58
4.3.16	TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)	58
4.3.17	Western Blotting	59
4.3.17.1	Proteingewinnung	59
4.3.17.2	SDS-PAGE	60
4.3.17.3	Transfer auf Nitrozellulose	62
4.3.17.4	Silberfärbung	62
4.3.17.5	Proteindetektion durch Antikörper	63
4.4	Methoden	64
4.4.1	DNA-Präparation für Schwanzspitzen-PCR	64
4.4.2	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	65
4.4.3	Agarosegelelektrophorese	66
4.4.4	Zyklusinduktion und Synchronisation der weiblichen Mäuse	67
4.4.5	männliche Mäuse	68
4.4.6	Probenentnahme	68
4.4.7	Präparation der Total-RNA	70
4.4.8	Reverse Transkriptase (RT)	71

4.4.9	PCR für Klonierungen und Galektin-Screening	71
4.4.10	Klonierung in pETBlue-1 AccepTor Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung	72
4.4.11	Klonierung in pGEM [®] -4Z-Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung der Plasmide für RNA-Sonden	73
4.4.12	Herstellen einer Digoxigenin-markierten sense- und antisense-RNA-Sonde	74
4.4.13	Northern Blot	78
4.4.14	<i>In situ</i> Hybridisierung (ISH)	79
4.4.15	Histologie	80
4.4.15.1	Einbetten der Organe und Anfertigen histologischer Schnitte am Mikrotom	80
4.4.15.2	Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin (HE, nach Romeis, 1989)	81
4.4.15.3	Färbung nach Papanicolaou (nach Romeis, 1989)	81
4.4.16	Immunhistochemie	82
4.4.16.1	Vorbehandlungen	82
4.4.16.2	Alternative Vorbehandlungen	83
4.4.16.3	Immunhistochemie am Paraffinschnitt und Gefrierschnitt	83
4.4.16.4	Negativkontrollen	85
4.4.17	TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)	86
4.4.18	Western-Blotting	87
4.4.18.1.	Proteingewinnung	87
4.4.18.2	SDS-PAGE	87
4.4.18.3	Elektrophoretischer Transfer auf Nitrozellulose (Tank Transfer System)	88
4.4.18.4	Silberfärbung	88
4.4.18.5.	Proteinnachweis durch Antikörper	89
5.	Ergebnisse	91
5.1	RT-PCR zum Nachweis der Expression von Galektinen	92
5.2	Klonierung von murinen Galektinen zur Überprüfung der Primerspezifität	93
5.3	Histologischer Verlauf des ovariellen Zyklus und Zykluskontrolle	95

5.4	Western Blotting zum Nachweis der Proteinexpression von Galektinen im Verlauf des ovariellen Zyklus bei Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)	99
5.5	Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation der Galektine von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) im Verlauf des ovariellen Zyklus	102
5.6	Immunhistochemische Koloalationen der Galektin-3 und der F4/80 Proteinexpression im ovariellen Zyklus von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+)	110
5.7	Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation des Proteins 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) im Verlauf des ovariellen Zyklus von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)	113
5.8	Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisationen der Galektin-3 und der 3 β -HSD Proteinexpression im ovariellen Zyklusverlauf von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+)	117
5.9	Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von cleaved Caspase-3- und TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)-positiven Zellen im ovariellen Zyklus von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)	119
5.10	<i>In situ</i> Hybridisierung (ISH) mit einer DIG-markierten RNA-Sonde zum Nachweis der Galektin-3-mRNA Expression im Ovar	122
5.11	Northern Blot Analyse der Expression der Galektin-3-mRNA im ovariellen Zyklusverlauf	124
5.12	Western Blot Analyse der Proteinexpression der Galektine im Hoden und Nebenhoden in der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)	126
5.13	Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der Lokalisation der Galektine und von Aktin im Hoden und Nebenhoden von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) im Verlauf der postnatalen Entwicklung	130

5.14	Immunhistochemische Darstellung der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) positiven Zellen im postnatalen Entwicklungsverlaufs des Hodens von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)	139
5.15	Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisationen der Galektin-3 und der 3 β -HSD Proteinexpression am Hoden von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+)	140
5.16	Northern Blot Analyse der Expression der Galektin-3-mRNA im postnatalen Entwicklungsverlauf des Nebenhodens	144
6.	Diskussion	146
7.	Zusammenfassung	156
8.	Summary	158
9.	Literaturverzeichnis	160

Geräteliste

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	RNA der 18S Ribosomen Untereinheit (18S)
28S rRNA	RNA der 28S Ribosomen Untereinheit (28S)
20 α -HSD	20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
ABC-Kit	Avidin-Biotin-Komplex Kit (engl. Complex)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary)
CL	Corpus luteum bzw. Corpora lutea (Gelbkörper)
CRD	Kohlenhydrat-bindende Domäne (engl. Carbohydrate Recognition Domain)
CRP	C-reaktives Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleid Acid)
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
EGF	epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FasL	Fas-Ligand
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
Gal	D-Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
GH	Wachstumshormon (engl. Growth Hormon)
HCG	humanes Choriongonadotropin
IE	Internationale Einheiten
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (engl. Insulin-like growth factor 1)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1	Interleukin-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
i. p.	intra peritoneal
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kDa	kiloDalton
LB	Luria Broth
LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	LH-Rezeptor
MAC2	Galektin-3
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
min	Minute

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaCl-Lösung	Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %
NBT/BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidin-Salz
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid (engl. <i>Nitric Oxide</i>)
OD	optische Dichte
P450 _{scc}	Cytochrom P450 side-chain cleavage
PAP	Papanicolaou
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
p. i.	post injectionem
PMSG	pregnant mare's serum gonadotropin
POD	Merettich-Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleid Acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion
s	Sekunde
SCOS	Sertoli cell only-Syndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
StAR	akutes Steroid-regulierendes-Protein
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TNF _α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling
uNK	uterine natürliche Killerzellen

1. Einleitung

Die Vielfalt biologischer Erkennungsprozesse wird von wenigen molekularen Prinzipien bestimmt. Seit Jahrzehnten werden die Grundprinzipien dieser Erkennungsprozesse intensiv erforscht, nämlich die Protein-Nukleinsäuren- sowie die Protein-Protein-Wechselwirkungen. Seit kurzem kommt die spezifische Interaktion von Proteinen mit Kohlenhydraten hinzu (Varki, 1993; Cook, 1995; Hakomori & Igarashi, 1995; Sharon & Lis, 1997). Ein medizinisch relevantes Beispiel für eine solche Interaktion ist u. a. die Art und Weise, wie Pathogene (Viren, Bakterien und Parasiten) räumlich zugängliche Zuckerantennen, die von einer Zelloberfläche in den extrazellulären Raum ragen, als Andockpunkte benützen (Ofek & Doyle, 1994; Fukuda & Vliegthart, 1999).

Im Stoffwechsel werden Kohlenhydrate als Energieträger benützt. Wenn sie kovalent an Proteine, Lipide und andere biologische Komponenten gebunden sind, dienen sie in Form von Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen oder Phosphoinositolen als Bestandteil zellulärer Strukturelemente. Der Aufbau dieser Strukturelemente wird von Glykosyltransferasen gesteuert und bildet auf diese Weise das Glykosylierungsmuster einer Zelle. Für diese Vielfalt von Zuckerkonjugaten wird eine entsprechende Vielfalt von Enzymen benötigt. Tatsächlich hat man gegenwärtig bei Säugetieren mindestens 200 Glykosyltransferasen identifiziert, die über 33 von 51 Sequenzfamilien verteilt sind (Breton et al., 2001). Dabei werden hier noch nicht einmal die Enzyme berücksichtigt, die für das Einfügen von Substituenten verantwortlich sind wie z. B. Sulfotransferasen (mindestens 23 Proteine in diesem Fall). Das Glykosylierungsmuster einer Zelle kann durch Differenzierungsprozesse, Erkrankungen wie maligne Transformation sowie durch definierte Faktoren wie Zytokine oder Steroidhormone beeinflusst und verändert werden. Eine fehlerhafte Bildung solcher Strukturen oder Veränderungen des Glykosylierungsmusters können zu einer Reihe von Erkrankungen führen. Der Ausfall eines Transportmoleküls für einen einzelnen Zucker, in diesem Fall der L-Fukose, bewirkt z. B. das Leukozyten-Adhäsions-Defizienzsyndrom II (LAD II), das sich in gravierenden, klinisch fassbaren Symptomen äußert wie z. B. rekurrenten Infektionen (Albelda et al., 1994; Fukuda, 1995; Reuter & Gabius, 1999). Mängel in diesem Aspekt der molekularen Protein-Zucker-Erkennung werden zunehmend als die Ursache für bestimmte Krankheiten, wie z. B. auch für die Mukopolidosen II, IIIA und IIIC enthüllt (Schachter, 1999). Auch die drastischen Störungen der Embryonalentwicklung bei transgenen Tieren, deren Proteinglykosylierung an

Asparaginresten eingeschränkt ist, sind Beweise für eine fundamentale Rolle dieser Protein- und Lipidmodifikationen (Metzler et al., 1994).

Nachdem die Bedeutung von Zuckern als Signalmoleküle belegt ist, stellt sich im Weiteren die Frage nach den Rezeptoren, die diese Signale umsetzen. Die Familie der Rezeptormoleküle, die die in den Saccharidstrukturen gespeicherten Informationen entschlüsselt und in biologische Effekte umsetzt, wird systematisch in Enzyme, die am Umsatz von Zuckern und Glykokonjugaten beteiligt sind, in Antikörper und in Kohlenhydrat-bindende Proteine, die weder ein Enzym noch ein Immunglobulin sind, eingeteilt. Letztere Gruppe wird als Lektine bezeichnet (Barondes, 1988). Ursprünglich wurden die Lektine von S. W. Mitchell (1860) in Schlangengiften und von H. Stillmark (1888) im Extrakt aus Rizinussamen als toxische, zellagglutinierende Proteinfraction entdeckt. In neuerer Zeit wurde gezeigt, dass Lektine bei Pflanzen und Tieren in großer Zahl und in verschiedenen Formen vorkommen. Ein Überblick wird hierzu in Abschnitt 2.1.1 gegeben. Zu ihren Funktionen gehören u. a. Zucker-vermittelte Endozytose, die Zielsteuerung von Glykoproteinen in verschiedenen Zelltypen (z. B. Hepatozyten, Makrophagen oder auch Tumorzellen), Vermittlung interzellulärer Wechselwirkungen mit Pathogenen oder Wirtszellen bzw. Zellen des Immunsystems und Auslösung von Biosignaltransduktionen, z. B. im Rahmen der Regulation von Proliferation (Sharon & Lis, 1989; Gabius & Bardosi, 1991; Hughes, 1992; Drickamer & Taylor, 1993; Gabius, 1997; Gabius et al., 2004). Eine dieser Proteinfamilien umfasst Ca^{2+} -unabhängige, β -Galaktosid-spezifische Lektine mit dem „sandwich“-Faltungsmuster für antiparallele β -Faltblätter, die Galektine. Galektine sind im Tierreich bis hin zu den Pilzen weit verbreitet und in der Evolution in Hinblick auf bestimmte Sequenzelemente relativ stark konservierte Proteine (Kasai & Hirabayashi, 1996). Sie werden nach der Synthese, die an zytoplasmatischen und nicht an am Endoplasmatischen Retikulum gebundenen Ribosomen stattfindet, über einen noch unbekanntem Sekretionsmechanismus aus der Zelle transportiert (Barondes et al., 1994b). Im Falle von Galektin-3 wurde gezeigt, dass es von den Zellen durch einen neuartigen, noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus, genannt Ektozytose, sezerniert wird, der von dem klassischen Sekretionsweg über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat unabhängig ist (Sato et al., 1993; Sato & Hughes, 1994; Hughes, 1999; Nickel, 2003). Wie in Abschnitt 2.1.2 dargestellt ist, hat man bis jetzt 14 Galektine in verschiedenen Geweben von Säugetieren entdeckt.

In dieser Arbeit sollten nun speziell die Gonaden (Ovarien, Hoden und Nebenhoden) der Maus einer genaueren Betrachtung in Hinblick auf die Expression von Galektinen unterzogen werden. Das besondere Augenmerk wurde dabei auf Galektin-3 gelegt, das momentan als

einzig bekannter Vertreter der Galektine von Chimären-Typ existiert. Bei diesem Galektin konnte man somit davon ausgehen, dass es keinen anderen Vertreter des gleichen Typs gibt, der bei einem Ausfall von Galektin-3 dessen funktionelle Rolle übernimmt. Deshalb wurde zusätzlich ein Knock-out Mausmodell für Galektin-3 (Gal-3 $-/-$) in die Untersuchungen miteinbezogen, um eventuell einen genaueren Einblick in die Funktionen dieses Galektins gewinnen zu können.

2. Literaturübersicht

Die Literaturübersicht befasst sich zunächst mit den wichtigsten Familien der tierischen Lektine und ihren bekannten Funktionen. Danach wird speziell auf die Familie der Galektine eingegangen. Anschließend wird ein Überblick über Galektine im Reproduktionstrakt der Maus gegeben und es werden die postnatalen Gegebenheiten und Vorgänge am Ovar und am Hoden und Nebenhoden genauer erläutert.

2.1 Tierische Lektine

2.1.1 Überblick über die wichtigsten Proteinfamilien der Lektine und ihre Funktionen

Mit der biochemischen Isolierung des Asialoglykoproteinrezeptors (Ashwell & Morell, 1974) wurde zum ersten Mal ein Lektin von einem Säugetier gereinigt. Somit wurde der Beweis erbracht, dass Lektine, die häufig als Pflanzenproteine *per se* angesehen wurden, endogen in tierischen Organismen vorkommen. Danach wurden Lektine in vielen Tierarten (Amphibien, Reptilien, Aale, Nematoden, Schwämme u. a.) gefunden und isoliert, was zeigte, dass Lektine weit verbreitet sind.

Die wichtigsten Proteinfamilien dieser Lektine wurden durch Vergleiche der Sequenzen und der Topologie der Kohlenhydrat-bindenden Domäne („carbohydrate recognition domain“, CRD) in 5 Hauptgruppen eingeteilt (Drickamer, 1995; Powell & Varki, 1995; Rini, 1995). Dies sind im Einzelnen die Lektine vom C-Typ, vom I-Typ und P-Typ sowie die Familien der Galektine und der Pentraxine (Tabelle 1).

Hauptfamilien der tierischen Lektine:

Familie	Strukturmotif	Zuckerligand
C-Typ	Konservierte CRD mit Ca ²⁺ -Ionen	variabel (u. a. Mannose, Galaktose, Fukose, Heparin-tetrasaccharid)
I-Typ	Immunglobulin-ähnliche CRD	variabel (Man ₆ GlcNAc ₂ , HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure, α2,3/α2,6-Sialyllaktose)
Galektine (früher S-Typ)	Konservierte CRD	Galβ1,3(4)GlcNAc Basisstrukturen mit Spezies- und Galektintyp-abhängigen Affinitätsunterschieden für die Verlängerung z. B. zu den Blutgruppenepitopen A, B oder H; Affinität auch zu poly(N-Acetyllaktosamin) Ketten
Pentraxine	Diskusähnliche Aggregation zu Pentameren	4,6-Ringacetale von β-Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide
P-Typ	Konservierte CRD	Mannose-6-Phosphat-enthaltende Glykoproteine

Tabelle 1: Einteilung verschiedener Säugtierlektine in Familien (Gabius, 2001)

CRD: Carbohydrate Recognition Domain

Des Weiteren sind noch Lektine bekannt, wie z. B. Calnexin und Calretikulin (Reuter & Gabius, 1997), die sich noch in keine dieser definitiven Kategorien einteilen lassen.

Für die einzelnen Familien mit Ausnahme der Galektine, die noch gesondert besprochen werden, sollen hier nun ein paar Beispiele gebracht werden:

a) C-Typ Lektine sind (Glyko)Proteine, deren Zuckerbindung nur in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen erfolgen kann. Diese Familie wird aufgrund homologer Sequenzabschnitte in der CRD noch in Untergruppen aufgeteilt. Beispiele für diese Familie sind der Asialoglykoproteinrezeptor (Ashwell & Morell, 1974; Ashwell & Harford, 1982), die Unterfamilien der Selektine und Kollektine sowie Rezeptoren von Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen. Selektine sind Typ I Transmembranproteine und finden sich z. B. auf der Zelloberfläche von aktivierten Endothelzellen (E-Selektin), aktivierten Plättchen (P-Selektin) und Lymphozyten (L-Selektin) (Bevilacqua & Nelson, 1993). Selektine z. B. sorgen in der frühen Phase von Entzündungsprozessen dafür, dass der Initialkontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen gebildet wird. Im Weiteren kommt es dann zum Einwandern von Immunzellen in das darunterliegende, betroffene Gewebe (Kaltner & Stierstorfer, 1998).

b) Die zweite Familie, die I-Typ Lektine, gehört strukturell zur Immunglobulin-Superfamilie. Diese Familie weist ein konserviertes Strukturmotiv auf, das zum ersten Mal bei Immunglobulinen beschrieben wurde. Zu dieser Gruppe gehören z. B. N-CAM (neurales Zelladhäsionsmolekül) und Sialoadhäsine (Powell & Varki, 1995).

c) Mitglieder der Familie der Pentraxine (CRP, Limulin) sind an Abwehrprozessen durch das Erkennen von fremden oder abweichenden Zuckersignaturen auf Zellen beteiligt (inklusive von Endozytose oder Einleitung der Opsonierung oder Komplementaktivierung) (Gabius, Ed., 2002).

d) P-Typ Lektine schließlich sind für das intrazelluläre Routing von Glykoproteinen und Vesikeln zuständig. So werden mit Mannose-6-Phosphat markierte lysosomale Enzyme z. B. durch P-Typ Lektine erkannt und sortiert (Gabius, 1997; Sharon & Lis, 1997).

Neben dieser auf Strukturmotiven basierenden Einteilung kann man die tierischen Lektine, wie in Tabelle 2 dargestellt, auch nach ihren bisher bekannten Funktionen einteilen.

Funktionen tierischer Lektine:

Aktivität	Beispiele von Lektinen
Erkennen von Stammregionen von N-Glykanen, ein Signal für die Konjugation von Ubiquitin, wenn es in inkorrekt gefalteten Proteinen zugänglich ist	F-Box Proteine Fbs1/2 (Fbx2/FBG1, Fbx6b/FBG2) als Liganden-spezifische Teile des SCF Ubiquitin-Ligase Komplexes
Liganden-selektive molekulare Chaperone im Endoplasmatischen Retikulum (ER)	Calnexin, Calretikulin
Leitung von falsch gefalteten Glykoproteinen zu dem mit dem ER verbundenen Abbau	EDEM/Mnl1 (Htm1)
Intrazelluläre Wegweiser („routing“) von Glykoproteinen und Vesikeln	ERGIC-53, VIP-36 (wahrscheinlich auch ERGL und VIPL), P-Typ Lektine, Komitin
Intrazellulärer Transport und extrazellulärer Zusammenbau	nicht-Integrin 67 kDa Elastin/Laminin-bindendes Protein
Induziert Superimposition und „zippering“ von Membranen (Bildung von Birbeck Granulas)	Langerin (CD207)
Zelltyp spezifische Endozytose	Asialoglykoproteinrezeptoren der Leber und von Makrophagen, dendritische Zellen und Makrophagen-C-Typ Lektine (Mannose-Rezeptor Familienmitglieder (Tandem-repeat Typ) und single CRD Lektine wie Langerin/CD207), Cystein-reiche Domäne der Dimer-Form des Mannose-Rezeptors für GalNAc-4-SO ₄ -tragende Glykoprotein hormone in hepatischen Endothelzellen, P-Typ Lektine
Erkennen von fremden Zuckern (β 1,3-Zucker, LPS)	CR3 (CD11b/CD18), Limulus-Koagulationsfaktoren C und G, Dektin-1, Erdwurm CCF
Erkennen von fremden oder abweichenden Zuckersignaturen auf Zellen (inklusive von Endozytose oder Einleitung der Opsonierung oder Komplementaktivierung)	Kollektine, L-Ficolin, C-Typ Rezeptor von Makrophagen und dendritischen Zellen, α / θ -Defensine, Pentraxine (CRP, Limulin), Tachylektine
Zielausrichtung der Enzymaktivität in multimodularen Proteinen	Akrosin, Limulus-Koagulationsfaktor C
Brückenbildung zwischen Molekülen	Homodimer und Tandem-repeat Galektine, Cytokine (z. B. IL-2, IL-2R und CD3 von TCR), cerebellar lösliches Lektin
Induktion oder Suppression von Effektorenfreisetzung (H ₂ O ₂ , Cytokine usw.)	Galektine, Selektine und andere C-Typ Lektine wie CD23, BDCA-2 und Dektin-1
Kontrolle des Zellwachstums und Induktion von Apoptose/Anoikis	Galektine, C-Typ Lektine, Amphoterin-like Protein, Hyaluronsäure-bindendes Protein, cerebellar lösliches Protein
Zellwanderung und Routing	Selektine und andere C-Typ Lektine, I-Typ Lektine, Galektine, Hyaluronsäure-bindende Proteine (RHAMM, CD44, Hyalektane/ Lektikane)
Zell-Zell-Interaktionen	Selektine und andere C-Typ Lektine (z. B. DC-SIGN), Galektine, I-Typ Lektine (z. B. Siglecs, N-CAM, P ₀ oder L1)
Zell-Matrix-Interaktionen	Galektine, Heparin- und Hyaluronsäure-bindende Lektine einschließlich der Hyalektane/ Lektikane, Calretikulin
Zusammenbau des Matrixnetzwerkes	Proteoglykan-Kernproteine (C-Typ CRD und G1 Domäne von Hyalektanen/Lektikanen), Galektine (z. B. Galektin-3/Hensin), nicht-Integrin 67 kDa Elastin/Laminin-bindendes Protein

Tabelle 2: Funktionen von tierischen Lektinen, von (Gabijs, 2001), erweitert

Wie man dieser Tabelle entnehmen kann, ist die Familie der Galektine an einer Vielzahl von Funktionen im tierischen Organismus beteiligt. Da es in dieser Arbeit um Galektine geht, soll diese Familie nun in einem eigenen Kapitel kurz besprochen werden.

2.1.2 Galektine

Galektine sind Mitglieder einer großen, noch immer wachsenden Familie von tierischen Lektinen, die durch die ganze tierische Entwicklung hindurch hoch konserviert geblieben sind (Barondes et al., 1994a; Liu, 2000; Rabinovich et al., 2002a). Sie teilen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der Sequenz für die Kohlenhydrat-Erkennungsregion (carbohydrate recognition domain, CRD) miteinander. Bis jetzt wurden bei den Säugetieren 14 Galektine formell in einer großen Vielzahl von Geweben bei mehreren Spezies identifiziert (Rabinovich et al., 2002b). Von diesen Kohlenhydrat-bindenden Proteinen wird berichtet, dass sie eine kritische Rolle z. B. bei der Wanderung von Zellen, in Signalketten und bei der Entzündung spielen (Barondes et al., 1994a). Durch Vergleiche von Sequenzen und Strukturmotiven der einzelnen Galektine untereinander erkennt man, dass sie noch in Untergruppen einteilt werden können. Wenn man z. B. die komplette Struktur der Domänen der einzelnen Galektine betrachtet, stellt man fest, dass die Art, wie die CRDs angeordnet sind, einen Schlüsselparameter für die Bildung von Untergruppen in dieser Lektinfamilie darstellt – mit bedeutenden Folgen für die Funktion der Galektine. Im Prinzip gibt es drei verschiedene Gruppen (Kasai & Hirabayashi, 1996), wie man in der Übersicht in Tabelle 3 sehen kann: Galektine vom Proto-Typ (Galektine 1, 2, 5 und 7), Tandem-repeat Typ (Galektine 4, 6, 8, 9 und 12) und Chimären-Typ (Galektin-3). Hier zeigt sich schon, dass Galektin-3 innerhalb der Galektinfamilie eine Sonderstellung einnimmt, indem es der momentan einzig bekannte Vertreter des Chimären-Typs ist. Galektine vom Prototyp können in einer oxidativen Umgebung unter Verlust ihrer Bindungsaktivität intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Eine andere Art der chemischen Bindung zeigt Galektin-3. Der einzige Vertreter des Chimären-Typs kann mit seinem N-terminalen Bereich kovalent mit anderen Galektin-3 Monomeren verknüpft werden, was als Voraussetzung für die Agglutination und Bindung an immobilisierte Glykoliganden wie IgE oder Laminin gilt (Hsu et al., 1992; Massa et al., 1993; Probstmeier et al., 1995; Liu et al., 1996). Bei Galektinen vom Tandem-repeat Typ wird anstelle einer nicht-kovalenten Dimerbildung ein Verbindungsprotein eingeführt, das kovalent zwei CRDs miteinander verbindet, wodurch eine Vernetzungseinheit aufgebaut wird.

Mitglieder der Galektinfamilie:

Name	Vorkommen	Strukturmerkmale
Galektin-1 (Galaptin, L-14)	Unterschiedliche Gewebe und Zelltypen	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (14-15 kDa): Proto-Typ
Galektin-2	Magen-Darm-Trakt; Klon eines humanen Lebertumors	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (43 % Sequenzgleichheit mit Galektin-1; 14 kDa): Proto-Typ
Galektin-3 (CBP35, Mac-2 Antigen, L-29, IgE-bindendes Protein, L-34)	Unterschiedliche Gewebe und Zelltypen	Monomer mit einer CRD (Bildung von Oligomeren in Lösung und auf Oberflächen); Pro-, Tyr- und Glyreiche Wiederholungen im N-terminalen Bereich (27-36 kDa): Chimären-Typ
Galektin-4	Dickdarm, Dünndarm, Magen, Mundschleimhaut, Speiseröhre; Lunge, Hoden, Brust, Leber und Plazenta in der RT-PCR	Monomer mit zwei teilweise homologen aber doch verschiedenen CRDs, verbunden durch ein Linkerpeptid (36 kDa); Proteolyse erzeugt abgeschnittene Proto-Typ ähnliche Produkte: Tandem-repeat Typ
Galektin-5	Retikulozyten, Erythrozyten (Ratte)	Monomer mit einer CRD (17 kDa): Proto-Typ
Galektin-6	Dünndarm, Dickdarm	Tandem-repeat Anordnung von zwei CRDs (33 kDa)
Galektin-7	Keratinocyten, verhornte Epithelien, Karzinomzellen	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (15 kDa): Proto-Typ
Galektin-8	Zahlreiche Gewebe; häufiges Vorhandensein in Tumorzelllinien (mögliche Verlängerung des Linkerpeptids)	Homolog zu den Galektinen 4 und 6 (Tandem-repeat Anordnung von zwei CRDs mit einem Linkerpeptid; 34 kDa)
Galektin-9	Dünndarm, Leber, Lunge, Niere, Thymus (Ratte/Maus; Dünndarm-Isoform mit 31/32 Aminosäuren mehr im Linkerpeptid); Lymphatische Gewebe und B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen, Pankreas, Dickdarmkarzinomzellen (human)	Homolog zu den Galektinen 4, 6 und 8 (Tandem-repeat Anordnung von zwei CRDs mit einem Linkerpeptid; 36 kDa)
Charcot-Leyden Kristallprotein (Galektin-10)	Selbstkristallisierender Hauptbestandteil von eosinophilen und basophilen Granulozyten	Eine CRD-ähnliche Struktur mit Spezifität für D-Man (16.5 kDa)
Galektin-11 (OvGal-11)	Magen-Darm-Trakt des Schafes, durch Nematodeninfektion induziert	Eine CRD, die den Proto-Typ Galektinen ähnelt (14 kDa)
Galektin-12	Verschiedene Gewebe (hochreguliert in Zellen, die in der G1-Phase oder an der Grenze der G1- zur S-Phase des Zellzyklus synchronisiert sind), Fettzellen	Homolog zu den Galektinen 4, 6, 8 und 9 (Tandem-repeat Anordnung von zwei CRDs mit einem Linkerpeptid; 35.3 kDa)
Galektin-13	Identisch mit dem Plazentaprotein 13 (pp13); auch in der Milz, Niere, Blase und in Tumorzellen exprimiert	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (16.1 kDa); große Ähnlichkeit mit Galektin-7 und dem Charcot-Leyden Kristallprotein
Galektin-14	Eosinophile des Schafes, die in die bronchoalveoläre Spülflüssigkeit sezerniert werden	Eine CRD, die den Proto-Typ Galektinen ähnelt (18.2 kDa)

Tabelle 3: Mitglieder der Galektinfamilie der Säugetierlektine (Gabijs et al, 2004)

Somit wurde gezeigt, dass Galektine als Mitglieder der Lektinfamilie in Säugetieren vorkommen und für eine ganze Reihe von Funktionen verantwortlich sind. Außerdem wurde die Sonderstellung von Galektin-3 innerhalb der Galektinfamilie dargestellt. Im Weiteren soll in der Literaturübersicht nun aufgezeigt werden, welche Untersuchungen in Bezug auf Galektine bereits vorgenommen worden sind. Dabei wurde das Gebiet auf Untersuchungen am Reproduktionstrakt beschränkt, insbesondere auf Untersuchungen am Reproduktionstrakt der Maus.

2.2 Vorkommen von Galektinen im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt

Die bisherigen Untersuchungen über Galektine im weiblichen Reproduktionstrakt beschränkten sich fast ausschließlich auf die Galektine 1 und 3, wodurch das Vorkommen dieser beiden Galektine gesichert ist. Im weiblichen Reproduktionssystem standen vor allem die Lokalisation dieser Galektine im Uterus und seinen Geweben im Vordergrund bzw. die Rolle dieser Galektine bei der Implantation der Blastozyste. Methodisch wurden vor allem immunhistochemische Untersuchungen und *in situ* Hybridisierung durchgeführt. So konnten Phillips et al. (1996) die Galektine 1 und 3 aus dem uteroplazentalen Komplex trächtiger Mäuse isolieren. Das spatiotemporale Verteilungsmuster wurde in dieser Studie dann mittels Antikörper in der Immunhistochemie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Galektin-1 in allen Zelltypen des Uterus mit Ausnahme des Lumen- und Drüsenepithels präsent war. Galektin-1 war in den Uteri aller Präimplantationsstadien der Trächtigkeit vorhanden bzw. in allen untersuchten Uteri. Nach der Implantation färbten sich die Zellen der Decidua basalis, alle Trophoblastenelemente der Plazenta, die granulären Uterindrüsen, das Myometrium und Endometrium, das nicht zur Decidua gehörte. Im Gegensatz dazu konnte Galektin-3 in den Gebärmüttern nichtträchtiger Tiere oder während der Präimplantationsstadien der Trächtigkeit nicht nachgewiesen werden. Nach der Implantation war Galektin-3 jedoch in Zellen des Endometriums nachweisbar und in den späteren Stadien der Trächtigkeit auch in der Decidua basalis, den Uterindrüsen und allen Trophoblastenelementen der Plazenta. Kein Galektin-3 konnte im Myometrium und im Endometrium, das nicht zur Decidua gehörte, nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten, dass Galektin-1 dem Gewebeerhalt diene, während die Funktion von Galektin-3 spezifisch auf die Trächtigkeit bezogen war. Schon hier konnte gezeigt werden, dass die Galektine spezifisch sowohl bestimmten Lokalisationen als auch bestimmten Funktionszuständen zugeordnet werden können. Choe et al. (1997) stellten im Weiteren fest, dass die mRNA für Galektin-1 in den Reproduktionsorganen der Maus, z. B.

im Uterus und im Ovar, reichlich exprimiert wurde. Bei der Expression im Uterus zeigte sich, dass sie durch den Implantationsprozeß des Embryos am fünften Tag post coitum spezifisch hochreguliert wurde. Weiterhin stellten sie fest, dass die ovariellen Steroide Progesteron und Östrogen die Expression der Galektin-1 mRNA im Gewebe des Uterus unterschiedlich regulierten.

Galektin-3 ist ein Protein, das sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorkommt. Somit stellte sich die Frage, ob die Lokalisation, an der das Protein detektiert wurde, auch der Ort der Proteinproduktion war. Den Beweis, dass mRNA und Proteinexpression gleich lokalisiert waren, lieferten Lee et al. (1998) mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung. So konnte hier gezeigt werden, dass die mRNA für Galektin-3 genau in den Zellen vorkam, von denen vorher schon gezeigt worden war, dass sie das immunreaktive Protein enthielten. Dazu gehörten die Epithelzellen des Uterus, an die sich bei der Implantation die Blastozysten anhefteten, das deciduale Endometrium der Implantationsstellen, die natürlichen Killerzellen des Uterus sowie einige Zelltypen der Trophoblasten. Es wurde gezeigt, dass Galektin-3 nicht nur von einer bestimmten Zellart produziert und dann im Gewebe verteilt wird, sondern dass es von verschiedenen Zelltypen produziert wird.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren zwar die Galektine 1 und 3 schon mehrfach nachgewiesen, aber die Frage nach einem Bindungspartner blieb offen. Schließlich fanden Crider-Pirkle et al. (2002) mittels Immunpräzipitation mit Anti-Galektin-3 IgG aus Homogenaten des uteroplazentalen Gewebes einen Bindungspartner für Galektin-3: Cubilin. Immunhistochemische Untersuchungen der Gewebeverteilung von Cubilin und Galektin-3 zeigten jedoch, dass beide Proteine nicht kolokalisiert waren. So trat Cubilin im Epithel des Dottersacks während der gesamten Dauer der Trächtigkeit auf, Galektin-3 konnte jedoch erst am Ende der Trächtigkeit dort nachgewiesen werden. Genauso konnte Cubilin nur in den Perforin-enhaltenden Granulas der uterinen natürlichen Killerzellen (uNK) nachgewiesen werden, während Galektin-3 im Zytoplasma dieser Zellen vorkam. Die *in situ* Hybridisierung zeigte, dass die Cubilin mRNA nur im Epithel des Dottersacks vorkam und nicht in den uNK, was andeutete, dass das Cubilin mit Hilfe von Galektin-3 von den uNK durch Endozytose aufgenommen worden war. Für die Autoren stimmte das mit der Annahme überein, dass Cubilin ein endogener Bindungspartner für Galektin-3 war, und sie vermuteten eine wichtige Rolle von Cubilin für die Funktion der uNK.

Neben den Galektinen 1 und 3 konnte noch ein weiteres Galektin im Reproduktionstrakt der Maus detektiert werden. Sato et al. (2002) fanden bei Western Blot Analysen von Geweben erwachsener Mäuse Galektin-7 neben den bereits bekannten Lokalisationen in geschichteten

Epithelien, wie z. B. in der Haut, auch im Ovar. Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen lokalisierten sie es im stromalen Epithel des Ovars. Das ließ sie vermuten, dass Galektin-7 Protein zwar v. a. in geschichteten, aber auch in feuchten Epithelien produziert wird, wo es eine einzigartige Rolle bei der Kontaktvermittlung zwischen den Zellen und den Schleimsubstanzen spielt. In Bezug auf das Ovar gingen sie davon aus, dass Galektin-7 eine Rolle beim Wachstum der ovariellen Follikel spielt.

Beim weiblichen Tier wurden also die Galektine 1, 3 und 7 im Reproduktionstrakt nachgewiesen und es konnte zum Teil ein sehr spezifisches Verteilungsmuster entdeckt werden. Die Untersuchungen am männlichen Reproduktionstrakt der Maus beschränkten sich bisher v. a. auf Galektin-1 und auf den Hoden.

Der Zyklus des samentragenden Epithels und die Spermatogenesewelle im Hoden sind konservierte Merkmale der spermatogenen Einrichtung von Wirbeltieren, die die Notwendigkeit der strengen Aufrechterhaltung der Spermienproduktion widerspiegeln. Obwohl der Zyklus und die Spermatogenesewelle des samentragenden Epithels beim Erwachsenen bereits gut dargestellt wurden, v. a. beim Nager, sind die Ursprünge ihrer Entwicklung unbekannt. Timmons et al. (2002) zeigten auf mRNA und Proteinebene, dass die Sertoli-Zellen einer präpubertalen Maus koordinierte, zyklische Muster einer Genexpression u. a. von Galektin-1 zeigten, die die Situation im adulten Hoden vorwegnahmen. Dort war die Funktion der Sertoli-Zellen dann mit dem spermatogenen Zyklus in einem biphasischen Muster verbunden. Dabei waren die jeweiligen Transkripte in den Sertoli-Zellen in den Stadien X-XII reichlich vorhanden, wohingegen sie in den Stadien VII-VIII nicht mehr detektierbar waren. Im Falle von Galektin-1 konnte eine lokalisierte, unterschiedliche Expression in den Sertoli-Zellen bis in das neonatale und embryonale Stadium zurückverfolgt werden. Das machte somit Galektin-1 zum frühesten bekannten Molekularmarker für funktionelle Heterogenität in den Hodensträngen von Säugetieren. Zusätzlich zeigte sich, dass im normalen präpubertalen Hoden der Zeitpunkt der Apoptose der Keimzellen mit dem zeitlichen Zyklus der Sertoli-Zellen verbunden ist. Die Autoren nahmen an, dass der spermatogene Zyklus ausschließlich von den Sertoli-Zellen abhing, weil das koordinierte, zyklische Genexpressionsmuster in diesen Zellen bereits bei der präpubertalen Maus vorkam, also zu einem Zeitpunkt, wenn die Gonozyten noch in einem Ruhezustand waren. Bei Timmons et al. (2002) erwiesen sich die Sertoli-Zellen in den Samenkanälchen aller Stadien des epithelialen Zyklus als immunoreaktiv auf Anti-Galektin-1 IgG. Ebenfalls zeigten sich größere Blutgefäße in der Hodenwand und Zellen des Interstitiums immunoreaktiv, sowie die Tunica albuginea und peritubuläre Zellen. Frühere Studien deuteten an, dass die zyklische

Aktivität der Sertoli-Zellen in der Abwesenheit von Keimzellen zum Erliegen kommt, dass also Signale der Keimzellen für den spermatogenen Zyklus wichtig sind (Jegou, 1991). Neben den Befunden bei der Maus wurde bei der Ratte ebenfalls Galektin-1 immunhistochemisch in unterschiedlichen Anteilen der Sertoli-Zellen detektiert, abhängig vom Stadium der Spermatogenese (Dettin et al., 2003). So konnte vor der Pubertät (45 Tage postnatal) Galektin-1 in den basalen Anteilen der Sertoli-Zellen nach der Entwicklung der Blut-Hoden Schranke und mit dem Auftreten von zygotänen-pachytenen Spermatozyten (Cavicchia & Sacerdote, 1991) nachgewiesen werden. Mit dem Voranschreiten der Differenzierung der Spermatozyten trat Galektin-1 auch in den apikalen Anteilen auf. Außerdem konnte Galektin-1 in den Köpfen der reifen Spermatozyten und bei den ins Lumen entlassenen Spermien nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die Verteilung von Galektin-1 in den Kernen und Zytoplasmafortsätzen der Sertoli-Zellen und auf den Köpfen und Schwänzen der späten Spermatozyten und Residualkörper. Eine Oberflächenlokalisation für Galektin-1 wurde an den Spermien im Nebenhodenkopf festgestellt. Die regulierte Expression und Lokalisation von Galektin-1 im Zyklus der Samenkanälchen in Verbindung mit der Spermatogenese ließ die Autoren eine neue Rolle für das immunsuppressive, proapoptotische Lektin im Reproduktionsgeschehen vermuten. Galektin-1 könnte eventuell nicht nur im männlichen Ejakulationstrakt, sondern auch im weiblichen Genitaltrakt an der Errichtung einer Immuntoleranz beteiligt sein, indem es durch Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen Entzündungen verhindert. Ebenfalls bei der Ratte zeigten Martinez et al. (2004), dass Galektin-1 bei Leydig-Zellen von der Ratte *in vitro* Apoptose auslösen konnte. Wenn sie Galektin-1 zu gereinigten Leydig-Zellen gaben, konnten morphologische Veränderungen im Sinne eines Ablösens der Zellen beobachtet werden und die Überlebensrate der Zellen nahm innerhalb von 24 Stunden um 80 % ab. Als funktionelle Konsequenz der Galektin-1 Applikation wurde die Testosteronproduktion dosisabhängig bis auf ein Minimum von 26 % der Basalwerte reduziert. Die Autoren vermuteten, dass die Verringerung der Überlebensrate und die Reduktion der Steroidhormonbildung auf eine durch Galektin-1 induzierte Apoptose zurückzuführen war.

Die Lokalisation von Galektin-1 in den Sertoli-Zellen warf die Frage auf, ob dieses Galektin eventuell an den Interaktionen der Spermien mit den Sertoli-Zellen oder der Spermien untereinander beteiligt sein könnte. In diesem Zusammenhang zeigten Akama et al. (2002), dass N-Glykan Strukturen eine Schlüsselrolle bei der Adhäsion der Spermien an die Sertoli-Zellen spielten und dass spezifische Kohlenhydrate für die Spermatogenese benötigt wurden. Diese präzise funktionelle Bedeutung der Galektin-1 Expression während dieses Vorgangs

sollte noch weiter untersucht werden. Allerdings muß man in dieser Studie in Hinblick auf mögliche Bindungspartner für Galektin-1 im Auge behalten, dass Galektine bindungsspezifisch für β -Galaktoside sind.

Neben Untersuchungen über Galektin-1 gibt es in der Literatur nur wenige Hinweise auf die Lokalisation anderer Galektine im männlichen Reproduktionstrakt. In einer Studie zeigte sich, dass das proapoptotische Peptid Nucling Apoptose indirekt dadurch vermittelt, dass es die Expression von Galektin-3, dessen antiapoptotische Wirkung mehrfach gezeigt wurde (Yang et al., 1996; Akahani et al., 1997; Matarrese et al., 2000a, 2000b; Moon et al., 2001), durch Interferenz mit dem Kernfaktor kappaB Signalweg verhindert (Liu et al., 2004). Bei einer Mutante, die kein Nucling exprimiert (Nucling $-/-$), kam es u. a. im Hoden und im Ovar zu einer Hochregulation von Galektin-3. Somit konnte hier gezeigt werden, dass auch Galektin-3 im Hoden vorkommt und gleichzeitig wurde hier ein Hinweis auf eine Galektin-3 Expression im Ovar gegeben.

Schon vor den Untersuchungen an Ratte und Maus fanden Wollina et al. (1999) im normalen menschlichen Hoden und beim sog. „Sertoli cell only-syndrome“ (SCOS, keine Keimzellen vorhanden) durch immunhistochemische Untersuchungen ebenfalls Galektin-1 Protein in den Sertoli-Zellen. In diesem Versuch konnte auch ein anderes Galektin, nämlich Galektin-3, im Hoden nachgewiesen werden. So konnte mit Anti-Galektin-3 IgG im normalen Hoden eine positive Reaktion in den Leydig-Zellen detektiert werden. Im Falle von SCOS konnte jedoch auch eine leichte Färbung der Sertoli-Zellen entdeckt werden.

Die Untersuchungen über das Auftreten von Galektinen im Reproduktionstrakt von Mäusen zeigten, dass v. a. Galektin-1, aber auch -3 und -7 detektiert werden konnten. Somit stellte sich die Frage, ob nicht eventuell auch andere Galektine in den Organen des Reproduktionstrakts zu finden wären und welche Lokalisationen ihnen zugeteilt werden könnten. Dabei stand natürlich die Frage im Vordergrund, ob das Auftreten von Galektinen bestimmten funktionellen Vorgängen in diesen Organen zugeordnet werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür die Gonaden der Maus (Ovar, Hoden und Nebenhoden) mit ihrer Vielzahl von physiologischen Vorgängen (u. a. Proliferation, Produktion von Steroidhormonen, Zelldifferenzierung, Apoptose) als Untersuchungsobjekte ausgewählt. Deshalb folgt nun ein Überblick über die physiologischen Vorgänge am Ovar bzw. am Hoden und Nebenhoden.

2.3 Physiologische Vorgänge am Ovar

An seiner Außenfläche trägt das Ovar einen Peritonealüberzug in Form eines einschichtigen, überwiegend kubischen Epithels. Dieses Epithel wird auch als „ovarian surface epithelium“ bezeichnet. Unter dem serösen Überzug befindet sich eine Bindegewebskapsel, die ohne deutliche Grenze in das Stroma übergeht. Im Mark des Ovars befindet sich ein lockeres Bindegewebe mit Gefäßen und Nerven. In der Rinde finden sich die Follikel verschiedener Entwicklungsstadien und die Gelbkörper (Corpora lutea) in einem zellreichen Stroma, das als spinozelluläres Bindegewebe bezeichnet wird (Hees & Sinowatz, 2000).

Vier Tage nach der Geburt liegen bei einer Maus ca. 2 400 (Pepling & Spradling, 2001) bis 5 000 Oozyten bzw. Follikel (Canning et al., 2003) auf den Ovarien vor, wobei die Gesamtzahl der Follikel, die bei einer neugeborenen Maus vorhanden ist, ebenso wie die Gesamtzahl der in Reserve vorliegenden Primordialfollikel abhängig vom jeweiligen Mäusestamm ist (Canning et al., 2003). Die Funktionseinheit eines Follikels setzt sich aus einer Eizelle und Follikelepithelzellen (Hüll- oder Nährzellen) zusammen. Die erste spontane Ovulation kann bereits im Alter von vier Wochen zu sehen sein und wenn die Maus mit der Pubertät ab einem Alter von ca. sechs Wochen einen regelmäßigen ovariellen Zyklus hat, kommt es alle 4,5 bis 5 Tage zu regelmäßigen Ovulationen über einen durchschnittlichen Zeitraum von 12-14 Monaten. Im histologischen Bild eines reifen Ovars kann man viele, aber oft nicht alle Reifungsstadien der Eizellen nebeneinander sehen:

- Primordiale Oogonien (Oozyt I): im Rindenbereich des Ovars gelegen, besitzen noch keine Follikelzellen.
- Primordialfollikel (Oozyt II): besitzen einen einschichtigen Ring von flachen Follikelepithelzellen (ruhende Follikel), die von einer Basalmembran umgeben sind. Eizelle befindet sich in der Prophase der 1. meiotischen Teilung.
- Primärfollikel: die Eizelle wird größer und die Follikelepithelzellen nehmen kubische bis hochprismatische Gestalt an, bleiben aber einschichtig.

Im Weiteren teilen sich die Epithelzellen, bis die Eizelle von mehreren Schichten umgeben ist. Zwischen der Eizelle und dem Follikelepithel bildet sich die Zona pellucida, eine aus Mukopolysacchariden bestehende Membran. In der weiteren Entwicklung dieser Sekundärfollikel treten in dem mehrschichtigen Follikelepithel Spalträume auf, die sich

zunehmend erweitern und mit dem Liquor folliculi, einem Sekretionsprodukt der Follikelepithelzellen füllen. Der Hohlraum wird nach seinem Zusammenfließen Antrum folliculi genannt (Hees & Sinowatz, 2000).

- Sekundärfollikel in der frühen Phase: zwischen den Follikelepithelzellen zeigen sich erste Anzeichen einer Antrumbildung
- Sekundärfollikel in der mittleren Phase: ein Antrum folliculi hat sich gebildet und die Eizelle befindet sich noch randständig auf den Follikelepithelzellen liegend. Ein schmaler Saum von Follikelepithelzellen umgibt die Eizelle (Corona radiata).
- Sekundärfollikel in der späten Phase: Antrum folliculi maximal ausgebildet, die Eizelle mit der Corona radiata sitzt auf dem Cumulus oophorus und ragt in das Antrum folliculi. Die Eizelle steht vor der Ovulation. Diese Follikel werden auch als Tertiärfollikel bezeichnet (Hees & Sinowatz, 2000). Die dichte Schicht der Follikelepithelzellen wird aufgrund ihres Kernreichtums auch als Granulosazellschicht bezeichnet.

(Einteilung angelehnt an die Follikelklassifikation von Pedersen & Peters, 1968)

Die der Basalmembran außen anliegenden Bindegewebszellen differenzieren sich zur Follikelhülle (Theca folliculi), was schon beim Sekundärfollikel erkennbar ist und durch das Follikelwachstum immer deutlicher wird. Die Theca folliculi interna ist zell- und gefäßreich und dient neben ihren endokrinen Funktionen der Ernährung des Follikels. Die Theca folliculi externa ist faserreich und dient der Abgrenzung gegen das Stroma (Hees & Sinowatz, 2000).

Pro Zyklus reifen immer mehrere Follikel heran, von denen nur einige (bei multiparen Tieren wie der Maus) zur Ovulation gelangen. Das Steroidhormon Östrogen ist für die Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen verantwortlich (Drummond & Findlay, 1999; Britt & Findlay, 2002) und induziert außerdem die Bildung von Rezeptoren für das Follikel stimulierende Hormon (FSH) und für das luteinisierende Hormon (LH) (Drummond & Findlay, 1999; Drummond et al., 2002). Die Follikel, die nicht zur Ovulation gelangen, werden atretisch, was auf jeder Stufe der Follikulogenese eintreten kann.

In der postnatalen Entwicklungsphase vom Primordialfollikel zum präantralen Follikel wird die Atresie v. a. durch den Tod der Oozyte ausgelöst (Morita & Tilly, 1999) und ist Caspase-2 abhängig (Johnson & Bridgham, 2002). Die Apoptose von Keimzellen kann entweder durch die Abwesenheit oder die ungenügende Verfügbarkeit von sog. Überlebensfaktoren für die Zelle (z. B. Insulin-like growth factor I, Morita & Tilly, 1999) ausgelöst werden, oder durch

Umweltgifte oder Chemotherapeutika (Robles et al., 2000). Der Tod der Keimzellen führt dann im Weiteren zum Absterben der Granulosazellen und zur Follikelatresie. Im Gegensatz dazu ist die Atresie in der Entwicklungsphase vom präantralen bis zum präovulatorischen Follikel häufig durch ein rasches Fortschreiten der Apoptose innerhalb der Granulosazellschicht gekennzeichnet, was dann letztendlich zum Untergang der Oozyte führt (Morita & Tilly, 1999; Tilly, 2001). So fallen z. B. Granulosazellen, die einen Mangel an FSH haben, im Rahmen der folliculären Atresie der Apoptose anheim (Hurwitz & Adashi, 1992; Tilly, 1997). In dieser Phase ist die Apoptose u. a. Caspase-3 abhängig, wie in Studien mit Caspase-3 Knock-out Mäusen gezeigt wurde (Matikainen et al., 2001). Granulosazellen von gesunden Follikeln haben fast nur die inaktive Form der Caspase-3, während die von atretischen Follikeln erhöhte Konzentrationen von aktivierter Caspase-3 zeigen (Johnson & Bridgham, 2002). Die Aktivierung von Caspase-3 ist u. a. mit der Spaltung der poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP, siehe auch weiter unten), der Spaltung von Aktin und mit der Bildung von Oligonukleosomen verbunden (Boone & Tsang, 1998).

Nach einer erfolgten Ovulation bildet sich aus den Resten eines ovulierten Follikels ein Corpus luteum an. Hierbei werden unter dem Einfluß luteotroper Hormone (Luteinisierendes Hormon (LH), Wachstumshormon (growth hormon GH), Prolaktin, Insulin-like growth factor (IGF)-1, Oxytozin, Prostaglandin E₂ und I₂) (Niswender et al., 2000) die Granulosa- und Thekazellen luteinisiert. Durch die luteotropen Hormone wird sowohl das Wachstum, die Luteinisierung als auch die Funktion des Corpus luteum gefördert. Der Prozeß der Luteinisierung beinhaltet den Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus (Robker & Richards, 1998), zelluläre Hypertrophie, Erwerb einer steroidogenen Morphologie und die Expression von Cytochrom P450 side chain cleavage (scc). P450scc ist ein Marker für differenzierte Lutealzellen (Niswender et al., 2000). Das akute Steroid-regulierende-Protein (StAR) sorgt für den Transport von Cholesterol in die innere Mitochondrienmembran, wo es von P450scc in Pregnenolon umgewandelt wird. Das wird dann, wieder außerhalb des Mitochondriums, durch die 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) in Progesteron umgewandelt. Das Corpus luteum ist eine hoch vaskularisierte, zeitlich begrenzt auftretende endokrine Drüse, deren Hauptaufgabe die Produktion von Progesteron ist. Progesteron wiederum ist für die Erhaltung einer Trächtigkeit nötig. Eine Null-Mutation des Prolaktinrezeptorgens (PRLP-/-) führt z. B. zu weiblicher Sterilität aufgrund eines kompletten Versagens der Implantation des Embryos (Ormandy et al., 1997). Bei den (PRLP-/-)-Mäusen kommt es unverändert zur Ovulation und es bildet sich ein Corpus luteum, aber in der Abwesenheit des Prolaktinsignals kommt es bei der Luteinisierung zu einer erhöhten Apoptoserate und einer ausgeprägten

Inhibition der Angiogenese. Diese Veränderungen führen zu einer Abnahme des LH-Rezeptors und folgend zu einem Verlust der Enzymkaskade, die nötig ist, um eine angemessene Menge Progesteron für den Erhalt einer Trächtigkeit zu produzieren. Hingegen ist Prolaktin weder für die Follikulogenese, noch für die Ovulation oder die Formierung des Corpus luteum nötig (Grosdemouge et al., 2003).

Falls es zu keiner Trächtigkeit kommt bzw. am Ende einer Trächtigkeit wird die Synthese von Progesteron eingestellt (funktionelle Regression), bzw. das Enzym 20α -HSD, das von Corpora lutea in Regression exprimiert wird, wandelt das Progesteron in einen inaktiven Metaboliten um (Zhong et al., 1997). Im Weiteren wird dann die Gewebemasse des Corpus luteum zurückgebildet (strukturelle Regression), wobei es kaum möglich ist, diese beiden Phasen der Regression streng zu trennen. Bei der Maus laufen die dynamischen Prozesse der Proliferation und Vaskularisation des Corpus luteum in einem sehr kurzen Zeitraum ab. Die strukturelle Regression dauert bei der Maus jedoch auch noch über die nächsten Zyklen an. Es gibt Beweise dafür, dass die luteale Regression durch den programmierten Zelltod oder Apoptose geschieht (Sawyer et al., 1990; Juengel et al., 1993; Tilly, 1996), auch bei der Maus (Quirk et al., 2000; Hasumoto et al., 1997). Die Faktoren allerdings, die das Einsetzen des Beginns der Apoptose im Corpus luteum regulieren und die biologische Basis, nach der die Zellen für die Apoptose ausgewählt werden, sind nicht bekannt. Apoptose ist ein organisierter Prozeß, der keine große entzündliche Reaktion beinhaltet. Das erste morphologische Anzeichen dafür, dass eine Zelle apoptotisch ist, ist das Erscheinen von Kernfragmenten, die degeneriertes Chromatin enthalten (Sawyer et al., 1990), das Schrumpfen der Zelle und das Erscheinen von membrangebundenen zytoplasmatischen Anteilen (Kerr et al., 1972). Diese Zellfragmente, auch als apoptotische Körper bezeichnet, sind Ziele für die phagozytierenden Zellen des Immunsystems. Makrophagen verstärken den apoptotischen Prozeß in den Populationen der Lutealzellen dadurch, dass sie von Membranen umschlossene Fragmente dieser Zellen phagozytieren (Gemmell et al., 1976). Eine weitere typische Erscheinung bei der Apoptose ist die Spaltung der genomischen DNA in 185 bp große Fragmente (Oligonukleosomen; Arends et al., 1990). Diese typische DNA-Fragmentation kann man als sog. DNA-Leiter auf einem Agarosegel sehen (Arends et al., 1990). Mit der Regression der CL werden Immunzellen, v. a. Makrophagen und T-Zellen in Verbindung gebracht, die zu diesem Zeitpunkt drastisch in die CL einströmen, was die meisten Untersucher beobachtet haben (Bagavandoss et al., 1988; Brännstrom & Norman, 1993; Best et al., 1996; Bowen et al., 1996; Takaya et al., 1997; Penny et al., 1999; Bauer et al., 2001). Hinsichtlich ihrer Rolle bei der Rückbildung der CL gibt es prinzipiell zwei Überlegungen (Pate & Keyes, 2001): die

eine ist, dass die Immunzellen aktiv am Rückgang der Steroidhormonbildung und der Zerstörung der Lutealzellen beteiligt sind, die andere, dass sie mögliche Entzündungsvorgänge, die durch die absterbenden Zellen entstehen könnten, kontrollieren. Kurz gefasst geht man bei der ersten Hypothese davon aus, dass voll funktionsfähige Lutealzellen als Antwort auf die Stimulation durch gonadotrope Hormone, wie z. B. LH, Progesteron produzieren. Hohe Progesteronkonzentrationen blockieren die Funktion von Immunzellen und den von ihnen produzierten Zytokinen. In vielen Spezies (nicht nachgewiesen für die Maus) unterbricht Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) die Progesteronsynthese, reduziert den Blutfluß, steigert die mit Streß verbundenen Signale und löst Zelltod im Corpus luteum aus (Niswender et al., 2000; McCracken et al., 1999). Residente Immunzellen werden entweder direkt oder indirekt durch $PGF_{2\alpha}$ stimuliert und sezernieren dann Zytokine. Diese Zytokine (z. B. Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , Interferon (IFN) γ und Interleukin (IL)- 1β) können den $PGF_{2\alpha}$ induzierten Anstieg der Phospholipase A2, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Apoptose vermitteln, all das, was bei der Regression auftritt (Wu & Carlson, 1990; Behrman et al., 1991; Juengel et al., 1993). Die proinflammatorischen Zytokine wie $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ stimulieren direkt die Endothelzellen zur Produktion des „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) (Cavicchio et al., 2002), aber auch Lutealzellen, die durch FasL induziert apoptotisch werden, sollen in benachbarten, nicht apoptotischen Zellen die Expression von MCP-1 auslösen (Nagaosa et al., 2002). Das Chemokin MCP-1 sorgt für eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen im Corpus luteum (Townson et al., 1996), die die apoptotischen Lutealzellen phagozytieren. Dieses Konzept deckt sich mit der kürzlich aufgestellten Hypothese von einer „nurturing role“ (Ammenfunktion; Phagozytose, um entzündliche Veränderungen durch die toten und sterbenden Zellen zu verhindern) der Immunzellen bei der lutealen Regression von Pate & Keyes (2001). $TNF\alpha$ bewirkt durch eine Verringerung der mRNA Expression von StAR und dem Luteinhormonrezeptor (LHR) (Risk & Gibori, 2001) ein weiteres Absinken der Progesteronsynthese (Chen et al., 1999). Bei in Kultur gebrachten Lutealzellen der Maus verändert $TNF\alpha$ alleine nichts am Überleben der Zellen, aber in der Anwesenheit von $IFN\gamma$ übt es einen Dosis-abhängigen zytotoxischen Effekt aus (Jo et al., 1995). Während der lutealen Regression kommt es zu einer Abnahme der Aktivität der Mn^{2+} -abhängigen Superoxiddismutase (Rueda et al., 1995), wodurch die Lutealzellen empfänglicher gegenüber reaktiven Sauerstoffradikalen und der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden können, die von den aktivierten residenten Immunzellen, möglicherweise v. a. von Makrophagen (Simpson et al., 1987) produziert werden. ROS ist ebenfalls in den Prozeß der lutealen Regression und Apoptose eingebunden (Caffrey et al.,

1979; Riley & Behrman, 1991). $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ regulieren die mRNA Expression für Fas in murinen Lutealzellen hoch (Quirk et al., 2000). Die Erkennung von Fas auf den Lutealzellen durch Fas-Ligand (FasL) auf den T-Lymphozyten initiiert die Apoptose der Lutealzellen. $\text{TNF}\alpha$ und FasL, die sog. „death receptor“ aktivierenden Zytokine, gelten als wichtige Vermittler der durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten lutealen Regression (Pate & Keyes, 2001; Quirk et al., 2000; Terranova, 1997). Fas wird auch als „death receptor“ bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der lutealen Regression. Die immunhistochemische Färbung von Fas in den Luteinzellen zeigt eine progressive Zunahme von der frühen bis zur späten Lutealphase und die intravenöse oder intraperitoneale Applikation eines Fas-aktivierenden Antikörpers löste *in vivo* bei der Maus luteale Regression aus (Sakamaki et al., 1997). Einen weiteren Beweis dafür, dass Fas oder FasL eine Rolle bei der lutealen Regression spielen, zeigten Sakamaki et al. (1997) durch den Einsatz von homozygoten *gld* (nicht-funktionierender FasL) und *lpr* (verminderte Fas Expression) Mäusen. Die Corpora lutea dieser Mäuse traten zwar auch in die Phase der Regression ein, aber in irregulären Intervallen. Nach der Aktivierung von Fas durch FasL aktivierte Fas seinerseits Caspase-8, eine Protease, die dann als Initiator Caspase-3 durch proteolytische Spaltung (cleavage) ihrer Vorstufe aktivierte (Shy, 2002). Caspase-3 spielt als Exekutor eine essentielle Rolle bei der Apoptose dadurch, dass sie entweder allein oder zumindest mitverantwortlich für die proteolytische Spaltung von vielen Proteinen in Schlüsselpositionen ist, wie z. B. die des nukleären Enzyms poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) (Alnemri et al., 1994). Es wurde an einem Mausmodell mit synchronisierter Ovulation gezeigt, dass die Aktivierung von Caspase-3 für die strukturelle Involution bzw. Regression des Corpus luteum nötig ist (Carambula et al., 2002). In diesem Modell wurde auch gezeigt, dass die strukturelle Regression des Corpus luteum durch Caspase-3 vermittelte Apoptose ca. 48 Stunden nach der Ovulation eintrat, was durch eine drastische Zunahme der TUNEL positiven Zellen in Verbindung mit einem raschen Abfall der Progesteronproduktion belegt wurde. Bei Caspase-3-defizienten Mäusen (Caspase-3-Null Maus) war die funktionelle Regression der Corpora lutea im Vergleich zu Wildtyp Tieren nicht verändert, aber die strukturelle Regression trat bis zu 4 Tage später ein (Carambula et al., 2002). Aktivierte Lymphozyten produzieren u. a. auch ROS und können, wenn sie Interleukin (IL)- 1β ausgesetzt werden, auch Stickstoffmonoxid (NO) produzieren, was ebenfalls als ein Vermittler des Zelltodes bei der Regression gilt (Olsen et al., 1996). Diese Vorgänge tragen alle zur Apoptose der steroidogenen Zellen und dadurch auch zur Regression des Corpus luteum bei. Somit gibt es eine Reihe von Befunden, die für eine aktive Beteiligung von Immunzellen beim Abbau von Lutealzellen sprechen. Die große Anzahl von Immunzellen, die

in einem sich zurückbildenden Corpus luteum gefunden werden kann, könnte sehr wohl ein Beweis dafür sein, dass diese Immunzellen Veränderungen initiieren bzw. vermitteln, die zum Absterben der Lutealzellen führen, was in erster Linie durch Apoptose geschieht. Allerdings kann das verstärkte Auftreten der Immunzellen zum Zeitpunkt der Regression der Corpora lutea auch im Sinne der zweiten Hypothese betrachtet werden. So gibt es Hinweise und Untersuchungen, dass diese Zellen mögliche Entzündungsprozesse, die durch tote und absterbende Zellen entstehen können, kontrollieren, um für die überlebenden Zellen eine nährnde Umgebung zu schaffen und um bei der kontinuierlichen Restrukturierung des Corpus luteum mitzuhelfen, wenn es an Masse verliert (Pate & Keyes, 2001). Da Makrophagen apoptotische Lutealzellen und membrangebundene apoptotische Zellkörper phagozytieren, bevor es zu deren Lyse kommt, wird eine Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes verhindert. Entzündungsreaktionen sind v. a. in den Organen des Reproduktionstrakts wie im Ovar, aber auch im Uterus oder, beim männlichen Tier, im Hoden und Nebenhoden, unbedingt zu vermeiden, weil es sonst zu irreparablen Schädigungen dieser Organe kommen kann, die bis zu einem totalen Funktionsausfall gehen können. Diese Organe werden auch als immunprivilegiert bezeichnet. Der Begriff Immun-Privilegiertheit wird für verschiedene Gewebe mit empfindlichen Anteilen, wie z. B. den Zellen der Fortpflanzung, verwendet, die eine einzigartige Beziehung zum Immunsystem bzw. zur Immunantwort haben. In diesen Geweben wird die Ausbreitung von Entzündungen verhindert, die schon in ihrer geringsten Ausprägung den Erhalt und die Funktion des Organs bedrohen (Filippini et al., 2001; Ferguson & Griffith, 1997). Die bekanntesten Vertreter immunprivilegierter Organe sind das Auge, das Gehirn, der Hoden und das Ovar, in denen eine Immunantwort entweder nicht oder auf eine andere Art und Weise als in anderen Organen stattfindet (Ferguson & Griffith, 1997). Somit spricht also auch viel für die zweite von Pate & Keyes (2001) aufgestellte Hypothese.

2.4 Physiologische Vorgänge am Hoden und Nebenhoden

Der Hoden wird außen von der bindegewebigen Tunica albuginea begrenzt, die ihrerseits von einer dünnen Tunica serosa (Epididymium) bedeckt ist. Das Hodenparenchym wird durch Bindegewebssepten (Septula testis), die von der Tunica albuginea stammen, in unvollständig voneinander getrennte Läppchen (Lobuli testis) unterteilt. In den Lobuli testis liegen in einem Gerüst aus Bindegewebe die stark gewundenen Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti). Zwischen den Tubuli sind die Leydig-Zellen angesiedelt, die für die Androgenproduktion

zuständig sind (Hees & Sinowatz, 2000). In den Leydig-Zellen wird mit Hilfe des Enzyms 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) Dehydroepiandrosteron in Androstenedion umgewandelt, was den Vorläufer der Steroide Testosteron und Östrogen darstellt. Die Leydig-Zellen sind also einerseits für die Produktion von Testosteron zuständig, andererseits wurde gezeigt, dass sie auch eine immunmodulatorische und eine für Lymphozyten inhibitorische Funktion besitzen (Pöllänen et al., 1990; Hedger & Meinhardt, 2000).

Das Keimepithel der Tubuli seminiferi contorti besteht aus den Stützzellen (Sertoli-Zellen), den Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden und Spermien) und der Membrana propria, die außen das Keimepithel umfaßt. Die Membrana propria besteht aus der Basalmembran, der das Keimepithel aufsitzt, kollagenen, elastischen und retikulären Fasern sowie aus mehreren Lagen von kontraktile Myofibroblasten, die auch als peritubuläre Zellen bezeichnet werden. Sertoli-Zellen sind somatische Zellen, die von der Basallamina der Samenkanälchen durch das gesamte Keimepithel hindurch bis in das Lumen ragen und die Räume zwischen den Keimzellen mehr oder weniger ganz ausfüllen. Sie haben eine Stütz- und Ernährungsfunktion für die Keimzellen (Hees & Sinowatz, 2000). Außerdem nehmen sie eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke und bei der Spermatogenese ein (Griswold, 1998). Die Blut-Hoden-Schranke stellt eine Diffusionsbarriere zwischen dem basalen Teil des Tubulus (Spermatogonien und präleptotäne Spermatozyten) und dem adluminalen Anteil (Meiose-Stadien und Spermatidendifferenzierung) dar. Durch Kontraktionen des Zytoskeletts sind die Sertoli-Zellen an der Spermiation (Abgabe der Spermien in das Lumen) beteiligt. Eine weitere Funktion der Sertoli-Zellen ist die Sekretion der intratubulären Flüssigkeit, in der die ausdifferenzierten Spermien suspendiert sind (Hees & Sinowatz, 2000). Viele sekretorische Produkte, die in hohen Konzentrationen im Zytoplasma der Sertoli-Zellen vorkommen, erscheinen später als Komponenten der Seminalflüssigkeit (Sylvester et al., 1984). Alle Stadien der Spermatogenese finden statt, während die sich entwickelnden Gameten einen sehr engen Kontakt zu den Sertoli-Zellen haben. Das erleichtert die Wandlung der Keimzellen zu den Spermien und die Kontrolle des Milieus im Samenkanälchen mit Hilfe von parakrinen Signalen. Viele Funktionen der Sertoli-Zellen werden anscheinend durch eine Vielfalt von Proteinen ausgeführt, die in das umgebende Lumen abgegeben werden, wie z. B. das Anti-Müller Hormon und Inhibin (Skinner, 1993). Sie produzieren auch eine Reihe von immunsuppressiven und homöostatischen Faktoren (Filippini et al., 2001).

Die Spermatogenese der Keimzellen ist ein streng koordinierter Zellproliferations- und -differenzierungsprozeß und läßt sich in 3 Phasen unterteilen:

- Spermatozytogenese: mitotische Vermehrung der Spermatogonien bis zur Entstehung der Spermatozyten I. Ordnung.
- Meiose: Reduktion des Chromosomensatzes auf die Hälfte und Austausch von genetischem Material zwischen den Chromosomen. Es entstehen die haploiden Spermatiden (1. und 2. Reifeteilung).
- Spermiogenese: Differenzierung der rundkernigen Spermatiden zu den reifen, hoch spezialisierten Spermien.

(Hees & Sinowatz, 2000)

Im Hoden von Säugetieren zeigt sich eine hohe Apoptoserate der spermatogenen Zellen und der Spermatozyten im Präleptotän, um die hohe Mitoserate auszugleichen und um defekte Zellen zu eliminieren (Yin et al., 1998). Die apoptotischen Keimzellen werden von den Sertoli-Zellen phagozytiert. Der Hoden kann, wie Ovar und Uterus, als ein immunprivilegiertes Organ betrachtet werden. Viele Faktoren tragen zum Aufbau der Immunprivilegiertheit bei, einschließlich der Blut-Hoden Schranke und der lokalen Produktion von immunosuppressiven Zytokinen und proapoptotischen Faktoren (Filippini et al., 2001; Turek et al., 1996). Genaueres zum Begriff der Immunprivilegiertheit wurde bereits in der Literaturübersicht zu den Vorgängen am Ovar dargestellt.

Das Endstück der Tubuli seminiferi contorti setzt sich aus modifizierten Sertoli-Zellen zusammen und wird als Terminalsegment bezeichnet. Hier wird ein Teil der Spermien, wahrscheinlich pathologische Formen, phagozytiert. Danach erfolgt über die Tubuli recti der Anschluß an das im Mediastinum gelegene Rete testis, von wo aus es in die Ductuli efferentes des Nebenhodens (Epididymis) weitergeht. Der Nebenhoden kann makroskopisch in den Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), den Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) und den Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) unterteilt werden. Die Ductuli efferentes bilden einen großen Anteil des Nebenhodenkopfes und haben ein unterschiedlich hohes, mehrreihiges Epithel aus resorptiv tätigen Hauptzellen, Flimmerzellen mit apikalen Kinozilien und kleinen Basalzellen. Eine dünne Schicht glatter Muskelzellen schließt sich außen an die Basallamina des Epithels an. Vom Epithel der Ductuli efferentes und vom Anfangsabschnitt des Nebenhodenkanals werden mehr als 90 % der testikulär gebildeten Flüssigkeit rückresorbiert. Das Epithel des sich anschließenden Nebenhodenkanals (Ductus epididymidis) ist zweireihig hochprismatisch und setzt sich aus den schlanken, Mikrovilli (Stereozilien) tragenden Hauptzellen (Prinzipalzellen) und den kleinen Basalzellen

zusammen. Die Höhe des Epithels nimmt nach distal ab und die Lumenweite nimmt zu. Die Stärke der glatten Muskelschicht, die den äußeren Wandanteil des Ductus epididymidis bildet, steigt im Verlauf nach distal deutlich an. Der Nebenhoden ist ein multifunktionelles Organ, in dem durch aktive Sekretions- (z. B. Glykoproteine, Glykosidasen, Carnitin, Glycerolphosphorylcholin) und Resorptionsprozesse in den einzelnen Abschnitten ein spezifisches Milieu für die funktionelle Ausreifung der Spermien (u. a. Erwerb der Eigenmotilität) geschaffen wird (Hees & Sinowatz, 2000). Während ihrer Wanderung im Nebenhoden erwerben die Spermien von Säugetieren im Sinne einer Reifung auch neue Oberflächenproteine, die für die Ausübung ihrer Funktion notwendig sind (Cuasnicu et al., 2002). Die Synthese und Sekretion dieser Proteine durch das Epithel des Nebenhodens findet unter der Kontrolle von Androgenen statt (Cooper, 1998; Hermo et al., 1994). Der Nebenhodenschwanz dient als Speicher für die beweglichen und fertilen Spermien.

Die drei Anteile des Nebenhodens haben sowohl ein unterschiedliches Muster der Gen- und Proteinexpression (Cornwall & Hann, 1995; Kirchhoff, 1999) als auch verschiedene Funktionen in Bezug auf die Reifung und Speicherung der Spermien (Cornwall et al., 2002).

In Bezug auf die Basalzellen fanden Yeung et al. (1994), dass diese Zellen sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Elektronenmikroskopie eine große Ähnlichkeit mit peritubulären Makrophagen in der Nähe des Epithels aufwiesen. Das ließ die Autoren vermuten, dass die Basalzellen als lokale Immunabwehr dienen. Seiler et al. (1998) stellten auch bei der Maus fest, dass die Basalzellen Makrophagen-ähnliche Qualitäten haben. Die von Holschbach & Cooper (2002) bei der Maus durchgeführten Experimente deuten ebenfalls an, dass die Basalzellen einen extratubulären Ursprung besitzen und die Autoren fanden auch Beweise für eine Beziehung zwischen Basalzellen und Immunzellen. Das ließ sie die Hypothese aufstellen, dass eine immunologisch bedingte Infertilität im Nebenhoden darauf zurückzuführen sein könnte, dass vor der Pubertät keine oder zu wenige Basalzellen in das Epithel rekrutiert worden sind.

3. Zielsetzung

Nachdem sich die bisherigen Untersuchungen über Galektine im Reproduktionstrakt der Maus mit wenigen Ausnahmen nur mit den Galektinen 1 und 3 beschäftigten, sollte im Rahmen der Anfertigung dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden überprüft werden, ob nicht auch andere Vertreter der Galektin-Familie speziell in den Gonaden (Ovar, Hoden und Nebenhoden) von Mäusen des Stammes C57BL/6NCrI anzutreffen sind. Dabei wurde der Rahmen dieser Arbeit auf die postnatalen Gegebenheiten beschränkt. Beim weiblichen Tier sollte der ovarielle Zyklus untersucht werden und beim männlichen Tier die postnatale Entwicklung von Hoden und Nebenhoden von der 1. bis zur 6. Lebenswoche. Speziell für Galektin-3 konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Knock-out Mausmodell für Galektin-3 (Gal-3 $-/-$) des Stammes C57BL/6NCrI vergleichend zum C57BL/6NCrI Wildtyp (Gal-3 $+/+$) herangezogen werden, um so eventuell einen Einblick in mögliche *in vivo* Funktionen von Galektin-3 in den Gonaden der Maus zu gewinnen. Um mit Tieren eines gleichen genetischen Hintergrunds arbeiten zu können, wurden die Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäuse erst untereinander zurück gekreuzt und anschließend wieder mittels genomischer PCR-Analyse selektioniert. Im Rahmen der Untersuchungen wurden als erstes RT-PCR Analysen an Organen von älteren Tieren durchgeführt, um einen Überblick über das mRNA Expressionsmuster der Galektine in den ausgesuchten Organen zu gewinnen. Dabei wurde zusätzlich der NMRI Mäusestamm herangezogen, um zu überprüfen, ob es eventuelle stammspezifische Unterschiede in der mRNA Expression der Galektine zwischen den beiden Mausstämmen C57BL/6NCrI und NMRI gibt. Danach wurde mit verschiedenen Anti-Galektin IgGs in Western Blot Analysen gezeigt, inwieweit sich die mRNA Expression auch auf der Ebene der Proteinexpression widerspiegelte. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde dann versucht, die Lokalisationen der Galektine darzustellen, für die sich in der Western Blot Analyse eine Proteinexpression nachweisen ließ. Der Einsatz von Markern für Steroidhormon-produzierende Zellen und für Makrophagen sollte dabei eine Zuordnung zu bestimmten Zelltypen ermöglichen. Speziell in Hinblick auf Galektin-3 wurde in der Northern Blot Analyse die mRNA Expression dieses Galektins über die ausgewählten Untersuchungszeitpunkte dargestellt und am Ovar sollte die *in situ* Hybridisierung die Lokalisation der mRNA aufzeigen. Schließlich wurden noch Apoptosemarker eingesetzt, um eine eventuell veränderte Situation der Apoptose im Knock-out Tier (Gal-3 $-/-$) zu detektieren.

4. Material und Methoden

4.1 Tiere und Tierhaltung

Mäuse des Stammes C57BL/6NCrI, bei denen gezielt das Gen für Galektin-3 durch Einfügen einer Neo-Kassette in Exon 5 unterbrochen wurde (Gal-3 $-/-$, Knock-out, siehe Abbildung 1), wurden von F.-T. Liu zur Verfügung gestellt. Der entsprechende Wildtyp-Stamm (Gal-3 $+/+$) wurde von Charles River Laboratories in Deutschland bezogen.

Mäuse des Stammes NMRI wurden von Prof. Wolf, Genzentrum Großhadern, zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden in einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden gehalten und mit handelsüblichem Futter und Wasser ad libitum (Fa. Altromin GmbH, Lage) versorgt. Die Haltung erfolgte in Kleingruppen in Macrolonkäfigen.

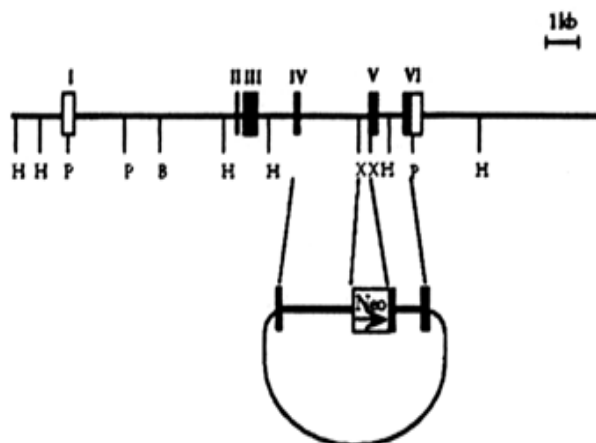


Abbildung 1: Vektorkonstruktion und homologe Rekombination in das Galektin-3 Gen.

Der Zielvektor wurde durch das Ersetzen eines 0,5 kb *XbaI-XbaI* Segments an der Verbindung von Intron 4 zu Exon 5 mit der Neo-Kassette des Vektors pMC1NeoPLA konstruiert. Copyright © American Society for Investigative Pathology

4.2 Zucht der Mäuse des Stammes C57BL/6NCrI

Da der Knock-out (Gal-3 $-/-$) und der Wildtyp (Gal-3 $+/+$) Stamm aus verschiedenen Zuchtbetrieben stammten, wurden sie erst untereinander verpaart und anschließend wieder in die zwei Linien selektiert, um Tiere eines gleichen genetischen Hintergrundes zu erhalten. Hierfür wurden in der F₀-Generation original Knock-out- und Wildtyp-Tiere verpaart. Die heterozygoten Jungtiere dieser Eltern, die F₁-Generation, wurden wiederum untereinander

angepaart. Nach den Mendelschen Gesetzen setzte sich die nun folgende F2-Generation folgendermaßen zusammen: 50 % heterozygote und 50 % homozygote Jungtiere, wobei die homozygoten Jungtiere sich zu 50 % aus Knock-out- und zu 50 % aus Wildtyp-Tieren zusammensetzen. Die Identifizierung dieser F2-Generation erfolgte auf genomischer Ebene über Schwanzspitzen-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, siehe Methodenteil 4.4.2). Nach den Ergebnissen dieser PCR wurden neue Zuchtpaare für eine Knock-out- (Gal-3 $-/-$) und eine Wildtyp- (Gal-3 $+/+$) Linie zusammengestellt. Für die Versuchsreihen wurden dann hauptsächlich Tiere der F4- und F5-Generation eingesetzt.

4.3 Material

alle Materialien und Reagenzien, die nicht speziell kenntlich gemacht wurden, wurden von folgenden Firmen bezogen:

Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Fa. VWR International GmbH, Ismaning

4.3.1 DNA-Präparation für Schwanzspitzen-PCR

NucleoSpin Tissue-Kit (Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)

Diethylether (stabilisiert) zur Synthese ($C_4H_{10}O$)

Ethanol, reinst (C_2H_5OH)

4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Taq DNA Polymerase, 5 Units/ μ l (Fa. Qiagen GmbH, Hilden)

10 \times PCR Puffer mit 15 mM $MgCl_2$ (Fa. Qiagen GmbH, Hilden)

dNTPs (Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Set aus dATP, dGTP, dTTP und dCTP, jeweils 100 mM

daraus einen Mix herstellen und mit steril filtriertem Aqua bidest. auf eine Konzentration von 10 mM einstellen und aliquotieren.

Primer (Fa. Metabion GmbH, Martinsried):

Primer (Orientierung)	Sequenz (5' → 3')	Temperatur in °C (T _m in °C)
INT 4A (s)	GTAGGTGAGAGTCACAAGCTGGAGGCC	65 (69,5)
NEO 1448 (s)	GGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG	65 (71,1)
EBPEX5DR (as)	CACTCTCAAAGGGGAAGGCTGACTGTC	65 (68)

Tabelle 4-1: in der genomischen PCR verwendete Primer

Von den Primern INT 4A und EBPEX5DR wurden mit steril filtriertem Wasser Verdünnungen mit einer Konzentration von 43,5 pmol/µl angefertigt, von NEO 1448 mit 13 pmol/µl (Vorgaben von F.-T. Liu). Alle Reagenzien für die PCR wurden bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Agarosegelelektrophorese

EDTA-Lösung, 0,5 M:

193 g EDTA Di-Natrium Dihydrat ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$)
auf 1000 ml Aqua dest., pH 8,0 mit NaOH einstellen.

TAE-Puffer, 50 × (2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA) :

242 g Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$)

100 ml EDTA-Lösung, 0,5 M, pH 8,0

57,1 ml Eisessig (Essigsäure $\geq 99,7\%$, $C_2H_4O_2$)

auf 1000 ml Aqua bidest., autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern

TAE-Puffer, 1 × (0,04 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA) :

20 ml TAE-Puffer, 50 ×

auf 1000 ml Aqua bidest., bei Raumtemperatur lagern.

SeaKem[®] LE Agarose (Fa. BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA)

Ethidiumbromid Stammlösung:

10 mg/ml (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

bei 4 °C und lichtgeschützt lagern

auf 10 ml Gel wurden 0,4 µl Ethidiumbromidlösung gegeben

Loading Dye Solution, 6 × (Ladepuffer) (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

GeneRuler™100bp DNA Ladder plus (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

4.3.4 Auswahl und Vorbehandlung der Tiere

- Zyklusinduktion und Synchronisation der weiblichen Mäuse

PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Intergonan®) und HCG (humanes Choriongonadotropin, Ovogest® 1500) (Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim)

Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Die Hormone PMSG und HCG wurden entsprechend der Angaben des Herstellers gelöst und mit 0,9 % NaCl-Lösung so verdünnt, dass sich 8 Internationale Einheiten (IE) in einem Volumen von 100 µl befanden.

4.3.5 Probenentnahme

Diethylether (stabilisiert) zur Synthese (C₄H₁₀O)

- für Aufreinigung von Total-RNA und von Gesamtprotein:

Flüssiger Stickstoff

- für *in situ* Hybridisierung (ISH)

Cryomatrix, Frozen specimen embedding medium (Fa. Shandon□®, Pittsburgh, PA, USA)

2-Methylbutan (Isopentan, C₅H₁₂)

Flüssiger Stickstoff

- für histologische und immunhistochemische Untersuchungen:

10 mM Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

Stammlösung A (1,5 M Natriumchlorid, 0,1 M di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat), 10 ×:

87,7 g Natriumchlorid (NaCl)

17,8 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ × 2 H₂O)

auf 1000 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern

Stammlösung B (1,5 M Natriumchlorid, 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat), 10 ×:

87,7 g Natriumchlorid (NaCl)

13,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

auf 1000 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern

für eine 1 × PBS-Lösung mit einem pH-Wert von 7,2 gibt man 80 ml Stammlösung A und 20 ml Stammlösung B auf 1000 ml Aqua dest. (im Weiteren als PBS bezeichnet).

Für eine 2 × PBS-Lösung gibt man 16 ml Stammlösung A und 4 ml Stammlösung B auf 100 ml Aqua dest. Bei Raumtemperatur aufbewahren.

Ethanol, reinst:

Ethanol, 50 % (v/v)

Ethanol, 70 % (v/v)

jeweilige Verdünnungen mit Aqua dest. herstellen

2 M NaOH:

800 mg Natriumhydroxid (NaOH)

auf 10 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern.

Fixative (nach Romeis, 1989):

<i>Bouin-Fixativ</i>	15 ml gesättigte Pikrinsäurelösung (C ₆ H ₃ N ₃ O ₇) (vor Gebrauch filtern) (nach dem Lösen der Pikrinsäure muß ein Bodensatz bleiben) 5 ml 37 %ige Formaldehyd-Lösung (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt) 1 ml Eisessig (Essigsäure ≥ 99,7 %, C ₂ H ₄ O ₂) vor Gebrauch frisch ansetzen
<i>4 % Paraformaldehyd in PBS</i>	8 g Paraformaldehyd (CH ₂ O) _n in 100 ml Aqua dest. auf ca. 60 °C erhitzen und unter tropfenweiser Zugabe von 2 M NaOH solange rühren, bis die Lösung an ihrem Neutralpunkt schlagartig klar wird. Dann 100 ml 2 × PBS zugeben und den pH auf 7,2 einstellen. Vor Gebrauch frisch ansetzen.
<i>Methanol-Eisessig</i>	2 Teile Methanol auf 1 Teil Eisessig vor Gebrauch frisch ansetzen

Tabelle 4-2: verwendete Fixative

- Zyklusdiagnostik

Objektträger SuperFrost[®] (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig)

Merckofix[®], Fixationsspray für die Zytodiagnostik

Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

4.3.6 Total RNA-Präparation

RNeasy[®] Mini Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden)

β -Mercaptoethanol:

10 μ l β -Mercaptoethanol (C₂H₆O₅)

auf 1 ml Puffer RLT. Der komplettierte Puffer ist für einen Monat stabil.

Diethylpyrocarbonat -(DEPC-)Wasser (0,1 % v/v):

1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC, C₆H₁₀O₅) (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

auf 1000 ml Aqua bidest., über Nacht rühren und am nächsten Tag autoklavieren, bei Raumtemperatur lagern. Im Weiteren als DEPC-Wasser bezeichnet.

0,1 M NaOH, 1 mM EDTA:

4 g Natriumhydroxid (NaOH)

372 mg Ethylendiamintetraacetic Acid Di-Natrium Dihydrat (EDTA, C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ × 2H₂O)

auf 1000 ml DEPC-Wasser, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

Die Lösung diente zum Reinigen von Geräten, die RNase-frei sein sollten. Danach wurde mit DEPC-Wasser nachgespült.

Ethanol, 70 %:

70 ml Ethanol reinst

30 ml DEPC-Wasser

2,5 % w/v Bromphenolblau:

250 mg Bromphenolblau (C₁₉H₉Br₄O₅SNa) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

auf 10 ml DEPC-Wasser, bei Raumtemperatur lagern

RNA-Ladepuffer

10 µl RNase freies Glycerol (C₃H₈O₃) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

2 µl 2,5 % Bromphenolblau

88 µl DEPC-Wasser

vor Gebrauch frisch ansetzen

RNA und Ladepuffer im Verhältnis 1:1 mischen

4.3.7 Reverse Transkriptase

DNaseI, 10 Units/µl, RNase frei (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

DNase-Puffer, 10 x (10 mM Tris, 10 mM Magnesiumchlorid MgCl₂):

121 mg Tris-Base

232 mg MgCl₂ x 6H₂O

auf 100 ml DEPC-Wasser, pH 7,0 einstellen und autoklavieren. Bei Raumtemperatur lagern.

SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase, 200 Units/µl (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

5 x First-Strand Puffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

0,1 M 1,4-Dithiothreitol (DTT) (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Oligo (dT)₁₈ Primer, 500 µg/µl (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Lagerung der Reagenzien bei -20 °C.

4.3.8 PCR für Klonierungen und Galektin-Screening

Reagenzien siehe Abschnitt 4.3.2

Primer (Fa. Metabion GmbH, Martinsried):

Primer (Orientierung)	Sequenz (5' → 3')	Temperatur in °C (Tm in °C)
Gal1 (s)	ATCATGGCCTGTGGTCTGGTC	56 (61,8)
Gal1 (as)	TTCACTCAAAGGCCACGCACT	56 (59,8)
Gal3 (s)	ATCACAATCATGGGCACA	50 (51,4)
Gal3 (as)	TCTGGCTTAGATCATGGCGTG	50 (59,8)
Gal4 (s)	GCCTCAGTGTCGGGATGTCCG	59 (65,7)
Gal4 (as)	AGCTATGTCTCCGGACGATCC	59 (61,8)
Gal6 (s)	CAAGATGGCCTATGTTCCAGC	55 (59,8)
Gal6 (as)	AGCTATGTCTTCGGAAGATCC	55 (57,9)
Gal7 (s)	GCCCGCCATGTCTGCTACCCA	57 (65,7)
Gal7 (as)	CTGGGGTCCTTTGCTTAGAAG	57 (57,9)
Gal8 (s)	AATGTTGTCCTTAAATAACCTACA	53 (54,2)
Gal8 (as)	GTGGGTTCAAGTGCAGAGCGA	53 (61,8)

Tabelle 4-3: Primer für Klonierungen

Primer (Orientierung)	Sequenz (5' → 3')	Enzym- schnittstelle	Temperatur in °C (Tm in °C)
Gal3 short (s)	CGTACGAAGCTTTATGACCTGCCCTTG	<i>HindIII</i>	61,5 (66,5)
Gal3 short (as) (sense-Sonde)	CGCTAGGAATTTCGAAGGCAACATCAT TC	<i>EcoRI</i>	61,5 (65,1)
Gal3 short (s)	CGTACGGAATTCTATGACCTGCCCTTG	<i>EcoRI</i>	61,5 (66,5)
Gal3 short (as) (antisense-Sonde)	CGCTAGAAGCTTGAAGGCAACATCAT TC	<i>HindIII</i>	61,5 (65,1)
Aktin short (s)	CGTACGAAGCTTACGGCCAGGTCATC ACTA	<i>HindIII</i>	62 (69,5)
Aktin short (as) (sense-Sonde)	CGCTAGGAATTCTCATGATGGAATTG AATGTAG	<i>EcoRI</i>	62 (65,8)
Aktin short (s)	CGTACGGAATTCACGGCCAGGTCATC ACTA	<i>EcoRI</i>	62 (69,5)
Aktin short (as) (antisense-Sonde)	CGCTAGAAGCTTTCATGATGGAATTG AATGTAG	<i>HindIII</i>	62 (65,8)

Tabelle 4-4: Primer für Klonierung zum Schreiben von RNA-Sonden

Primer (Orientierung)	Sequenz (5' → 3')	Temperatur in °C (T _m in °C)
Mu Gal1 (s)	ATCATGGCCTGTGGTCTGGTC	58 (61,8)
Mu Gal1 (as)	TTCACTCAAAGGCCACGCACT	58 (59,8)
Mu Gal2 (s)	GTCACCATGTTCGGAGAAATTTG	56 (58,4)
Mu Gal2 (as)	CTAAGGTCTTCTGAGGTGCCG	56 (61,8)
Mu Gal3 (s)	GAAAATGGCAGACACGTTTTTCG	56 (58,4)
Mu Gal3 (as)	TCTGGCTTAGATCATGGCGTG	56 (59,8)
Mu Gal4 (s)	GCCTCAGTGTTCGGGATGTCCG	59 (65,7)
Mu Gal4 (as)	AGCTATGTCTCCGGACGATCC	59 (61,8)
Mu Gal6 (s)	CAAGATGGCCTATGTTCCAGC	56 (59,8)
Mu Gal6 (as)	AGCTATGTCTTCGGAAGATCC	56 (57,9)
Mu Gal7 (s)	GCCCGCCATGTCTGCTACCCA	56 (65,5)
Mu Gal7 (as)	CTTGGGTCCTTTGCTTAGAAG	56 (57,9)
Mu Gal8 (s)	AATGTTGTCCTTAAATAACCTACA	53 (54,2)
Mu Gal8 (as)	GTGGGTTCAAGTGCAGAGCGA	53 (61,8)
Mu Gal9 (s)	AGAGATGGCTCTCTTCAGTGC	56 (59,8)
Mu Gal9 (as)	GGTTGATATGGAACCTCGTAG	56 (57,9)
Mu Gal12 (s)	ATGTCAACTGACGAACACCTGG	58 (60,3)
Mu Gal12 (as)	TTAGCAGTGGACACAGTAGTGG	58 (60,3)

Tabelle 4-5: Primer für Galektin-PCRs

Von diesen Primern wurden mit steril filtriertem Aqua bidest. Verdünnungen mit 10 pmol/μl angefertigt und bei -20 °C gelagert.

Für einen PCR-Ansatz von 25 μl wurden von jedem Primer 10 pmol eingesetzt.

4.3.9 Klonierung in pETBlue-1 AccepTor Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung

- Gelextraktion:

QIAquick[®] Gelextraktionskit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden)

- Ligation :

T4 DNA Ligase, 1 Unit/μl (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

10 x Ligationspuffer mit ATP (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

pETBlue-1 AccepTor Vektor, 50 ng/ μ l (0,02-0,022 pmol/ μ l) (Fa. Novagen[®], Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.)

Lagerung der Reagenzien bei -20 °C.

- Transformation:

NovaBlue Singles[™] kompetente Zellen (Fa. Novagen[®], Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.)

LB-Agar:

25 g Luria Broth Base

14 g Agar

auf 1000 ml Aqua dest., pH 7,2 einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern

LB-Medium:

25 g Luria Broth Base

auf 1000 ml Aqua dest., pH 7,2 einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern

Ampicillin, 50 mg/ml:

500 mg Ampicillin

auf 10 ml steril filtriertes Aqua bidest., in Aliquots von 500 μ l bei -20 °C lagern.

Tetrazyklin, 12,5 mg/ml:

125 mg Tetrazyklin

auf 10 ml steril filtriertes Aqua bidest., in Aliquots von 500 μ l bei -20 °C lagern.

X-Gal, 20 mg/ml:

200 mg X-Gal (C₁₄H₁₅BrClNO₆)

auf 10 ml N, N-Dimethylformamid (C₃H₇NO), in Aliquots von 500 μ l bei -20 °C lagern.

IPTG, 0,1 M:

238 mg IPTG (C₉H₁₈O₅S)

auf 10 ml steril filtriertes Aqua bidest., in Aliquots von 500 μ l bei -20 °C lagern

- Plasmidaufreinigung

E.Z.N.A.[®] Plasmid-Miniprep Kit I (Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

- Restriktionsenzymverdau und DNA-Sequenzierung

Restriktionsenzyme *XbaI* und *SmaI* (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

(*XbaI* liegt 47 bp vor der Klonierungsstelle, *SmaI* 293 bp nach der Klonierungsstelle)

10 x Puffer Y+/Tango (Fa. Fermentas, GmbH, St. Leon-Rot)

4.3.10 Klonierung in pGEM[®]-4Z-Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung der Plasmide für RNA-Sonden

Siehe auch Abschnitt 4.3.9

pGEM[®]-4Z-Vektor (Fa. Promega GmbH, Mannheim)

Restriktionsenzyme: *EcoRI* und *HindIII* (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

10 × Puffer O+ (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

JM109 kompetente Zellen (Fa. Promega GmbH, Mannheim)

PCR: siehe Abschnitt 4.3.2

Primer (Fa. Metabion GmbH, Martinsried):

Primer (Orientierung)	Sequenz (5' → 3')	Temperatur in °C (T _m in °C)
T7 (Vektorprimer)	TAATACGACTCACTATAGGG	44 bzw. 51 (53,2)
Gal3 short (s)	TATGACCTGCCCTTG	44 (47,8)
Gal3 short (as)	GAAGGCAACATCATTC	44 (46,6)
Aktin short (s)	ACGGCCAGGTCATCACTA	51 (56)
Aktin short (as)	TCATGATGGAATTGAATGTAGTTTC	51 (56,4)

Tabelle 4-6: Primer für Überprüfung der Insertorientierung

Von diesen Primern wurden mit steril filtriertem Aqua bidest. Verdünnungen mit 10 pmol/ μ l angefertigt und bei -20 °C gelagert.

Für einen PCR-Ansatz von 25 μ l wurden von jedem Primer 10 pmol eingesetzt.

4.3.11 Herstellen einer Digoxigenin-markierten Sonde

- Linearisierung der Plasmide

Restriktionsenzym *EcoRI* (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

10 \times Puffer O+ (Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit (Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

- Schreiben der Sonde und Reinigung

AmpliScribe[™] T7 High Yield Transcription Kit (Fa. EPICENTRE[®] Technologies, Madison, Wisconsin, USA), bei -20 °C lagern

EDTA-Lösung, 0,2 M, pH 8,0:

745 mg EDTA Di-Natrium Dihydrat ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$)

auf 100 ml DEPC-Wasser, pH 8,0 einstellen und bei -20 °C lagern

DIG-11-UTP, 10 mM (Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat) (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

High Pure PCR Produkt Purification Kit (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

MOPS-Puffer, 10 \times (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA Di-Natrium Dihydrat), pH 7,0:

41,9 g MOPS ($C_7H_{15}NO_4S$)

6,83 g Natriumacetat Trihydrat ($C_2H_3NaO_2 \times H_2O$)

7,44 g EDTA Di-Natrium Dihydrat

Auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,0 einstellen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern

Zum Gebrauch mit DEPC-Wasser auf eine 1 \times Lösung verdünnen.

Poly(A)-Lösung, 10 µg/µl:

10 mg Poly(A) (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

in 1 ml DEPC-Wasser lösen, bei 4 °C aufbewahren

RNA-Ladepuffer:

16,6 µl Formaldehyd-Lösung, 37 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

10 µl 100 % RNase freies Glycerol (C₃H₈O₃) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

2 µl 2,5 % Bromphenolblau (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

71,4 µl DEPC-Wasser

Agarosegel, 2 %ig w/v, mit 2 % v/v Formaldehyd:

1 g Agarose

47,3 ml 1 × MOPS-Puffer

2,7 ml Formaldehyd-Lösung, 37 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

Die Agarose in der Mikrowelle in 1 × MOPS-Puffer aufkochen, bis sie vollständig gelöst ist.

Dann das vorgewärmte Formalin unter einem Abzug zugeben, gut mischen und nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C Ethidiumbromid zugeben und das Gel gießen. Als Laufpuffer diene 1 x MOPS-Puffer.

peqGOLD High Range RNA-Leiter, 0,5 mg RNA/ml (Fa. PeqLab Biotechnologies, Erlangen):

4 µl RNA-Standard mit 2 x Menge RNA-Ladepuffer versetzen und wie die Proben-RNA behandeln

- Quantifizierung der Sonden

Nylon Membran, positively charged (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Digoxigenin-markierte Kontroll-RNA, 100 ng/µl (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

SSC-Lösung, 20 × (3,0 M Natriumchlorid, 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat), pH 7,0:

175,3 g Natriumchlorid (NaCl)

88,2 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇ × 2H₂O)

auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,0 einstellen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

Mit DEPC-Wasser die benötigten Verdünnungen herstellen.

Formaldehyd-Lösung, 37 % p.a. (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

RNA-Verdünnungspuffer:

3 ml 20 × SSC

2 ml Formaldehyd-Lösung, 37 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

5 ml DEPC-Wasser

Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M Natriumchlorid), pH 7,5:

11,6 g Maleinsäure (C₄H₄O₄)

8,76 g NaCl

7,3 g NaOH

auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,5 einstellen und bei Raumtemperatur lagern

Waschpuffer (0,3 % v/v Tween20 in Maleinsäurepuffer):

1000 ml Maleinsäurepuffer

3 ml Tween20

bei Raumtemperatur lagern

Blocking Reagenz, 10 % (w/v):

10 g Blocking Reagenz (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

100 ml Maleinsäurepuffer

unter Erwärmen lösen, bei -80 °C lagern

Blocking Solution, 1 % (v/v):

1 ml Blocking Reagenz, 10 %

9 ml Maleinsäurepuffer

Menge nach Bedarf, vor Gebrauch frisch ansetzen

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, 150 Units/200 µl (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Bei 2-8 °C lagern, vor Gebrauch 5 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugieren,

1:10 000 in Blocking Solution verdünnen

kurz vor Gebrauch ansetzen

Detektionspuffer (0,1 M Tris, 0,1 M Natriumchlorid NaCl), pH 9,5:

12,11 g Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$)

5,84 g NaCl

auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 9,5 einstellen und bei Raumtemperatur lagern

2 M NaOH:

800 mg NaOH

auf 10 ml DEPC-Wasser, bei Raumtemperatur lagern

CDP-Star, ready to use (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

CL-XPosure™ Film (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)

Kodak Professional Entwicklungs- und Fixierlösung, Pulver (EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, NY, USA)

4.3.12 Northern Blot

Natriumdodecylsulfat SDS, 20 % w/v:

20 g SDS ultra pure ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)

auf 100 ml DEPC-Wasser bei Raumtemperatur lagern

SDS, 0,5 % w/v:

25 ml 20 % SDS

auf 1000 ml DEPC-Wasser, bei Raumtemperatur lagern

Die Lösung diente als Reinigungslösung für Materialien und Gerätschaften, die RNase-frei sein sollten. Danach wurde mit DEPC-Wasser nachgespült.

SSC-Lösung, 30 × (4,5 M Natriumchlorid, 0,45 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat):

263 g Natriumchlorid (NaCl)

132,3 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)

auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,0 einstellen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern
mit DEPC-Wasser die benötigten Verdünnungen herstellen.

Formamid, 100 %, deionisiert (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

N-Lauroylsarcosine, 10 % w/v:

10 g N-Lauroylsarcosine, Natriumsalz ($C_{15}H_{28}NO_3Na$) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

in 100 ml DEPC-Wasser lösen, steril filtrieren und bei Raumtemperatur aufbewahren

Natriumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,0:

13,35 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$)

3,45 g Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \times H_2O$)

auf 100 ml DEPC-Wasser, pH 7,0

High SDS Hybridisierungspuffer:

250 ml Formamid, 100 %, deionisiert

83 ml $30 \times SSC$

5 ml 10 % N-Lauroylsarcosine

100 ml 10 % Blocking Reagenz

25 ml 1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

Lösungen in dieser Reihenfolge in ein Gefäß geben, das 35 g SDS enthält und solange unter rühren erhitzen, bis das SDS vollständig gelöst ist. Mit DEPC-Wasser auf 500 ml auffüllen und bei Raumtemperatur aufbewahren. Vor Gebrauch auf 65 °C erhitzen.

Für die Hybridisierung wurde die DIG-markierte RNA-Sonde in einer Konzentration von 90 ng/ml eingesetzt. Die benötigte Sondenmenge wurde mit 50 µl DEPC-Wasser gemischt und 5 min bei 99 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und dann zu dem auf 68 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben. Der Hybridisierungspuffer wurde ohne die Zugabe der RNA-Sonde auch für die Prehybridisierung verwendet

2 × SSC, 0,1 % SDS:

100 ml $20 \times SSC$

5 ml 20 % SDS

auf 1000 ml DEPC-Wasser, bei Raumtemperatur lagern

0,1 × SSC, 0,1 % SDS:

5 ml 20 × SSC

5 ml 20 % SDS

auf 1000 ml DEPC-Wasser, bei Raumtemperatur lagern

SeaKem[®] LE Agarose (Fa. BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA)

Agarosegel, 1 %ig w/v, mit 2 % v/v Formaldehyd:

1,5 g Agarose

141,9 ml 1 × MOPS-Puffer

8,1 ml Formaldehyd-Lösung, 37 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

Die Agarose in der Mikrowelle in 1 × MOPS-Puffer aufkochen, bis sie vollständig gelöst ist.

Dann das vorgewärmte Formalin unter einem Abzug zugeben, gut mischen und nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C das Gel gießen. Laufpuffer 1 x MOPS-Puffer.

RNA Ladepuffer:

250 µl Formamid, 100 %, deionisiert (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

83 µl Formaldehyd-Lösung, 37 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

50 µl 10 x MOPS-Puffer

50 µl 100 % RNase freies Glycerol (C₃H₈O₃) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

10 µl 2,5 % Bromphenolblau (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

57 µl DEPC-Wasser

vor Gebrauch frisch ansetzen

RNA und Ladepuffer im Verhältnis 1:2 mischen

Die auftragsfertige RNA für 10 min bei 65 °C inkubieren, dann für 1 min auf Eis geben und anschließend in die Geltaschen laden

Nylon Membran, positively charged (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Gel-Blotting-Papier

Weitere Lösungen und Reagenzien siehe Abschnitt 4.3.11

4.3.13 *In situ* Hybridisierung

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4 (1 x: 0,9 % NaCl w/v, 12,5 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaOH / PBS-ISH), 20 x:

34,5 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)

180 g Natriumchlorid (NaCl)

8 g Natriumhydroxid (NaOH)

auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,4 einstellen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

Zum Gebrauch mit DEPC-Wasser verdünnen. Im Weiteren als PBS-ISH bezeichnet.

4 % Paraformaldehyd in PBS-ISH:

8 g Paraformaldehyd in 100 ml DEPC-Wasser auf ca. 60 °C erhitzen und unter tropfenweiser Zugabe von 2 M NaOH solange rühren, bis die Lösung an ihrem Neutralpunkt schlagartig klar wird. Dann 10 ml 20 × PBS-ISH zugeben und den pH auf 7,2 einstellen. Mit DEPC-Wasser auf 200 ml auffüllen. Vor Gebrauch frisch ansetzen.

Heringssperma (Salmon Sperm)-DNA, 10 µg/µl:

10 mg Heringssperma-DNA (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

auf 1 ml DEPC-Wasser lösen, 10 min bei 100 °C inkubieren, bei -20 °C lagern.

Vor Gebrauch 5 min bei 95 °C inkubieren und auf Eis abkühlen. Die Heringssperma-DNA wurde im Hybridisierungspuffer in einer Konzentration von 40 µg/ml verwendet.

Hybridisierungspuffer:

5 ml Formamid, 100 %, deionisiert (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

2,5 ml 20 x SSC

2,5 ml DEPC-Wasser

40 µl Heringssperma-DNA

Für die Hybridisierung wurde die DIG-markierte RNA-Sonde in einer Konzentration von 400 ng/ml eingesetzt. Die Sonde wurde 5 min bei 80 °C inkubiert, kurz auf Eis gekühlt und dann zu dem auf 58 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben. Der Hybridisierungspuffer wurde ohne die Zugabe von DIG-markierter RNA-Sonde auch für die Prehybridisierung verwendet.

Aktives DEPC, 0,1 % v/v, in PBS-ISH:

200 µl DEPC

auf 200 ml PBS-ISH, vor Gebrauch frisch ansetzen

Puffer 1 (100 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid NaCl), pH 7,5:

12,11 g Tris-Base

8,76 g NaCl

auf 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,5, bei Raumtemperatur lagern

Puffer 2 (0,5 % w/v Blocking Reagenz in Puffer 1):

25 mg Blocking Reagenz (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

auf 5 ml Puffer 1, unter erwärmen lösen, vor Gebrauch frisch ansetzen.

Puffer 3 (100 mM Tris, 100 mM Natriumchlorid NaCl, 50 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat $MgCl_2 \times 6 H_2O$), pH 9,5:

12,11 g Tris-Base

5,84 g NaCl

10,16 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$

auf 1000 ml Aqua bidest., pH 9,5, bei Raumtemperatur lagern

NBT/BCIP Stock Solution (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim):

100 µl Stock Solution

auf 5 ml Puffer 3, vor Gebrauch frisch ansetzen

Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) (TE-Puffer), pH 8,0:

1,21 g Tris-Base

372 mg EDTA

auf 1000 ml Aqua bidest., pH 8,0

Aquatex[®]

Weitere Lösungen und Reagenzien siehe Abschnitt 4.3.12

4.3.14 Histologie

4.3.14.1 Einbetten der Organe und Anfertigen histologischer Schnitte am Mikrotom

VOGEL HISTO-COMP[®], Gewebereinbettmittel (Linsenform, Schmelzpunkt 56 °C) (Vogel Medizinische Technik und Elektronik, Giessen)

SuperFrost[®] und SuperFrost[®] plus- Objektträger (Menzel-GmbH + Co KG, Braunschweig)

4.3.14.2 Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin (HE nach Romeis, 1989)

Xylol (Isomere) f. d. Histologie (C₈H₁₀)

2-Propanol (C₃H₈O)

Ethanol (C₂H₆OH)

Mayers Hämalaun mit Hämatoxin:

1. 1 g Hämatoxin (Certistain[®], C₁₆H₁₄O₆ x H₂O) in 1000 ml Aqua dest. lösen
2. 200 mg Natriumjodat (NaJO₃) und
3. 50 g Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat, KAlS₂O₈ x 12H₂O) in der Hämatoxinlösung unter Schütteln lösen; die so erhaltene Lösung soll blauviolett sein.
4. 50 g Chloralhydrat (C₂H₃Cl₃O₂) und
5. 1 g Zitronensäure-Monohydrat (C₆H₈O₇ x H₂O) werden zugegeben, nun schlägt der Farbton zu rotviolett um.

Als Kernfärbung für die HE-Färbung verwendet.

Die Färbelösung ist sofort gebrauchsfertig und bleibt in einer verschlossenen Flasche über lange Zeit stabil. Im Kühlschrank aufbewahren und vor Gebrauch filtrieren.

Eosin:

0,1 % w/v Eosin G CERTISTAIN[®] (C₂₀H₆Br₄Na₂O₅) in wässriger Lösung

1 Tropfen Eisessig auf 100 ml

Als Plasma- oder Gegenfärbung für die HE-Färbung verwendet.

Die Färbelösung ist sofort gebrauchsfertig und bleibt in einer verschlossenen Flasche über lange Zeit stabil. Im Kühlschrank aufbewahren und vor Gebrauch filtrieren.

Eukitt[®] (Fa. O. Kindler GmbH & CO, Freiburg)

4.3.14.3 Färbung nach Papanicolaou (nach Romeis, 1989)

Färbelösungen Papanicolaou 1a (Harris` Hämatoxilinlösung), 2a (OrangeG-Lösung, OG 6) und 3b (Polychromlösung EA 50) (Fa. Merck KGaA, Darmstadt)

4.3.15 Immunhistochemie

4.3.15.1 Vorbehandlungen

Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)-Lösung, 0,1 % w/v:

100 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua dest. lösen und auf 37 °C vorwärmen

NaOH, 0,1 M:

40 mg NaOH

in 10 ml Aqua dest. lösen, bei Raumtemperatur lagern

Trypsin, 0,01 % w/v:

10 mg Trypsin in 100 ml vorgewärmter CaCl_2 -Lösung lösen und mit einer 0,1 M NaOH-Lösung den pH rasch auf 7,8 einstellen. Lösung nicht abkühlen lassen und unmittelbar verwenden.

EDTA-Puffer, 1 mM, pH 8,0:

186 mg EDTA

in 500 ml Aqua dest. lösen, pH 8,0 mit einer 0,1 M NaOH-Lösung einstellen.

10 mM Zitrat-Puffer, pH 6,0:

Stammlösung 1 (0,1 M Zitronensäure):

21,01 g Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) auf 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung 2 (0,1 M Natriumzitat):

29,41 g Tri-Natriumzitat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) auf 1000 ml Aqua dest.

Stammlösungen bei 4 °C lagern.

1,9 ml Stammlösung 1 und 8,1 ml Stammlösung 2 auf 100 ml Aqua dest., pH 6,0, vor Gebrauch frisch ansetzen.

4.3.15.2 Alternative Vorbehandlungen

Tris-Puffer, 50 mM :

0,606 g Tris-Base

in 100 ml Aqua dest. lösen, pH auf 8,0 oder 10,6 einstellen, vor Gebrauch frisch ansetzen

Tris-EDTA-Puffer (100 mM Tris, 50 mM EDTA), pH 8,0

1,21 g Tris-Base

1,86 g EDTA

auf 100 ml Aqua dest., pH 8,0, vor Gebrauch frisch ansetzen

Proteinase K (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim):

20 µg/ml Proteinase K in Tris-EDTA-Puffer, pH 8,0

vor Gebrauch frisch ansetzen

Natriumzitrattpuffer, 0,1 % w/v:

100 mg Tri-Natriumzitraddihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)

in 100 ml Aqua dest. lösen, vor Gebrauch frisch ansetzen.

Triton-X-100, 0,1 % v/v:

100 µl Triton-X-100

in 100 ml 0,1 % Natriumzitrattpuffer lösen.

Vor Gebrauch frisch ansetzen

4.3.15.3 Immunhistochemie am Paraffinschnitt und am Gefrierschnitt

Bovines Serumalbumin (BSA), 1 % w/v:

0,1 g Bovines Serumalbumin, Fraktion V (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

in 10 ml 10 mM PBS, pH 7,2, lösen

vor Gebrauch frisch ansetzen. Im Weiteren als BSA bezeichnet.

Wasserstoffperoxid, 1 % v/v:

1 ml H₂O₂, 30%

29 ml Aqua dest

Tris-Puffer, 100 mM:

12,11 g Tris-Base

in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH mit HCl auf einen Wert zwischen 8,2 und 8,5 einstellen
vor Gebrauch frisch ansetzen

NaOH, 2 M:

800 mg NaOH

in 10 ml Aqua dest. lösen, bei Raumtemperatur lagern

Primärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Rabbit Anti-Galektin-3 IgG	1:2 000 (0,5 µg/ml)	Von Dr. Kaltner
Rabbit Anti-Galektin-1 IgG	1:500 (2µg/ml) 1:50 (20 µg/ml)	Von Dr. Kaltner
Rabbit Anti-Galektin-7 IgG	1:1 000 (1 µg/ml)	Von Dr. Kaltner
Rabbit Anti cleaved Caspase-3 IgG (Asp 175)	1:200 (5 µg/ml)	Fa. Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
Rabbit Anti-Aktin Ig (affinity isolated antibody)	1:200 (5 µg/ml)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rabbit Anti-3β-HSD IgG	1:100 (10 µg/ml)	Von Dr. Suzanne L. Ullmann, Universität Glasgow
Rat Anti-Mouse F4/80 (monoklonal) Isotyp Rat IgG2b Klon: CI:A3-1 (F4/80)	1 :50 (20 µg/ml)	Fa. Caltag Laboratories (International) GmbH, Hamburg
Rat Anti-Mouse F4/80 purified IgG, Isotyp IgG2b (Rat) Klon: CI:A3-1 (F4/80)	1:50 (20 µg/ml)	Fa. Serotec GmbH, Düsseldorf

Tabelle 4-7: Liste der verwendeten Primärantikörper

Tiersera:

Schweineserum normal (Fa. DakoCytomation GmbH, Hamburg)

Ziegenserum normal (Fa. Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)

Kaninchenserum normal (von Dr. Kaltner zur Verfügung gestellt)

Biotinylierte Sekundärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Swine Anti-Rabbit Ig, F(ab') ₂ Fragment	1:800 (1,25 µg/ml)	Fa. DakoCytomation GmbH, Hamburg
PAb to Rat IgG (Mouse Ig absorbed) from goat	1:200 (5 µg/ml)	Fa. ALEXIS DEUTSCHLAND GmbH, Grünberg

Tabelle 4-8: Liste der verwendeten Zweitantikörper

Vectastain® ABC-Kits (Fa. Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA):

Elite PK-6100 Standard (POD)

Alkalische Phosphatase Standard AK-5000

Farbsubstrate (Fa. Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA):

Vector® DAB Substrat Kit für Peroxidase SK-4100

(DAB: 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)

Vector® Red Alkalische Phosphatase Substrat Kit I SK-5100

4.3.15.4 Negativkontrollen

Depletierte Antikörperfraktionen: von Dr. Kaltner zur Verfügung gestellt

Cleaved Caspase-3 (Asp175) Blocking Peptide (Fa. Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA)

4.3.16 TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)

-TUNEL-Enzym: Enzymlösung mit terminaler deoxynucleotidyl-Transferase vom Kalberthymus

-TUNEL-Label: Nukleotid-Mix, mit Fluoreszein-dUTP und dNTP

Lagerung bei -20 °C

-TUNEL-AP: Converter AP, anti-Fluoreszein Antikörper Fab Fragment vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP), ready-to-use

Lagerung bei 4 °C

(Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

4.3.17 Western Blotting

4.3.17.1 Proteingewinnung

20 mM Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2:

Stammlösung A (1 x: 0,9 % w/v Natriumchlorid NaCl, 20 mM di-Natriumhydrogen-phosphat Na₂HPO₄), 10 x:

90 g NaCl

35,6 g Na₂HPO₄

auf 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B (1 x: 0,9 % w/v Natriumchlorid NaCl, 20 mM Kalium-dihydrogenphosphat KH₂PO₄), 10 x:

90 g NaCl

27,2 g KH₂PO₄

auf 1000 ml Aqua dest.

für eine 1 x PBS-Lösung mit pH 7,2 gibt man 80 ml Stammlösung A und 20 ml Stammlösung B auf 1000 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern. Im Weiteren als PBS-2 bezeichnet.

Lysispuffer:

1 % w/v Triton X-100

0,1 % w/v Desoxycholsäure Natriumsalz (Desoxycholat, C₂₄H₃₉NaO₄)

50 mM Laktose Monohydrat (C₁₂H₂₂O₁₁ x H₂O)

2 mM β-Mercaptoethanol

2 mM EDTA

1 mM Pefablock

2 mM Aprotinin

5 mM Leupeptin

in PBS-2 lösen, bei -20 °C lagern

Lysispuffer wurde zum Organgewicht im Verhältnis 6:1 eingesetzt, jedoch mindestens 100 µl bei Ovarien und 30 µl bei Nebenhoden

Bio-Rad Protein Assay Farbstoff Konzentrat (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976), 40 %ig verwendet

4.3.17.2 SDS-PAGE

Protein-Größenstandard (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Bromphenolblau, 0,05 % w/v:

50 mg Bromphenolblau (C₁₉H₉Br₄O₅SNa) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

auf 100 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern

SDS, 10 % w/v:

10 g SDS

auf 100 ml Aqua dest., steril filtrieren und bei Raumtemperatur lagern

Tris-Puffer, 0,5 M, pH 6,8:

6,05 g Tris-Base

auf 100 ml Aqua dest., pH 6,8

SDS-Probenpuffer:

3,8 ml Aqua bidest.

1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

0,8 ml Glycerol

1,6 ml SDS, 10 %

0,4 ml β-Mercaptoethanol

0,4 ml Bromphenolblau, 0,05 %

bei -20 °C lagern

Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,4 % w/v SDS), pH 8,8 :

45,4 g Tris-Base

1 g SDS

auf 250 ml Aqua dest, pH 8,8, steril filtrieren und bei 4 °C lagern

Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 0,4 % w/v SDS), pH 6,8:

6,06 g Tris-Base

400 mg SDS

auf 100 ml Aqua dest., pH 6,8, steril filtrieren und bei 4 °C lagern

Ammoniumperoxodisulfat (APS), 10 % w/v:

100 mg APS ($[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$)

auf 1 ml Aqua dest., vor Gebrauch frisch ansetzen

Rotiphorese®Gel 30: gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30 %ige Acrylamidstamm-
lösung mit 0,8 % Bisacrylamid

N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)

	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
Destilliertes Wasser	2,45 ml	2,3 ml
1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8	2,5 ml	–
0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8	–	0,94 ml
Acrylamid, 30 %	5 ml	0,49 ml
10 % APS	50 μl	19 μl
TEMED	5 μl	3,8 μl
Angaben für ein Gel, Dicke 1,5 mm		

Tabelle 4-9: SDS-Page

SDS, 10 % w/v:

10 g SDS

auf 100 ml Aqua dest., steril filtrieren und bei Raumtemperatur lagern

Elektrophoresepuffer, 10 x (250 mM Tris, 2 M Glycin):

30,3 g Tris

150 g Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)

auf 1000 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern

Elektrophorese-Laufpuffer, 1 x:

40 ml Elektrophoresepuffer, 10 x

4 ml 10 % SDS

auf 400 ml Aqua dest., vor Gebrauch frisch ansetzen.

Rekombinantes Protein für Galektin1, 3 und 7 (von Dr. Kaltner zur Verfügung gestellt)

100 ng/10 µl

von diesen Proteinen wurden als Positivkontrolle 10 µl pro Lauf eingesetzt und dazu mit einer äquivalenten Menge an SDS-Probenpuffer versetzt.

4.3.17.3 Transfer auf Nitrozellulose

Blotting Puffer (Towbin):

100 ml Elektrophoresepuffer, 10 x

200 ml Methanol (CH₃OH)

auf 1000 ml Aqua dest., bei 4 °C aufbewahren

PonceauS, 0,1 % in 1 %iger Essigsäure:

1 ml Eisessig

100 mg PonceauS

auf 100 ml Aqua dest.

Gel-Blotting Papiere

PROTRAN[®] Nitrozellulose Transfer Membran, Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel)

4.3.17.4 Silberfärbung

Fixierung:

50 ml Ethanol (vergällt)

12 ml Eisessig

auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen, bei Raumtemperatur lagern. Fixierung 1-2 Stunden oder länger auf einem Orbitalschüttler einwirken lassen. Die Lösung ist mehrfach verwendbar.

Ethanol (vergällt), 50 %ig

Natriumthiosulfat , 0,01 % w/v:

10 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Na₂S₂O₃·5H₂O)

auf 100 ml Aqua dest., vor Gebrauch frisch ansetzen

Silberlösung, 0,1 % w/v:

1 g Silbernitrat (AgNO_3)

700 μl Formaldehyd-Lösung (HCOH), 37 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

auf 1000 ml Aqua dest., lichtgeschützt bei Raumtemperatur lagern

Entwicklerlösung:

1,4 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

50 μl Formaldehyd-Lösung (HCOH), 37 %ig (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

2 ml Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$), 0,01 %ig

auf 100 ml Aqua dest., vor Gebrauch frisch ansetzen

EDTA-Stopplösung, 0,01 M:

3,7 g EDTA

auf 1000 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur lagern

4.3.17.5 Proteindetektion durch Antikörper

Trisgepufferte Kochsalzlösung, 10 x (0,5 M Tris, 1,5 M Natriumchlorid) (TBS), pH 7,5:

60,5 g Tris-Base

87,66 g NaCl

auf 1000 ml Aqua dest., pH 7,5, bei 4 °C lagern. Im Weiteren als TBS bezeichnet.

Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS), 1 x, mit 0,05 % v/v Tween20 (T-TBS):

100 ml TBS, 10 x

500 μl Tween20

auf 1000 ml Aqua dest., vor Gebrauch frisch ansetzen. Im Weiteren als T-TBS bezeichnet.

Milchpulverlösung, 5 % w/v, in T-TBS:

5 g Milchpulver, Blotting Grad

auf 100 ml T-TBS, vor Gebrauch frisch ansetzen

Primärantikörper:

Rabbit-Anti-Galektin-1 IgG, 1:500 (Einsatz: 2 µg/ml)

Rabbit-Anti-Galektin-2 IgG, 1:500 (Einsatz: 2 µg/ml)

Rabbit-Anti-Galektin-3 IgG, 1:2 000 (Einsatz: 0,5 µg/ml)

Rabbit-Anti-Galektin-7 IgG, 1:1 000 (Einsatz: 1 µg/ml)

Rabbit-Anti-Galektin-8 IgG, 1:500 (Einsatz: 2 µg/ml)

alle Anti-Galektin-IgG von Dr. Kaltner zur Verfügung gestellt

Rabbit-Anti-Aktin Ig, 1:200 (Einsatz: 5 µg/ml) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Sekundärantikörper:

Anti-rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate from goat, Einsatz 1:2000 (0,5 µg/ml) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

ECL™ Western Blotting Detektion Reagents (Fa. Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg)

CL-Xposure™ Film (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)

Kodak Professional Entwicklungs- und Fixierlösung, Pulver (EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, NY, USA)

4.4 Methoden

4.4.1 DNA-Präparation für Schwanzspitzen-PCR

Die Überprüfung des genetischen Status der Jungtiere der F2-Generation erfolgte mittels genomischer PCR. Hierfür wurde den Jungtieren im Alter von 8 Wochen unter einer leichten Ethernarkose ein ca. 2 mm großes Stück von der Schwanzspitze zur DNA-Gewinnung abgetrennt.

Die DNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Tissue-Kits nach Anleitung des Herstellers. Nach Zugabe von 180 µl Puffer-T1 und 25 µl Proteinase K-Lösung wurden die Schwanzspitzen über Nacht bei 56 °C in einem Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert, um restliche

Haare und Knochen zu entfernen. Vom Überstand wurden dann 200 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 200 µl Puffer-B3 und 210 µl Ethanol gut gemischt und dann auf eine Säule gegeben. Nach der Zentrifugation wurden erst 500 µl Puffer BW und danach 600 µl Puffer B5 auf die Säule pipettiert, bevor diese in einem weiteren Zentrifugationsschritt ohne Pufferzugabe getrocknet wurde. Danach erfolgte die Elution mit 100 µl vorgewärmtem (70 °C) Elutionspuffer BE. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurden die geschlossenen Säulen mit Elutionspuffer für 2 Minuten in einem Inkubator bei 70 °C inkubiert.

Der Gehalt an DNA in der eluierten Probe wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (E = 1 bei 50 µg/ml DNA) und 100-150 ng in der PCR verwendet.

4.4.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Ein 25 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Menge in µl	Reagenz	Endkonzentration
X	Steril filtriertes Aqua bidest. (Menge abhängig vom Volumen der Template-DNA)	
2,5	10 × PCR Puffer mit 15 mM MgCl ₂	1 x
2	dNTP Set, 10 mM	0,2 mM
1	Primer sense INT 4A oder	1,74 µM
1	Primer sense NEO 1448	0,52 µM
1	Primer antisense EBPEX5DR	1,74 µM
0,125	Taq DNA Polymerase	2,5 Units/100µl
X	Template-DNA	4-6 ng/µl

Tabelle 4-10 : Angaben für genomische PCR

Für die Negativkontrolle wurde statt der Template-DNA eine entsprechende Menge steril filtriertes Aqua bidest. zu dem PCR-Ansatz gegeben.

PCR-Programm (Mastercycler gradient):

	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94 °C	2 min
2. Denaturierung	94 °C	45 s
3. Annealing der Primer	Primer spezifisch	45 s
4. Elongation	72 °C	45 s
5. GOTO 2. Repeat 29		
6. Elongation	72 °C	10 min
7. HOLD 4 °C		

Tabelle 4-11: PCR-Programm

Zur Darstellung des Wildtyp-Genoms (Gal-3 +/+) wurde das Primerpaar INT 4A und EBPEX5DR (siehe Tabelle 4-1) eingesetzt, das einen Sequenzabschnitt des Gens für Galektin-3 von ca. 490 bp amplifizierte, zur Darstellung des Knock-out-Genoms (Gal-3 -/-) das Primerpaar NEO 1448 und EBPEX5DR. Letztere amplifizierten einen Sequenzabschnitt von ca. 300 bp.

Jede DNA-Probe wurde zur besseren Darstellung der beiden möglichen Banden mit beiden Primerpaaren getrennt in der PCR getestet und je nach Erscheinen von PCR-Banden konnte bestimmt werden, ob ein Tier heterozygot oder homozygot war. Falls bei beiden Primerpaaren spezifische Banden auftraten, war das Tier heterozygot (Gal-3 +/-). Wenn nur bei dem Primerpaar INT 4A und EBPEX5DR eine Bande auftrat, hatte das Tier das Wildtyp-Genom (Gal-3 +/+), und wenn nur bei dem Primerpaar NEO 1448 und EBPEX5DR eine Bande auftrat, das Knock-out-Genom (Gal-3 -/-). Als Positivkontrollen für die PCR diente DNA aus Organen, die sowohl den original Wildtyp-Mäusen (Gal-3 +/+) als auch den original Knock-out-Mäusen (Gal-3 -/-) entnommen wurden und aus denen gemäß dem NucleoSpin Tissue-Protokoll von Macherey-Nagel die DNA extrahiert wurde (siehe Abschnitt 4.4.1).

4.4.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 2 % (w/v) Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 1,6 g Seakem[®]-Agarose in 80 ml TAE-Puffer (1 x) eingewogen und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war.

Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60 °C wurde eine entsprechende Menge Ethidiumbromid zugesetzt und in der Lösung gleichmäßig verteilt. Dann wurde die Lösung in einem Gießstand in einen Gelschlitten eingefüllt und ein Gelkamm zur Aussparung von Taschen eingesetzt.

Nach vollständigem Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit TAE-Puffer (1 x) gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt. Die PCR-Proben und der DNA-Marker wurden 6:1 mit der Loading Dye Solution (6 x) vermischt und in die Taschen gefüllt.

Die konstante Spannung wurde solange angelegt, bis die Proben im Gel ausreichend weit gewandert waren, was durch die Farbstoffe sichtbar wurde. Meistens jedoch liefen die Proben für 45 Minuten bei 80 V und wurden dann mit Hilfe eines Dokumentationsgerätes durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Ein repräsentatives PCR-Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt, Interpretation des Bandenmusters ist unter Abschnitt 4.4.2 erklärt.

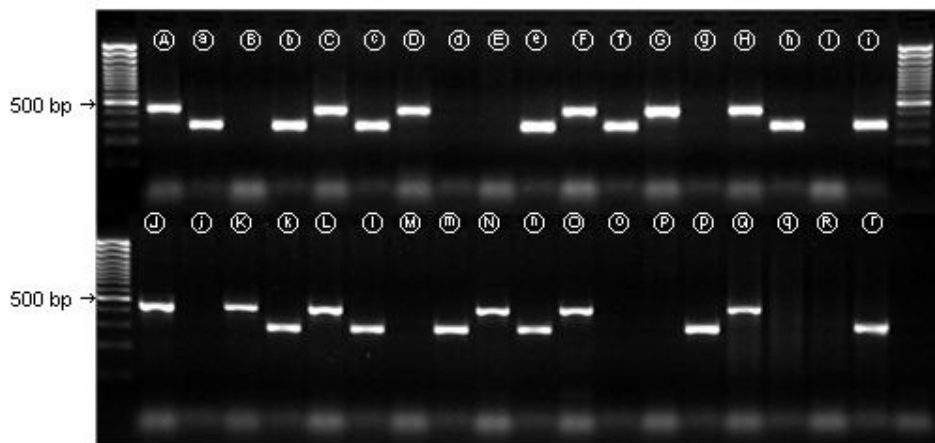


Abbildung 2: Genomische Schwanzspitzen-PCR. Großbuchstaben: PCR-Fragment entstanden mit dem Primerpaar INT 4A und EBPEX5DR. Kleinbuchstaben: PCR-Fragment entstanden mit dem Primerpaar NEO 1448 und EBPEX5DR. Die jeweils gleichen Groß- und Kleinbuchstaben ergeben in Kombination, ob ein Tier heterozygot oder homozygot – entweder für das Wildtyp-Genom (Gal-3 +/+) oder für das Knock-out-Genom (Gal-3 -/-) – ist. Eine Positivkontrolle für das Wildtyp-Genom (Gal-3 +/+) ist unter (Qq), eine Positivkontrolle für das Knock-out-Genom (Gal-3 -/-) unter (Rr) dargestellt.

4.4.4 Zyklusinduktion und Synchronisation der weiblichen Mäuse

Für die Versuchsreihe wurden vor allem 4 Wochen alte weibliche Tiere vor Beginn des ersten ovariellen Zyklus verwendet. Am ersten Versuchstag wurden den Weibchen zur Stimulation des Follikelwachstums 8 IE PMSG intra peritoneal (i.p.) injiziert. Am dritten Tag, 40 Stunden

nach der ersten Injektion, wurden den Weibchen 8 IE HCG i.p. injiziert, um die Ovulation zu induzieren. Zur Kontrolle der Hormonwirkung bzw. als Negativkontrolle wurden einzelnen Weibchen statt der Hormone nur jeweils 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung injiziert. Eine zweite Versuchsreihe wurde im Vergleich dazu mit 11-21 Wochen alten Weibchen gestartet, also mit Tieren, die sich bereits im Zyklus befanden. Einzelnen unbehandelten Tieren wurden im Alter von 8 Wochen die Organe entnommen. Für diese Zwecke wurden nur Tiere des Stammes C57BL/6NCrl genommen, Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-).

Für das Screening der Galektinexpression wurden Organe unbehandelter Tiere der Stämme C57BL/6NCrl, Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-), und NMRI im Alter von 6 Monaten verwendet.

4.4.5 männliche Mäuse

Für die Versuchsreihen wurden männliche Tiere im Alter von einer, zwei, drei, vier und sechs Wochen verwendet. Einzelnen Tieren wurden im Alter von zwölf Wochen und von sechs Monaten Organe entnommen. Für diese Zwecke wurden nur Tiere des Stammes C57BL/6NCrl eingesetzt, Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-).

Für das Screening der Galektinexpression wurden Organe von Tieren der Stämme C57BL/6NCrl, Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-), und NMRI im Alter von 6 Monaten verwendet.

4.4.6 Probenentnahme

Nach einer Betäubung mit Diethylether in einem Glastopf wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Organentnahme erfolgte direkt nach dem Tod der Tiere.

Die Probenentnahme bei 4 bzw. 11-21 Wochen alten vorbehandelten weiblichen Tieren erfolgte über einen Zeitraum von 8 Tagen. Am ersten Tag wurden Ovarien von Tieren beider Linien (Gal-3 +/+ und Gal-3 -/-) entnommen, die keine Injektion erhielten. Am dritten Tag wurden die Tiere genommen, die lediglich PMSG erhielten. Am vierten bis achten Tag wurden im Abstand von 24 Stunden zur HCG-Injektion jeweils zur gleichen Tageszeit Ovarien von Tieren entnommen, die beide Injektionen erhalten hatten. Den Tieren, die nur Injektionen mit NaCl erhielten, wurden am fünften Tag die Organe entnommen. Diese

Ovarien dienten als Negativkontrolle zu den hormonell vorbehandelten Tieren und wurden an dem Tag entnommen, wo bei den behandelten Tieren Gelbkörper am Ovar zu erwarten waren. Bei den unbehandelten weiblichen Tieren und bei den männlichen Tieren erfolgte die Organentnahme entsprechend dem Alter der Tiere.

Für die Aufreinigung von RNA und für die Proteinbestimmung wurden bei den weiblichen Tieren Ovarien, Eileiter und Uterus entnommen, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80 °C gelagert. Bei den männlichen Tieren wurden Hoden und Nebenhoden entnommen und auf die gleiche Art behandelt. Zu Kontrollzwecken wurden gelegentlich andere Organe wie Milz, Leber, Niere, Lunge, Dünn- und Dickdarm eingefroren.

Für die *in situ* Hybridisierung wurden einzelne Ovarien in Aluförmchen mit Cryomatrix gegeben und darin mittels stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurde pro Entnahmetag von mindestens zwei weiblichen Tieren beider Linien (Gal-3 +/+ und Gal-3 -/-) je ein Ovar mit Eileiter und einem Teil des Uterushorns in Bouin'scher Lösung fixiert. Von den männlichen Tieren wurden von mindestens zwei Tieren jeder Altersstufe und jeder Linie (Gal-3 +/+ und Gal-3 -/-) je ein Hoden mit dazu gehörendem Nebenhoden in Bouin'scher Lösung fixiert. Die Fixierung erfolgte für maximal 24 Stunden bei 4 °C, dann wurde das Fixativ erst gegen 50 %igen und dann gegen 70 %igen Ethanol ausgetauscht.

Einzelne Organe wurden für Vergleichszwecke in andere Fixative eingelegt, nämlich in 4 %iges Paraformaldehyd in PBS und in Methanol-Eisessig. Auch hier erfolgte die Fixierung für maximal 24 Stunden bei 4 °C. In Methanol-Eisessig fixierte Organe wurden danach, ebenso wie bei Bouin, erst in 50 %igen und dann in 70 %igen Ethanol verbracht. In 4 %igem Paraformaldehyd fixierte Organe wurden im Anschluß an die Fixierung in Leitungswasser gegeben, und erst nach gründlichem Spülen damit in 50 %igen und 70 %igen Ethanol.

Um die erfolgreiche Synchronisation zu kontrollieren, wurde von den vier Wochen alten Tieren unmittelbar vor der Organentnahme ein Vaginalabstrich für die Zyklusdiagnostik gemacht. Dazu wurde die Vagina mit 15 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült. Die Spüllösung wurde dann auf einem SuperFrost[®]-Objektträger verteilt und sofort durch Aufsprühen von Merckofix[®] fixiert. Anschließend wurde eine Färbung nach Papanicolaou (siehe Abschnitt 4.4.15.3) durchgeführt.

4.4.7 Präparation der Total-RNA

Die RNA-Präparation aus Mausorganen wurde gemäß der Anleitung des RNeasy[®] Mini Kits von Qiagen durchgeführt. Die Disruption und Homogenisation der Organe erfolgte nach Zugabe des Lysispuffers RLT mit Hilfe des Ultra-Turrax T8 und des Dispergierstabes S25N-8G auf Stufe 5. Während dieses 40-60 s dauernden Vorgangs wurden die Proben auf Eis gehalten. Bei der Bearbeitung mehrerer Proben zur gleichen Zeit wurde der Dispergierstab zwischen den verschiedenen Organen mit einer 0,1 M NaOH-, 1 mM EDTA-Lösung und DEPC-Wasser gespült. Nach der Homogenisation wurden die Proben für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand mit 70 %igem Ethanol vermischt und auf eine Säule gegeben. Im Weiteren wurde die Säule erst mit dem Puffer RW1 und dann zweimal mit dem Waschpuffer RPE (mit Ethanol komplettiert) gewaschen. Anschließend wurde die Säule zum Trocknen ohne Puffer zentrifugiert und dann die RNA mit 50 µl DEPC-Wasser eluiert. Davon wurde 1 µl für die Messung der RNA-Konzentration am Photometer ($E = 1$ bei 37 µg RNA/ml) entnommen und 1 µl für die Kontrolle der RNA auf einem Agarosegel. Die Integrität der RNA bei der Agarosegelelektrophorese zeigte sich durch das Erscheinen der 18S und 28S ribosomalen Banden, wobei die 28S Bande ungefähr doppelt so stark sein sollte wie die 18S. Als weiteres Maß für die Integrität der RNA diente der Quotient der Absorptionskoeffizienten $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$ am Photometer, der für intakte und saubere RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen muß. Nur eine derartig verifizierte und intakte RNA wurde für weitere Experimente verwendet. Die restliche RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Ein repräsentatives Ergebnis einer Total-RNA Präparation ist in Abbildung 3 dargestellt.

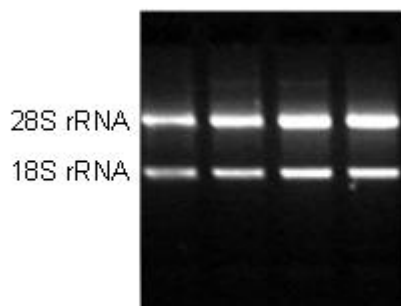


Abbildung 3: Total-RNA Präparation. Die 28S und 18S ribosomalen Banden sind deutlich zu erkennen und die 28S Bande ist stärker als die 18S. Keine Zeichen einer RNA-Degradierung zu erkennen, die Banden sind scharf begrenzt.

4.4.8 Reverse Transkriptase (RT)

Eventuelle DNA-Reste nach der RNA-Präparation wurden durch einen DNA-Verdau entfernt. Dazu wurde die Total-RNA mit DEPC-Wasser so verdünnt, daß sich 5 µg in einem Volumen von 15 µl befanden. Zu diesen 15 µl wurden dann 2 µl DNase-Puffer, 1 µl DNaseI und 2 µl DEPC-Wasser pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurde das Enzym für 10 Minuten bei 75 °C inaktiviert. Mit Hilfe der SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase können in einem 20 µl Volumen 1 ng bis 5 µg Total-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hier wurden immer 2,5 µg Total-RNA umgeschrieben.

Dazu pipettiert man die gewünschte Menge Total-RNA zusammen mit 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer und 1 µl 10 mM dNTP-Mix in ein RNase-freies Tube und ergänzt das Volumen mit DEPC-Wasser auf 13 µl. An dieser Stelle erhitzt man alles für 5 Minuten auf 65 °C und kühlt es dann auf Eis. Anschließend gibt man 4 µl 5 x First-Strand Puffer und 2 µl 0,1 M DTT dazu, mischt es gut und erhitzt es für 2 Minuten auf 42 °C. Danach pipettiert man 1 µl SuperScript™ II RT dazu, mischt alles und inkubiert den Ansatz für 50 Minuten bei 42 °C. Nach den 50 Minuten folgt eine Hitzeinaktivierung der gesamten Reaktion für 15 Minuten bei 70 °C. Die cDNA wurde bei 4 °C gelagert. Von dieser RT-Reaktion wurden 2 µl cDNA direkt für einen PCR-Ansatz eingesetzt.

4.4.9 PCR für Klonierungen und Galektin-Screening

Ein 25 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Menge in µl	Reagenz	Endkonzentration
16,375	Steril filtriertes Aqua bidest.	-
2,5	10 × PCR Puffer mit 15 mM MgCl ₂	1 x
2	dNTP Set, 10 mM	0,2 mM
1	Primer sense	0,4 µM
1	Primer antisense	0,4 µM
0,125	Taq DNA Polymerase	0,625 Units
2	cDNA	-

Tabelle 4-12: Angaben für PCR

Als Negativkontrolle wurden statt der cDNA 2 µl steril filtriertes Aqua bidest. zu dem PCR-Ansatz gegeben. PCR-Programm: siehe Abschnitt 4.4.2

Für die Klonierungen wurde nur cDNA von Tieren des Stammes C57BL/6NCrl, Wildtyp (Gal-3 +/+) eingesetzt, außer für die Klonierung von Galektin-3. Hier wurde zusätzlich für die Sequenzierung die cDNA von einem Knock-out-Ovar (Gal-3 -/-) genommen.

Für das Screening der Galektinexpression wurde die cDNA von Ovarien, Hoden und Nebenhoden von Tieren der Stämme C57BL/6NCrl, Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-), und NMRI eingesetzt.

4.4.10 Klonierung in pETBlue-1 AccepTor Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden zuerst auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abschnitt 4.4.3) und die gewünschten Banden, die kloniert werden sollten, unter UV-Kontrolle mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die PCR-Produkte, die mit den Primern für das Galektin-Screening produziert wurden, wurden nur unter UV-Licht photographiert.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick[®] Gelextraktionkits nach den Angaben des Herstellers. Kurz gefaßt wurde das ausgeschnittene Agarosestück in Puffer QG bei 50 °C gelöst, mit Isopropanol versetzt und auf eine Säule gegeben. Nach der Zentrifugation wurde die Säule erst nochmal mit Puffer QG und mit Waschpuffer PE (komplettiert mit Ethanol, reinst) gewaschen und dann ohne Pufferzugabe getrocknet. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer und die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm ($E = 1$ bei 50 ng DNA/µl) bestimmt.

Die Ligation der PCR-Produkte mit den A-Überhängen in die Klonierungsstelle des pETBlue-1 AccepTor Vektors mit den T-Überhängen (T-Vektor-Klonierung) erfolgte unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase. Die Ligationen wurden in einem 20 µl Volumen mit einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert (PCR-Produkt) von 1:10 angesetzt (vom pETBlue-1 AccepTor Vektor wurden 0,5 µl genommen und entsprechend dazu die nötige Insert-Menge berechnet). Nach Zugabe von 2 µl 10 x Ligationspuffer und 2,5 µl T4 DNA Ligase (2,5 Units für einen 20 µl Ansatz), wurde das Volumen mit steril filtriertem Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 15 °C inkubiert.

Die Transformation des Ligaseproduktes in die NovaBlue Singles[™] kompetenten Bakterien wurde am folgenden Tag durchgeführt. Hierfür wurden die auf -80 °C gelagerten Bakterien kurz auf Eis angetaut. Nach Zugabe von 5 µl Ligaseprodukt wurden die Bakterien erst noch

für 20 Minuten auf Eis gehalten und im Anschluß daran für 45 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gegeben. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurde das Transformationsprodukt dann für 45 Minuten mit 300 µl LB-Medium bei 37 °C vermehrt. Danach erfolgte die Ausplattierung auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin und 12,5 µg/ml Tetrazyklin als Selektionsantibiotika. Des Weiteren wurden 40 µg/ml X-Gal und 0,1 mM IPTG für die Blau-Weiß-Selektion den Agarplatten hinzugefügt. Nach einer Bebrütung der Agarplatten für 20-24 Stunden bei 37 °C wurden weiße Kolonien gepickt und in flüssigem LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Tetrazyklin für 16 Stunden bei 37 °C vermehrt.

Zur Plasmidgewinnung wurden 5 ml Übernachtskultur eingesetzt, abzentrifugiert und mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid-Miniprep Kit I aufgearbeitet. Hierfür wurde das Bakterienpellet in einer RNase A- haltigen Lösung resuspendiert, mit Lösung II lysiert und schließlich mit Lösung III versetzt. Das entstehende Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Überstand auf eine Säule gegeben. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit einem Ethanol-haltigem Waschpuffer wurde die Säule getrocknet. Die Elution erfolgte mit 80 µl steril filtrierten Aqua bidest. und die Plasmidkonzentration wurde analog zur DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Die gereinigten Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Xba*I (jeweils 5 Units/µg Plasmid-DNA) geschnitten und die entstehenden Fragmente wurden auf ihre erwartete Größe hin im Agarosegel kontrolliert. Von den auf diese Weise positiv getesteten Plasmiden wurden für die Sequenzierung 10 µg Plasmid-DNA in einem Vakuumkonzentrator eingetrocknet und an die MWG-BIOTECH AG, Ebersberg geschickt.

4.4.11 Klonierung in pGEM[®]-4Z-Vektor, Transformation, Plasmidaufreinigung und Sequenzierung der Plasmide für RNA-Sonden

Die in den pETBlue-1 AccepTor Vektor einklonierte DNA, die als Matrize für RNA-Sonden dienen sollte (Gal-3 und Aktin), und der pGEM[®]-4Z-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Hind*III (jeweils 5 Units/µg DNA) geschnitten. Die Ansätze wurden dafür 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, die gewünschten Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel gereinigt. Die Ligation der Inserts in den pGEM[®]-4Z-Vektor erfolgte unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase, wie bereits oben beschrieben, bei 15 °C über Nacht. Die Transformation der Ligationsprodukte in die JM109 kompetenten Zellen, die Anzucht der Bakterien und die anschließende Plasmidaufreinigung wurden wie unter 4.4.10 beschrieben durchgeführt. Als Selektionsantibiotikum wurde nur Ampicillin (50 µg/ml) verwendet. Von den gereinigten

Plasmiden wurden Aliquots dazu verwendet, die Größe und die Orientierung der einligierten PCR-Produkte zu kontrollieren.

Die Größe der Inserts (ca. 120 bp Länge) wurde nach einem Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *HindIII* auf einem Agarosegel kontrolliert. Die Orientierung der Inserts (jeweils sense und antisense, und zwar für Gal-3 und Aktin) wurde mit Hilfe der PCR überprüft. Der PCR-Ansatz und das Programm des Thermocyclers waren so wie unter 4.4.9 beschrieben, abgesehen davon, dass nur 0,5 µl Plasmid-DNA als Template eingesetzt wurden und das fehlende Volumen von 1,5 µl durch steril filtriertes Aqua bidest. ersetzt wurde. Der Vektorprimer T7 wurde jeweils mit dem sense- und dem antisense-Primer (Gal-3 und Aktin) getrennt kombiniert. Je nach Lage des Inserts im Vektor durfte sich immer nur bei einer Primerkombination eine spezifische Bande ergeben. Falls das Insert in sense-Orientierung zur T7-Stelle des Vektors vorlag, ergab die Kombination T7(s) und Gal-3/Aktin (as) eine ca. 130 bp große Bande. Wenn diese Bande bei der Kombination T7 (s) und Gal-3/Aktin (s) auftrat, dann lag das inklonierte DNA-Stück in antisense-Orientierung zu T7 vor.

Die Sequenzierung der Inserts dieser Plasmide wurde durch die Firma GATC in Konstanz durchgeführt. Hierfür wurden die Plasmide in einer Konzentration von 30-50 ng/µl (mindestens 30 µl) verschickt. Die Sequenzierungsergebnisse konnten ca. 3 Tage später im Internet unter www.my-gatc.de eingesehen werden.

4.4.12 Herstellen einer Digoxigenin-markierten sense- und antisense-RNA-Sonde

Dazu wurden die entsprechenden Plasmide (Gal-3 und Aktin im pGEM[®]-4Z-Vektor, jeweils in sense- und antisense-Orientierung) mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (5 Units/µg DNA, 1 Stunde bei 37 °C) linearisiert und mit dem E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure-Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Reaktionsansatz wurde hierzu mit CP-Puffer versetzt und auf eine Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit dem DNA-Waschpuffer (mit Ethanol komplettiert) und Trocknen der Säule ohne Puffer, erfolgte die Elution mit 50 µl DEPC-Wasser. Für die Produktion der DIG-markierten RNA-Sonden wurde der Amplifikationskit AmpliScribe T7 verwendet.

Alle Reagenzien, außer der RNA-Polymerase, mussten vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Inkubation erfolgte für 5 Stunden bei 42 °C, danach wurde die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA pro 20 µl Ansatz gestoppt.

Pipettierschema für einen 20 µl Ansatz:

Reagenz	µl	Endkonzentration
Template	x (mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 4,3 µl bringen)	50 ng/µl
10 x Puffer	2	1 x
ATP 100 mM	1,5	7,5 mM
CTP 100 mM	1,5	7,5 mM
GTP 100 mM	1,5	7,5 mM
UTP 100 mM	1,2	6 mM
DIG-11-UTP 10 mM	4	2 mM
DTT 100 mM	2	10 mM
T7 RNA-Polymerase	2	-

Tabelle 4-13: RNA-Sondenmarkierung

Neben der eigentlichen Sondenherstellung wurde auch von dem Kontrollplasmid des Amplifikationskits und von den eigenen linearisierten Plasmiden jeweils ein auf 10 µl reduzierter Ansatz ohne DIG-11-UTP gemacht.

Pipettierschema für einen 10 µl Ansatz:

Reagenz	µl	Endkonzentration
Template	x (mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 4 µl bringen)	50 ng/µl
10 x Puffer	1	1 x
ATP 100 mM	0,75	7,5 mM
CTP 100 mM	0,75	7,5 mM
GTP 100 mM	0,75	7,5 mM
UTP 100 mM	0,75	7,5 mM
DTT 100 mM	1	10 mM
T7 RNA-Polymerase	1	-

Tabelle 4-14: Kontrolle der Sondenlänge und der RNA-Integrität

Von diesen RNA-Transkripten wurden zusammen mit einem RNA-Standard jeweils 2 µl auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Das diente dazu, die Integrität der RNA und die Länge der Transkripte zu überprüfen. Bevor die RNA auf das Gel aufgetragen wurde, wurde

sie, mit RNA-Ladepuffer versetzt, 10 Minuten auf 70 °C erhitzt, kurz auf Eis gekühlt und dann in die Geltaschen geladen. Ein entsprechendes Agarosegel mit den RNA-Kontrolltranskripten ist in Abbildung 4 dargestellt.

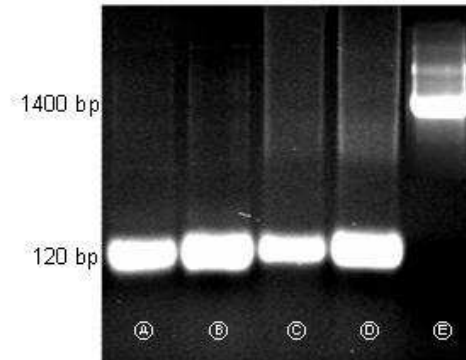


Abbildung 4: RNA-Kontrolltranskripte. (A) Plasmid mit Aktin-Insert in sense-Orientierung. (B) Plasmid mit Aktin-Insert in antisense-Orientierung. (C) Plasmid mit Galektin-3-Insert in sense-Orientierung. (D) Plasmid mit Galektin-3-Insert in antisense-Orientierung. Die transkribierte RNA der vier eigenen Plasmiden hatte jeweils die erwartete Größe von ca. 120 bp. (E) Kontrollplasmid des Amplifikationskits. Größe des RNA-Transkripts wie vom Hersteller angegeben bei ca. 1 400 kb. Bei keinem der Transkripte konnten Zeichen einer Degradierung der RNA erkannt werden und die Stärke der Banden sprach für eine gute Effizienz bei der Transkription.

Die RNA-Sonden wurden anschließend, nach Zugabe von 20 µl Poly(A) (10 µg/µl), mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit dem High Pure PCR Product Purifikation Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Der Reaktionsansatz wurde dazu mit dem 5fachen Volumen Bindepuffer gemischt, auf ein Filtrationsgefäß pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA 2 x mit Waschpuffer (komplettiert mit Ethanol, reinst) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl Elutionspuffer und die gereinigten Sonden wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Vor und nach der Reinigung wurden jeweils 0,5 µl für die Quantifizierung der produzierten Sondenmenge entnommen.

Ausgehend von der Annahme, dass sich vor der Reinigung 30 µg markierte RNA in einem Volumen von 22 µl befunden haben, wurden die entnommenen 0,5 µl mit RNA-Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 10 ng/µl (V1) gebracht. Ebenso wurde mit den 0,5 µl verfahren, die nach der Reinigung entnommen wurden, wobei sich nun die 30 µg in 100 µl befanden (ohne Berücksichtigung von Verlusten durch die Reinigung). Ausgehend von

dieser Verdünnung wurde eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema hergestellt (siehe DIG Application Manual for Filter Hybridization von der Fa. Roche):

RNA-Verdünnungsstufe	μl RNA von Verdünnungsstufe x	μl RNA-Verdünnungspuffer	Konzentration
V1			10 ng/ μl
V2	1 von V1	9	1 ng/ μl
V3	1 von V2	99	10 pg/ μl
V4	3 von V3	7	3 pg/ μl
V5	1 von V3	9	1 pg/ μl
V6	3 von V5	7	0,3 pg/ μl
V7	1 von V5	9	0,1 pg/ μl
V8	3 von V7	7	0,03 pg/ μl

Tabelle 4-15: RNA-Verdünnungsreihe

Um die Menge der markierten RNA abschätzen zu können, wurde von einer DIG-markierten Kontroll-RNA (100 ng/ μl) die gleiche Verdünnungsreihe angefertigt. Von diesen Verdünnungsreihen wurde dann von jeder Stufe 1 μl auf einen Streifen Nylon Membran pipettiert. Nach der Vernetzung der RNA mit der Membran durch UV-Licht-Bestrahlung wurde sie kurz in Waschpuffer gewaschen, gefolgt von einer Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit 1 %iger Blocking Solution für 30 Minuten, und anschließender Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper (1:10 000 in 1 %iger Blocking Solution verdünnt), auch für 30 Minuten. Im Anschluß daran wurde die Membran erst 2 x 15 Minuten in Waschpuffer gewaschen, dann kurz in Detektionspuffer, bevor sie in eine verschließbare Plastikhülle gelegt und mit einer ausreichenden Menge CDP-Star bedeckt wurde. Die Oberseite der Plastikhülle wurde sofort ohne den Einschluß von Luftblasen auf die Flüssigkeitsschicht aufgelegt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Hülle geschlossen. Zur Filmentwicklung wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt, ein Röntgenfilm für 15 Minuten aufgelegt und anschließend entwickelt. Die Menge der markierten RNA wurde durch Vergleich mit der Kontroll-RNA abgeschätzt. Für die antisense-Sonden ist ein entsprechendes Ergebnis in Abbildung 5 dargestellt, jeweils vor und nach der Reinigung der Sonden.

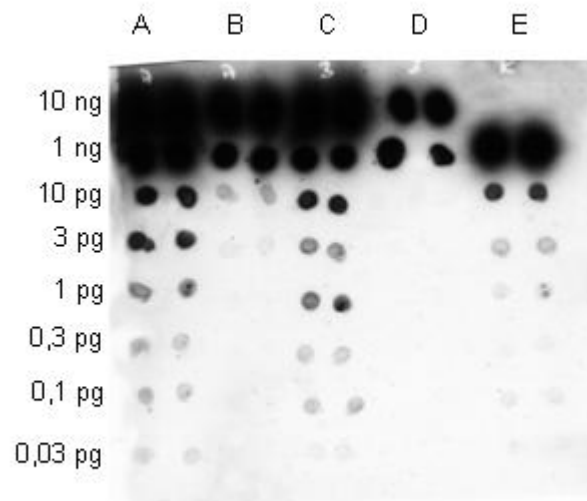


Abbildung 5: Quantifizierung der RNA-Sonden. Proben jeweils doppelt aufgetragen. (A) Verdünnungsreihe der Aktin-antisense-Sonde vor der Reinigung. (B) Verdünnungsreihe der Aktin-antisense-Sonde nach der Reinigung. (C) Verdünnungsreihe der Gal-3-antisense-Sonde vor der Reinigung. (D) Verdünnungsreihe der Gal-3-antisense-Sonde nach der Reinigung. (E) Verdünnungsreihe der DIG-markierten Kontroll-RNA. Die Verluste durch die Reinigung sind deutlich zu erkennen, wurden aber zur Vermeidung von Hintergrundproblemen, v. a. in der ISH, in Kauf genommen.

4.4.13 Northern Blot

Die RNA wurde wie unter 4.4.7 beschrieben gewonnen und 4 µg Total-RNA von jedem Organ wurden in der Northern Blot Analyse eingesetzt (siehe DIG Application Manual for Filter Hybridization von der Fa. Roche). Falls nötig, wurde die RNA in einem Vakuumkonzentrator auf ein geringeres Volumen reduziert. Nachdem die RNA mit dem 2fachen Volumen RNA-Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert wurde, wurde sie für 1 Minute auf Eis gekühlt und anschließend in die Probenaschen des 1 %igen Agarosegels pipettiert. Vom RNA-Standard wurden 3 µl genommen und auf die gleiche Weise vorbehandelt. Es wurde ein denaturierendes Formaldehydgel verwendet und als Laufpuffer diente 1 × MOPS. Anschließend wurde die RNA, nach einer Anfangsspannung von 90 Volt für 10 Minuten, bei einer konstanten Spannung von 60 Volt für mindestens 5 Stunden aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde der Gelabschnitt mit dem RNA-Standard abgetrennt, in 1 x MOPS mit 0,4 µl Ethidiumbromid/10 ml Puffer gelegt und dann unter UV-Licht fotografiert.

Das Gel wurde für 2 x 15 Minuten in 20 x SSC gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Über Nacht wurde dann die RNA durch einen Kapillartransfer auf eine Nylonmembran geblottet. Als Transferpuffer diente 20 x SSC. Hierfür wurde eine Plastikwanne mit 20 x SSC gefüllt und eine zweite Plastikschiene darin diente als Boden für den Blotaufbau. Darauf wurde eine Brücke aus Gel-Blotting Papier gelegt, die in die mit 20 x SSC gefüllte Plastikwanne reichte, und ein zweites Gel-Blotting Papier in der Größe des Gels, beide mit 20 x SSC angefeuchtet. Als nächstes folgte das Gel, und zwar mit der Oberseite nach unten. Auf das Gel kamen die Nylon Membran und drei trockene Gel-Blotting Papiere in Gelgröße, zum Schluß ein Stapel trockene Papiertücher und eine Glasplatte als Gewicht. Um die Verdunstung gering zu halten, wurde der Blotaufbau ringsum mit Plastikfolie abgedeckt. Am nächsten Tag wurde die Membran zur Quervernetzung der RNA mit UV-Licht bestrahlt und anschließend mit DEPC-Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit einer auf 68 °C vorgewärmten Prehybridisierungslösung in einer rotierenden Glasflasche in einem Hybridisierungsöfen inkubiert. Nach 2 Stunden wurde diese Lösung gegen die Hybridisierungslösung, die mit der RNA-Sonde (antisense für Galektin-3- oder Aktin-mRNA) komplettiert wurde, ausgetauscht. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 90 ng/ml Hybridisierungsmix eingesetzt und vor der Zugabe für 5 Minuten gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und dann zu dem vorgewärmten Hybridisierungsmix gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht für mindestens 16 Stunden bei 68 °C. Danach wurde die Membran erst für 2 x 10 Minuten mit 2 x SSC/0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur, dann für 2 x 30 Minuten mit vorgewärmter 0,1 x SSC/0,1 % SDS-Lösung bei 68 °C gewaschen. Danach folgte ein kurzer Waschschrift in Waschpuffer. Die weitere Behandlung und Entwicklung der Membran erfolgte wie bei der Membran für die Quantifizierung der RNA-Sonden (siehe 4.4.12) beschrieben.

4.4.14 *In situ* Hybridisierung (ISH)

Die *in situ* Hybridisierung erfolgte nach einem Protokoll von Braissant & Wahli (1998). Die Gefrierschnitte wurden an einem Cryostat in einer Stärke von 5 µm angefertigt und auf SuperFrost® Plus-Objektträger aufgeschmolzen. Nachdem sie kurz an der Luft getrocknet waren, wurden sie 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd in PBS-ISH fixiert und kurz in DEPC-Wasser gespült (Gefrierschnitte, die für die Immunhistochemie mit Anti-Galektin-3 IgG verwendet werden sollten, wurden danach kurz bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert). Anschließend wurden sie 2 x 15 Minuten in

PBS-ISH mit 0,1 % aktivem DEPC inkubiert, bevor sie für 15 Minuten in 5 x SSC kamen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger unter Aussparung der Organschnitte vorsichtig abgetrocknet, danach erfolgte die Inkubation mit der vorgewärmten Prehybridisierungslösung in Feuchtkammern für mind. 2 Stunden bei 58 °C. Nach dieser Zeit wurde die Prehybridisierungslösung gegen die vorgewärmte und mit der DIG-markierten RNA-Sonde (antisense oder sense für Galektin-3-mRNA, sense als Negativkontrolle) ergänzten Hybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung wurde für 40 Stunden bei 58 °C durchgeführt. Danach wurden die Schnitte mit 2 x SSC 30 Minuten bei Raumtemperatur und 60 Minuten bei 68 °C gewaschen, mit jeweils einem Wechsel des Waschpuffers, bevor sie mit 0,1 x SSC 60 Minuten bei 68 °C gewaschen wurden, auch mit einmaligem Pufferwechsel. Für die Waschschrte bei 68 °C wurden die jeweiligen Puffer vorgewärmt. Als nächstes wurden die Schnitte kurz mit Puffer 1 gespült, bevor der Anti-DIG-Antikörper, AP-gekoppelt, in einer Verdünnung von 1:5 000 in Puffer 2 für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben wurde. Anschließend wurde 2 x 15 min in Puffer 1 und dann 5 min in Puffer 3 gewaschen. Zur Farbentwicklung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Die Objektträger wurden hierfür in Feuchtkammern gelegt und im Dunkeln für mind. 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz in Puffer 3, 15 Minuten in TE-Puffer und anschließend in Aqua dest. gewaschen und mit Aquatex[®] eingedeckt.

4.4.15 Histologie

4.4.15.1 Einbetten der Organe und Anfertigen histologischer Schnitte am Mikrotom

Nach einem zweiten Wechsel des 70 %igen Ethanolts wurden die Organe in die Einbettformen aus Plastik gegeben und im Weiteren in einem Einbettautomaten entwässert (durch folgende Bäder von 80 und 96 %igem Ethanol, Isopropanol und Xylol) und in flüssiges Paraffin gebracht. Das Ausgießen der Organe erfolgte mit 62 °C heißem Paraffin. Die Blöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Die Blöcke wurden am Rotationsmikrotom mit einer Dicke von 4,5 µm in Serie geschnitten. Je nach Zyklusstand des Ovars konnten zwischen 250 und 450 Schnitte pro Ovar angefertigt werden. Zum Aufziehen wurde auf die nummerierten Objektträger ein Tropfen kaltes Aqua dest. gegeben, auf den die Schnitte gelegt wurden. Zum Strecken des Schnittes wurde der Objektträger dann auf einen 42 °C warmen Strecktisch gelegt. Nach der vollständigen

Trocknung der Schnitte wurden diese noch für mindestens 24 Stunden bei 42 °C in einen Trockenschrank gegeben.

4.4.15.2 Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin (HE, nach Romeis, 1989)

Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert (zwei Bäder Xylol für jeweils 15 Minuten) und über eine absteigende Alkoholreihe (zwei Bäder Isopropanol und je ein Bad 96 %iger, 80 %iger und 70 %iger Ethanol, für jeweils 10 Minuten) in Aqua dest. gebracht. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte für 6 Minuten in Mayers Hämalaun eingestellt, danach in destilliertem Wasser gewaschen, bis keine Farbschlieren mehr abgingen und dann zum Bläuen für mindestens 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Nach einem kurzen Bad in Aqua dest. kamen die Schnitte dann zur Plasmafärbung für 8 Minuten in Eosin, wobei mäßig überfärbt wurde. Anschließend wurde für jeweils 1-2 Minuten erst in Aqua dest., dann in 80 %igem Ethanol differenziert. Nach einem kurzen Bad in 96 %igem Ethanol kamen die Schnitte zweimal für 5 Minuten in Isopropanol und dann 3 x 5 Minuten in Xylol. Das Einschließen unter einem Deckglas erfolgte unter Verwendung von Eukitt[®].

4.4.15.3 Färbung nach Papanicolaou (nach Romeis, 1989)

Die von Papanicolaou (1941, 1954) empirisch erarbeitete Färbetechnik sollte dazu dienen, die zyklischen Schwankungen im geschichteten Plattenepithel des weiblichen Genitaltraktes darzustellen. Hier wurde nun versucht, mit Hilfe dieser Färbetechnik eine Zyklusdiagnostik bei der Maus zu erstellen.

Färbung nach Papanicolaou von Hand:

Die fixierten Abstriche wurden zur Ablösung des Fixiermittels für 20 Minuten in 30 %igen Ethanol gestellt und dann in Aqua dest. gewaschen. Die Färbung mit Harris' Hämatoxilin erfolgte für 3-5 Minuten mit anschließender Differenzierung in 0,03 N HCl, wobei die Schnitte maximal zweimal eingetaucht wurden. Das Bläuen der Schnitte wurde für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 % und 96 %iger Ethanol, jeweils mindestens 30 s) für 3-5 Minuten in die Orange G (OG 6) Färbelösung gebracht. Danach wurden die Schnitte durch jeweils zweimaliges Eintauchen in 3 Volumina 96 %igen Ethanols gespült. Die letzte Färbung erfolgte für 3-5 Minuten in Eosin-Azur 50 (EA 50) mit

wiederum anschließender Spülung durch jeweils zweimaliges Eintauchen in 3 Volumina 96 %igen Ethanol. Zum Eindecken wurden die Schnitte kurz in 2 Bäder Isopropanol und dann in 3 Bäder Xylol gegeben. Der Einschluß unter dem Deckglas erfolgte unter Verwendung von Eukitt®.

4.4.16 Immunhistochemie

4.4.16.1 Vorbehandlungen

Bei einigen Primärantikörpern musste eine Vorbehandlung der Schnitte im Sinne des so genannten „antigen-unmasking“ oder „antigen-retrieval“ erfolgen. Diese Vorbehandlung wurde im Falle der Antikörper gegen Galektin-1 und Galektin-3 nur bei der Darstellung der jeweils positiven Zellen im Hoden eingesetzt.

Primärantikörper	Vorbehandlung
- Rabbit Anti-Cleaved Caspase3 IgG (Asp 175) (1 mM EDTA-Puffer, pH 8,0) - Rabbit Anti-Galektin-3 IgG (1 mM EDTA-Puffer, pH 8,0) - Rabbit Anti Galektin-1 IgG (10 mM Zitratpuffer, pH 6,0)	Mikrowellen-Vorbehandlung: nach dem Entparaffinieren und Wässern der Schnitte wurden diese in einen Plastikfärbetrog mit Deckel, gefüllt mit 1 mM EDTA-Puffer, pH 8,0, bzw. 10 mM Zitratpuffer, pH 6,0, gegeben und in die Mikrowelle gestellt. Hier wurden sie bei 375 Watt erhitzt, bis der Puffer zu kochen begann, dann wurden sie für weitere 10 min bei 112 Watt in der Mikrowelle belassen, wobei der Puffer immer wieder leicht kochte. Nach dieser Zeit blieben die Objektträger noch für 30 min zum Abkühlen in dem zugedeckten Gefäß.
- Rat-Anti-Mouse F4/80 IgG - Rabbit-Anti-Aktin Ig	Vorbehandlung mit Trypsin: nach dem Entparaffinieren und Wässern der Schnitte wurden diese in eine auf 37 °C vorgewärmte 0,1 %ige CaCl ₂ -Lösung mit 0,01 % Trypsin (pH 7,8) gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Objektträger mehrfach mit 4 °C kaltem Aqua dest. gespült und 2 x für 5 min darin gewaschen.

Tabelle 4-16 : Vorbehandlungen für immunhistochemische Untersuchungen

4.4.16.2 Alternative Vorbehandlungen

Die beiden 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0 und 10,6, wurden unter den gleichen Bedingungen wie der EDTA- und der Zitrat-Puffer in der Mikrowelle benutzt.

Die Proteinase K-Lösung (20 µg/ml) wurde nach der Wässerung der Schnitte direkt auf die Objektträger gegeben und entweder für 15 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte erst in Aqua dest. gewaschen, dann in PBS.

Die 0,1 %ige Triton-X-Lösung wurde nach der Wässerung der Schnitte als Bad eingesetzt und die Objektträger darin für 2 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte erst in 0,1 % Natriumzitrat-Puffer gewaschen und dann in PBS.

Es wurden auch Kombinationsvorbehandlungen getestet, z. B. Mikrowelle und Verdau zusammen. In diesen Fällen wurde erst die Mikrowellen Behandlung durchgeführt.

4.4.16.3 Immunhistochemie am Paraffinschnitt und Gefrierschnitt

Das Entparaffinieren und Wässern der Schnitte erfolgte durch zwei Bäder Xylol, für jeweils 15 Minuten, dann zwei Bäder Isopropanol und anschließend je ein Bad 96 %igen, 80 %igen und 70 %igen Ethanol, für jeweils 10 Minuten. Danach kamen die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten in Aqua dest., bevor sie für mindestens 5 Minuten in PBS verbracht wurden. Die Gefrierschnitte wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert und dann erst aus dem Behältnis genommen, in dem sie eingefroren worden waren. Diese Objektträger wurden sofort in PBS verbracht und im Weiteren wie die Paraffinschnitte behandelt.

Als Enzyme für die Farbentwicklung wurde entweder Peroxidase oder alkalische Phosphatase verwendet. Bei Peroxidase als Markierungsenzym wurden die Objektträger zur Blockierung der endogenen Peroxidase nach dem zweiten Aqua dest.-Bad für 15 Minuten in eine wässrige, 1 %ige H₂O₂-Lösung gestellt. Der Vorgang erfolgte unter Verwendung eines Magnetrührers und eines Rührfisches bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte mehrfach kurz mit Aqua dest. gespült und dann in PBS gestellt. Im Falle der Verwendung von alkalischer Phosphatase erwies sich eine Blockierung mit Levamisol als nicht erforderlich.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 5 % Vollserum in 1 %iger BSA-Lösung in PBS. Es wurde jeweils das Serum der Tierspezies verwendet, von der der Sekundärantikörper stammte. Hierfür wurden die Objektträger einzeln aus dem PBS-Bad genommen und unter Aussparung des Organschnittes trocken gewischt. Dann wurde der jeweilige Objektträger waagrecht auf die Einteilungen einer Objektträgerbox aus Plastik gelegt, die durch das Einfüllen von etwas PBS in den Bodenraum zur Feuchtkammer gemacht wurde, und anschließend mit einer Pipette mit ausreichend Blockierungslösung bedeckt. Die Inkubation erfolgte bei geschlossenem Deckel und bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten. Danach wurde die Blockierungslösung abgegossen, der Objektträger wieder vorsichtig unter Organaussparung trocken gewischt, in die Feuchtkammer zurückgelegt und nun mit der entsprechenden Antikörperlösung bedeckt. Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte in 1 %iger BSA-Lösung in PBS. Die optimale Verdünnung wurde für jeden Antikörper in entsprechenden Vorexperimenten ermittelt. Bei gekauften Antikörpern dienten die Angaben des Herstellers, soweit vorhanden, als Richtlinie. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in der geschlossenen Feuchtkammer über Nacht (16 Stunden) bei 4 °C im Kühlschrank.

Im Anschluß an die entsprechende Inkubationszeit wurden die Objektträger 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Objektträger, die mit verschiedenen Antikörpern inkubiert wurden, wurden in getrennten Behältern gewaschen. Dann wurden die Objektträger einzeln aus der PBS-Lösung entnommen, vorsichtig abgetrocknet und in der Feuchtkammer mit einer PBS-Lösung, mit 1 % BSA, die den biotinylierten Sekundärantikörper enthielt, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder für 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Die ABC-Komplex-Lösung wurde während dieses Waschschrtes frisch angesetzt. Für den ABC-Komplex gekoppelt mit Peroxidase wurde ein Tropfen Lösung A und ein Tropfen Lösung B auf 2,5 ml PBS gegeben, für den ABC-Komplex gekoppelt mit alkalischer Phosphatase ein Tropfen A und ein Tropfen B auf 5 ml PBS. Die jeweilige Lösung wurde gut gemischt und für mindestens 30 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor sie auf die Schnitte gegeben wurde. Die Inkubation mit dem ABC-Komplex erfolgte in der Feuchtkammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Als Farbsubstrat für das Enzym Peroxidase wurde DAB verwendet. Dazu wurden ein Tropfen Pufferlösung, zwei Tropfen DAB-Lösung und ein Tropfen H₂O₂-Lösung auf 2,5 ml Aqua dest. gegeben, gut gemischt und unverzüglich auf die Schnitte gegeben. Diese wurden hierfür wieder vorsichtig trocken gewischt und in die Inkubationsboxen gelegt. Die Farbentwicklung

erfolgte im Dunkeln für ca. 5-10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte für 2 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Für das Enzym alkalische Phosphatase wurde als Farbsubstrat Vector[®] Red gewählt. Dazu wurden die Objektträger nach dem Waschen in PBS-Lösung in eine Tris-Pufferlösung verbracht, weil Phosphate die Farbentwicklung stören. Das Ansetzen des Farbsubstrates erfolgte durch Vermischen von jeweils einem Tropfen der Reagenzien 1, 2 und 3 in 2,5 ml Tris-Puffer. Auch dieses Substrat wurde unverzüglich auf die Schnitte gegeben, da diese Farbe nach 45 Minuten ihre Wirksamkeit verliert. Die Entwicklung erfolgte ebenfalls im Dunkeln und bei Raumtemperatur und das Substrat wurde für 25-30 Minuten auf den Schnitten belassen. Danach wurden die Objektträger erst für 5 Minuten in Tris-Puffer, dann für 2 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Dann wurden die Schnitte in Mayers Hämalaun gegeben und darin für 6 Minuten gegengefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte erst in Aqua dest. gewaschen, bis keine Farbschlieren mehr abgingen, danach zum Bläuen für mindestens 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Nach einem kurzen Bad in Aqua dest. wurden die Objektträger schließlich in eine aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 80 %, 96 %iger Ethanol und zweimal Isopropanol, jeweils für 5 Minuten) und dann 3 x 5 Minuten in Xylol gebracht. Der Einschluß der Schnitte unter dem Deckglas erfolgte unter Verwendung von Eukitt[®].

Im Rahmen der gesamten Immunhistochemie wurden neben der Bouin`schen Lösung auch noch 4 % Paraformaldehyd in PBS und Methanol-Eisessig als Fixative getestet (siehe Abschnitt 4.3.5). Da mit den verwendeten Antikörpern kein Unterschied im Hinblick auf den Erhalt der Antigene im Gewebe festzustellen war, wurden im Weiteren in der Immunhistochemie nur noch in Bouin`scher Lösung fixierte Organe verwendet, da sie den besten morphologischen Erhalt der Zellen aufwiesen. Alle histologischen Bilder in dieser Arbeit sind von in Bouin`scher Lösung fixierten Organen.

4.4.16.4 Negativkontrollen

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden folgende Negativkontrollen verwendet:

Bei der Inkubation mit Anti-Galektin-3 IgG, Anti-Galektin-1 IgG und Anti-Galektin-7 IgG wurden als Negativkontrollen jeweils depletierte IgG-Fractionen in der gleichen Verdünnung wie der jeweilige Primärantikörper eingesetzt.

(Dazu wurden 5-10 mg des jeweiligen Galektins an 1 ml Affi-Gel 601 (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gekoppelt und mittels Affinitätschromatographie die spezifischen IgG-Fractionen gebunden.)

Bei Verwenden des Primärantikörpers Anti-F4/80 wurde mindestens ein Objektträger pro Färbeansatz ohne Primärantikörper inkubiert.

Zusätzlich wurde bei den Primärantikörpern Anti-Aktin-Ig und Anti-3 β -HSD IgG, die beide vom Kaninchen stammten, eine weitere Kontrolle mit Vollserum hinzugefügt, indem anstelle des Primärantikörpers Kaninchenserum in der gleichen Verdünnung wie der jeweilige Primärantikörper auf die Schnitte gegeben wurde.

Im Falle des Primärantikörpers Anti-cleaved Caspase3 IgG wurde dieser mit einem inhibitorischen Peptid vorinkubiert.

4.4.17 TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)

Das Entparaffinieren und Wässern der Schnitte erfolgte wie unter 4.4.16.3 beschrieben. Anschließend wurden die Objektträger einer Vorbehandlung in der Mikrowelle, wie unter 4.4.16.1 beschrieben, unterzogen. Der 1 mM EDTA-Puffer erwies sich als der beste von den getesteten Puffern. Der für in Bouin'scher Flüssigkeit fixierte Organe empfohlene basische Tris-Puffer (pH 10,6) (Labat-Moleur et al, 1998) führte zur Detektion der gleichen Zellen wie der 1 mM EDTA-Puffer, verursachte aber wesentlich mehr Hintergrund.

Die Schnitte wurden in PBS-Puffer gewaschen, anschließend vorsichtig trockengewischt und in die Feuchtkammer eingelegt. Dann wurden die Schnitte unverzüglich mit einer Mischung aus 45 μ l TUNEL-Label und 5 μ l TUNEL-Enzym bedeckt und für 1 Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Negativkontrollen wurden nur mit 50 μ l TUNEL-Label bedeckt. Nach der Inkubation wurden die Objektträger für 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde eine Signalkonversion durchgeführt, indem ein Anti-Fluoreszein Antikörper, gekoppelt mit AP, auf die Schnitte gegeben wurde. Die Präparate wurden für 30 Minuten bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert und dann 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Wie bereits oben beschrieben wurden dann Farbentwicklung, Gegenfärbung und Eindeckung durchgeführt.

4.4.18 Western-Blotting

4.4.18.1. Proteingewinnung

Die Organe wurden in gefrorenem Zustand gewogen und mit der 6-fachen Menge eiskaltem Lysispuffer versetzt, je nach der Größe des Organs. Die Disruption und Homogenisation der Organe erfolgte im Eisbad mit dem Ultra-Turrax T8 und dem Dispergierstabes S25N-8G auf Stufe 5 und dauerte im Durchschnitt 40-60 s. Im Anschluß daran wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C für 20 Minuten bei 15 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Tube pipettiert und Proteinpellet und Überstand getrennt bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurde 1 µl des Proteinüberstandes für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) eingesetzt. Hierfür wurde mit PBS-2 Puffer für jede Proteinprobe in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe angesetzt und schließlich mit einer äquivalenten Menge 40 %iger Bio-Rad Protein Assay-Lösung versetzt. Als Leerwert diente ein Ansatz ohne Proteinprobe. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Mini-Reader gemessen und gemäß einer mit bovinem Serumalbumin ermittelten Standardkurve, wonach eine Extinktion von 0,15 einer Proteinkonzentration von 1 µg entspricht, der Proteingehalt errechnet.

4.4.18.2 SDS-PAGE

In der SDS-Gelelektrophorese wurden 50 µg Protein von jeder Probe verwendet. Dazu wurde das Probenvolumen, das die 50 µg Protein enthielt, mit PBS-Puffer auf 10 bzw. 20 µl aufgefüllt und mit der äquivalenten Menge SDS-Probenpuffer versetzt. Bevor die Proben in die Geltaschen geladen wurden, wurden sie für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der Proteingrößenstandard und die Positivkontrollen für Galektin-1, -2, -3, -7 und -8 wurden auf die gleiche Weise vorbehandelt.

Das Trenngel wurde in einem Gießstand bis zu einer Höhe von 5,5 cm gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation (Dauer ca. 30-45 Minuten) mit Isopropanol überschichtet. Nach gründlichem Abwaschen des Isopropanols mit Aqua dest. wurde das Sammelgel darauf gegossen und ein Teflonkamm zur Aussparung von 10 Probentaschen hineingesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele in den Elektrophorese-Einsatz der Mini-PROTEAN[®] II oder 3 cell gegeben, die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült und die

Proben aufgetragen. Schließlich wurde die Elektrophoresekammer mit 400 ml Laufpuffer befüllt und die Auftrennung der Proben erfolgte bei 200 V für 45 Minuten.

4.4.18.3 Elektrophoretischer Transfer auf Nitrozellulose (Tank Transfer System)

Nach dem Lauf und nach der Entfernung des Sammelgels wurden die Gele in Blottingpuffer (Towbin) äquilibriert, dreimal für 15 Minuten bei 4 °C. Der Blotaufbau begann mit einem Schwammtuch und drei Lagen Gel-Blotting Papier (auf Gelgröße zugeschnitten), getränkt in Blottingpuffer. Darauf kamen erst das Gel, dann ein entsprechend großes Stück Nitrozellulose, schließlich nochmal drei Lagen Gel-Blotting Papier und zum Abschluß wieder ein Schwammtuch, alles in Blottingpuffer getränkt. Dann wurde die Mini Trans-Blot[®] (Electrophoretic Transfer) Cell mit Blottingpuffer aufgefüllt und ein Einsatz, der gefrorenes Wasser enthielt, wurde hineingestellt, um während des elektrischen Transfers den Puffer zu kühlen. Der Transfer auf die Nitrozellulose erfolgte auf einem Magnetrühr Tisch bei konstant 100 V für mindestens 1 Stunde. Die Vollständigkeit des Transfers konnte anhand der steigenden Stromstärke (mA) überprüft werden. Nach dem Transfer wurden die Gele für eine Silberfärbung fixiert und die Nitrozellulose wurde zur Kontrolle des Proteintransfers und zur Sichtbarmachung des Proteinstandards mit PonceauS gefärbt. Nach Markierung des Standards mit Kugelschreiber wurde die PonceauS Lösung mit Aqua dest. abgewaschen.

4.4.18.4 Silberfärbung

Die Gele wurden für mindestens 2 Stunden (unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur) in der Fixierungslösung belassen und dann 3 x für 20 Minuten mit 50 %igem Ethanol gewaschen. Dann erfolgte die Vorbehandlung der Gele mit einer Natriumthiosulfatlösung für 1 Minute, bevor sie 3 x 20 s mit Aqua dest. gewaschen wurden. Im Anschluß daran wurden die Gele für 20 Minuten in die Silberlösung gelegt und dann wieder 2 x 20 s mit Aqua dest. gewaschen. Als nächstes wurden die Gele mit der Entwicklerlösung inkubiert, solange, bis die Banden die gewünschte Färbeintensität hatten. Zum Abstoppen der Entwicklung kamen die Gele für mindestens 30 min in die EDTA-Stopplösung und nach weiteren 30 Minuten in Aqua dest. wurden die Gele in einem Vakuumtrockner getrocknet.

Die rekombinanten Proteine für Galektin-1, -3 und -7 wurden auf diese Art auf ihre Reinheit überprüft, auch im Hinblick auf ihre Verwendung für die Herstellung depletierter IgG-Fractionen von den Antikörpern Anti-Galektin-1, -3 und -7 (siehe Abschnitt 4.4.16.4).

Das entsprechende Silbergel ist in Abbildung 6 dargestellt.

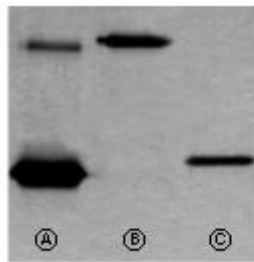


Abbildung 6: Silberfärbung eines SDS-Gels. (A) Galektin-1 rekombinantes Protein, Bande bei 14 kDa. (B) Galektin-3 rekombinantes Protein, Bande bei 29 kDa. (C) Galektin-7 rekombinantes Protein, Bande bei 15 kDa. Die Doppelbande bei Galektin-1 ist auf Dimerisierung zurückzuführen.

4.4.18.5. Proteinnachweis durch Antikörper

Nach dem Entfernen der PonceauS-Lösung und mehrfachem Spülen mit Aqua dest. wurde die Nitrozellulose zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur in eine 5 %ige Milchpulverlösung (in T-TBS) eingelegt. Danach wurde der jeweilige Primärantikörper in der Blockierungslösung verdünnt, auf die Membran gegeben und für mindestens 16 Stunden bzw. über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator auf der Membran belassen. Anschließend wurde die Nitrozellulose 3 x 10 Minuten mit T-TBS-Puffer gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (gekoppelt mit Peroxidase) in der Blockierungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Dann wurde nochmal 3 x 10 Minuten mit T-TBS-Puffer gewaschen. Die Peroxidase-Substratlösung wurde erst kurz vor Gebrauch angesetzt und für 1 Minute auf die Membran gegeben. Dann wurde die Membran nach Abtropfen der Substratlösung in eine Filmkassette gelegt und unter Vermeidung von Luftblasen mit einer Plastikfolie abgedeckt. Darauf wurde der Röntgenfilm gegeben und für 5 Minuten auf der Nitrozellulose belassen. Die weitere Entwicklung des Films erfolgte wie bei der Quantifizierung der RNA-Sonden beschrieben.

Für eine weitere Verwendung und erneuten Proteinnachweis mit einem anderen Primärantikörper auf derselben Nitrozellulose wurde diese über Nacht bei 4 °C in T-TBS-Waschpuffer gelagert. Am nächsten Tag wurde die Membran nochmals 3 x 10 Minuten in T-TBS-Puffer gewaschen und anschließend wurde ein anderer Primärantikörper, verdünnt in der Blockierungslösung, darauf gegeben und wieder über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator auf der Membran belassen. Das weitere Vorgehen war wie bereits oben beschrieben.

5. Ergebnisse

Die Expression von Galektinen wurde mit verschiedenen Methoden (RT-PCR, Klonierungen, Western Blotting) im Ovar und im Hoden und Nebenhoden der Maus untersucht. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden dann mittels spezifischer Antikörper immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Speziell in Hinblick auf die Ergebnisse bei dem Nachweis von Galektin-3 wurden dann im Weiteren noch die Methoden der *in situ* Hybridisierung am Ovar und des Northern Blottings am Ovar und am Nebenhoden eingesetzt. Beim weiblichen Tier stand dabei die Frage im Vordergrund, inwieweit die Expression von Galektin-3 im Ovar zyklusabhängig geregelt wird und in welchen Zellen Galektin-3 vorhanden ist. Um eine deutliche zelluläre Zuordnung der Galektin-3 Expression zu gewährleisten und gegen andere Zellen abzugrenzen, wurden neben Anti-Galektin-3 IgG weitere für einzelne Zelltypen spezifische Marker eingesetzt. So wurden Steroidhormonproduzierende Zellen mit einem Antiserum gegen das Enzym β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (β -HSD) nachgewiesen und zur Identifizierung von Makrophagen wurde ein monoklonaler Antikörper, der gegen das Oberflächenepitop F4/80 gerichtet ist, eingesetzt. Parallel dazu wurde ein Galektin-3 Knock-out Mausmodell (Gal-3 $-/-$) untersucht. Die fehlende Expression von Galektin-3 in diesem Mausmodell sollte dazu genutzt werden, eventuelle phänotypische Veränderungen im Verlauf des ovariellen Zyklus aufzuzeigen. Nachdem Galektine eine ähnliche Zuckerspezifität (siehe Einleitung) aufweisen, war die Frage zu klären, inwieweit Galektine anderen Typs die Lokalisation bzw. Funktion von Galektin-3, dem momentan einzig bekannten Galektin vom Chimera-Typ, übernehmen könnten. Dies zielte darauf ab, die Frage zu untersuchen, inwieweit Redundanz vorliegt oder ob jedes Galektin seine eigene Funktion besitzt.

Galektine sind, wie eine Reihe von Studien (siehe Literaturteil) gezeigt haben, an der Apoptose beteiligt, zum einen als proapoptotische (Galektine 1, 2 und 7), zum anderen als antiapoptotische (Galektin-3) Moleküle. Daher sollte in einem abschließenden Versuch dargelegt werden, ob und wo apoptotisch veränderte Zellen in einem Ovar auftraten. Nachdem Galektin-3 eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben wird, war es die Frage, ob die fehlende Expression von Galektin-3 beim Knock-out-Mausmodell (Gal-3 $-/-$) sich durch eine Zunahme der apoptotisch veränderten Zellen im Ovar bemerkbar machte. Dazu wurde ein Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 eingesetzt, ein Molekül, das zur Signalkette der durch $\text{TNF}\alpha$ ausgelösten Apoptose gehört. Zusätzlich wurde der TUNEL (terminale

deoxynucleotidyl transferase nick end labeling) Test, der DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen detektiert, angewendet.

Der zweite Schwerpunkt im Abschnitt Ergebnisse beschäftigt sich mit der Expression von Galektinen im Hoden und Nebenhoden. Hauptsächlich wurde dabei wiederum die Expression von Galektin-3 in den Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+) im Vergleich zu den Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) untersucht. In diesem Zusammenhang wurde die entwicklungsabhängige Expression in Hoden und Nebenhoden von einem sehr frühen postnatalen Zeitpunkt bis zur Geschlechtsreife untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, inwieweit die Expression einzelner Galektine mit bestimmten Entwicklungsprozessen in Zusammenhang gebracht werden konnte.

Um zunächst einen Überblick zu erhalten, welche Galektine im Ovar, Hoden und Nebenhoden exprimiert werden, wurde mittels spezifischer Oligonukleotidprimer eine RT-PCR Analyse durchgeführt. Anschließend wurden einige PCR-Produkte in einen Vektor kloniert und die Sequenzen überprüft. Der Ergebnisteil ist so gegliedert, dass zunächst die Befunde, die die Ovarien betreffen, beschrieben werden.

5.1 RT-PCR zum Nachweis der Expression von Galektinen

Das erste Experiment, das durchgeführt wurde, war die Polymerasekettenreaktion mit cDNA, die aus der Umschreibung von ovarieller bzw. testikulärer und epididymaler Total-RNA stammte. Mit jeweils spezifischen Primerpaaren (siehe Materialteil 4.3.8) für die Galektine 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 und 12 sollte das Expressionsmuster der Galektinfamilie in diesen Organen als Orientierung für die weiteren Experimente untersucht werden. Es wurde einerseits ein Vergleich zwischen Mäusen der Stämme NMRI und C57BL/6NCrl, andererseits ein Vergleich zwischen den C57BL/6NCrl Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-) Mäusen vorgenommen.

Abbildung 7-1: RT-PCR Ergebnisse mit spezifischen Primerpaaren für Galektin-1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, -9 und -12 amplifiziert aus ovarieller (7-1a), testikulärer (7-1b) und epididymaler (7-1c) cDNA von Wildtyp (Gal-3 +/+) Mäusen des Stammes C57BL/6NCrl. (A) Galektin-1, (B) Galektin-2, (C) Galektin-3, (D) Galektin-4, (E) Galektin-6, (F) Galektin-7, (G) Galektin-8, (H) Galektin-9, (I) Galektin-12.

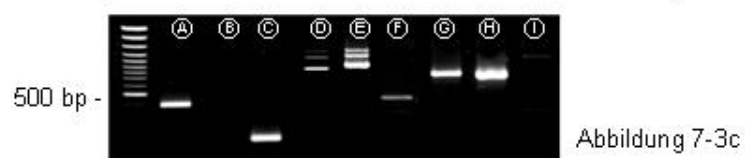
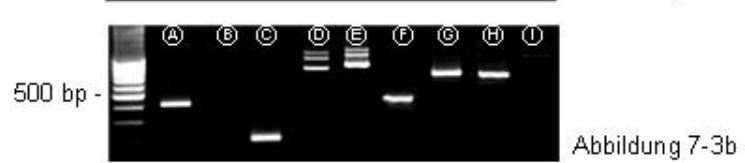
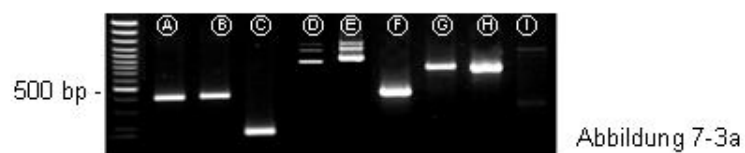
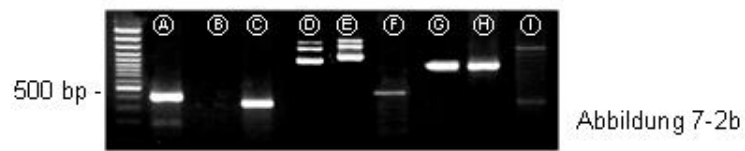
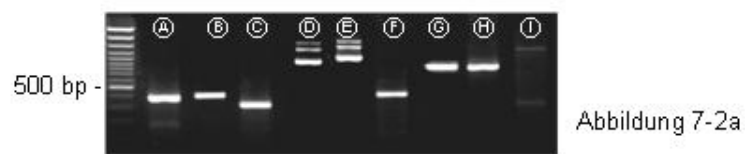
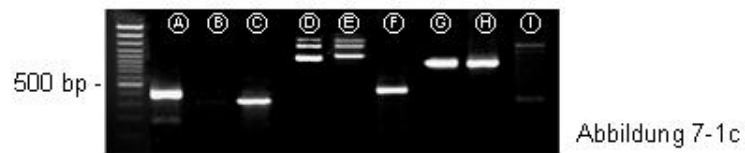
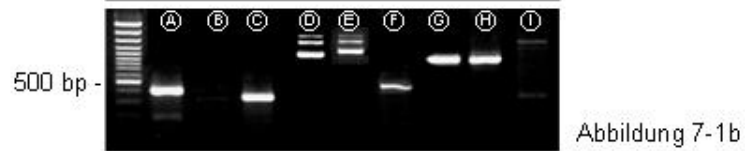
Abbildung 7-2: RT-PCR Ergebnisse mit spezifischen Primerpaaren für Galektin-1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, -9 und -12 amplifiziert aus ovarieller (7-2a), testikulärer (7-2b) und epididymaler (7-2c) cDNA von Mäusen des Stammes NMRI. (A) Galektin-1, (B) Galektin-2, (C) Galektin-3, (D) Galektin-4, (E) Galektin-6, (F) Galektin-7, (G) Galektin-8, (H) Galektin-9, (I) Galektin-12.

Abbildung 7-3: RT-PCR Ergebnisse mit spezifischen Primerpaaren für Galektin-1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, -9 und -12 amplifiziert aus ovarieller (7-3a), testikulärer (7-3b) und epididymaler (7-3c) cDNA von Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen des Stammes C57BL/6NCrl. (A) Galektin-1, (B) Galektin-2, (C) Galektin-3, (D) Galektin-4, (E) Galektin-6, (F) Galektin-7, (G) Galektin-8, (H) Galektin-9, (I) Galektin-12.

Wie aus den Abbildungen 7-1, 7-2 und 7-3 hervorgeht, konnten mit den spezifischen Primern Banden für fast alle untersuchten Galektine amplifiziert werden. Eine Ausnahme bildete die Expression von Galektin-2 am Hoden und am Nebenhoden, die in diesen Organen nicht nachgewiesen werden konnte. Galektin-12 konnte zwar amplifiziert werden, aber nicht in der Bandenstärke wie die anderen Galektine. Es ergab sich weder ein Unterschied in der Galektin-Expression im Vergleich der beiden Mausstämme miteinander, noch im Vergleich von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) zu Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen. Um zu überprüfen, ob in der PCR auch die entsprechenden kodierenden Sequenzen amplifiziert wurden, wurden im folgenden Versuch verschiedene Galektine kloniert und sequenziert.

5.2 Klonierung von murinen Galektinen zur Überprüfung der Primerspezifität

Aus ovarieller cDNA (C57BL/6NCrl Wildtyp-Mäuse, Gal-3 $+/+$) wurden mit Primerpaaren, die spezifisch für die murinen Galektine 1, 3, 4, 6, 7 und 8 entworfen wurden, Sequenzen amplifiziert und in pETBlue-1 AccepTor Vektor inkloniert (siehe Methodenteil 4.4.10). Im Fall von Galektin-3 wurde neben der cDNA von Wildtyp Mäusen (Gal-3 $+/+$) auch die von Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$) eingesetzt, um zu sehen, welcher Bereich der mRNA entfernt wurde. Die Sequenzierung wurde von der Fa. MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden unter dem BLAST-Programm von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) mit der NCBI-Datenbank verglichen und es zeigte sich, dass die amplifizierten und sequenzierten DNA-Abschnitte der Galektine den in der Datenbank jeweils



ausgewiesenen kodierenden Sequenzen der Galektine entsprachen. Der Sequenzvergleich der mRNA von Galektin-3 von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-) Maus zeigte, daß bei der Knock-out Maus 167 Basenpaare der mRNA im Vergleich zum Wildtyp fehlen. Der Vergleich mit der mRNA für Galektin-3 (NCBI-ID: X16834, Mouse mRNA for Mac-2 antigen, Authors: Cherayil et al., 1989) zeigte, dass die Lücke der 955 Basenpaare großen mRNA zwischen den Basen 516 und 683 lag. Dieser Abschnitt in der mRNA codiert für die „carbohydrat recognition domain“ (CRD) von Galektin-3 (Hsu et al., 2000).

Nachdem die morphologisch-anatomische Beurteilung bei der Präparation der Ovarien keinerlei Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen (Gal-3 +/+) und Knock-out-Mäusen (Gal-3 -/-) aufzeigte, stellte sich die Frage, inwieweit auf der mikroskopischen Ebene Veränderungen zu beobachten waren. Dazu wurden Ovarien synchronisierter Tiere (siehe Methodenteil 4.4.4) entnommen, eingebettet und HE Präparate angefertigt. Gleichzeitig wurde auf zytologischer Ebene der Zyklusstand überprüft und mit den Befunden der HE Bilder verglichen.

5.3 Histologischer Verlauf des ovariellen Zyklus und Zykluskontrolle

Im Ovar der Maus umfassen die Vorgänge der Follikelreifung, Ovulation, Anbildung, Blüte und Regression des Corpus luteum (CL) ca. 3-5 Tage. Ein unbehandeltes, 4 Wochen altes weibliches Tier (Abbildung 4, A) zeigte Follikelstadien bis maximal zum frühen Sekundärfollikel, der die ersten Anzeichen einer Antrumbildung aufwies. Die Applikation des Hormons PMSG führte 40 Stunden später zur Anbildung von reifen Sekundärfollikeln mit deutlichem Antrum folliculi (Abbildung 4, B). Die zu diesem Zeitpunkt erfolgte Applikation des Hormons HCG führte dann zur Ovulation und zur Anbildung von Corpora lutea (CL), die 24 Stunden nach Hormongabe bereits deutlich formiert und in Blüte waren (Abbildung 4, C). Die ovulierten Eizellen konnten zu diesem Zeitpunkt im Eileiter nachgewiesen werden (Abbildung 4, C2). Zwei bzw. drei Tage nach der Verabreichung von HCG waren zahlreiche CL in Blüte auf dem Ovar nachweisbar (Abbildung 4, D und F). Die CL befanden sich an der Oberfläche des Ovars und waren deutlich abgegrenzt. Auf dem Ovar einer Maus, die anstelle der Hormone nur NaCl appliziert bekommen hatte, waren zwei Tage nach der zweiten Applikation nur verschiedene Follikelstadien bis zum frühen Sekundärfollikel sichtbar, jedoch keine CL (Abbildung 4, E). Vier Tage später waren die CL mehr im Inneren des Ovars zu sehen und sie waren nicht mehr so deutlich gegen das umgebende Ovargewebe abgegrenzt. Sie hatten sowohl an Größe als auch an Prominenz verloren und die rundliche Gestalt

eingebüßt (Abbildung 4, H). Die strukturelle Regression hatte zu diesem Zeitpunkt bereits sichtbar begonnen. Gleichzeitig war auf diesem Ovar bereits eine erneute Ovulation nachweisbar (Abbildung 4, G) und die ovulierten Eizellen waren im Eileiter sichtbar (Abbildung 4, G2). Fünf Tage nach HCG-Gabe schritt die strukturelle Regression der CL des induzierten Zyklus weiter voran (Abbildung 4, I), während vom nachfolgenden Zyklus bereits ein CL in Anbildung bzw. am Übergang zur Blüte sichtbar war (Abbildung 4, J). Die CL des induzierten Zyklus waren noch ca. 3 Tage als Reste vorhanden, ehe eine komplette strukturelle Regression stattfand (keine Abbildung).

Gleichzeitig zu den HE Färbungen wurde mittels nach Papanicolaou (PAP) gefärbten Vaginalabstrichen bzw. Vaginalspülungen eine Zykluskontrolle durchgeführt (siehe Methodenteil 4.4.15.3). Zellkerne der Vaginalepithelzellen sollen sich durch Harris' Hämatoxilin kräftig blau darstellen, das Zytoplasma der Parabasalzellen intensiv blaugrün, der Intermediärzellen blass grünblau und das der reifen Superfizialzellen rosa (hier erschienen die kernlosen Superfizialzellen eher dunkelgelb).

Beim unbehandelten, 4 Wochen alten Tier waren noch keine spezifischen Zellen des Vaginalepithels zu sehen (Abbildung 4, A1). 40 Stunden nach PMSG-Gabe hingegen waren kernlose Superfizialzellen zu sehen, jedoch auch etliche kernhaltige Vaginalepithelzellen (Abbildung 4, B1). Kernlose Superfizialzellen sind ein Hinweis auf einen bevorstehenden Östrus. Am Tag nach der HCG-Gabe zeigte die Färbung zusätzlich zu den Zellen des Epithels auch Leukozyten, die nach einem stattgefundenen Östrus erwartet werden (Abbildung 4, C1). Am zweiten und dritten Tag p. i. wurde die Spülflüssigkeit von Leukozyten dominiert. Dieser Befund sprach dafür, dass die Tiere sich im Diöstrus befanden (Abbildung 4, D1 und F1). Jedoch sind am dritten Tag bereits wieder kernhaltige Epithelzellen zu sehen gewesen. Bei einem mit NaCl behandelten Kontrolltier sind im Ausstrich genauso wenig spezifische Zellen des Vaginalepithels (Abbildung 4, E1) enthalten wie bei einem unbehandelten, 4 Wochen alten Tier (Abbildung 4, A1). Die Leukozyten waren 4 Tage p. i. verschwunden. Viele kernlose Superfizialzellen im Ausstrich wiesen darauf hin, dass das Tier sich im Östrus befand (Abbildung 4, G1). Dies ließ sich auch anhand der HE gefärbten Präparate belegen, die zeigten, dass gerade eine Ovulation stattgefunden hatte (Abbildung 4, G). Am darauf folgenden Tag traten neben den kernlosen Superfizialzellen auch wieder Leukozyten auf (Abbildung 4, I1). Der Zeitpunkt des Östrus war bereits überschritten und das Tier trat in wieder in den Diöstrus ein, die Phase, die den Hauptanteil des ca. 4 Tage dauernden Zyklus einnahm. Die zytologische Untersuchung der Vaginalabstriche ergab eine gute Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden der HE Färbungen und konnte als

Kontrolle für den Zyklusstand der Maus verwendet werden. Weder bei den HE Färbungen noch bei den PAP-Färbungen konnten bei den Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$) morphologische Veränderungen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (Gal-3 $+/+$) erkannt werden.

Abbildung 8: HE Färbungen von Mäuseovarien im Verlauf des ovariellen Zyklus mit den entsprechenden Abschnitten der Eileiter (C2 und G2) und den zugehörigen Vaginalabstrichen zur Zykluskontrolle (A1-J1, PAP-Färbungen von Vaginalsekret). (A) unbehandeltes, 4 Wochen altes Tier, Follikelstadien bis zum frühen Sekundärfollikel. (A1) unspezifische Zellen. (B) 40 Stunden nach PMSG Behandlung, mitt- und späten antrale Sekundärfollikel. (B1) kernhaltige Vaginalepithelzellen und kernlose Superfizialzellen. (C, C2) 24 Stunden nach HCG Behandlung, Corpora lutea (CL) in Anbildung bzw. in Blüte, ovulierte Eizellen im zugehörigen Eileiter sichtbar. (C1) wie B1, zusätzlich Leukozyten. (D) 48 Stunden nach HCG Behandlung, CL in Blüte. (D1) Leukozyten. (E) 48 Stunden nach der 2. NaCl-Injektion, Kontrolle zu (D), hier nur Follikelstadien bis zum frühen Sekundärfollikel vorhanden. (E1) unspezifische Zellen wie bei (A1). (F) mit HCG behandeltes Tier, 72 Stunden danach, CL in Blüte. (F1) Leukozyten und einzelne kernhaltige Vaginalepithelzellen. (G, G2 und H) mit HCG behandeltes Tier, 96 Stunden danach, CL in Regression und ein Corpus rubrum, ovulierte Eizellen im zugehörigen Eileiter sichtbar. (G1) hauptsächlich kernlose Superfizialzellen. (I und J) mit HCG behandeltes Tier, 120 Stunden danach, CL in Regression und CL in Anbildung bzw. Blüte. (I1) kernlose Superfizialzellen und Leukozyten. CL: Corpus luteum. CR: Corpus rubrum. SF1: Sekundärfollikel in der frühen antralen Phase. SF3: Sekundärfollikel in der späten antralen Phase. →: Eizellen im Eileiter. Balken: 17,5 μm .

Da keine Unterschiede in der makroskopischen und lichtmikroskopischen Untersuchung am Ovar zwischen Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen festgestellt wurden, sollte als nächstes die Proteinexpression verschiedener Galektine in den Ovarien, basierend auf den Befunden der RT-PCRs, untersucht werden. Dabei war von Interesse, welche Galektine im Mäuseovar vorhanden sind und ob die Unterbrechung des Galektin-3 Gens Auswirkungen auf das Expressionsmuster hatte.

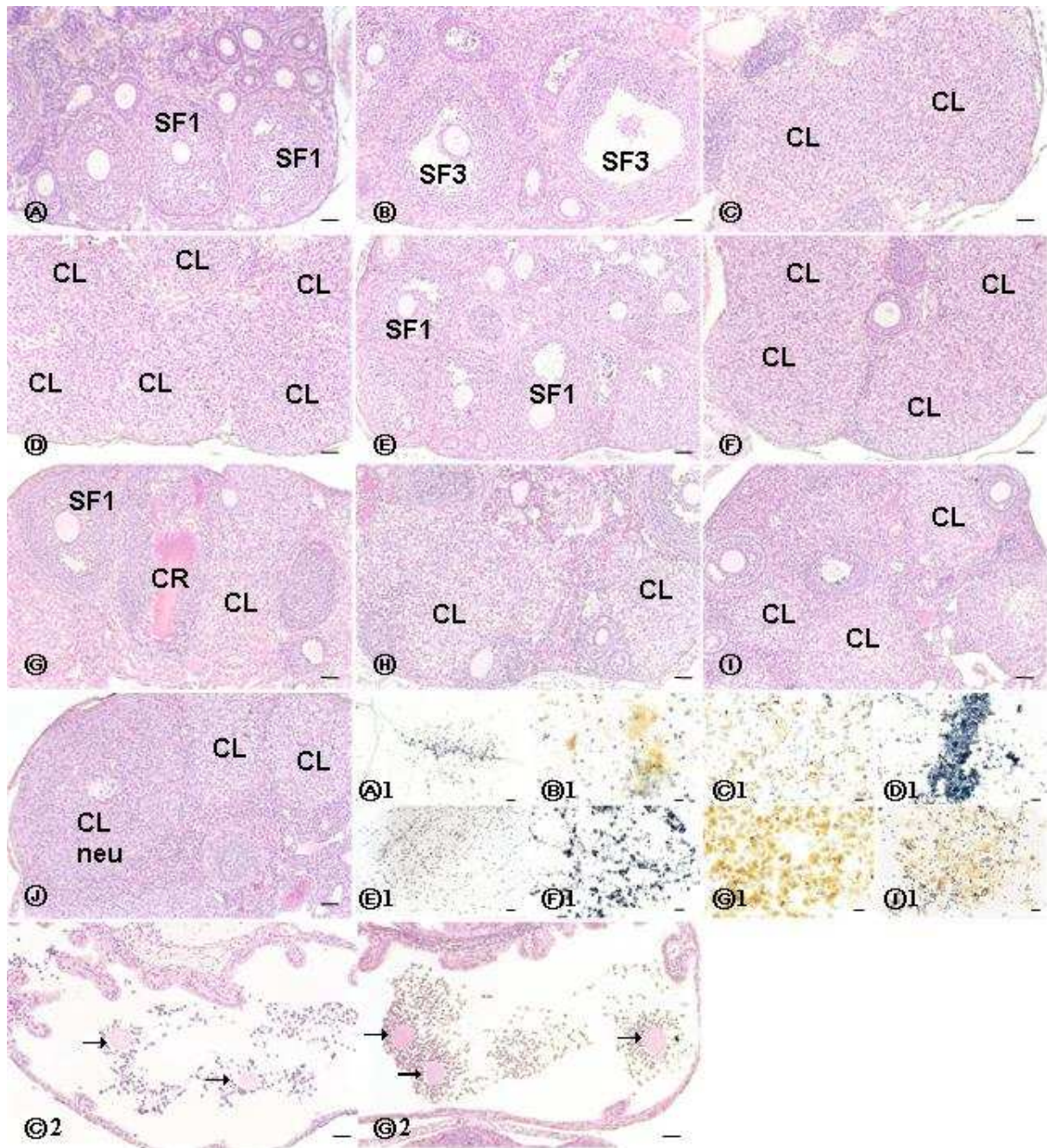


Abbildung 8

5.4 Western Blotting zum Nachweis der Proteinexpression von Galektinen im Verlauf des ovariellen Zyklus bei Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)

Für die Analyse der Proteinexpression standen polyklonale Antikörper zur Verfügung, die die Proteine Galektin-1, -2, -3, -7 und -8 detektierten. Kreuzreaktivitäten für jeden Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie bereinigt. Dafür wurde das jeweilige kreuzreaktive Galektin an Affi-Gel 601 (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gekoppelt und somit die jeweils kreuzreaktiven IgG Moleküle aus den IgG Fraktionen gebunden. Die hierfür verwendeten rekombinanten Proteine wurden auch als Positivkontrollen in den entsprechenden Western Blot Analysen eingesetzt. Für die Western Blotting Experimente wurde ovarielles Gesamtprotein (50 µg) von Tieren der verschiedenen Zyklusstadien (siehe Ergebnisteil 5.3) mittels SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern (Anti-Galektin-1 IgG: 2 µg/ml, Anti-Galektin-2 IgG: 2 µg/ml, Anti-Galektin-3 IgG: 0,5 µg/ml, Anti-Galektin-7 IgG: 1 µg/ml, Anti-Galektin-8 IgG: 2 µg/ml) inkubiert und anschließend mit Hilfe des ECL-Systems detektiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (siehe Methodenteil 4.4.18.5). Die Western Blot Analyse zeigte, dass auf Proteinebene im Ovar lediglich Galektin-1 und -3 nachgewiesen werden konnten, zu einem sehr geringen Maß auch noch Galektin-7 (Abbildung 9-1). Hingegen konnte mit den Antikörpern gegen die Proteine Galektin-2 und -8 keine nachweisbare Proteinexpression im Ovar gefunden werden. Diese Antikörper wurden dann auch in den folgenden immunhistochemischen Untersuchungen nicht mehr verwendet. Die Befunde zeigten, dass Galektin-1 unabhängig vom jeweiligen Zyklusstand (Follikelreifung, Ovulation, CL in den verschiedenen Stadien) in relativ gleicher Stärke exprimiert wurde. Dies traf sowohl auf die Wildtyp (Gal-3 +/+, Abbildung 9-1) als auch auf die Knock-out (Gal-3 -/-, keine Abbildung) Tiere zu. Im Falle von Galektin-3 hingegen zeigte sich eine deutliche Zyklusabhängigkeit der Proteinexpression. Zwar war bereits beim unbehandelten, 4 Wochen alten Tier eine schwache Expression (Abbildung 9-1, A) vorhanden, die sich auch bis 2 Tage nach HCG-Verabreichung nur leicht erhöhte (Abbildung 9-1, B-D), jedoch konnte am dritten Tag p. i. ein deutlicher Anstieg der Galektin-3 Expression detektiert werden (Abbildung 9-1, E). Eine weitere Erhöhung der Galektin-3 Expression zeigte sich am vierten Tag p. i. (Abbildung 9-1, F), die bis zum fünften Tag p. i. noch weiter zunahm (Abbildung 9-1, G). Die Expression bei dem Tier, das nur mit NaCl behandelt wurde (Abbildung 9-1, H), war nur etwas geringer als die des Tieres vom vergleichbaren Zyklustag (Abbildung 9-1, D). Wie erwartet konnte bei den Knock-out Tieren

(Gal-3 $-/-$) keinerlei Galektin-3 Protein über den gleichen Zeitverlauf des eingeleiteten Zyklus nachgewiesen werden (Abbildung 9-2, A-H). Um zu beweisen, dass die aufgetragene Proteinmenge jeweils gleich war und Veränderungen in der Intensität der Galektin-3 Expression auch tatsächlich auftraten, wurden alle Proben (Gal-3 $+/+$ und Gal-3 $-/-$) auf der Nitrozellulosemembran auch mit einem Antikörper gegen das Protein Aktin getestet. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Dieses „Housekeeping“-Protein konnte dabei bei allen Proben in gleicher Stärke nachgewiesen werden (Abbildung 9-1, Gal-3 $+/+$ und Abbildung 9-2, Gal-3 $-/-$). Bei den Knock-out Tieren (Gal-3 $-/-$) diente dies v. a. auch dazu, im Vergleich mit der Aktin Expression bei den Wildtyp Tieren (Gal-3 $+/+$), zu zeigen, dass tatsächlich eine vergleichbare Proteinmenge aufgetragen wurde. Im Falle von Galektin-7 konnte sowohl bei den Wildtyp (Gal-3 $+/+$; Abbildung 9-1) wie bei den Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$; keine Abbildung) keine bzw. nur eine sehr schwache Expression gezeigt werden. Wie bei dem Nachweis von Galektin-1 Protein konnte auch für Galektin-7 keine Korrelation mit dem Zyklusverlauf am Ovar festgestellt werden. Zur Spezifitätskontrolle der Antikörper gegen die Proteine Galektin-1, -3 und -7 wurden zusätzlich die jeweiligen depletierten IgG-Fraktionen in der Western Blot Analyse eingesetzt. Fehlende Banden zeigten deutlich die Spezifität der jeweiligen Antikörper.

Abbildung 9-1: Darstellung der Galektin-1, -3, -7 und Aktin Proteinexpression von Wildtyp-Tieren (Gal-3 $+/+$) im Verlauf des ovariellen Zyklus mittels Western Blotting. (A) unbehandeltes, 4 Wochen altes Tier. (B) 40 Stunden nach PMSG. (C) 24 Stunden nach HCG. (D) 24 Stunden nach HCG. (E) 72 Stunden nach HCG. (F) 96 Stunden nach HCG. (G) 120 Stunden nach HCG. (H) 48 Stunden nach der 2. NaCl-Injektion. Die Nitrozellulosemembran wurde in 5 % Milchpulver in T-TBS-Puffer, pH 7,5, blockiert. Der Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper wurde mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ in der Blockierungslösung eingesetzt. Detektion siehe Text.

Abbildung 9-2: Darstellung der Galektin-3 und Aktin Proteinexpression von Knock-out-Tieren (Gal-3 $-/-$) im Verlauf des ovariellen Zyklus mittels Western Blotting. Identifizierung der Proben und Vorgehensweise siehe Abbildung 9-1.

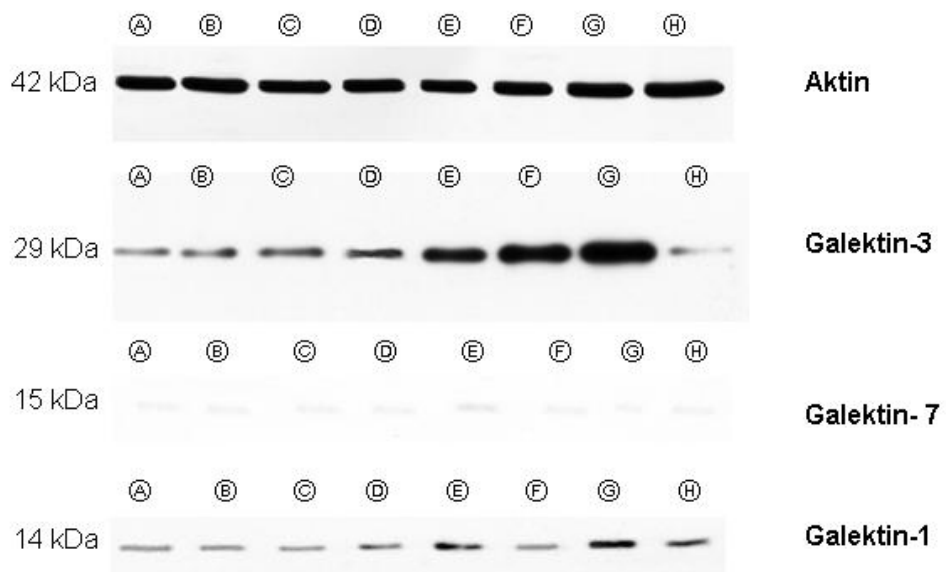


Abbildung 9-1

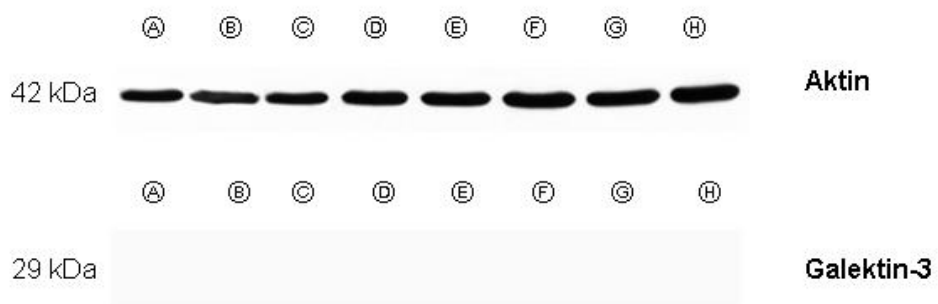


Abbildung 9-2

Nachdem in den Western Blot Analysen neben Galektin-1 und Galektin-3 auch Galektin-7 nachgewiesen wurde, war es von Interesse, in histologischen Schnitten auch die Lokalisationen dieser Galektine zu untersuchen. Bei den Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$) war es zudem die Frage, ob aufgrund des Fehlens von Galektin-3 Protein ein anderes Galektin eine veränderte Lokalisation aufwies.

5.5 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation der Galektine im Ovar von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$) im Verlauf des ovariellen Zyklus

Nachdem bei der Analyse mittels Western Blotting gezeigt wurde, dass im ovariellen Zyklus der Maus Galektin-1, -3 und -7 mehr oder weniger stark exprimiert wurden, wurden nun mit den gegen diese Proteine gerichteten polyklonalen Antikörpern immunhistochemische Untersuchungen im Verlauf des ovariellen Zyklus durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten nun Aufschluss über die zelluläre Lokalisation dieser Proteine geben. Obwohl sich in der Western Blot Analyse nur für Galektin-3, nicht aber für Galektin-1 und -7, eine Zyklusabhängigkeit zeigte, wurden trotzdem alle drei Galektine im gesamten Zyklusverlauf immunhistochemisch untersucht, weil eine veränderte Lokalisation im Zyklusgeschehen nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Befunde für Galektin-1 und -7 konnten insofern bestätigt werden, als dass das Auftreten dieser Proteine nicht zyklusabhängig war. Für Galektin-3 hingegen konnte das Auftreten dieses Proteins mit Umstrukturierungen am Ovar während des Zyklusgeschehens in Verbindung gebracht werden.

Die histologischen Schnitte wurden hierfür erst mit den entsprechenden Primärantikörpern (Anti-Galektin-1 IgG: 0,5 $\mu\text{g/ml}$, Anti-Galektin-3 IgG: 0,5 $\mu\text{g/ml}$, Anti-Galektin-7 IgG: 1 $\mu\text{g/ml}$) und dann mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Danach folgte der ABC-Komplex mit anschließender Farbentwicklung und Gegenfärbung (siehe Methodenteil 4.4.16.3).

Die Inkubation mit Anti-Galektin-1 IgG zeigte eine mittlere Färbeintensität im Bereich des ovariellen Stroma und eine stärkere Intensität im Oberflächenepithel des Ovars („Ovarian Surface Epithelium“). Benachbartes Gewebe im Hilusbereich und der Eileiter zeigten ebenso spezifische Gewebelokalisationen für Galektin-1 (Abbildung 10-1, B und D). So ist z. B. die glatte Muskulatur des Eileiters deutlich gefärbt. Auf zellulärer Ebene war keine Kernfärbung in den Stromazellen des Ovars zu erkennen, hingegen zeigte sich eine deutliche nukleäre Lokalisation von Galektin-1-Protein im Oberflächenepithel des Ovars (Abbildung 10-1, E). Mit der depletierten IgG-Fraktion (siehe Abschnitt 4.4.16.4) durchgeführte Kontrollen der

Spezifität des Antikörpers führten zu einem Verschwinden des positiven Signals (Abbildung 10-1, J und K). Damit wurde deutlich, dass spezifisch Galektin-1-Protein nachgewiesen wurde. Im Falle von Galektin-7 konnte in der Western Blot Analyse keine oder nur eine sehr geringgradige Expression nachgewiesen werden. Dies wurde durch die Inkubation von histologischen Schnitten mit Anti-Galektin-7 IgG erklärbar. Die Lokalisation des Galektin-7 Proteins im Ovar war eng begrenzt mit mittlerer bis starker Intensität im Oberflächenepithel des Ovars nachweisbar, v. a. auch im Hilusbereich, wobei auch auf einer kurzen Strecke positive Zellen an der Außenseite des anhaftenden Bindegewebes zu detektieren waren (Abbildung 10-1, A, C und F). Auch im Falle des Proteins von Galektin-7 trat eine Kernfärbung mit deutlicher Intensität auf (Abbildung 10-1, G). Ebenso führte hier der Einsatz der depletierten IgG-Fraktion anstelle von Anti-Galektin-7 IgG zu einem Verschwinden des positiven Signals (Abbildung 10-1, H und I), wodurch die Spezifität des verwendeten Antikörpers bewiesen wurde. Das immunhistologische Ergebnis für Galektin-7 erklärte dessen geringe Nachweisbarkeit im Western Blotting. Der Anteil der positiven Zellen am Gesamtovar und somit auch an dem in der SDS-PAGE eingesetzten ovariellen Gesamtprotein war so gering, dass sich entweder nur eine sehr schwache oder keine Expression nachweisen ließ. Bei der immunhistochemischen Darstellung von Galektin-1 und von Galektin-7 konnte im Verlauf des Zyklus kein Unterschied in der Lokalisation der Expression zwischen den Wildtyp (Gal-3 +/+) und den Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) festgestellt werden.

Abbildung 10-1: Darstellung der immunhistochemischen Lokalisation von Galektin-1 und Galektin-7 im Ovar einer unbehandelten, 4 Wochen alten Maus (A, B, E-G) und am Ovar eines mit PMSG behandelten Tieres (C und D). (A, C, F und G) Anti-Galektin-7 IgG ergab eine streng lokalisierte Detektion von Galektin-7-Protein mit mittlerer bis starker Färbeintensität im Oberflächenepithel des Ovars mit Kernfärbung (G), v. a. im Bereich des Hilus mit kurzem Übergang auf die äußere Begrenzung des am Ovar anhaftenden Gewebes. (B, D und E) Anti-Galektin-1 IgG ergab im Stroma des Ovars und im benachbarten Gewebe sowie in der Muskulatur des Eileiters (Zytoplasmafärbung) eine Färbung mittlerer Intensität. Hingegen war das Oberflächenepithel des Ovars stark gefärbt (Kernfärbung, hohe Intensität, E). (H und I) Kontrolle der Spezifität von Anti-Galektin-7 IgG durch Gegenüberstellung eines mit Anti-Galektin-7 IgG und eines mit der depletierten IgG-Fraktion inkubierten Schnittes. Beim Einsatz der depletierten Fraktion kam es zu einem Verschwinden des positiven Signals. (J und K) Kontrolle der Spezifität von Anti-Galektin-1 IgG durch Gegenüberstellung eines mit Anti-Galektin-1 IgG und eines mit der depletierten IgG-Fraktion inkubierten Schnittes.

Beim Einsatz der depletierten Fraktion kam es zu einem Verschwinden des positiven Signals. S: Stroma. H: Hilus. EL: Eileiter. SF3: Sekundärfollikel in der späten antralen Phase. OSE: Ovarian Surface Epithelium. →: positive Lokalisationen mit Anti-Galektin-1 bzw. Anti-Galektin-7 IgG. Balken: 17,5 µm.

Im Gegensatz zu Galektin-1 und -7 zeigte sich in der Western Blot Analyse eine deutliche Abhängigkeit der Galektin-3-Proteinexpression vom Zyklusgeschehen. Somit stand einerseits die Frage im Vordergrund, ob sich dieses Ergebnis a) bei der immunhistochemischen Darstellung dieses Proteins im Zyklusverlauf wieder spiegelte, b) ob die Expression dieses Galektins bestimmten Vorgängen im Ovar zuzuordnen war und c) in welchen Zellen dieses Galektin lokalisiert war. Die immunhistochemische Färbung mit Anti-Galektin-3 IgG zeigte im Ovar einer unbehandelten, 4 Wochen alten Wildtyp Maus (Gal-3 +/+) v. a. in atretischen Follikeln im Bereich um die Eizelle stark Galektin-3 positive Zellen (Abbildung 10-2, A und B). Nach der Applikation von PMSG und der Bildung von späten antralen Sekundärfollikeln nach 40 Stunden blieb die Färbung zum Nachweis von Galektin-3 weiterhin auf die atretischen Follikel und einzelne Zellen und Zellhaufen im Stromabereich des Ovars beschränkt (Abbildung 10-2, C). Nach Applikation von HCG und der 24 Stunden später bereits erfolgten Bildung von Corpora lutea (CL; Abbildung 10-2, D) bzw. bei CL in Blüte 48 Stunden danach (Abbildung 10-2, E) ergab sich zusätzlich eine positive Reaktion von einzelnen Zellen innerhalb dieser CL. Dies wurde besonders deutlich, wenn eine Ausschnittsvergrößerung aus einem solchen CL vorlag. Bei einem nur mit NaCl behandelten Tier (Abbildung 10-2, F) waren 48 Stunden nach der zweiten Injektion im Vergleich dazu nur Follikelstadien bis zum frühen Sekundärfollikel vorhanden, wie bereits bei der HE Färbung gezeigt wurde. Hier beschränkten sich die positiven Zellen auf atretische Follikel und Bereiche im ovariellen Stromabereich. Die bisherigen immunhistochemischen Befunde spiegelten den in der Western Blot Analyse erhaltenen Befund wieder, dass bis zu 48 Stunden nach der Applikation von HCG und auch bei dem mit NaCl behandeltem Tier kein Anstieg der Galektin-3-Expression zu verzeichnen war (Abbildung 9-1). Der deutliche Anstieg der Proteinexpression von Galektin-3 (Abbildung 9-1, E-G) im weiteren Zyklusverlauf spiegelte sich auch in den immunhistochemischen Untersuchungen wieder. So zeigte sich bei den CL 72 Stunden nach Applikation von HCG eine Zunahme der positiven Zellen (Abbildung 10-2, G und H), die sich 96 und 120 Stunden später noch massiv steigerte (Abbildung 10-2, I und K). Zu den beiden letzteren Untersuchungszeitpunkten befanden sich die CL des induzierten Zyklus schon in der Phase der sog. strukturellen Regression, was bereits in den HE gefärbten

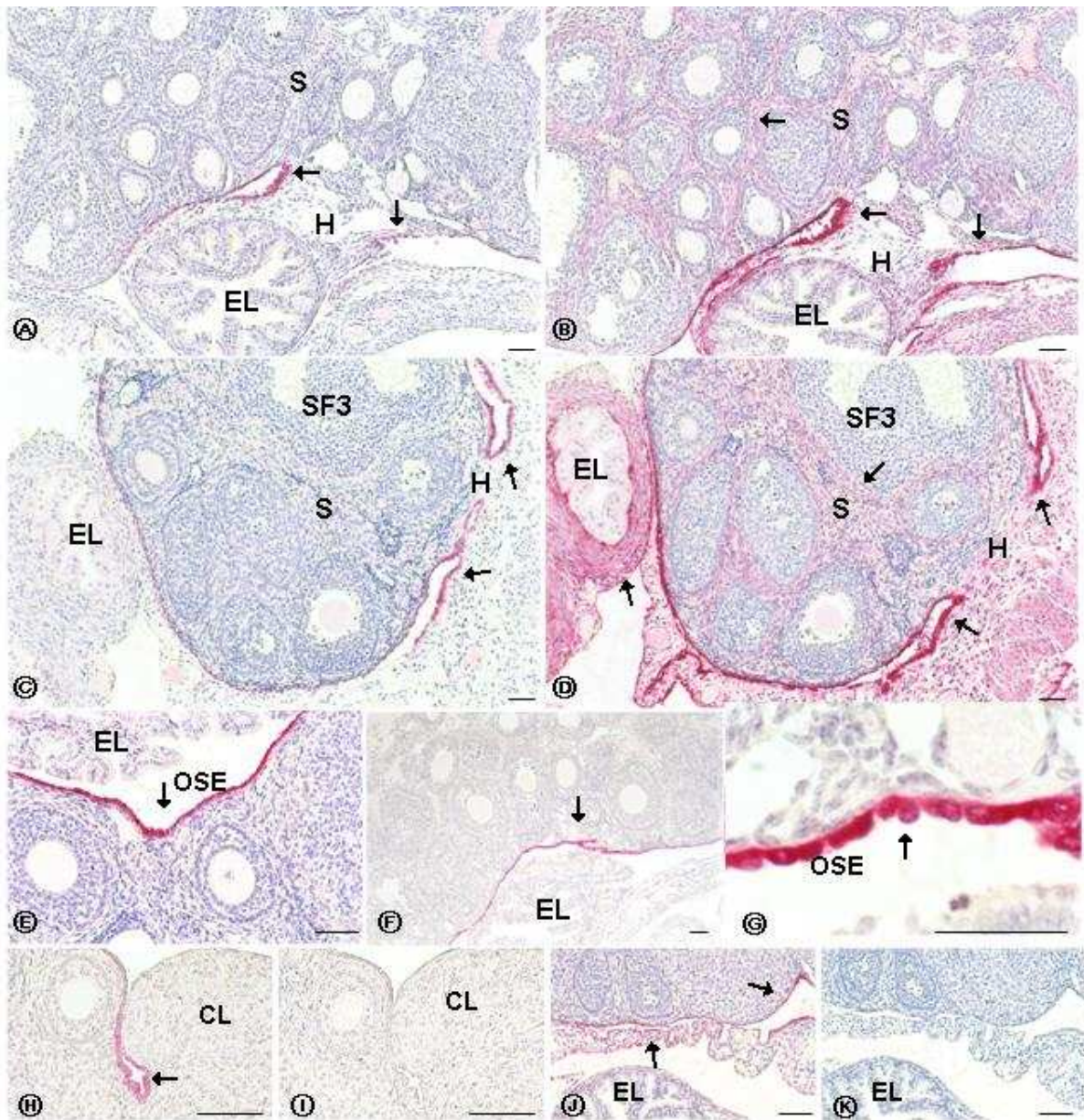


Abbildung 10-1

histologischen Schnitten beobachtet wurde (Abbildung 8, G-J). Zudem waren zu diesem Zeitpunkt des induzierten Zyklus bereits wieder neue CL in Ausbildung, bzw. schon in Blüte befindlich, des nächsten Zyklus vorhanden (Abbildung 10-2, L). Hier konnten auf einem Ovar, 120 Stunden nach HCG, nebeneinander zwei verschiedene Funktionszustände von CL gezeigt werden und gleichzeitig ihre unterschiedliche positive Reaktion auf Anti-Galektin-3 IgG demonstriert werden. Somit konnte die Frage, ob sich die zyklusabhängige Veränderung der Galektin-3-Expression, wie im Western Blot gezeigt, bestimmten Vorgängen im Ovar zuordnen ließ, eindeutig positiv beantworten. Auch in diesem Zyklusstadium (120 Stunden nach der Applikation von HCG) waren weiterhin einzelne Galektin-3 positive Zellen bzw. Zellhaufen im ovariellen Stroma anzutreffen, die bei genauerer Betrachtung eine nukleäre Lokalisation des Proteins aufwiesen (Abbildung 10-2, M und N). Bei der Färbung eines histologischen Schnittes vom Ovar einer Knock-out Maus (Gal-3 $-/-$) mit Anti-Galektin-3 IgG 96 Stunden nach der HCG-Verabreichung konnten, wie erwartet, keinerlei positive Signale nachgewiesen werden (Abbildung 10-2, J). Ebenso führte der Einsatz der depletierten IgG-Fraktion anstelle von Anti Galektin-3 IgG zu einem Verschwinden des positiven Signals (Abbildung 10-2, O und P).

Nachdem bekannt ist, dass es im Verlauf der Entwicklung der CL zu einem deutlichen und massiven Einstrom von Immunzellen kommt (siehe Literaturteil) und Makrophagen Galektin-3 zytoplasmatisch in großer Menge exprimieren, wurde in einem folgenden Versuch überprüft, ob die zelluläre Lokalisation von Galektin-3 mit der des Oberflächenepitops F4/80 von Makrophagen räumlich und zeitlich in Übereinstimmung zu bringen war. Eine exakte Übereinstimmung beider Proteine zu finden konnte allerdings nicht erwartet werden, da für das Galektin-3-Protein ein hauptsächlich zytoplasmatisches und nukleäres Expressionsprofil bekannt ist (zum Teil wird das Protein auch in den extrazellulären Bereich sezerniert), das Protein F4/80 hingegen ein Oberflächenepitop von Makrophagen darstellt.

Abbildung 10-2: Immunhistochemische Lokalisation von Galektin-3 im Ovar der Maus im Verlauf des ovariellen Zyklus von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$). (A und B) Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung eines Ovars einer unbehandelten, 4 Wochen alten Maus. Um die Eizellen atretischer Follikel sind deutlich positiv markierte Zellen zu erkennen. (C) 40 Stunden nach PMSG. Wiederum ist eine deutliche Markierung atretischer Follikel zu erkennen und die Färbung einzelner Zellen und Zellhaufen im ovariellen Stroma zwischen zwei spätantralen Sekundärfollikeln (SF3). (D) 24 Stunden nach HCG-Applikation. CL in Blüte ist erkennbar, das sich deutlich absetzt.

Eine Färbung lediglich schwacher Intensität mit Anti-Galektin-3 IgG ist zu beobachten. (E) Ausschnittvergrößerung aus einem Ovar eines mit HCG behandelten Tieres, 48 Stunden p. i.. Einzelne Galektin-3 positive Zellen sind in einem CL in Blüte zu erkennen. (F) Ovar einer nur mit NaCl behandelten Maus, vergleichbarer Zeitpunkt zu E. Lokalisation der Galektin-3 positiven Zellen wie bei einer unbehandelten, 4 Wochen alten Maus (A). Keine CL nachweisbar. (G) 72 Stunden p. i.. Bei den beiden gezeigten CL ist eine deutliche Zunahme der Galektin-3 positiven Zellen zu vermerken. (H) Zeitpunkt wie bei (G). Von diesen CL weist eines eine deutlich positivere Reaktion als die anderen auf. (I) Übersichtsaufnahme von mehreren CL in struktureller Regression im Ovar einer Maus, 96 Stunden p. i.. Die massive Zunahme der Galektin-3 positiven Zellen ist auf die CL begrenzt. (J) Übersichtsaufnahme von CL in struktureller Regression im Ovar einer Knock-out Maus (Gal-3 $-/-$), Zeitpunkt identisch mit (I). Keinerlei positive Signale für Galektin-3 erkennbar. (K) Übersichtsaufnahme von CL des induzierten Zyklus in fortschreitender struktureller Regression, und (L) von einem CL des nächsten Zyklus in Anbildung bzw. in Blüte. Beide Stadien auf einem Ovar 120 Stunden p. i.. Die CL in Regression zeigen eine unvermindert starke, positive Reaktion für Galektin-3 Protein. Das CL in Anbildung bzw. Blüte zeigt eine schwache Expression von Galektin-3 Protein, wie das vergleichbare CL (D) des induzierten Zyklus. Hier zeigte sich an einem Ovar, dass die Expression von Galektin-3 mit dem sich im Verlauf des Zyklus änderndem Erscheinungsbild der CL korreliert war. (M und N) Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung aus dem Rindenbereich eines Ovars, 120 p. i.. Es finden sich wie in allen Zyklusstadien einzelne positive Zellen und Zellhaufen im Stroma des Ovars. Bei der Vergrößerung einer positiven Zelle ist deutlich erkennbar, dass sich sowohl die unregelmäßige Kernstruktur als auch das Zytoplasma intensiv anfärben. (O und P) Kontrolle der Spezifität von Anti-Galektin-3 IgG durch Gegenüberstellung eines mit Anti-Galektin-3 IgG und eines mit der depletierten IgG-Fraktion inkubierten Schnittes. Beim Einsatz der depletierten Fraktion kommt es zu einem Verschwinden des positiven Signals. AF: atretischer Follikel. SF2: Sekundärfollikel in der mittleren antralen Phase. SF3: Sekundärfollikel in der späten antralen Phase. CL: Corpus luteum. PF: Primärfollikel. →: positive Lokalisationen für Anti-Galektin-3 IgG. Balken: 17,5 μ m.

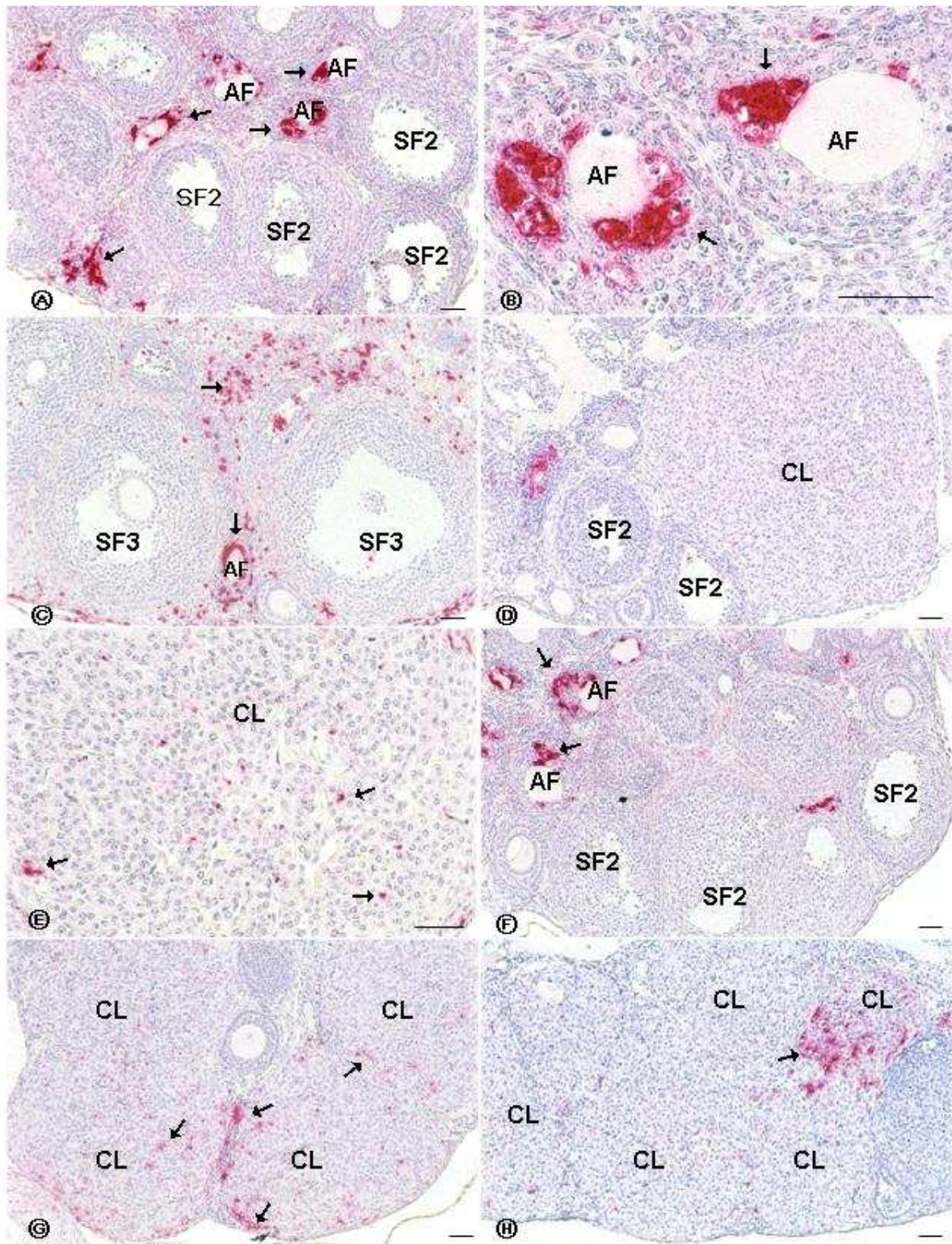


Abbildung 10-2

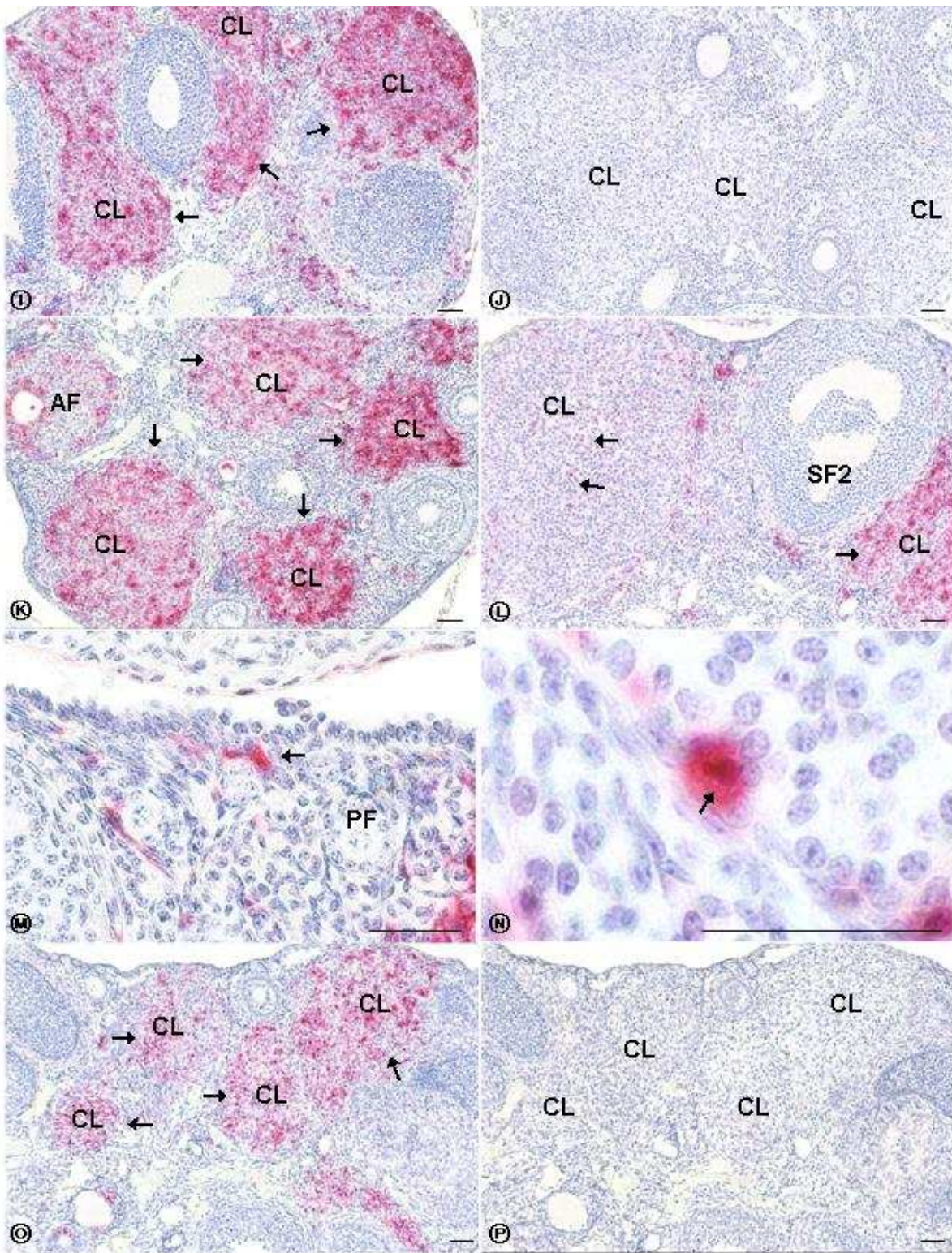


Abbildung 10-2

5.6 Immunhistochemische Kollokalisierungen der Galektin-3 und der F4/80 Proteinexpression im ovariellen Zyklus von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+)

Der immunhistochemische Nachweis des Oberflächenantigens F4/80 von Makrophagen fand wie im Methodenteil unter 4.4.16.3 beschrieben statt. Das F4/80 Protein ist ein 160 kDa großes Glykoprotein und beinhaltet sieben ähnliche Domänen, eine Spacerregion und eine hydrophobe, siebenspannige transmembrane Region und wird nur von Makrophagen exprimiert. Die entsprechenden Schnitte wurden hierfür mit 0,01 % Trypsin behandelt und anschließend mit dem Primärantikörper rat-Anti-mouse F4/80 in einer Verdünnung von 20 µg/ml inkubiert. Nach Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex erfolgte die Farbentwicklung mit anschließender Gegenfärbung. Der Vergleich der Färbungen mit polyklonalen Anti-Galektin-3 IgG und monoklonalen Anti-F4/80 IgG wurde mit jeweils zwei aufeinander folgenden Schnitten aus einer Schnittserie durchgeführt.

Für beide Proteine konnte ein sowohl zeitlich wie räumlich ähnliches Verteilungsmuster erkannt werden (Abbildung 11). So korrelierte die schwach positive Färbung von F4/80 Protein in einem CL in Anbildung bzw. Blüte (Abbildung 11, A) mit einer ebenso schwach positiven Färbung von Galektin-3 in jeweils gleicher Lokalisation (Abbildung 11, B). Genauso ließ sich das Verteilungsmuster von Galektin-3 in mehreren CL, die sich in struktureller Regression befanden (Abbildung 11, D; Ovar eines mit HCG behandelten Tieres, 96 Stunden p. i.), bei Verwendung des Antikörpers gegen F4/80 reproduzieren (Abbildung 11, C). Gleiches traf auch auf die im Stroma des Ovars und bei atretischen Follikeln vorkommenden Galektin-3 positiven einzelnen Zellen und Zellhaufen zu (Abbildung 11, F und H, Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung). Auch hier konnte mit Einsatz des Antikörpers gegen F4/80 ein räumlich ähnliches Verteilungsmuster erkannt werden (Abbildung 11, E und G, Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung). Für den Antikörper gegen das Oberflächenantigen F4/80 wurden Negativkontrollen durch Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt, die kein positives Signal ergaben.

Abbildung 11: Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisation der Proteine Galektin-3 und F4/80 im Ovar von Wildtyp Mäusen (Galektin-3 +/+). (A) F4/80 Protein Nachweis in einem CL in Blüte, 24 Stunden nach Applikation von HCG. Einzelne Zellen zeigten eine positive Reaktion. (B) Galektin-3 Nachweis am Folgeschnitt und an der gleichen Stelle wie bei (A). Sowohl Signalintensität wie auch die Lokalisation zeigten eine große Übereinstimmung mit den Ergebnissen beim Nachweis von F4/80. (C) F4/80 Nachweis in einem CL, das sich in struktureller Regression befand, 96 Stunden p. i.. Es zeigte sich eine massiv positive Reaktion im Bereich der in Regression befindlichen CL. (D) Galektin-3 Nachweis am Folgeschnitt und an der gleichen Stelle wie bei (C). Auch hier waren Lokalisation und Signalintensität weitgehend übereinstimmend. (E und G) Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung, Nachweis von F4/80 im Stroma eines Ovars. (F und H) Nachweis von Galektin-3 am Folgeschnitt und an der gleichen Stelle wie bei (E und G). Auch hier kommt es zu einem räumlich und zeitlich zusammenfallenden Auftreten der Proteine Galektin-3 und F4/80. CL: Corpus Luteum. AF: atretischer Follikel. PF: Primärfollikel. →: positive Lokalisationen des Proteins F4/80 bzw. Galektin-3. Balken: 17,5 µm.

Eine der Hauptfunktionen von Corpora lutea (CL) ist die Produktion des so genannten Schwangerschaftsschutzhormones Progesteron. Die Steroidhormon-produzierenden Lutealzellen benötigen dazu u. a., wie im Literaturteil ausgeführt, das Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD). Im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Untersuchungen war der immunhistochemische Nachweis dieses Enzyms als Marker für die Lutealzellen von Interesse, um Galektin-3 exprimierende Zellen und Lutealzellen, falls möglich, voneinander abzugrenzen. Darüber hinaus konnte der Nachweis von 3 β -HSD dazu dienen, die funktionelle Regression der Corpora lutea zu charakterisieren. Im Vergleich der Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-) Mäuse sollte mit Hilfe dieses Markers gezeigt werden, ob der Verlust von Galektin-3 eventuelle sichtbare Auswirkungen auf die Steroidhormon produzierenden Lutealzellen hatte. In einer ersten Untersuchung war es zunächst einmal notwendig, die 3 β -HSD Expression im Verlauf des induzierten ovariellen Zyklus darzustellen.

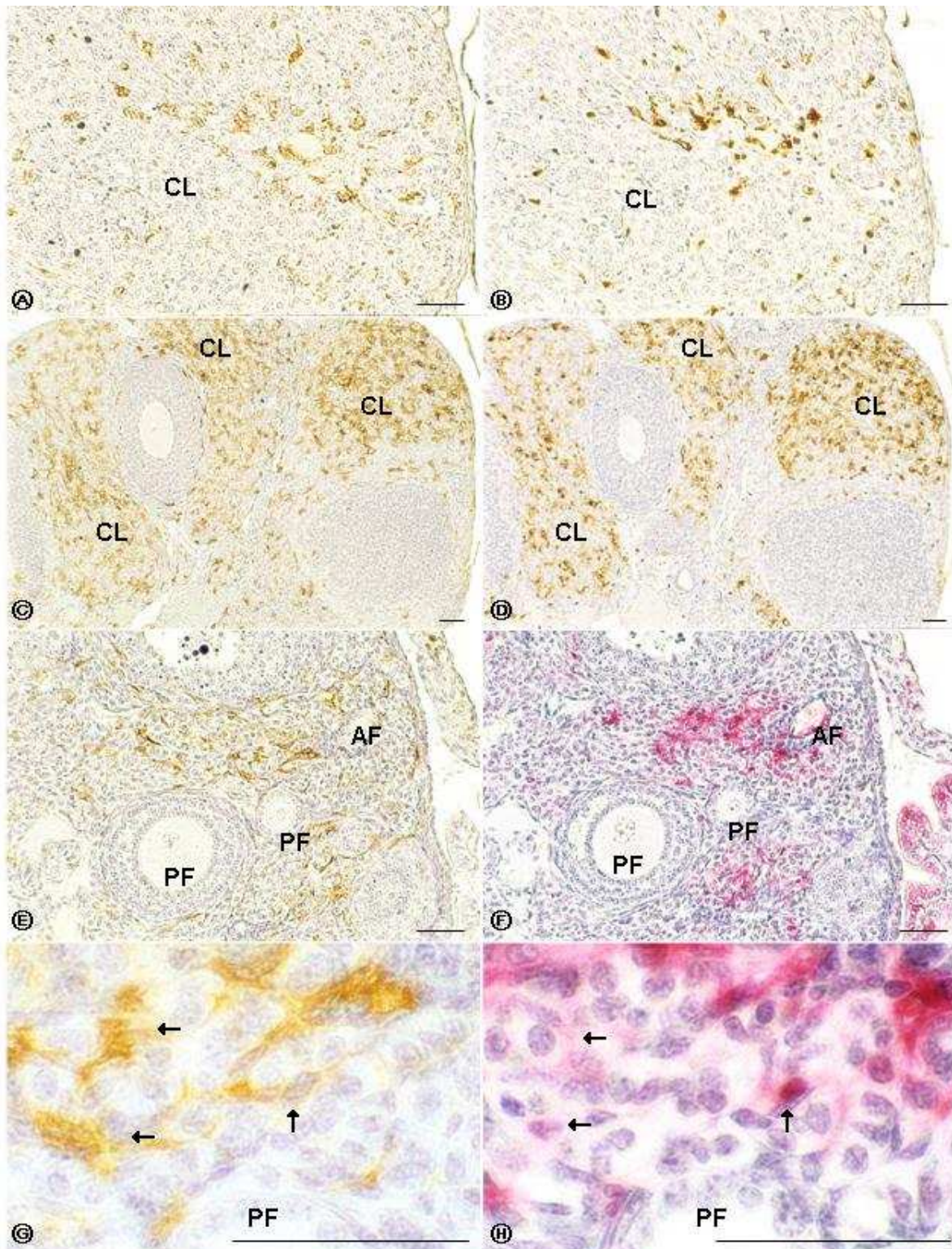


Abbildung 11

5.7 Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation des Proteins 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) im Verlauf des ovariellen Zyklus von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)

Die immunhistochemische Untersuchung mit Anti-3 β -HSD IgG wurde wie weiter oben bei den Galektinen und im Methodenteil unter 4.4.16.3 beschrieben durchgeführt. Anti-3 β -HSD IgG wurde in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt. Negativkontrollen wurden in diesem Fall mit Kaninchenserum in der gleichen Verdünnung durchgeführt und erzeugten kein positives Signal. Bei einem nicht behandelten, 4 Wochen alten Tier zeigten v. a. die Randbereiche von größeren Primär- und frühen Sekundärfollikeln eine stark positive Reaktion. Die betreffenden Zellen entsprachen von ihrer Lokalisation her den Theka-Zellen, die durch Differenzierung aus den Fibroblasten des ovariellen Stromas hervorgehen (Abbildung 12, A). Die Granulosazellen einzelner größerer Sekundärfollikel reagierten auch positiv. 40 Stunden nach der Applikation von PMSG zeigte sich eine positive Reaktion überwiegend in den Granulosazellen der vermehrt auftretenden späten antralen Sekundärfollikel (Abbildung 12, B). 24 Stunden nach HCG Behandlung war eine deutliche Expression von 3 β -HSD Protein im Zytoplasma der Lutealzellen in den neu gebildeten Corpora lutea zu sehen (Abbildung 12, C und D, Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung). Weiterhin war eine starke positive Reaktion am zweiten (Abbildung 12, E) und dritten Tag (Abbildung 12, G und H) nach der Applikation von HCG (48 bzw. 72 Stunden p. i.) in den Corpora lutea in Blüte darstellbar. Allerdings wirkte am dritten Tag die positive Reaktion einzelner Corpora lutea optisch aufgelockert, d. h. nicht mehr alle Lutealzellen eines Corpus luteum sprachen positiv auf Anti-3 β -HSD IgG an. Zudem waren zu diesem Termin bereits wieder antrale Sekundärfollikel in der mittleren Phase vorhanden, deren Granulosazellen 3 β -HSD exprimierten (Abbildung 12, H). Das zur Kontrolle nur mit NaCl behandelte Tier zeigte wie in den Experimenten zuvor das gleiche Färbeverhalten wie ein nicht behandeltes, 4 Wochen altes Tier (Abbildung 12, F). 96 Stunden p. i. zeigte sich eine weitere Abnahme der positiv reagierenden Lutealzellen innerhalb der in Regression befindlichen Corpora lutea (Abbildung 12, I und J, Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung). Außerdem waren zu diesem Zeitpunkt neben den Corpora lutea in Regression bereits wieder Corpora hämorrhagica zu sehen (Abbildung 12, K), als Zeichen von erfolgten Ovulationen. Das weitere Voranschreiten der strukturellen Regression der Corpora lutea äußerte sich 120 Stunden p. i. in einer zunehmenden Abschwächung des 3 β -HSD positiven Signals bzw. in einer voranschreitenden Abnahme der positiv reagierenden Zellen (Abbildung 12, K und L). Gleichzeitig waren in

diesem Zyklusabschnitt, wie bereits weiter oben festgestellt, neue Corpora lutea des folgenden Zyklus zu sehen, die mit einer entsprechend starken Färbeintensität reagierten (Abbildung 12, M). Ansonsten fanden sich, wie im Prinzip zu jedem Zeitpunkt des Zyklus, auch positive Theka-Zellen um größere Primär- und Sekundärfollikel und positive Granulosazellen größerer Sekundärfollikel (Abbildung 12, N), ebenso wie positiv reagierende Zellen im ovariellen Stroma. Bei dem immunhistochemischen Nachweis der 3β -HSD positiven Zellen in den gleichen Zyklusabschnitten von Ovarien von Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$) konnten keine Unterschiede zu den Wildtyp Mäusen (Gal-3 $+/+$) entdeckt werden.

Abbildung 12: Immunhistochemische Lokalisation von 3β -HSD exprimierenden Zellen bei Wildtyp Mäusen (Gal-3 $+/+$) im Verlauf des ovariellen Zyklus. (A) nicht behandelte, 4 Wochen alte Maus. Deutlich positive Darstellung der Theka-Zellen größerer Primärfollikel und früher Sekundärfollikel. Vereinzelt positive Signale in den Granulosazellen dieser Sekundärfollikel. (B) Ausschnitt aus einem Ovar eines PMSG behandelten Tieres, 40 Stunden p. i.. Spätantrale Sekundärfollikel mit 3β -HSD positiven Granulosazellen. (C und D) Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung, erster Tag nach Applikation von HCG (24 Stunden p. i.). Die Corpora lutea in Blüte zeigten eine starke Färbung. Eine deutliche Zytoplasmafärbung war zu erkennen. (E) 48 Stunden p. i.. Wie in (C) unverändert positive Reaktion der CL in Blüte auf Anti- 3β -HSD IgG. (F) NaCl-Kontrolle, 48 Stunden nach der zweiten Injektion. Ergebnis identisch mit einem nicht behandelten, 4 Wochen alten Tier (siehe A). (G und H) 72 Stunden p. i.. CL zeigten stark positive Färbung, aber bei einzelnen CL (G) nahm der Anteil der positiven Lutealzellen ab. Bereits zu diesem Zeitpunkt waren wieder 3β -HSD positive Sekundärfollikel zu finden (H). (I und J) Übersichtsaufnahme und Ausschnittvergrößerung 96 Stunden p. i.. Der Anteil der im CL positiv reagierenden Lutealzellen nahm als Zeichen der Regression weiter ab. (K) 96 Stunden p. i.. Neben einem CL in Regression war hier ein Corpus hämorrhagicum zu sehen. (L, M und N) 120 Stunden p. i.. Weitere Abnahme der auf Anti- 3β -HSD IgG positiv reagierenden Zellen mit Voranschreiten der strukturellen Regression (L), jedoch zeigten neu gebildete CL in Blüte des nächsten Zyklus (M) wieder stark 3β -HSD positive Lutealzellen. (N) Größere Primärfollikel und frühe Sekundärfollikel zeigten hier positive Theka-Zellen und letztere vereinzelt auch positive Granulosazellen. SF1, SF2 und SF3: Sekundärfollikel in der frühen, mittleren bzw. späten antralen Phase. CL: Corpus Luteum. AF: atretischer Follikel. \rightarrow : positiv reagierende Granulosazellen. \blacktriangleright : positiver 3β -HSD Nachweis in Theka-Zellen. \Leftrightarrow : Zytoplasmafärbung der Lutealzellen. $*$: 3β -HSD Nachweis in Zellen des Interstitiums. Balken 17,5 μ m.

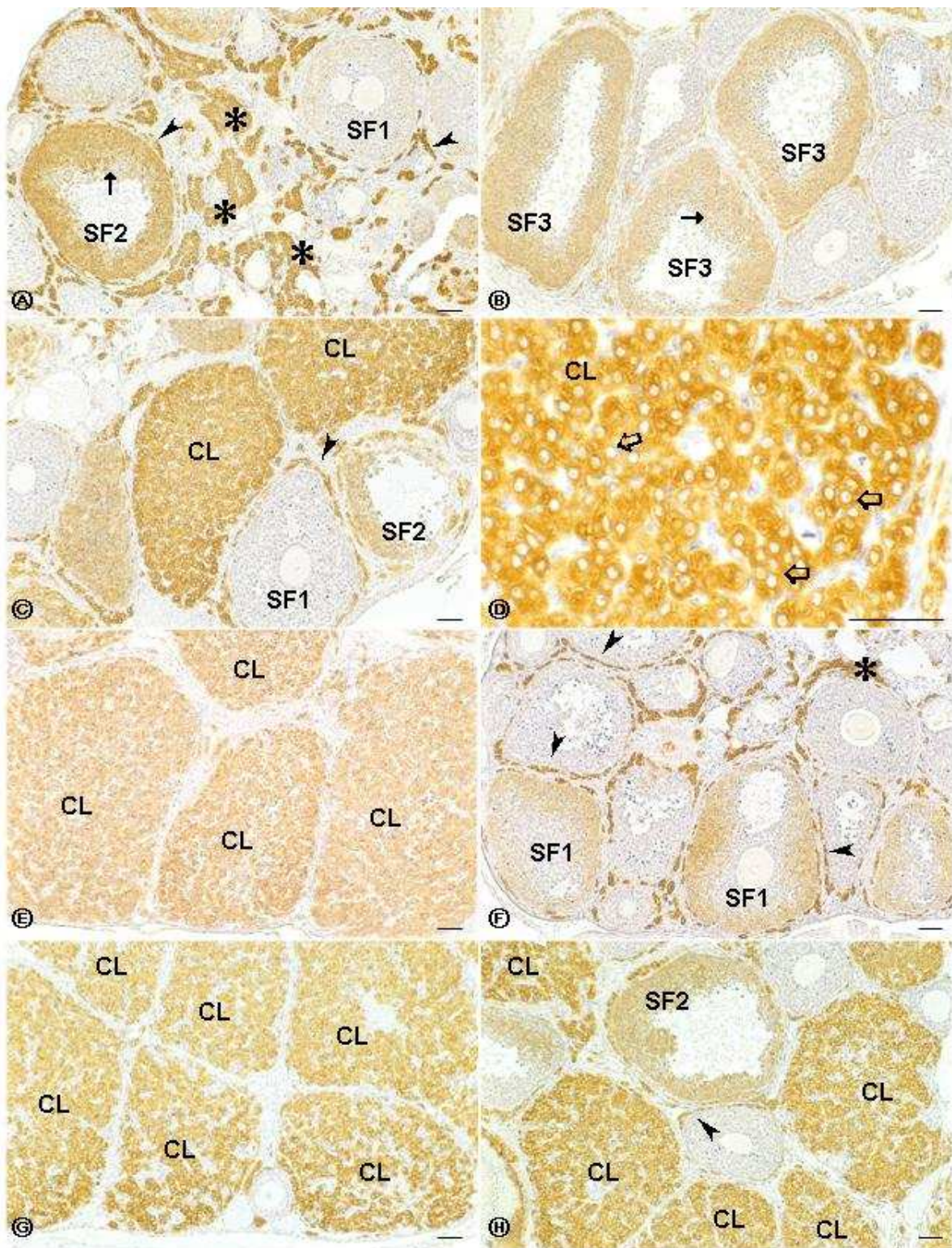


Abbildung 12

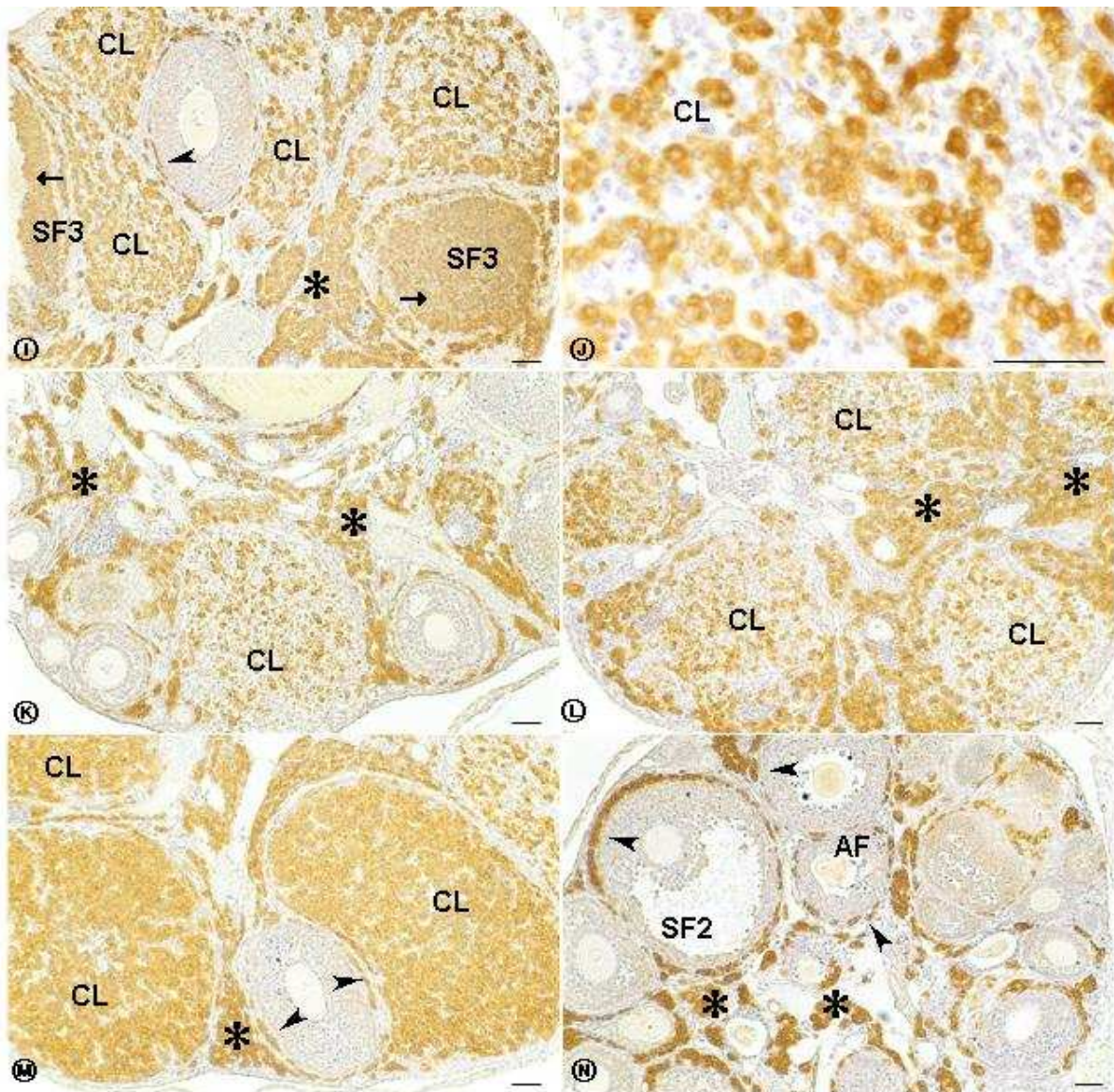


Abbildung 12

Im nächsten Schritt war die Frage zu klären, inwieweit die Expression von Galektin-3 und 3 β -HSD im Verlauf des ovariellen Zyklus im Zusammenhang standen.

5.8 Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisationen der Galektin-3 und der 3 β -HSD Proteinexpression im ovariellen Zyklusverlauf von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+)

Der immunhistochemische Nachweis der Proteine Galektin-3 und 3 β -HSD im ovariellen Zyklusverlauf lieferte gewisse Anhaltspunkte für einen spatiotemporalen Bezug beider Proteine. Es konnte beobachtet werden, dass eine abnehmende Färbeintensität der 3 β -HSD positiven Zellen einer Zunahme der Reaktivität auf Anti-Galektin-3 IgG gegenüberstand. 72 Stunden nach der Applikation von HCG war in den Corpora lutea eine Abnahme der 3 β -HSD positiven Zellen zu beobachten (Abbildung 13, A). Demgegenüber zeigte die am Folgeschnitt vorgenommene Färbung mit Anti-Galektin-3 IgG an den entsprechenden Stellen zum ersten Mal nach der Anbildung der Corpora lutea eine deutlich positive Reaktion im Corpus luteum (B). Ähnliche Verhältnisse waren auch in den weiteren Zyklusstadien zu beobachten. So zeigte sich 96 und 120 Stunden nach der Applikation von HCG eine starke Abnahme der 3 β -HSD positiven Zellen in den Corpora lutea (C und E), die von einer starken Zunahme der Galektin-3 positiven Zellen in der gleichen Lokalisation begleitet wurde (D und F). 120 Stunden p. i. konnte auf dem gleichen Ovar schon wieder ein CL des folgenden Zyklus in Blüte beobachtet werden, das eine stark positive Reaktion für Anti-3 β -HSD IgG aufwies (G), jedoch eine nur sehr schwache für Anti-Galektin-3 IgG (H).

Abbildung 13: Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisation der Proteine Galektin-3 und 3 β -HSD im Ovar von Wildtyp Mäusen (Galektin-3 +/+) im Verlauf des Zyklus. (A) 72 Stunden nach Applikation von HCG. CL in Blüte mit deutlich positiver Reaktion auf Anti-3 β -HSD IgG. (B) gleicher Zeitpunkt wie A, Folgeschnitt. An der Stelle der verminderten 3 β -HSD Aktivität finden sich Galektin-3 positive Zellen, die anderen CL sind praktisch frei davon. (C) 96 Stunden p. i.. Abnahme der 3 β -HSD positiven Zellen in allen CL. (D) Folgeschnitt zu (C). In allen CL starke Zunahme der Galektin-3 positiven Zellen. (E-H) 120 Stunden p. i.. (E) weitere Abnahme der 3 β -HSD Färbeintensität in den CL mit parallel starker Reaktion auf Anti-Galektin-3 IgG (F). (G) CL in Blüte des folgenden Zyklus. Hier wieder deutlich positive Reaktion auf Anti-3 β -HSD IgG, hingegen kaum Galektin-3 positive Zellen vorhanden (H). CL: Corpus luteum. SF, SF2 und SF3: Sekundärfollikel in der jeweiligen Phase der Bildung des Antrum folliculi. →: gleiche Lokalisation. Balken 17,5 μ m.

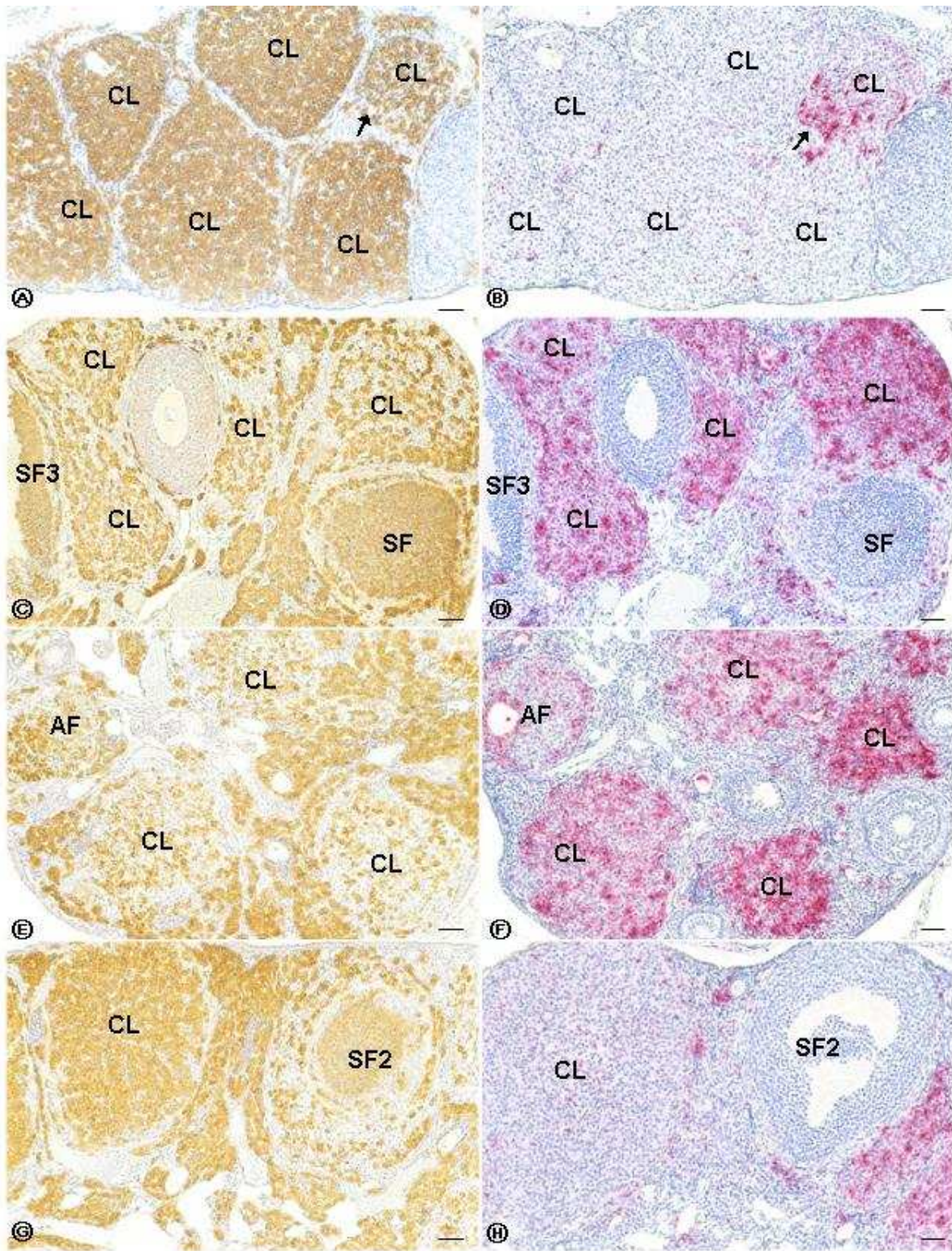


Abbildung 13

5.9 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von cleaved Caspase-3- und TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)-positiven Zellen im ovariellen Zyklus von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)

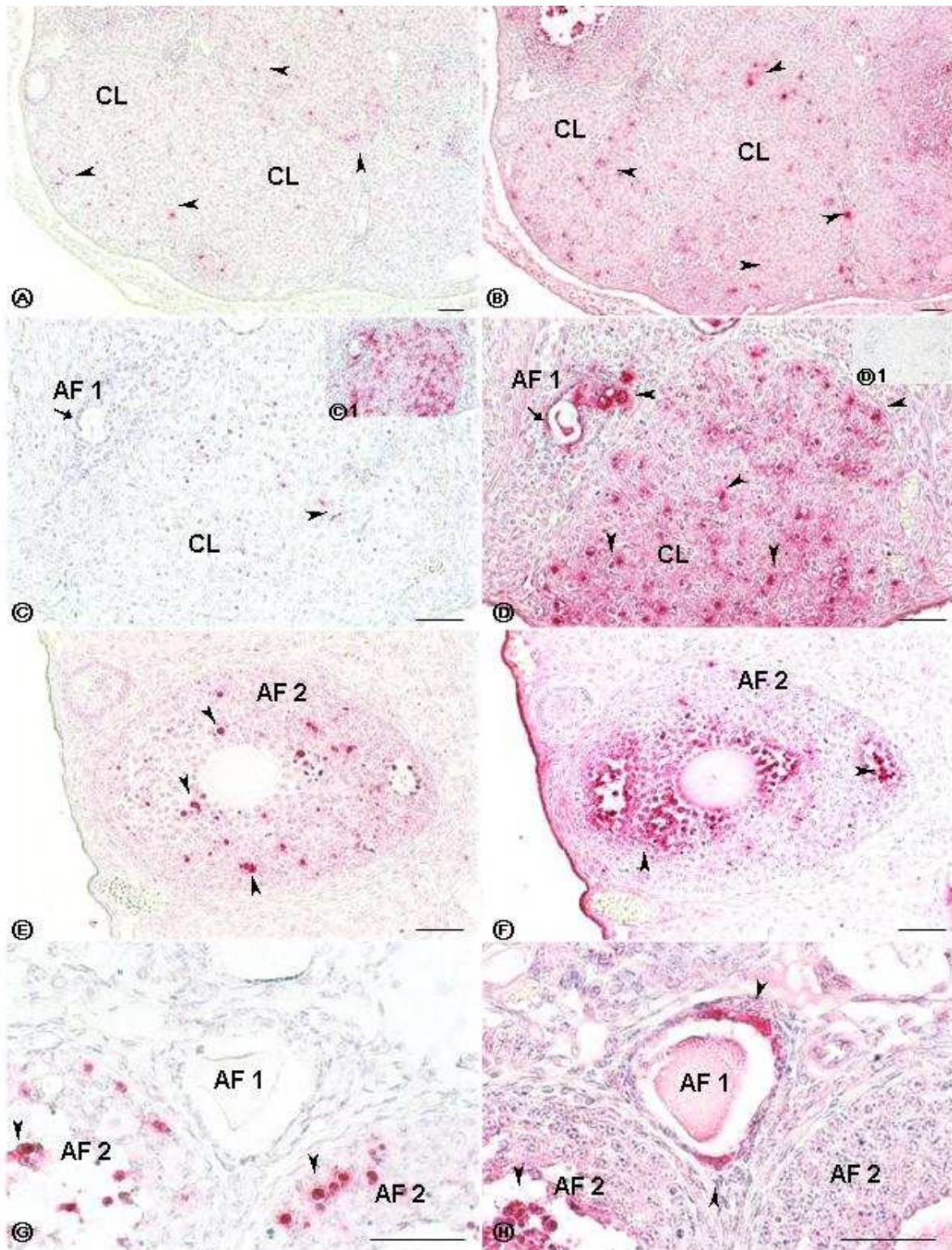
Wie bereits in der Literaturübersicht dargestellt, besitzt Galektin-3 eine Anti-apoptotische Funktion. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob nicht in einem Knock-out-Modell für Galektin-3 (Gal-3 -/-) verstärkt apoptotische Zellen zu detektieren sein müssten. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden immunhistochemische Experimente zum einen mit einem Antikörper gegen cleaved (aktivierte) Caspase-3 durchgeführt, zum anderen wurde der TUNEL-Test angewendet. Cleaved Caspase-3 hat eine Schlüsselfunktion bei der Apoptose von Zellen und das Vorkommen und die Bedeutung dieser Protease in Corpora lutea in Regression wurde bereits erfolgreich nachgewiesen (siehe Literaturteil). Der Antikörper gegen cleaved Caspase-3 wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt und für das „antigen retrieval“ wurden die Schnitte in der Mikrowelle in einem 1 mM EDTA-Puffer vorbehandelt (siehe Methodenteil 4.4.16.1). Die weitere Detektion des Proteins erfolgte wie im Methodenteil unter 4.4.16.3 beschrieben. Der TUNEL-Test hingegen detektiert DNA-Doppelstrangbrüche im Genom einer Zelle. Bei diesen Strangbrüchen werden terminale Desoxynukleotide freigelegt, die dann von dem TUNEL-Enzym erkannt und bearbeitet werden. Dabei wird wie hier z. B. Fluoreszein eingebaut, das dann durch einen Anti-Fluoreszein Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper ist seinerseits mit alkalischer Phosphatase gekoppelt und wird dann zum Farbnachweis genutzt (siehe Methodenteil 4.4.17). Die Schnitte wurden hierfür ebenfalls in der Mikrowelle in einem 1 mM EDTA-Puffer vorbehandelt.

Beispiele für das entweder getrennte oder gemeinsame Auftreten der beiden Apoptosemarker sind in Abbildung 14 dargestellt. Es wurden sowohl atretische Follikel markiert, als auch Corpora lutea in struktureller Regression. 72 bzw. 96 Stunden nach HCG-Applikation konnten in den CL viele TUNEL-positive (Abbildung 14, B bzw. D) und einzelne cleaved Caspase-3 positive Zellen (Abbildung 14, A bzw. C) detektiert werden. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme zwischen den beiden Tagen für die TUNEL positiven Zellen und eine Abnahme der cleaved Caspase-3 positiven Zellen. 96 Stunden p. i. zeigte sich in den CL parallel eine starke Reaktion auf Anti-Galektin-3 IgG (Abbildung 14, C1), was für ein CL in struktureller Regression sprach. Negativkontrollen für den TUNEL Test (keine Enzymzugabe) blieben ohne jede Farbreaktion (Abbildung 14, D1). Es fanden sich in fast allen Zyklusstadien atretische Follikel, die positiv auf den cleaved Caspase-3 Nachweis

(Abbildung 14, E und G) und den TUNEL Test (Abbildung 14, F und H) reagierten. Dabei zeigte sich, dass nur Follikel, die die ersten Anzeichen einer Entstehung des Antrum folliculi aufwiesen, positiv auf Anti-cleaved Caspase-3 IgG reagierten (Abbildung 14, E und G). Bei Primärfollikeln konnte keine cleaved Caspase-3 nachgewiesen werden (Abbildung 14, G), obwohl der TUNEL Test an den gleichen Primärfollikeln deutlich positiv ausfiel (Abbildung 14, H). Im Verlauf des ovariellen Zyklus konnte zwischen den Wildtyp (Gal-3 +/+) und den Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) kein Unterschied in Bezug auf den Nachweis von apoptotischen Zellen festgestellt werden.

Abbildung 14: Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von cleaved Caspase-3- und TUNEL-positiven Zellen im ovariellen Zyklus. (A und B): CL 72 Stunden nach Applikation von HCG. Vereinzelt cleaved Caspase-3 (A) und TUNEL-positive (B) Zellen in den CL zu detektieren. (C und D): 96 Stunden p. i., wenig cleaved Caspase-3 im CL nachweisbar (C), aber eine stark positive Reaktion im TUNEL Test (D). (D1): Negativkontrolle für TUNEL weist kein positives Signal auf. (C1): Deutlich positive Reaktion des CL auf Anti-Galektin-3 IgG. (E und G): Atretische Sekundärfollikel sind positiv für cleaved Caspase-3, atretische Primärfollikel (G) nicht. (F und H): sowohl Primär- als auch Sekundärfollikel, die atretisch sind, stellen sich im TUNEL Test mit einer positiven Reaktion dar. CL: Corpus luteum. AF1: atretischer Primärfollikel. AF2: atretischer Sekundärfollikel. →: zeigt atretischen Primärfollikel (C und D). ►: positive Lokalisationen für cleaved Caspase-3 bzw. für TUNEL positive Zellen. Balken 17,5 µm.

Die Lokalisation des Galektin-3 Proteins muß nicht zwangsläufig identisch mit dem Auftreten seiner mRNA sein, d. h. Prozesse wie Sekretion und Aufnahme in Zellen wie z. B. in Makrophagen könnten dazu führen, dass dieses Protein in anderen Zellen als in denen, von denen es produziert wurde, detektiert wird. Daher sollte in einem Experiment die Frage geklärt werden, ob die Lokalisation des Galektin-3 Proteins mit der Lokalisation der hierfür kodierenden mRNA übereinstimmte.



Abbilduna 14

5.10 *In situ* Hybridisierung (ISH) mit einer DIG-markierten RNA-Sonde zum Nachweis der Galektin-3-mRNA Expression im Ovar

Die ISH wurde an Gefrierschnitten wie im Methodenteil unter 4.4.14 beschrieben durchgeführt. Die Schnitte wurden mit einer DIG-markierten RNA-Sonde, in antisense Orientierung für Galektin-3-mRNA, in einer Konzentration von 400 ng/ml Hybridisierungsmix für 40 Stunden bei 68 °C hybridisiert und nach verschiedenen Waschschrritten mit einem AP-gekoppelten Anti-DIG-Antikörper inkubiert. Als Farbsubstrat wurde NBT/BCIP eingesetzt und es erfolgte keine Gegenfärbung. Als Negativkontrolle wurde eine DIG-markierte RNA-Sonde für in sense Orientierung Galektin-3-mRNA verwendet. Die immunhistochemische Darstellung des Galektin-3 Proteins mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers wurde in diesem Versuchsabschnitt ebenfalls am Gefrierschnitt durchgeführt (siehe Methodenteil 4.4.16.3). Das Vorgehen war identisch zu dem am Paraffinschnitt. Anti-Galektin-3 IgG wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Die Lokalisation der mRNA für Galektin-3 (Abbildung 15, B) und die für das Protein Galektin-3 (Abbildung 15, A) waren räumlich sehr benachbart.. Die Kontrolle mit der Sonde in sense Orientierung (Abbildung 15, C) lieferte im gesamten Ovar kein positives Signal (C).

Abbildung 15: Nachweis der Galektin-3-mRNA Expression im Vergleich zum Galektin-3-Protein Nachweis am Ovar einer 8 Wochen alten Wildtyp Maus (Gal-3 +/+). (A) Immunhistochemie mit Anti-Galektin-3 IgG. (B) ISH mit einer Galektin-3-mRNA Sonde in antisense Orientierung am Folgeschnitt zu (A). Positive Signale der Immunhistochemie und der ISH räumlich eng benachbart. (C) ISH mit einer Galektin-3-mRNA Sonde in sense Orientierung. Keine Farbreaktion. →: positive Lokalisationen für Galektin-3 Protein bzw. Galektin-3 mRNA. Balken 17,5 µm.

Nachdem sowohl bei der Western Blot Analyse als auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen eine deutliche Abhängigkeit der Galektin-3 Protein Expression im Verlauf des ovariellen Zyklus zu erkennen war, wurde nun in der Northern Blot Analyse überprüft, ob das auch auf die Expression der mRNA für Galektin-3 zutraf und ob im Ovar splice-Varianten auftraten.

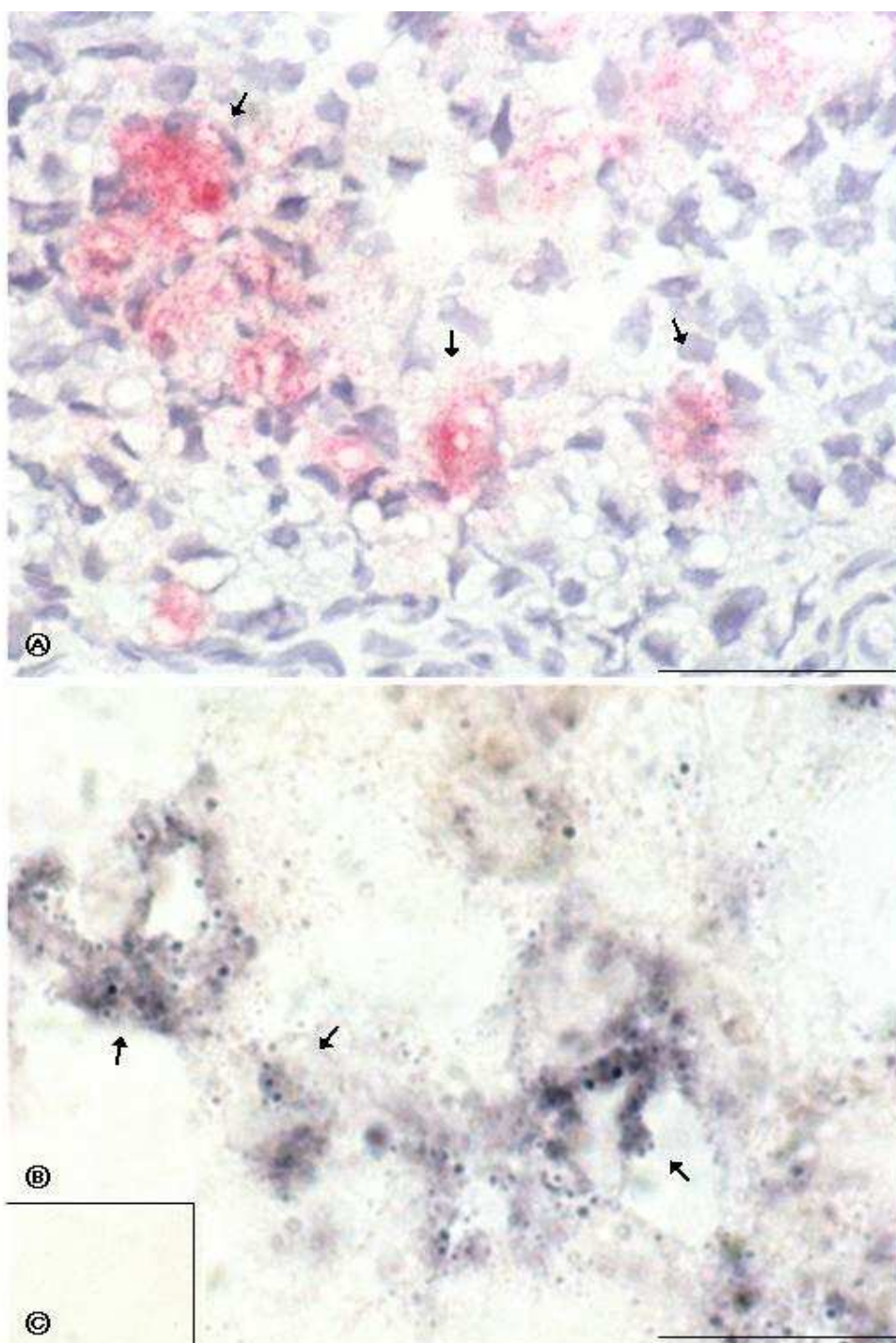


Abbildung 15

5.11 Northern Blot Analyse der Expression der Galektin-3-mRNA im ovariellen Zyklusverlauf

Hierfür wurde aus den Ovarien der behandelten Wildtyp (Gal-3 +/+) Tiere und von einem Knock-out (Gal-3 -/-) Tier die Total-RNA isoliert (siehe Methodenteil 4.4.7) und Aliquots in der Northern Blot Analyse eingesetzt (siehe Methodenteil 4.4.13). Die RNA wurde nach der Auftrennung in einem denaturierenden Formaldehydgel durch Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert, mit einer DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert und mit einem Anti-DIG-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, und dem ECL-System detektiert. Ähnlich wie bei der Western Blot Analyse der Galektin-3 Proteinexpression zeigte sich eine sehr deutliche Abhängigkeit der Galektin-3 mRNA Expression vom Zyklusverlauf. In der Total-RNA einer unbehandelten, 4 Wochen alten Maus (Abbildung 16, A) und einer mit PMSG behandelten Maus, 40 Stunden p. i. (Abbildung 16, B), zeigte sich eine kaum nachweisbare Expression. Nach der Applikation von HCG, 24 Stunden p. i., konnte eine schwache Expression der Galektin-3 mRNA detektiert werden (Abbildung 16, C). Die Expression der spezifischen mRNA nahm dann über die nächsten drei Tage (Abbildung 16, E-G) kontinuierlich zu, mit einem Maximum am dritten Tag (96 Stunden p. i., Abbildung 16, G). 120 Stunden p. i. zeigte sich wieder eine abgeschwächte Expression (Abbildung 16, H). Im Gegensatz zur Western Blot Analyse, wo die stärkste Expression des Galektin-3 Proteins 120 Stunden nach der Verabreichung von HCG war (Abbildung 9-1, G), hatte die Expression der mRNA für dieses Protein ihr Maximum 24 Stunden früher. Bei einem nur mit NaCl behandeltem Tier (Abbildung 16, D) zeigte sich im Gegensatz zum Vergleichszeitpunkt des Zyklus (Abbildung 16, E) eine kaum nachweisbare Expression. Die Größe der Transkripte lag bei ca. 1000 bp, das der Knock-out (Gal-3 -/-) Maus um ca. 200 bp tiefer (Abbildung 16, I), was aufgrund der Sequenzierung zu erwarten war (siehe Ergebnisse 5.2). Die mRNA Expression von Galektin-3 wurde mit der Expression der mRNA des „Housekeeping“ Gens Aktin verglichen. Nachdem die spezifische mRNA für Aktin über den gesamten Zeitraum relativ gleichmäßig exprimiert wurde (Abbildung 16), konnte bei der Expression der Galektin-3 mRNA von einer sehr deutlichen und starken Zyklusabhängigkeit gesprochen werden. Splice-Varianten der Galektin-3 mRNA konnten nicht detektiert werden.

Abbildung 16: Northern Blotting Analyse der Expression der Galektin-3-mRNA und der mRNA für Aktin im Verlauf des ovariellen Zyklus von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-). (A) unbehandelte, 4 Wochen alte Maus. (B) 40 Stunden nach der Applikation von PMSG. (C) ein Tag nach der Applikation von HCG (24 Stunden p. i.). (D) NaCl behandeltes Tier, Vergleichszeitpunkt zu (E). (E) 48 Stunden p. i.. (F) 72 Stunden p. i.. (G) 96 Stunden p. i.. (H) 120 Stunden p. i.. (I) Knock-out Maus, 96 Stunden p. i..

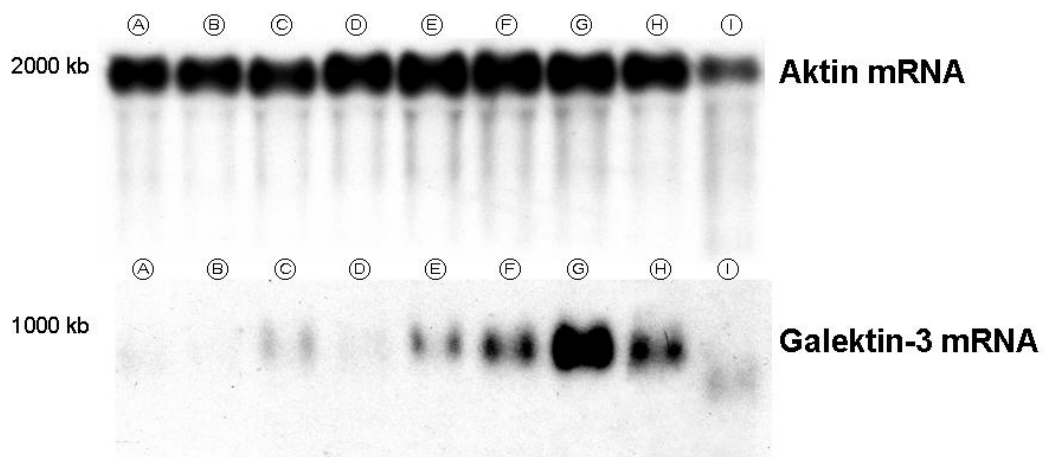


Abbildung 16

In den nächsten Versuchen sollte nun das Auftreten von Galektinen am Hoden und Nebenhoden von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) in der postnatalen Entwicklung genauer untersucht werden. Nachdem die RT-PCR Analysen zeigten, dass alle getesteten Galektine außer Galektin-2 im Hoden und Nebenhoden exprimiert wurden, sollte nun auf Proteinebene die Expression von Galektinen getestet werden.

5.12 Western Blot Analyse der Proteinexpression der Galektine am Hoden und Nebenhoden in der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)

Es standen polyklonale Antikörper zur Verfügung, die gegen die Proteine Galektin-1, -3, -7 und -8 gerichtet waren, wie bereits im Ergebnisteil unter 5.4 beschrieben. Von Extrakten der Hoden und Nebenhoden wurden hier jeweils 50 µg Gesamtprotein eingesetzt, wobei die Proteinexpression am Nebenhoden in den drei Anteilen, nämlich Kopf (Caput epididymidis), Körper (Corpus epididymidis) und Schwanz (Cauda epididymidis), getrennt untersucht wurde. Das Gesamtprotein wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern (Anti-Galektin-1 IgG: 2 µg/ml, Anti-Galektin-3 IgG: 0,5 µg/ml; Anti-Galektin-7 IgG: 1 µg/ml, Anti-Galektin-8 IgG: 2 µg/ml) inkubiert und anschließend mit Hilfe des ECL-Systems detektiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (siehe Methodenteil 4.4.18.5). Im Falle des Hodens und Nebenhodens wurde der postnatale Entwicklungsverlauf von der ersten bis zur sechsten Lebenswoche im Western Blotting untersucht.

Die durchgeführten Analysen zeigten, dass die Galektin-1-Proteinexpression sowohl im Hoden als auch im Nebenhoden nachweisbar war, wohingegen Galektin-3 nur im Nebenhoden in allen drei Anteilen vorhanden war. Die Expression von Galektin-1 in den Proteinextrakten der Hoden war am deutlichsten in der Probe, die von Mäusen entnommen wurde, die eine Woche alt waren (Abbildung 17-1, A). Die anderen Altersstufen wiesen eine schwächere, aber gleich bleibende Intensität der Expression auf (Abbildung 17-1, B-E). Kein Unterschied war dabei im Vergleich zu den Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) zu beobachten, von denen lediglich repräsentativ das Ergebnis der Proben eines sechs Wochen alten Tier abgebildet ist (Abbildung 17-1, F). Wie bereits bei den Ovarien beschrieben wurden auch hier die entsprechenden Expressionsanalysen für das „Housekeeping“-Protein Aktin durchgeführt. Die gleichmäßige Expression dieses Protein über alle Stadien hinweg (Abbildung 17-1) ermöglichte es, die Expression von Galektin-1 dazu in Relation zu setzen, so dass man von

einer wirklichen Abnahme der Galektin-1 Proteinexpression im Hoden nach der ersten Lebenswoche sprechen konnte. Interessanterweise konnte eine Expression von Galektin-3 im Hoden nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17-1).

Vom Nebenhoden wurden die einzelnen Abschnitte (Caput, Corpus und Cauda epididymidis) getrennt untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Galektin-1 Expression in Corpus und Cauda relativ gleichmäßig war (Abbildung 17-3 und 17-4), im Caput hingegen konnte eine entwicklungsabhängige, geringgradige Abnahme verzeichnet werden (Abbildung 17-2). Als repräsentatives Beispiel für die Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäuse ist bei allen Ergebnissen das Resultat von einem 6 Wochen alten Tier abgebildet (in allen Abbildungen jeweils F). Auch diese Ergebnisse für Galektin-1 am Nebenhoden wurden wieder in Relation zur Expression von Aktin gesetzt. Aufgrund der gleichmäßigen Expression dieses Proteins im untersuchten Zeitraum konnte von wirklichen Veränderungen der Galektin-1 Expression im Caput gesprochen werden.

Bei der Expression von Galektin-3 in den einzelnen Abschnitten des Nebenhodens zeigten sich sowohl zeitlich als auch räumlich (spatiotemporal) deutliche Unterschiede. Im Caput war eine mittlere bis schwache Expression dieses Proteins vorhanden, die im Alter von 6 Wochen nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 7-2). Im Vergleich dazu nahm die Expression von Galektin-3 im Corpus von der ersten Lebenswoche bis zur dritten stark zu und blieb dann gleichmäßig stark ausgeprägt (Abbildung 17-3). In der Cauda war eine Expression von Galektin-3 erst ab der zweiten Lebenswoche zu sehen und verzeichnete anschließend eine kontinuierliche Zunahme bis zur sechsten Woche (Abbildung 17-4). Insgesamt blieb aber die Expressionsintensität in der Cauda etwas hinter der im Corpus zurück. Auch diese Resultate für Galektin-3 wurden in Relation zur Expression von Aktin gesetzt, um von einer wirklichen Erhöhung oder Erniedrigung sprechen zu können, die nicht auf Schwankungen in der Proteinmenge zurückzuführen war. Da das Protein Aktin wie bereits beschrieben eine gleichmäßige Expression zeigte, waren die Veränderungen der Galektin-3 Expression im Entwicklungsverlauf tatsächlich als solche anzusprechen. Zur Spezifitätskontrolle von Anti-Galektin-1 und -3 IgG wurden zusätzlich die jeweiligen depletierten IgG-Fractionen in der Western Blot Analyse eingesetzt. Da damit keine Banden detektierbar waren, konnte man von der Spezifität der Antikörper ausgehen. Mit Anti-Galektin-7 und -8 IgG konnte weder beim Wildtyp (Gal-3 $+/+$) noch beim Knock-out Tier (Gal-3 $-/-$) eine Proteinexpression nachgewiesen werden.

Abbildung 17-1: Western Blot Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, Galektin-3 und Aktin im Hoden in der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-). (A) 1. Lebenswoche (B) 2. Lebenswoche (C) 3. Lebenswoche (D) 4. Lebenswoche (E) 6. Lebenswoche (F) 6. Lebenswoche, Knock-out (Gal-3 -/-) Maus. Kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp (Gal-3 +/+) Maus des gleichen Alters (E) erkennbar. Von jedem Organ wurden 50 µg Gesamtprotein verwendet. Die Nitrozellulosemembran wurde in 5 % Milchpulver in T-TBS-Puffer, pH 7,5, blockiert und der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe Text) in der Blockierungslösung eingesetzt. Der mit Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper wurde mit 0,5 µg/ml in der Blockierungslösung eingesetzt. Detektion siehe Text.

Abbildung 17-2: Western Blot Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, Galektin-3 und Aktin im Nebenhodenkopf (Caput epididymidis) in der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-). Identifizierung der Proben und Vorgehensweise siehe Abbildung 17-1.

Abbildung 17-3: Western Blot Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, Galektin-3 und Aktin im Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) in der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-). Identifizierung der Proben und Vorgehensweise siehe Abbildung 17-1.

Abbildung 17-4: Western Blot Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, Galektin-3 und Aktin im Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) in der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-). Identifizierung der Proben und Vorgehensweise siehe Abbildung 17-1.

Im nächsten Experiment wurde nun die Lokalisation von Galektin-1 bzw. -3 im Hoden und Nebenhoden untersucht.

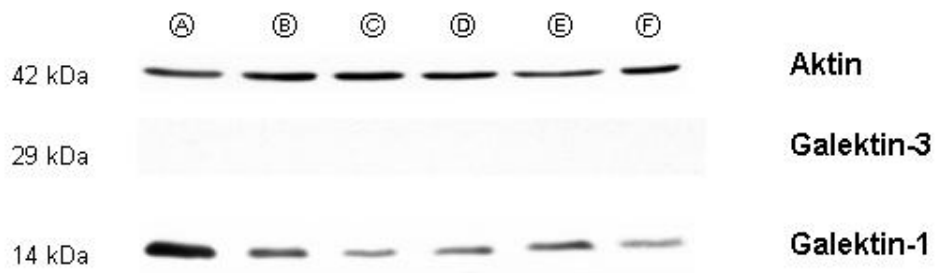


Abbildung 17-1

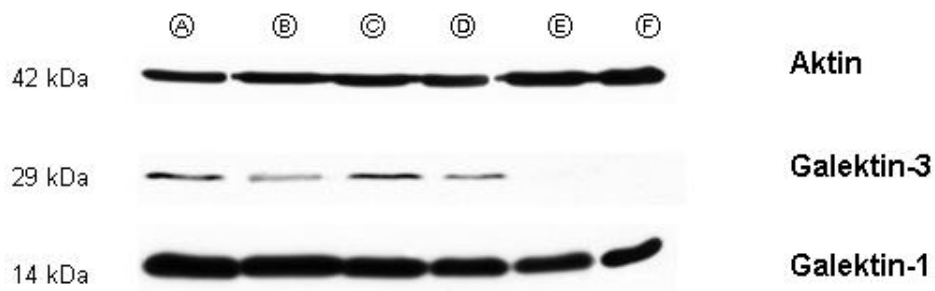


Abbildung 17-2

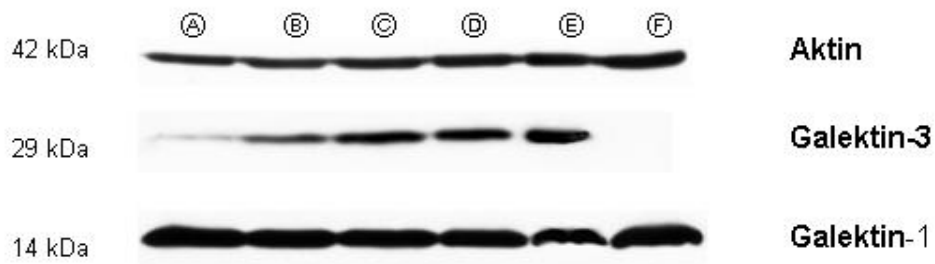


Abbildung 17-3



Abbildung 17-4

5.13 Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der Lokalisation der Galektine und von Aktin in Hoden und Nebenhoden von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-) im Verlauf der postnatalen Entwicklung

Da in der Western Blot Analyse beim Hoden nur eine Expression von Galektin-1 nachgewiesen werden konnte, wurde erstmal nur dieser Antikörper in der Immunhistochemie am Hoden eingesetzt. Das Vorgehen war wie weiter oben bei den Ovarien beschrieben, aber Anti-Galektin-1 IgG wurde hier in einer Verdünnung von 10 und 2 µg/ml eingesetzt. Außerdem wurden die Schnitte teilweise mit einem 0,01 M Zitratpuffer in der Mikrowelle vorbehandelt, um das sonst sehr schwache Signal zu verstärken. Die Detektion von Galektin-1 im Nebenhoden erfolgte ohne Vorbehandlung der Schnitte und Anti-Galektin-1 IgG wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

Im Nebenhoden wurde Galektin-1 in allen Abschnitten, aber v. a. im Bereich der Cauda, um die Anschnitte des Ductus epididymidis herum sowie im Stroma des Epididymis detektiert (Abbildung 18, A und C). Des Weiteren zeigte sich auch eine Färbung im Bereich der Tunica muscularis von größeren Blutgefäßen vom arteriellen Typ (Abbildung 18-1, A). Dass es sich dabei tatsächlich um glatte Muskulatur handelte, zeigte die Färbung mit Anti-Aktin IgG (5 µg/ml) an einem Folgeschnitt (Abbildung, 18-1, B und D).

Nach Vorbehandlung der Schnitte konnten mit Anti-Galektin-1 IgG (10 µg/ml) im Hoden die Sertoli-Zellen in den Tubuli seminiferi contorti bzw. auch im Zwischenraum die Leydig-Zellen detektiert werden (Abbildung 18-1, E und F). Es wurde hier nur die Färbung bei einem 6 Wochen alten Tier vom Wildtyp (Gal-3 +/+) abgebildet, die für die anderen Zeitpunkte und auch für die Knock-out Tiere (Gal-3 -/-) repräsentativ ist. In der 1. Lebenswoche konnte in der Immunhistochemie im Gegensatz zum Western Blot kein Unterschied zu den anderen Alterstufen detektiert werden. Bei einer Konzentration von Anti-Galektin-1 IgG von 2 µg/ml und ohne Vorbehandlung ließen sich im Hoden nur noch in geringer Intensität die Leydig-Zellen darstellen (Abbildung 18-1, G). Die Färbung entwickelte sich nicht bei Verwendung der depletierten IgG Fraktion (Abbildung 18-1, H). Weder bei der Darstellung mit Anti-Galektin-1 IgG noch mit Anti-Aktin IgG konnten zwischen den Wildtyp (Gal-3 +/+) und den Knock-out Tieren (Gal-3 -/-) Unterschiede in der Lokalisation oder in der Stärke der Expression beobachtet werden

Abbildung 18-1: Immunhistochemische Lokalisation von Galektin-1 und Aktin im Hoden und Nebenhoden (A und C) Übersichtsaufnahme von Hoden und Nebenhoden in der 3. Lebenswoche. Deutlich positive Zeichnung der Galektin-1 positiven Muskelschichten um die Nebenhodengänge und um größere Gefäße, schwächere Zeichnung des Nebenhodenstromas und der Leydig-Zellen im Hoden. (B und D) Färbung mit Anti-Aktin IgG. Färbung auf die Muskulatur der Gefäße, die Lamina propria der Samenkanälchen und die Muskelschichten um die Nebenhodengänge herum beschränkt. (E und F) Hoden eines 6 Wochen alten Tieres. Eine positive Reaktion nach Inkubation Anti-Galektin-1 IgG (10 µg/µl) und nach Vorbehandlung war in den Sertoli-Zellen und den Leydig-Zellen zu sehen. (G) Hoden eines 6 Wochen alten Tieres. Ohne Vorbehandlung der Schnitte nur eine schwach positive Reaktion der Leydig-Zellen auf Anti-Galektin-1 IgG (2 µg/µl). (H) Hoden eines 6 Wochen alten Tieres. Inkubation mit der depletierten IgG Fraktion von Anti-Galektin-1 IgG. Kein Signal mehr nachweisbar. Ho: Hoden. Corpus: Nebenhodenkörper. Cauda: Nebenhodenschwanz. TSC: Tubuli seminiferi contorti. →: Lokalisationen von Galektin-1 bzw. Aktin im Hoden und Nebenhoden. ►: Galektin-1 positive Sertoli-Zellen. *: Galektin-1 positive Leydig-Zellen. Balken 17,5 µm.

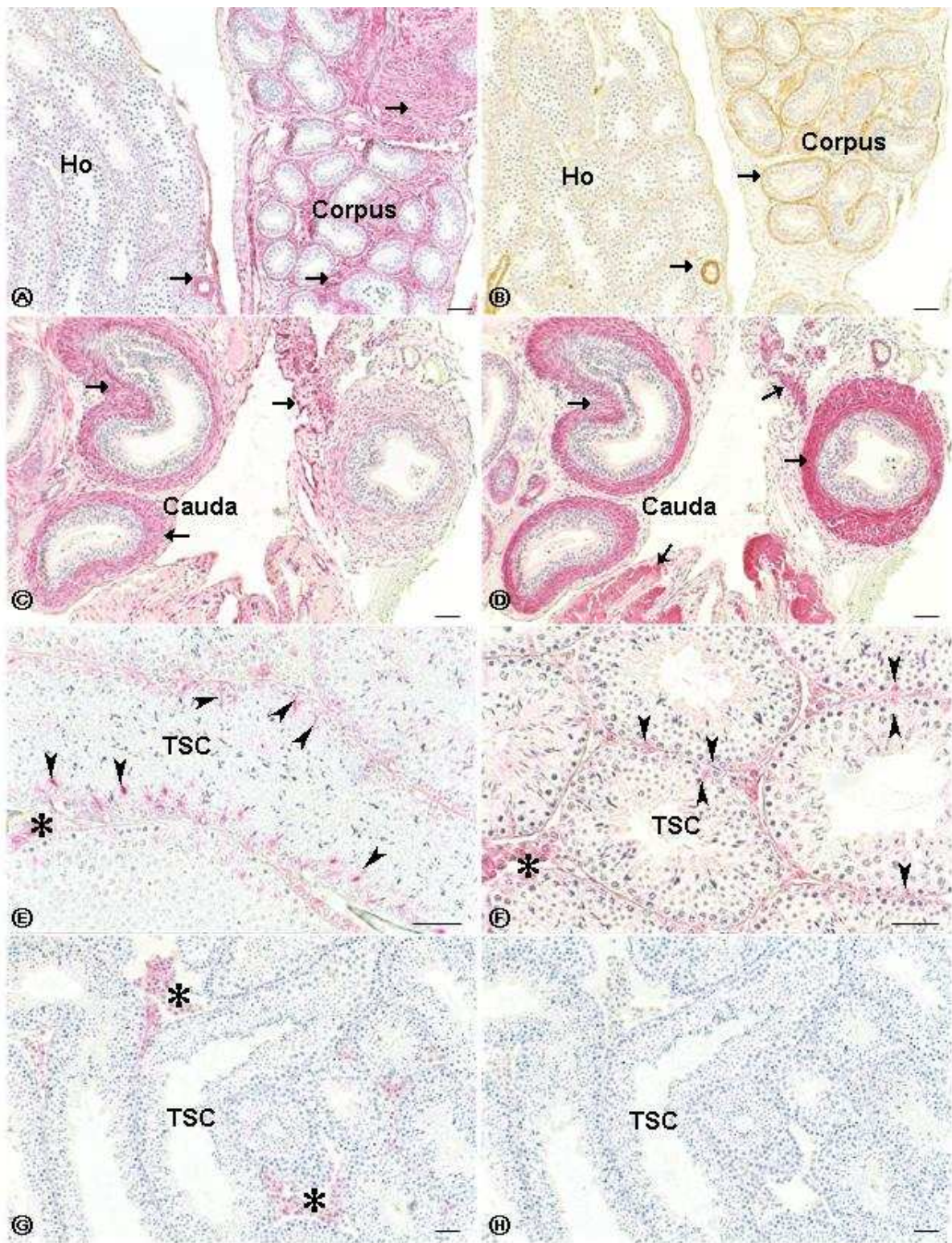


Abbildung 18-1

Am Nebenhoden wurde im Weiteren die Lokalisation von Galektin-3 untersucht. Der Antikörper wurde hierfür, wie bei den Ovarien, in einer Verdünnung von 0,5 µg/ml eingesetzt und das weitere Vorgehen war wie bereits beschrieben. Am Nebenhodenkopf und im Initialsegment konnten in der ersten Lebenswoche einzelne positive Epithelzellen und vereinzelt auch noch positive Zellen zwischen den Nebenhodengängen detektiert werden (Abbildung 18-2, A). Dieses Erscheinungsbild und Verteilungsmuster blieb über den Entwicklungsverlauf bis zur 6. Lebenswoche (Abbildung 18-2, B-E) konstant, was die schwachen Banden im Western Blotting erklärte. Das Absinken der Proteinmenge in der 6. Lebenswoche unter die Nachweisgrenze des Western Blotting Verfahrens war eventuell auf die wachstumsbedingte Größenzunahme des Organs zurückzuführen, die anscheinend nicht in gleichem Maße die Galektin-3 positiven Zellen betraf. Bei der Knock-out (Gal-3 $-/-$) Maus (Abbildung 18-2, F) konnte im Vergleich zum Wildtyp (Gal-3 $+/+$) zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 18-2, E) kein morphologischer Unterschied erkannt werden und der Nachweis von Galektin-3 war wie erwartet negativ.

Im Nebenhodenkörper zeigte die Immunhistochemie mit Anti-Galektin-3 IgG eine bildliche Darstellung der in der Western Blot Analyse gewonnenen Erkenntnisse. In der 1. Lebenswoche (Abbildung 18-3, A) sah man eine ganz schwache positive Reaktion des Epithels, die sich in der 2. Woche nur unwesentlich verstärkte (Abbildung 18-3, B). In der 3. Woche allerdings ergab sich eine sehr starke positive Reaktion des Epithels im Nebenhodenkörper (Abbildung 18-3, D) und der Übergang vom Nebenhodenkopf zum Körper wurde deutlich markiert (Abbildung 18-3, C). Dieses Bild präsentierte sich auch in der 4. Lebenswoche (Abbildung 18-3, E und F) und die Färbung im Epithel des Körpers erschien noch intensiver (Abbildung 18-3, F). Auch in der sechsten Lebenswoche reagierte das Epithel in seiner Gesamtheit stark positiv auf Anti-Galektin-3 IgG (Abbildung 18-3, G), wobei die Färbung weniger intensiv erschien als im Alter von 4 Wochen. Beim Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tier zeigte sich keine positive Reaktion (Abbildung 18-3, H).

Auch in Bezug auf den Nebenhodenschwanz konnten die Resultate des Western Blottings in den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen wieder gefunden werden. So zeigte sich auch hier wieder im Alter von einer Woche (Abbildung 18-4, A) eine nur sehr schwache Reaktion des Epithels, die sich aber schon in der 2. Woche (Abbildung 18-4, B) verstärkte und in der 3. (Abbildung 18-4, C), 4. (Abbildung 18-4, D) und 6. Lebenswoche (Abbildung 18-4, E und F) noch geringfügig zunahm. In der 4. Woche fielen auch viele Galektin-3 positive Zellen im Bindegewebe zwischen den Kanälchen auf. Solche positiven Zellen waren im gesamten Nebenhoden zu sehen, besonders stark waren sie allerdings im Bereich der

Cauda zu finden. Aufgrund des beim Ovar gefundenen räumlichen und zeitlichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Galektin-3 positiven Zellen und solchen, die auf den Antikörper gegen F4/80 positiv reagierten, lag auch hier der Schluss nahe, dass es sich bei diesen Zellen im Bindegewebe um Immunzellen bzw. Makrophagen handelte. Am Übergang zum Ductus Deferens nahm die positive Reaktion des Epithels auf Anti-Galektin-3 IgG wieder ab und im Deferens selbst war sie nur noch sehr schwach. Dafür färbten sich hier Zellen im Bereich der Basallamina des Ductus deferens (Abbildung 18-4, F). Auf eine Darstellung eines Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tieres wurde hier zugunsten einer anderen Spezifitätskontrolle verzichtet. Abbildung 18-4 (G) zeigt eine Färbung mit Anti-Galektin-3 IgG im Bereich des Körperanfangs eines sechs Wochen alten Tieres. Abbildung 18-4 (H) zeigt einen histologischen Folgeschnitt, der mit der depletierten IgG-Fraktion inkubiert wurde, was zu einem Verschwinden des positiven Signals führte.

Abbildung 18-2: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation von Galektin-3 im Nebenhodenkopf im Verlauf der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$) (A) 1. Lebenswoche postnatal. Im Epithel des Nebenhodenkopfes und des Initialsegmentes stellten sich einzelne positive Zellen dar, ebenso im dazwischen liegenden Bindegewebe. (B-E) Die Ausprägung der Galektin-3 positiven Zellen im Initialsegment und im Nebenhodenkopf änderte sich im Verlauf der Entwicklung bis zur 6. Lebenswoche nicht. (F) Bei der Knock-out (Gal-3 $-/-$) Maus traten keine Färbungen auf. (G und H) Ausschnittvergrößerungen aus dem Nebenhodenkopf eines 6 Wochen alten Tieres. Deutlich sind hier gefärbte neben ungefärbten Epithelzellen zu erkennen. Ebenso zeigte sich zum Teil neben der Zytoplasmafärbung eine Kernfärbung für Galektin-3. IN: Initialsegment. Caput: Nebenhodenkopf. \rightarrow : Galektin-3 positive Zellen. \blacktriangleright : deutliche Kernfärbung einer Prinzipalzelle mit Anti-Galektin-3 IgG. $*$: Basalzelle. Balken 17,5 μ m.

Abbildung 18-3: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation von Galektin-3 im Nebenhodenkörper im Verlauf der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out Mäusen (Gal-3 $-/-$). (A) 1. Lebenswoche, schwach positive Reaktion des Epithels der Kanälchen im Nebenhodenkörper. (B) 2. Lebenswoche, geringgradige Zunahme der positiven Reaktion. (C und D) 3. Lebenswoche mit nun stark positiver Reaktion des Epithels. Die Grenze zwischen Nebenhodenkopf und Körper ist dadurch gut zu erkennen (C). (E und F) 4. Lebenswoche. Weitere Verstärkung der positiven Reaktion des Epithels auf Anti-Galektin-3 IgG, deutliche Markierung des Epithels im Nebenhodenkörper.

(G) 6. Lebenswoche. Weiterhin stark positiv, wenn auch optisch etwas geringere Intensität als in der 4. Woche. Spermien im Lumen sichtbar. (H) keine Reaktion beim Knock-out (Gal-3 -/-) Tier in der 6. Woche. Ho: Hoden. Corpus: Nebenhodenkörper. →: Lokalisationen von Galektin-3. ►: Galektin-3 positive Zellen im Hoden. Balken 17,5 µm.

Abbildung 18-4: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation von Galektin-3 im Nebenhodenschwanz im Verlauf der postnatalen Entwicklung von Wildtyp (Gal-3 +/+) Mäusen. (A) 1. Lebenswoche, schwach positive Färbung des Caudaepithels mit Anti-Galektin-3 IgG. (B) 2. Woche, verstärkte Reaktion des Epithels. (C) 3. Lebenswoche, gleich bleibende Reaktion auf den Antikörper. (D) 4. Woche, keine Veränderungen im Bereich des Epithels, aber deutlich positive Zellen im Bindegewebe zwischen den Nebenhodengängen. (D und E) 6. Lebenswoche. Das Epithel der caudalen Nebenhodenabschnitte zeigt eine geringe Zunahme der Färbeintensität. Am weiteren Übergang in den Abschnitt des Ductus deferens nimmt die Nachweisbarkeit der Galektin-3 Proteinexpression im Epithel stark ab und im Samenleiter ist nur noch eine schwache Reaktion zu erkennen. Hier reagieren Zellen an der Basallamina stark positiv auf den Antikörper (E). (F) Übergangsbereich vom Caput zum Corpus bei einem sechs Wochen alten Tier. Deutliche Zunahme der positiven Reaktion des Epithels im Corpusbereich. (G) Folgeschnitt zu (F), Inkubation mit der depletierten IgG-Fraktion führt zu einem kompletten Verschwinden des positiven Signals. Cauda: Nebenhodenschwanz. Ductus deferens: Samenleiter. →: Lokalisationen von Galektin-3 im Nebenhodenepithel. ►: Positive Zellen im Interstitium. Balken 17,5 µm.

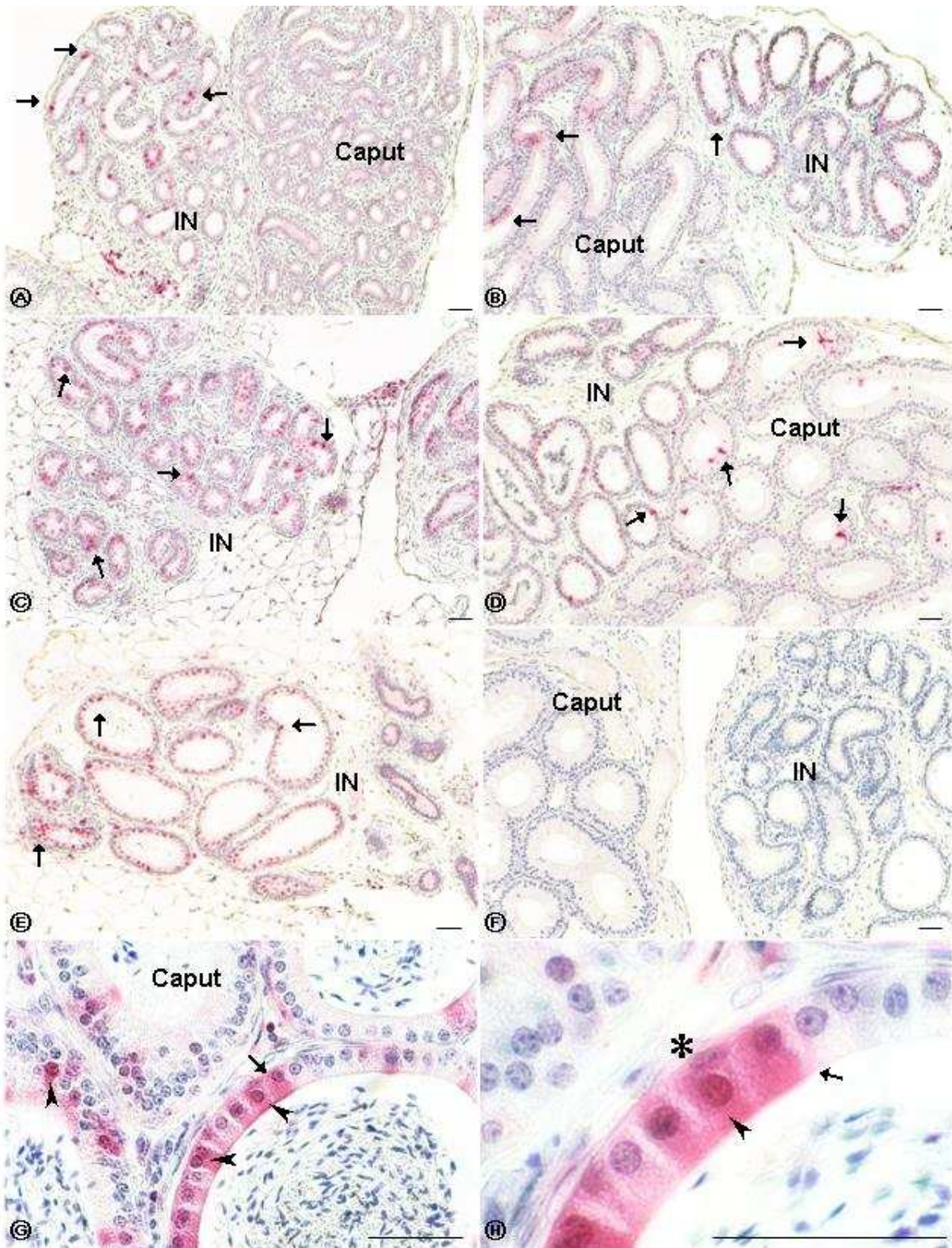
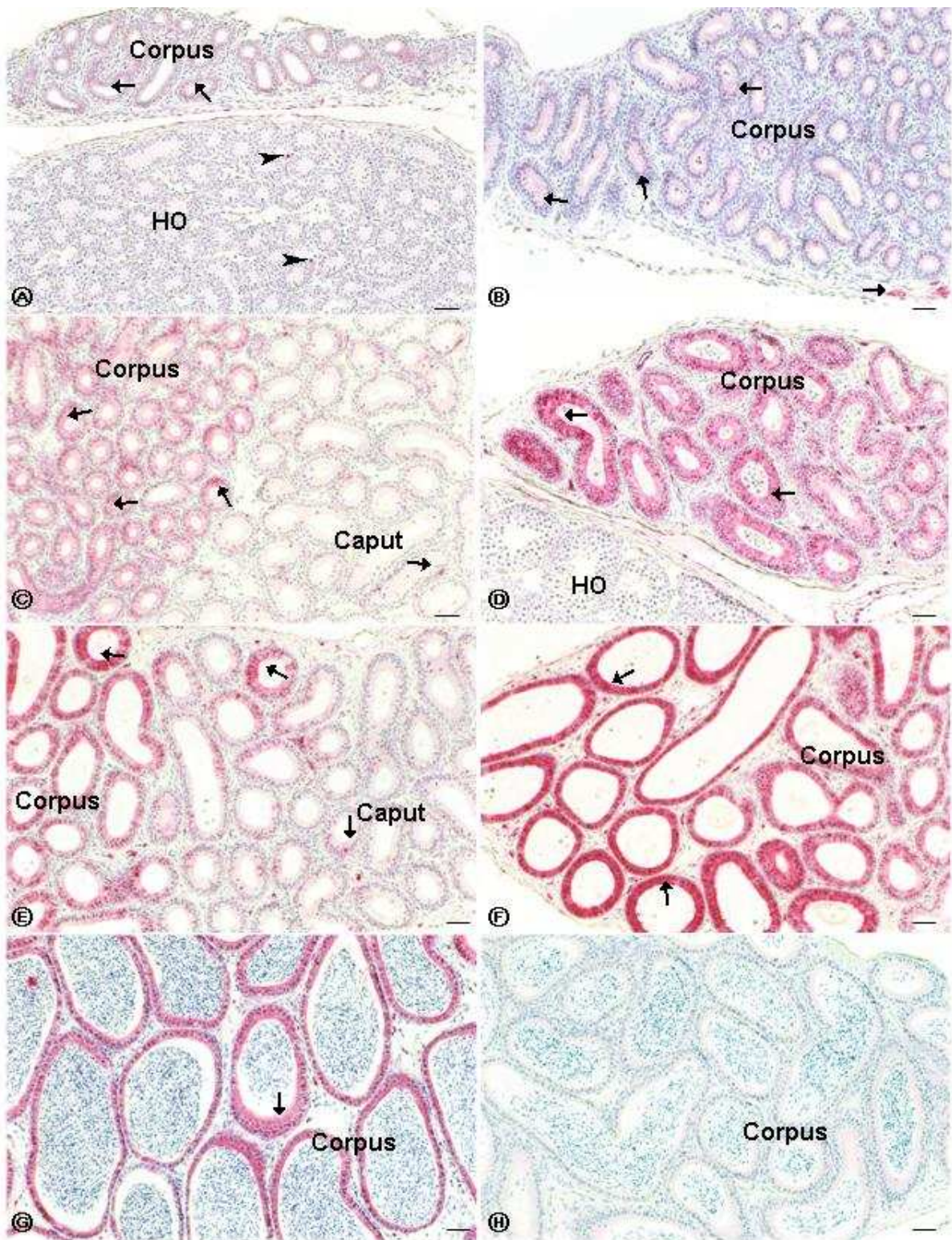


Abbildung 18-2



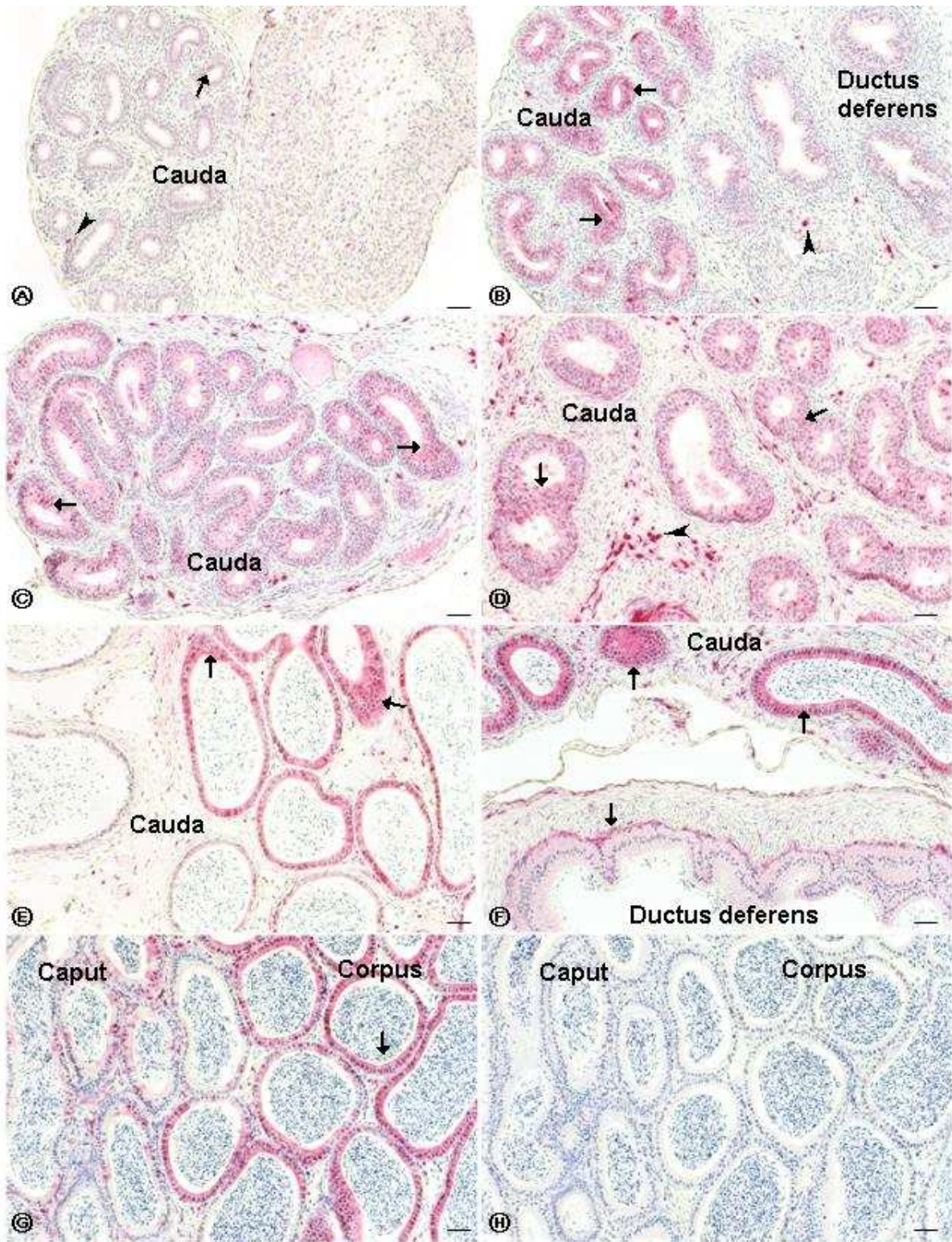


Abbildung 18-4

5.14 Immunhistochemische Darstellung der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) positiven Zellen im postnatalen Entwicklungsverlaufs des Hodens von Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out Mäusen (Gal-3 -/-)

Der Antikörper, der bereits am Ovar dazu diente, die 3 β -HSD positiven Zellen darzustellen (siehe Ergebnisteil 5.7), wurde nun auch am Hoden eingesetzt, um die Leydig-Zellen zu detektieren. Diese Zellen dienen dazu, Testosteron zu produzieren. Der Antikörper wurde auch hier in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt. Die Leydig-Zellen sind bereits vor der Geburt vorhanden, denn ihre Testosteronproduktion ist für die Entwicklung des männlichen Geschlechtsapparates nötig. Somit waren diese Zellen auch bereits in der ersten Lebenswoche nachweisbar (Abbildung 19, A). Die 3 β -HSD positiven Zellen waren in kleinen Gruppen zwischen den Samenkanälchen zu finden. In der zweiten Lebenswoche (Abbildung 19, B) zeigte sich das gleiche Erscheinungsbild. Eine solche kleine Zellgruppe ist in einer Ausschnittvergrößerung dargestellt (Abbildung 19, C). Auch in der dritten Lebenswoche (Abbildung 19, D) änderte sich nichts an dem Verteilungsmuster und der Menge der 3 β -HSD positiven Zellen. In der vierten Woche, wenn die männlichen Tiere in die Geschlechtsreife kamen, schien die Zahl der Zellen in den einzelnen Zellhaufen zugenommen zu haben (Abbildung 19, E). In einer Ausschnittvergrößerung ist die enge Nachbarschaft der Leydig-Zellen zu den Blutgefäßen zu erkennen (Abbildung 19, F). Außerdem ist an den beiden Aufnahmen von der vierten Lebenswoche zu erkennen, dass es sich bei der Darstellung der 3 β -HSD positiven Zellen um eine Färbung des Zytoplasmas handelte. In der sechsten Lebenswoche hatte sich optisch nicht nur die Zahl der positiven Zellen erhöht, sondern auch die Ausdehnung der Zellen war deutlich vorangeschritten (Abbildung 19, G und H). Wenn anfangs nur einzelne verstreute Zellhaufen zwischen den Samenkanälchen zu detektieren waren, dann waren nun die Kanälchen auf teilweise langer Strecke mit positiven Zellen umgeben. Auch bei der Darstellung der 3 β -HSD positiven Zellen beim Hoden konnte kein Unterschied zwischen den Wildtyp (Gal-3 +/+) und den Knock-out (Gal-3 -/-) Tieren entdeckt werden.

Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) positiven Zellen im Entwicklungsverlauf des Hodens von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+). (A) einzelne positive Zellhaufen zwischen den Samenkanälchen, eine Woche nach der Geburt. (B) 2. Lebenswoche, Samenkanälchen haben an Volumen zugenommen. Unverändertes Bild der 3β -HSD positiven Zellen. (C) Ausschnittvergrößerung, 2. Lebenswoche. (D) drei Wochen nach der Geburt. Keine Veränderung zu den beiden früheren Stadien. (E) 4. Lebenswoche. Zunahme der positiv reagierenden Zellen. (F) Ausschnittvergrößerung. Enge Nachbarschaft der 3β -HSD positiven Zellen zu Blutgefäßen. Zytoplasmafärbung erkennbar. (G und H): 6. Lebenswoche. Starke Ausbreitung und Zunahme der hormonproduzierenden Zellen. Ho: Hoden. NH: Nebenhoden. →: auf Anti- 3β -HSD IgG positiv reagierende Leydig-Zellen. Balken 17,5 μ m.

5.15 Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisationen der Galektin-3 und der 3β -HSD Proteinexpression am Hoden von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+)

In der Western Blot Analyse fand sich im Hoden, im Gegensatz zu den Ergebnissen am Nebenhoden, kein Hinweis auf eine Galektin-3 Proteinexpression über den Entwicklungsverlauf von der 1. bis zur 6. Lebenswoche. Bei den immunhistochemischen Färbungen der Schnitte von Hoden und Nebenhoden zur Darstellung der Lokalisation der Galektin-3 positiven Zellen im Nebenhoden zeigten sich jedoch schon bei Präparaten von der 1. Woche auch einzelne Galektin-3 positive Zellen im Hoden selbst (Abbildung 18-3, A). Diese lagen verstreut im Hoden im Bereich der Leydig-Zellen. Unter der Annahme, dass es sich bei den Galektin-3 positiven Zellen um Immunzellen bzw. Makrophagen handelte (siehe Ergebnisteil 5.6), wurde nun versucht, die räumliche Beziehung der auf Anti-Galektin-3 IgG positiv reagierenden Zellen zu den Leydig-Zellen darzustellen. Hierfür wurden Folgeschnitte verwendet und für die Darstellung der Galektin-3 positiven Zellen wurden die Schnitte in der Mikrowelle einer Vorbehandlung unterzogen. Dies hatte bereits beim Nachweis der Galektin-1 positiven Zellen im Hoden (siehe Ergebnisteil 5.13) zu einer Verbesserung der Darstellung beigetragen. Die Vorbehandlung erfolgte in einem 1 mM EDTA-Puffer und Anti-Galektin-3 IgG wurde in der gleichen Konzentration wie bisher (0,5 μ g/ml) eingesetzt. Da sich dadurch bereits die Darstellung der Galektin-3 positiven Zellen verbessern ließ, wurde auf eine Erhöhung der Antikörperkonzentration verzichtet, die oft zu Hintergrundproblemen führte. Die Inkubation mit Anti- 3β -HSD IgG erfolgte wie weiter oben beschrieben. Wegen der Zunahme der 3β -HSD positiven Zellen nach der 6. Lebenswoche wurden hier neben

Schnitten von einem 6 Wochen alten auch solche von einem 12 Wochen alten Wildtyp Tier (Gal-3 +/+) verwendet. Abbildung 20, (A) zeigt die 3 β -HSD Färbung bei einem 12 Wochen alten Tier und Abbildung 20, (B) die entsprechende Galektin-3 Färbung an einem Folgeschnitt. Es waren zwar nur wenige Zellen Galektin-3 positiv, aber diese lagen in enger Nachbarschaft zu den 3 β -HSD positiven Zellnestern, also zu den Leydig-Zellen. Eine noch bessere Darstellung des räumlichen Bezugs beider Zelltypen gelang an den Schnitten bei einem 6 Wochen alten Tier. Hier zeigte sich, dass die Samenkanälchen von einem feinen Netzwerk von Galektin-3 positiven Strukturen umgeben waren (Abbildung 20, D). In diesem Netzwerk wiederum konnten die 3 β -HSD positiven Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 20, C). Um eine durch die Vorbehandlung ausgelöste positive Reaktion des Gewebes auf den Galektin-3 Antikörper auszuschließen, wurde ein ebenso vorbehandelter Schnitt mit der depletierten IgG Fraktion inkubiert. In diesem Fall kam es zu keinem positiven Signal (Abbildung 20, E).

Abbildung 20: Immunhistochemischer Vergleich der Lokalisationen der Galektin-3 und der 3 β -HSD Proteinexpression im Hoden von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+).

(A) 12 Wochen altes Tier. Die 3 β -HSD positiven Zellen liegen zwischen den Samenkanälchen. (B) Folgeschnitt zu (A). Die Galektin-3 positiven Zellen liegen in der räumlichen Nähe der 3 β -HSD-positiven Zellnester. (C) 6 Wochen altes Tier. 3 β -HSD positive Zellen in Haufen um die Kanälchen herum. (D) entsprechende Färbung mit Anti-Galektin-3 IgG an einem Folgeschnitt zu (C). Es zeigte sich ein Netzwerk von positiv reagierenden Zellen und Strukturen. (E) Inkubation mit der depletierten Fraktion von Anti-Galektin-3 IgG führte zu einem Verschwinden des positiven Signals. →: Lokalisationen von 3 β -HSD und Galektin-3 positiven Zellen zwischen den Tubuli seminiferi contorti. Balken 17,5 μ m.

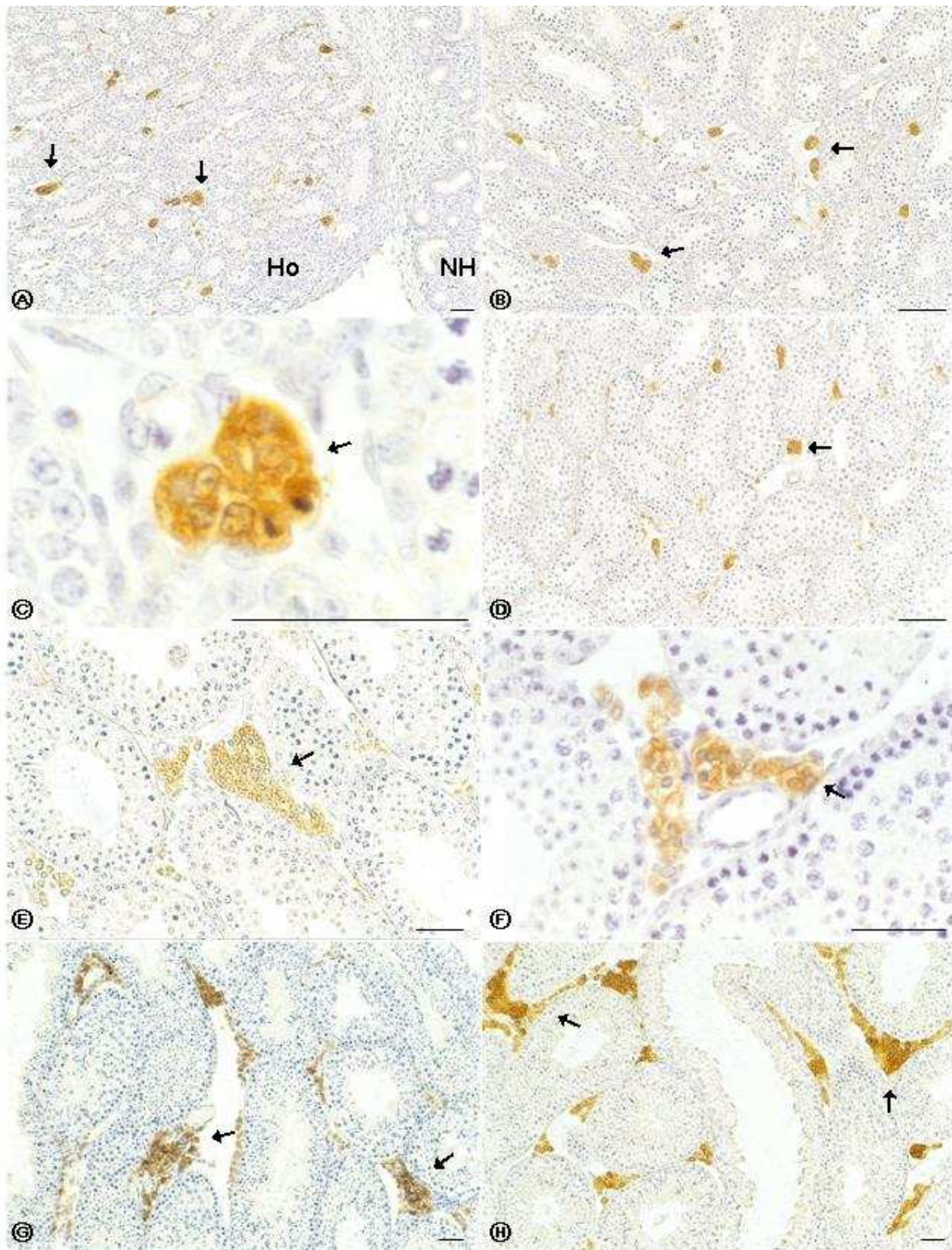


Abbildung 19

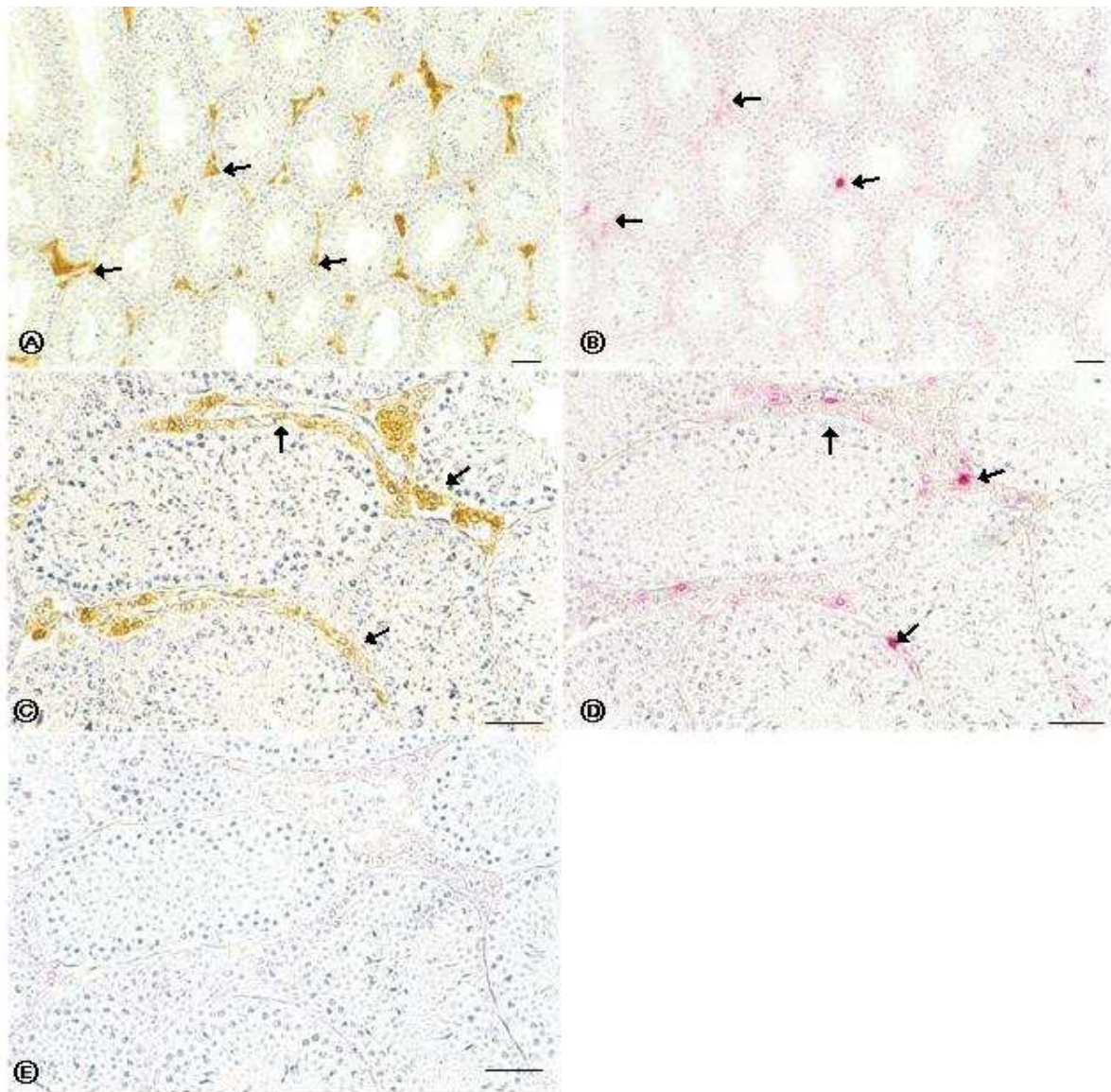


Abbildung 20

5.16 Northern Blot Analyse der Expression der Galektin-3-mRNA im postnatalen Entwicklungsverlauf des Nebenhodens

Nachdem sowohl bei der Western Blot Analyse als auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen eine deutliche Abhängigkeit der Galektin-3 Protein Expression im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Nebenhodens zu erkennen war, wurde nun überprüft, ob das auch auf die Expression der mRNA für Galektin-3 zutraf. Hierfür wurde aus den Nebenhoden der Wildtyp Tiere (Gal-3 +/+) und von einem Knock-out Tier (Gal-3 -/-, im Alter von 6 Wochen zum Vergleich der Größe des Transkripts) die Total-RNA isoliert (siehe Methodenteil 4.4.7) und in der Northern Blot Analyse eingesetzt (siehe Methodenteil 4.4.13). Das weitere Vorgehen erfolgte wie bereits bei den Ovarien besprochen. Hier zeigte sich nun eine nicht nachweisbaren Expression der mRNA für Galektin-3 in der 1. Lebenswoche (Abbildung 21, A) und eine nachweisbare, aber schwache Expression in der 2. (Abbildung 21, B) und 3. Lebenswoche (Abbildung 21, C). In der 4. Lebenswoche (Abbildung 21, D) kam es zu einer deutlichen Zunahme der Galektin-3 mRNA. Zwar war für dieses Stadium auch eine vermehrte Expression der Aktin mRNA (Abbildung 21, K) nachzuweisen, aber trotzdem konnte in Relation dazu noch von einer Erhöhung der Galektin-3 mRNA gegenüber den vorherigen Stadien gesprochen werden. Im Alter von 6 Wochen zeigte sich jedoch ein zu den bisherigen Ergebnissen der Western Blot Analyse und der Immunhistochemie abweichendes Ergebnis insofern, als hier wieder eine deutlich reduzierte Expression der Galektin-3 mRNA detektiert wurde (Abbildung 21, E). Allerdings wies hier auch die Aktinexpression (Abbildung 21, L) wieder eine deutlich geringere Stärke auf.

Die um 167 bp verringerte Galektin-3 mRNA bei den Knock-out (Gal-3 -/-) Tieren, die bei einem weiblichen Tier im Northern Blot zum Vergleich dargestellt wurde, ließ sich hier bei einem männlichen Tier nicht darstellen (Abbildung 21, F). Zusätzlich wurde noch die Total-RNA vom Hoden eines 6 Wochen alten Tieres aufgetragen. Trotz einer sehr starken Expression der Aktin mRNA, die sich beim Hoden in zwei Banden zeigte (Abbildung 21, N), konnte keine mRNA für Galektin-3 nachgewiesen werden (Abbildung 21, G). Bis zum Alter von vier Wochen konnte anhand dieser Ergebnisse von einer Abhängigkeit der Galektin-3 mRNA Expression vom postnatalen Entwicklungsverlauf des Nebenhodens gesprochen werden. Danach konnte durch die abweichende Expression der Aktin mRNA keine zuverlässige Aussage mehr über eine Relation der Galektin-3 mRNA Expression zum Entwicklungsverlauf getroffen werden.

Wie bei der Darstellung der Galektin-3 mRNA vom Ovar konnten auch hier keine splice-Varianten detektiert werden.

Abbildung 21: Northern Blot Analyse der Expression der Galektin-3-mRNA und Aktin mRNA im postnatalen Entwicklungsverlauf des Nebenhodens von Wildtyp Mäusen (Gal-3 +/+). (A) 1. Lebenswoche (B und C) 2. und 3. Lebenswoche (D) 4. Lebenswoche. (E) 6. Lebenswoche. (F) 6. Lebenswoche, Knock-out Maus (Gal-3 -/-). (G) 6. Lebenswoche, Total-RNA vom Hoden.

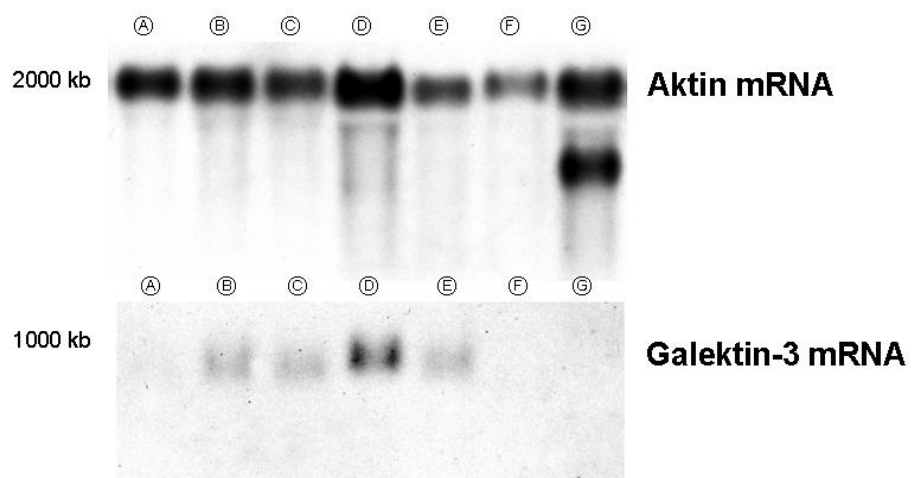


Abbildung 21

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden zunächst untersucht, welche Galektine im Ovar bzw. Hoden und Nebenhoden der Maus exprimiert werden. Anschließend wurde immunhistochemisch die Lokalisation der im Western Blotting positiven Galektine in den genannten Organen untersucht. Weiterhin sollte im Vergleich mit Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen die Frage geklärt werden, ob bei diesen Tieren durch das Fehlen von Galektin-3 phänotypischen Veränderungen auftraten und ob aufgrund dessen Rückschlüsse auf Funktionsänderungen gezogen werden könnten. In der folgenden Diskussion werden nun zuerst die am Ovar gefundenen Ergebnisse diskutiert und dann die von Hoden und Nebenhoden.

Zuerst wurde gezeigt, dass β -Galaktosid-spezifische Lektine, nämlich Galektine, in den Ovarien von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen exprimiert werden. Zum Nachweis der Galektine wurden die Methoden der RT-PCR und des Western Blottings verwendet. Daran anschließend wurde die zelluläre Lokalisation immunhistochemisch untersucht. Die RT-PCR zeigte Amplifikate für alle bekannten und mit passenden Primerpaaren detektierbaren Galektine auf. Der proteinchemische Nachweis im Western Blotting ergab, dass sich mit Hilfe spezifischer Antikörper lediglich Galektin-1, -3 und -7 nachweisen ließen. Dabei konnte bereits mit dieser analytischen Methode dargestellt werden, dass die Expression zum einen zyklusunabhängig wie im Fall von Galektin-1 und -7, zum anderen zyklusabhängig wie im Fall von Galektin-3 verlief. Die Detektion mit polyklonalem Anti-Galektin-3 IgG im histologischen Schnitt ergab eine deutliche Korrelation mit der Anbildung, Blüte und Regression der Corpora lutea (CL). So waren bei Anbildung und Blüte der CL lediglich Färbungen einzelner Zellen zu beobachten, im Zustand der Regression zeigte sich jedoch eine hohe Färbeintensität vieler Lutealzellen. Diese Korrelation der Galektin-3 Proteinexpression mit den verschiedenen Stadien der CL konnte auch auf Ebene der mRNA im Northern Blotting belegt werden.

Der Vergleich des Expressionsmusters von Galektin-3 mit dem eines Antikörpers, der gegen F4/80, ein 160 kDa großes Zellmembranprotein von reifen Gewebemakrophagen (Austyn & Gordon, 1981), gerichtet ist, erbrachte ein ähnliches zelluläres Muster. Somit konnte zumindest ein großer Teil der Zellen, die sowohl im Kern als auch im Zytoplasma Galektin-3 exprimierten, als Makrophagen angesprochen werden. Das Vorkommen von Galektin-3 in Makrophagen im Blut und in Geweben ist mittlerweile in der Literatur häufig belegt worden (Cherayil et al., 1989, 1990; Liu et al., 1995; Reichert & Rothschenker, 1999; Sano et al., 2000, 2003; Sharma et al., 2004). Die bisher dargestellten Befunde bezogen sich auf die

untersuchten Wildtyp (Gal-3 +/+) Mäuse. In den Knock-out (Gal-3 -/-) Mäusen war wie erwartet auf protein- und immunhistochemischer Ebene keine Expression von Galektin-3 vorhanden. Nachdem auch keine phänotypischen Veränderungen zu sehen waren, bezieht sich die weitere Diskussion der Befunde auf Wildtyp (Gal-3 +/+) Mäuse. Einen weiteren Hinweis dafür, dass es sich tatsächlich um Makrophagen handelte, lieferte auch der von anderen Untersuchern häufig berichtete Einstrom von Immunzellen, einschließlich von Makrophagen, bei der Rückbildung der CL (Petrovská et al., 1996; Zhao et al., 1998; Bowen et al., 1999; Pate & Keyes, 2001; Nagaosa et al., 2002; Davis & Rueda, 2002; Komatsu et al., 2003). Schließlich mußten die Galektin-3 positiven Zellen noch von den Lutealzellen abgegrenzt werden. Dies gelang mit Hilfe eines Antiserums gegen 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta^{5\rightarrow4}$ isomerase (3 β -HSD) (Ullmann et al., 2003), das hormon(Progesteron)-produzierende Lutealzellen markiert. Diese derart markierten Zellen konnten aufgrund eines anderen Verteilungsmusters von den Galektin-3 positiven Zellen abgegrenzt werden. Weitere Mitglieder der Proteinfamilie der Galektine, die sich in der Western Blot Analyse und immunhistochemisch nachweisen ließen, sind Galektin-1 und -7. Diese sind zum einen im ovariellen Stroma und Oberflächenepithel (Galektin-1), zum anderen lediglich im ovariellen Oberflächenepithel (Galektin-7) lokalisiert.

Die drei angesprochenen Galektine können Zellwachstum modulieren, spielen eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle und können zudem Apoptose induzieren oder hemmen. Galektin-1 und -3 können sowohl intra- als auch extrazelluläre Wirkungen entfalten. Nach der Sekretion von Galektin-1 beispielsweise erfolgt bei Neuroblastomazellen nach Bindung an die Pentasaccharidstruktur des Gangliosids GM₁ eine Wachstumsinhibition (Kopitz et al., 1998; Siebert et al., 2003). Proapoptotische Wirkung entfaltet Galektin-1 z. B. bei aktivierten humanen T-Zellen, humanen T-Leukämiezell-Linien und Teilpopulationen von CD4(lo) und CD8(lo) Thymozyten (Perillo et al., 1995, 1997; Rabinovich et al., 1998; Vespa et al., 1999). Demgegenüber besitzt intrazelluläres Galektin-3 antiapoptotische Wirkung (Yang et al., 1996; Akahani et al., 1997), vermutlich über die Interaktion mit Bcl2 (Yang et al., 1996). Galektin-7 wiederum ist ein proapoptotisches Molekül (Bernerd et al., 1999).

Die Galektin-3 Expression im Ovar konnte nahezu ausschließlich in den Corpora lutea lokalisiert werden und zwar mit umso höherer Färbeintensität je weiter fortgeschritten der ovarielle Zyklus und die Regression der CL war. Das Corpus luteum ist ein wichtiges Folgeprodukt des ovulierten Follikels und stellt ein vorübergehendes, hormonell reguliertes Organ dar, das aus einer heterogenen Zellpopulation besteht, nämlich aus hormonproduzierenden Lutealzellen, Endothelzellen (hoch vaskularisiert, ca. 50 % der Zellen) und

Immunzellen je nach Status. Die steroidogenen Zellen produzieren Progesteron zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit bei Säugetieren. Falls keine Trächtigkeit stattfindet kommt es zu einem dynamischen Regressionsprozess des CL, bei dem zunächst die Progesteronsynthese eingestellt wird (funktionelle Regression) und anschließend setzt die Rückbildung der Struktur des CL (strukturelle Regression) ein, bis zum vollkommenen Verschwinden des Gewebes. Letztere ist mit dem Phänomen des programmierten Zelltodes oder Apoptose eng assoziiert (Pate & Keyes, 2001; Bowen-Shauver & Telleria, 2003).

Immunzellen, vorwiegend Galektin-3 positive Makrophagen und T-Zellen, fanden sich, wie in dieser Arbeit gezeigt, zum Zeitpunkt der Regression vermehrt in den CL. Der Funktionsverlust der Lutealzellen konnte unter Verwendung eines Antiserums gegen 3 β -HSD, eines essentiellen Enzyms der Steroidhormonsynthese dargestellt werden. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Einstrom von Immunzellen und somit steigender Galektin-3 Positivität die Zahl der Progesteron-produzierenden Zellen abnahm. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der beiden Marker auch dargestellt werden, dass der ovarielle Zyklus der Maus Besonderheiten gegenüber dem anderer Säugetiere aufweist. Immunhistochemisch war eine funktionelle und strukturelle Regression nicht immer deutlich voneinander abzugrenzen. CL in Regression blieben über weitere zwei bis drei Zyklen erhalten und selbst in CL, von denen nur noch kleine Reste der ursprünglichen Zellmasse vorhanden waren, konnten noch Hormonproduzierende Zellen nachgewiesen werden. Bei anderen Tierarten und auch beim Mensch müssen die CL des einen Zyklus erst vollständig abgebaut werden, damit der nächste Zyklus beginnen kann.

Welche Funktion besitzen nun die Immunzellen und das exprimierte Galektin-3 bei der Rückbildung der CL? Dazu muß in Betracht gezogen werden, dass, wie bereits im Literaturteil (Ferguson & Griffith, 1997) erwähnt, das Ovar zu den immunprivilegierten Organen gehört. Diese Gewebe verhindern durch verschiedene Mechanismen die Ausbreitung einer Entzündung, weil selbst durch kleinste entzündliche Prozesse die Integrität und Funktion des Organs bedroht werden kann. Neben den Reproduktionsorganen sind die bekanntesten Beispiele Auge und Gehirn, in denen trotz Anwesenheit von Immunzellen keine typische Immunantwort erfolgt oder anders verläuft als in anderen Geweben (Green & Ferguson, 2001). Auch bei der Rückbildung der CL der Maus treten trotz Anwesenheit einer hohen Zahl von Immunzellen keine Entzündungserscheinungen (vermehrte Durchblutung, Thrombenbildung, Nekrose etc.) auf, sondern als typisches Zeichen der Apoptose die Oligonukleosomen-Formation (Arends et al., 1990) in den Lutealzellen. Den Immunzellen, insbesondere den Makrophagen, kommt dabei vermutlich die Aufgabe zu, durch rasche

Phagozytose die apoptotischen Zellen abzubauen, so dass eine Lyse der apoptotischen Zellen vermieden wird. Dies ist als Schutzmechanismus anzusehen, um die restlichen intakten Zellen bzw. Zelltypen keinen entzündlichen Prozessen auszusetzen (Pate & Keyes, 2001).

Zur Rolle von Galektin-3 in den Makrophagen gibt es einige Untersuchungen, die nahe legen, dass Galektin-3 eine wichtige Rolle für die Funktionsfähigkeit der Makrophagen spielt. Dieses Lektin wird deutlich hochreguliert, wenn Monozyten zu Makrophagen differenzieren. Sano et al. (2000) legten dar, dass extrazelluläres Galektin-3 an der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen mit Hilfe eines parakrinen Mechanismus beteiligt ist. Demgegenüber ist intrazelluläres Galektin-3 nach Sano et al. (2003) in den Phagozytosemechanismus, der der Beseitigung apoptotischer Zellen dient, miteinbezogen. Bei den Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tieren konnten die Autoren eine um etwa 24 Stunden verzögerte Phagozytoserate *in vitro* und *in vivo* beobachten. Schließlich ist intrazelluläres Galektin-3 offensichtlich auch für das Überleben der Makrophagen wichtig, nämlich als antiapoptotisches Molekül. Bei Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tieren war eine höhere Apoptoserate von Peritonealmakrophagen zu beobachten (Hsu et al., 2000). Beide intrazellulären Funktionen waren allerdings erst nach der Induktion einer Entzündung im Peritoneum zu sehen. Die Verhältnisse beim Corpus luteum sind jedoch anders zu betrachten und die aus der Literatur angeführten Befunde führen im Fall der Funktionsklärung von Galektin-3 im Ovar nicht weiter. Gerade bei der Regression der CL sind Entzündungsvorgänge zu vermeiden. Dadurch sollen intakte Zellen der CL und des restlichen Ovars nicht in ihrer Integrität und Funktion gefährdet werden. Insofern ist es fraglich, ob sich diese zum großen Teil in *in vitro* Experimenten gewonnenen Erkenntnisse auf das kompakte Organsystem Corpus luteum bzw. Ovar übertragen lassen. Trotzdem wurde versucht, den Angaben in der Literatur folgend, in einem abschließenden Experiment mögliche Unterschiede zwischen den Galektin-3 positiven Zellen im Wildtyp (Gal-3 $+/+$) Tier und den in den CL vorhandenen Immunzellen des Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tieres hinsichtlich der Apoptose herauszufinden. Dazu wurde ein Antikörper gegen aktivierte Caspase-3, der zentralen Protease der proapoptotischen Signaltransduktionskaskade, die in CL in Regression deutlich hochreguliert wird (Carambula et al., 2002), eingesetzt. Um aktiviert zu werden, muß die Caspase-3 proteolytisch gespalten werden (cleavage). Somit wurde hier der Versuch gemacht, mit einem Antikörper gegen cleaved Caspase-3 apoptotische Zellen im Verlauf der lutealen Regression darzustellen. Parallel dazu wurde der TUNEL Test eingesetzt, der in der zeitlichen Reihenfolge der apoptotischen Ereignisse das Folgegeschehen der aktivierten Caspase-3 zeigt. Der TUNEL Test weist nämlich DNA-Doppelstrangbrüche nach. Bereits

72 Stunden nach der Applikation von HCG zeigten sich sowohl cleaved Caspase-3 als auch TUNEL positive Zellen in den CL. 96 Stunden p. i. sind zwar deutlich weniger cleaved Caspase-3 positive Zellen zu sehen, aber die Zahl der TUNEL positiven Zellen hat stark zugenommen. In diesem Stadium des Zyklusverlaufs zeigte sich auch eine stark positive Reaktion der CL auf Anti-Galektin-3 IgG und somit ein CL in fortgeschrittener Regression. Sowohl bei der immunhistochemischen Detektion von cleaved Caspase-3 positiven Zellen sowie in den TUNEL Tests zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp (Gal-3 +/+) und Knock-out (Gal-3 -/-) Mäusen. Allerdings ist zu bedenken, dass die Anzahl der in einer immunhistochemischen Färbung sichtbaren apoptotischen Zellen oft sehr gering ist und nur einen kleinen Einblick in das apoptotische Geschehen in einem Gewebe gibt. Savill (1997) stellte fest, dass eine als Bedrohung erkannte apoptotische Zelle innerhalb von 1-2 Stunden aufgrund des raschen Abbaus durch Makrophagen phagozytiert wird. Selbst wenn die Apoptoserate niedrig scheint, kommt es zu einem raschen Verschwinden des Gewebes: wenn man davon ausgeht, dass in einem histologischen Schnitt, der immer nur eine Momentaufnahme der Situation darstellen kann, 1 % der Zellen apoptotisch ist und die Säuberung durch die Makrophagen ca. 1 Stunde in Anspruch nimmt, dann werden innerhalb von 24 Stunden 25 % des Gewebes verschwunden sein (Savill, 1997). Gerade im Ovar als sog. immunprivilegierten Organ (siehe Literaturteil) ist eine rasche Elimination von apoptotischen Zellen wichtig, bevor es durch die Lyse dieser Zellen zu einer Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes kommen kann.

Neben den CL konnten bei atretischen Follikeln apoptotische Zellen sowohl mit Anti-cleaved Caspase-3 IgG als auch im TUNEL Test dargestellt werden. Interessanterweise war zu beobachten, dass präantrale atretische Follikel im TUNEL Test zwar positiv waren, aber nicht für cleaved Caspase-3. Diese Ergebnisse deckten sich mit den von Morita & Tilly (1999) bzw. Tilly (2001) festgestellten Befunden, dass Atresie vom Primordialfollikel bis zum präantralen Primärfollikel von der Oozyte ausgeht. Außerdem ist sie Caspase-2 abhängig (Johnson & Bridgham, 2002). Wenn im weiteren Entwicklungsverlauf vom antralen bis zum präovulatorischen Follikel ein Follikel atretisch wird, so zeigt sich das zuerst an apoptotischen Zellen in der Granulosazellschicht. Auf dieser Entwicklungsstufe ist die Apoptose Caspase-3 abhängig (Matikainen et al., 2001).

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Galektinexpression in den männlichen Reproduktionsorganen Hoden und Nebenhoden. Hier wurde die postnatale Entwicklung dieser Organe von der ersten bis zur sechsten Lebenswoche verfolgt und ebenso Galektin-3

Wildtyp (Gal-3 +/+) Mäuse und Galektin-3 Knock-out (Gal-3 -/-) Mäuse untersucht. Trotz anderer Resultate im RT-PCR Experiment, das außer für murines Galektin-2 für alle untersuchten Galektine Amplifikate zeigte, konnten im Western Blotting im Hoden lediglich Galektin-1 und im Nebenhoden Galektin-1 und Galektin-3 proteinchemisch nachgewiesen werden. Gleich wie am Ovar konnten auch hier keine Unterschiede im Phänotyp der Knock-out (Gal-3 -/-) Mäuse aufgezeigt werden. Somit werden nur die Befunde bei den Wildtyp (Gal-3 +/+) Mäusen diskutiert.

Die Galektin-1 Expression in Hoden und Nebenhoden war über den gesamten postnatalen Entwicklungszeitraum dabei relativ konstant, während für Galektin-3 im Nebenhoden eine sowohl segmentspezifische als auch entwicklungsabhängige Expression beobachtet wurde. Die immunhistochemische Untersuchung des Hodens mit Anti-Galektin-1 IgG ergab u. a., dass Sertoli-Zellen Galektin-1 exprimierten. Diese sind somatische Zellen, die sich von der Basalmembran (Lamina basalis) bis ins Lumen der Tubuli seminiferi contorti erstrecken, mit Schlüsselfunktionen in der Ausbildung der Blut-Hoden Schranke und der Spermatogenese (Griswold, 1998). In allen Stadien der Spermatogenese stehen die sich entwickelnden Keimzellen in engem Kontakt mit den Sertoli-Zellen. Dies erleichtert die Entwicklung der Keimzellen zu Spermatozyten und die Kontrolle des Milieus innerhalb der Tubuli seminiferi contorti durch parakrine Signalübertragung. Viele Funktionen der Sertoli-Zellen werden durch eine Vielzahl von Proteinen bewirkt, die an das adluminal Kompartiment abgegeben werden, wie z.B. Inhibin (Rüsse & Sinowatz, 1991). Auch immunsuppressive Substanzen werden von diesen Zellen produziert (Filippini et al., 2001).

Wollina et al. (1999) beschrieben immunhistochemisch das Vorhandensein von Galektin-1 im humanen Hoden. Die immunhistochemischen Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression und Lokalisation dieses Zucker-bindenden Proteins während der verschiedenen Stadien des Keimepithelzyklus in enger Beziehung zur Spermatogenese moduliert wird. Obwohl in allen Tubuli seminiferi contorti Galektin-1 in den Sertoli-Zellen exprimiert wurde, waren zum einen Samenkanälchen vorhanden, in denen der gesamte Zellkörper bzw. die Sertoli-Zellen basal gefärbt waren, zum anderen Samenkanälchen, in denen die Färbung auf die apikalen Fortsätze der Sertoli-Zellen beschränkt war. Laut Dettin et al. (2003) wird in den Sertoli-Zellen in den Stadien der Spermiation Galektin-1 in den apikalen Prozessen, die die reifen Spermatozoen enthalten, exprimiert, anschließend findet sich Galektin-1 wieder im basalen Bereich der Sertoli-Zellen und breitet sich von dort über die ganze Zelle aus.

Sertoli-Zellen sind zyklisch aktiv, was bedeutet, dass dies eine differentielle Expression einer Reihe von Genen während der verschiedenen Stadien der Spermatogenese zur Folge hat (Parvinen, 1993). In diesem Sinn werden eine Reihe von Wachstumsfaktoren und immunosuppressiven Substanzen, die von den Sertoli-Zellen stammen, während der Perioden der meiotischen Teilungen abgegeben, während andere nur während der Stadien der Spermiation synthetisiert werden (Griswold, 1995). Auch die vorliegenden immunhistochemischen Befunde dieser Untersuchung, die eine unterschiedliche Lokalisation von Galektin-1 zeigten, lassen vermuten, dass diese somatischen Zellen mindestens zwei unterschiedliche Funktionszustände aufweisen. Dies belegten auch Timmons et al. (2002) mit dem Befund, dass die Höhe der Galektin-1 mRNA Expression in der Maus in Abstimmung mit dem Keimepithelzyklus reguliert wird. Dies geschieht in zwei Phasen, nämlich auf hohem Niveau in den Sertoli-Zellen der Stadien X-XII und in nahezu nicht detektierbaren Mengen in den Sertoli-Zellen der Stadien VII-VIII.

Um Hinweise auf die mögliche physiologische Relevanz von Galektin-1 in den Sertoli-Zellen in Bezug auf die sich differenzierenden Keimzellen zu erhalten, muß man in Betracht ziehen, dass es sich beim Hoden, ähnlich wie beim Ovar um ein immunprivilegiertes Organ handelt (siehe oben). Die Faktoren, die dazu beitragen, sind im Falle des Hodens die Blut-Hoden-Schranke und die lokale Produktion von immunosuppressiven Zytokinen und proapoptotischen Faktoren (Turek et al., 1996; Filipinni et al., 2001). Nachdem Galektin-1 die T-Zellen Homöostase reguliert, könnte es sich hier um einen alternativen Mechanismus handeln mit dessen Hilfe Apoptose in infiltrierenden T-Zellen induziert wird. Diese Rolle von Galektin-1 könnte zudem auch von Leydig-Zellen verstärkt werden, die ebenso Galektin-1 exprimieren. Interessanterweise sind diese hormonproduzierenden Leydig-Zellen an der Immunregulation beteiligt und können Lymphozytenaktivität hemmen (Hedger & Meinhardt, 2000, 2003). Eine mögliche andere Funktion von Galektin-1 in den Sertoli-Zellen kann noch in Betracht gezogen werden. Spermatogonien und Spermatozyten im Präleptotän besitzen eine hohe Apoptoserate, um überschüssige Mitosen auszugleichen und defekte Zellen zu eliminieren (Yin et al., 1998). Da Galektin-1 in den Sertoli-Zellen meistens in den Stadien nach der Spermiation exprimiert wird, könnte man vermuten, dass dieses Lektin in der Erhaltung der Organintegrität eine Rolle spielt, indem es mögliche beschädigende Immunreaktionen oder die Erzeugung defekter Keimzellen verhindert. Darüber hinaus könnte Galektin-1 in den Wechselwirkungen zwischen den Sertoli- und den Keimzellen und den Kontakten der Keimzellen untereinander eine Rolle spielen. Akama et al. (2002) zeigten in diesem Zusammenhang, dass N-Glykane eine Schlüsselrolle in den Adhäsionsprozessen

zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen spielen und dass spezifische Zucker für die Spermatogenese benötigt werden.

Die Expression von Galektin-3 im Hoden konnte im Western Blotting nicht nachgewiesen werden. In der Immunhistochemie war es jedoch möglich, eine enge räumlich Zuordnung zwischen den hormonproduzierenden Leydig-Zellen und (im jeweiligen Anschnitt) vereinzelt Galektin-3 positiven Makrophagen zu erkennen. Diese enge räumliche Beziehung legt nahe, dass Leydig-Zellen und im Interstitium vorkommende testikuläre Makrophagen funktionell in Beziehung stehen. Unter normalen physiologischen und nichtentzündlichen Bedingungen spielen Makrophagen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Leydig-Zellen. Falls Makrophagen nicht vorhanden sind findet keine normale Entwicklung der Leydig-Zellen statt. Vermutlich werden von Makrophagen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren abgegeben. Im Gegensatz dazu können aktivierte Makrophagen, die proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1 oder TNF α produzieren, die Bildung von Steroidhormonen hemmen und agieren vermutlich als Repressoren der Expression von Enzymen, die an der Steroidhormonbildung beteiligt sind (Hales, 2002; Hedger, 2002).

Die Reifung der Spermien, die den Hoden verlassen, erfolgt im Nebenhoden, dessen Wachstum und Funktion Androgen-abhängig ist. Während der Embryonal- und auch der postnatalen Entwicklung proliferieren die Epithelzellen relativ schnell und das Organ nimmt postnatal rasch an Umfang zu. Die immunhistochemische Untersuchung der postnatalen Entwicklung des Nebenhodens bei den Wildtyp (Gal-3 +/+) Tieren zeigte im Falle von Galektin-3 eine entwicklungsabhängige sowie segmentspezifische Expression. Diese segmentspezifische Expression ist charakteristisch für den Nebenhoden (Kirchhoff, 1999). Im Nebenhodenkopf wurde Galektin-3 über den gesamten Untersuchungszeitraum der postnatalen Entwicklung nur vereinzelt im Epithel exprimiert. Im Körper des Nebenhodens war postnatal in den beiden ersten Lebenswochen nur eine schwache Expression zu sehen. Ab der dritten Lebenswoche kam es zu einer starken Expression, die bis zum Ende des Untersuchungszeitraums aufrechterhalten wurde. Im Nebenhodenepithel adulter Tiere blieb diese Expression weiterhin erhalten. Auch im Bereich des Epithels des Nebenhodenschwanzes war die Expression von Galektin-3 vergleichbar zum Nebenhodenkörper entwicklungsabhängig, fiel jedoch etwas schwächer aus.

Galektin-3 spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Phagozytose von IgG-opsonierten Partikeln, wie sich bei Galektin-3 Knock-out (Gal-3 -/-) Makrophagen zeigte (Sano et al., 2003). Die Mikropinozytose (Aufnahme von Flüssigkeit in eine Zelle) von löslichen

Substanzen war jedoch davon unbeeinflusst (Sano et al., 2003). Im Nebenhoden werden von den Ductuli efferentes und dem Anfangsteil des Nebenhodenkopfes 90 % der Seminalflüssigkeit aus dem Hoden rückresorbiert. Hier zeigte sich jedoch nur eine geringe Aktivität von Galektin-3. Im Nebenhodenkörper, in dessen Prinzipalzellen eine starke Aktivität von Galektin-3 nachgewiesen werden konnte, findet weiter Rückresorption, aber auch Sekretion statt, um selektiv das Milieu an die Bedürfnisse der reifenden Spermien anzupassen. Möglicherweise ist Galektin-3 für eine zielgerichtete Phagozytose nötig, wie sie anscheinend im Nebenhodenkörper stattfindet, jedoch nicht für die doch relativ unspezifische im Kopfbereich. Dass im Nebenhoden keine Folgeerscheinungen durch den Galektin-3 Mangel zu sehen waren, erklärt sich eventuell wieder durch die nicht-entzündlichen Bedingungen oder auch dadurch, dass die Resorption von löslichen Substanzen durch Fehlen von Galektin-3 nicht beeinträchtigt ist (Sano et al., 2003).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tiere weder im Verlauf des ovariellen Zyklus noch in der untersuchten postnatalen Entwicklung des Hodens und Nebenhodens mit den hier angewandten Untersuchungsmethoden phänotypische Veränderungen erkennen ließen. Derartige Schwierigkeiten beschrieben bereits Poirier & Robertson (1993), die Galektin-1-defiziente Mäuse erzeugten ohne phänotypische Veränderungen beobachten zu können. Die Autoren vermuteten, dass ein ähnliches Protein den Ausfall kompensieren konnte. Hsu et al. (2000) und Sano et al. (2003) beobachteten in Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen, von denen auch die in dieser Studie verwendeten Knock-out Mäuse abstammen, erst nach Aktivierung der Makrophagen durch Thioglycollat Veränderungen wie z. B. eine erhöhte Apoptoserate und verringerte Phagozytose. Ebenso war es Colnot et al. (1998) nicht möglich, in Galektin-1 und Galektin-3 Doppel-Knock-out Mäusen Veränderungen festzustellen.

Wird die Expression eines Galektins unterbrochen, so ist stets zu bedenken, dass in den meisten Organen bzw. sogar auf zellulärer Ebene in der RT-PCR oder Western Blot Analyse immer mehrere Galektine nachgewiesen werden können. Dies war auch in der vorliegenden Untersuchung der Fall. Weiterhin könnte vermutet werden, dass aufgrund einer ähnlichen Zuckerspezifität der Ausfall eines Galektins durch ein anderes kompensiert werden kann. Ein derartiger Effekt konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Bei den Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Tieren waren weder in den molekularbiologischen und biochemischen Analysen andere Galektine im Vergleich zum Wildtyp (Gal-3 $+/+$) hochreguliert, noch konnte in der Immunhistochemie eine Veränderung der Lokalisation von Galektin-1 bzw.-7 beobachtet werden. Jedes Galektin erfüllt vermutlich eine eigenständige

Funktion und trotz ähnlicher Bindungsspezifität in der Proteinfamilie der Galektine handelt es sich nicht um ein redundantes System. Demzufolge konnten Colnot et al. (2001) zeigen, dass in Galektin-3 Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen bei der Untersuchung der Ultrastruktur der Wachstumszone der Epiphysenfugen von langen Knochen Hinweise für eine erhöhte Rate an apoptotischen hypertrophen Chondrozyten zu finden waren. Offensichtlich muß die elektronenmikroskopische Untersuchung bzw. die detaillierte molekulare Analyse die phänotypischen Veränderungen darstellen. So bietet sich im letzteren Fall an, das Proteom der Corpora lutea von Wildtyp (Gal-3 $+/+$) und Knock-out (Gal-3 $-/-$) Mäusen in verschiedenen Stadien (Anbildung, Regression) mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zu vergleichen. Falls Unterschiede in der Proteinexpression auftreten, könnten die betroffenen Proteine mittels Massenspektrometrie und Datenbankanalyse bestimmt werden.

7. Zusammenfassung

Expression und Lokalisation von Galektinen im ovariellen Zyklus und in der postnatalen Entwicklung von Hoden und Nebenhoden bei der Maus

Die zyklischen Aktivitäten in Ovar und Hoden der Maus sind von einer Reihe von proliferativen und apoptotischen Ereignissen gekennzeichnet. Dadurch werden diese Organe zu interessanten Studienobjekten wenn es gilt, eine Proteinexpression mit Funktionen zu verknüpfen. Corpora lutea z. B., vorübergehende endokrine Drüsen, die aus den Resten ovulierter Follikel entstehen, zeigen hohe Zellproliferationsraten und während der Regression eine ausgedehnte Apoptose. Im Hoden zeigt der Zyklus der Spermatogenese und der Tubuli seminiferi contorti ein System von dynamischen Wachstumsprozessen aber auch von Apoptose, beeinflusst von den Sertoli- und Leydig-Zellen. Die Epithelzellen im Nebenhoden durchlaufen im Rahmen der postnatalen Entwicklung eine rasche Proliferation und Ausbreitung.

Von Galektinen glaubt man, dass sie an diesen zellulären Prozessen beteiligt sind. Um die Anwesenheit von Galektinen in diesen Organen zu überprüfen, wurden RT-PCR Analysen mit verschiedenen Galektin-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Dabei erhielten wir Signale von Galektin-1 und -3, bemerkenswerterweise aber auch von Galektin-2, -4, -6, -7, -8, -9 und -12. Zur Entschlüsselung der *in vivo* Funktion(en) eines bestimmten Galektins verglichen wir normale (C57BL/6NCrI, Gal-3 +/+) und Galektin-3 Knock-out Mäuse (C57BL/6NCrI, Gal-3 -/-). Als nächstes überprüften wir mit polyklonalen Antikörpern gegen Galektin-1, -3 und -7 die Proteinexpression im Western Blotting. Es zeigten sich verschiedene Ergebnisse für Galektin-1 und -3, und im Falle des Ovars ein sehr schwaches Signal für Galektin-7. In der im Folgenden durchgeführten Immunhistochemie zur Darstellung der zellulären Lokalisation ergaben sich verschiedene Färbemuster für die Galektine. Wie erwartet führte Anti-Galektin-3 IgG zu keinerlei Färbung beim Knock-out Tier (C57BL/6NCrI, Gal-3 -/-). Im Einzelnen zeigte sich eine diffuse Verteilung von Galektin-1 im ovariellen Stroma, daneben war es noch zusammen mit Galektin-7 im „ovarian surface epithelium“ zu finden. Galektin-3 hingegen fand sich v. a. in den Corpora lutea. Vermutlich wurde die Galektin-3-positive Reaktion durch Gewebemakrophagen verursacht, die positiv für Galektin-3 sind. Diese Zellen sollen eine Rolle bei der lutealen Regression haben, indem sie apoptotische Zellen phagozytieren, um eine entzündliche Reaktion zu verhindern.

Im Hoden wurde Galektin-1 v. a. in den Sertoli- und Leydig-Zellen gefunden, Galektin-3 fand sich nur bei den Makrophagen in der Nähe der Leydig-Zellen. Während Galektin-1 eine Rolle als immunsuppressives Lektin beim spermatogenen Zyklus haben könnte, könnte Galektin-3 für die Funktion der Makrophagen im Hoden nötig sein, die die Entwicklung der Leydig-Zellen beeinflussen. Das spatiotemporale Expressionsmuster von Galektin-3 im Nebenhoden, v. a. im Nebenhodenkörper, könnte für die resorptiven und sekretorischen Prozesse von Bedeutung sein, die für eine optimale Umgebung zur Reifung und Lagerung der Spermien sorgen.

8. Summary

Expression and Localisation of galectins during the ovarian cycle and the postnatal development of testis and epididymis

The cyclic activities of the murine ovary and testis are characterised by a series of proliferative and apoptotic events. They make these organ systems attractive study objects to link protein expression with effects. For example, corpora lutea, which are transient endocrine glands that evolve from the remnants of ovulated follicles, show high rates of cell proliferation and in the case of their regression extended apoptosis is present. In the testis the spermatogenic cycle and the tubuli seminiferi contorti cycle exhibit a system of dynamic growth processes and also apoptosis which will be influenced by Sertoli and Leydig cells. The epithelial cells in the epididymis undergo rapid proliferation and expansion during postnatal development.

In these cellular processes galectins are supposed to be involved. To detect galectin presence in these organs RT-PCR analyses were performed with a panel of galectin-type specific primer sets. We obtained signals for galectins-1 and -3 and, notably, also for galectins-2, -4, -6, -7, -8, -9, and -12. To delineate *in vivo* function(s) of a certain galectin, we compared normal mice (C57BL/6NCrl, gal-3 +/+) and galectin-3-knock-out mice (C57BL/6NCrl, gal-3 -/-). Next, expression on the protein level was investigated in Western blotting applying polyclonal antibodies against galectins-1, -3, and -7. We measured distinct signals of galectins-1 and -3, and only in the ovary a faint one in the case of galectin-7. Subsequently, we used immunohistochemistry to identify cellular localisation. Immunohistochemical staining showed distinct patterns for the tested galectins. As expected, no staining with antibodies against galectin-3 was found in galectin-3-knock-out mice (C57BL/6NCrl, gal-3 -/-). In detail, diffuse distribution of galectin-1 in the ovarian stroma was detected, and galectin-7 was localised in the ovarian surface epithelium where galectin-1 was also found, whereas galectin-3 staining was mostly confined to the corpora lutea. Presumably, the immune reaction is due to tissue macrophages which are positive for galectin-3. These cells are reported to have a function in corpora lutea regression, probably in the phagocytosis of apoptotic luteal cells to avoid inflammatory reactions.

In testis galectin-1 was mainly expressed in Sertoli and Leydig cells, whereas galectin-3 expression was restricted to macrophages associated to Leydig cells. Whereas galectin-1 may have a role during the spermatogenic cycle as an immunosuppressive lectin, galectin-3 may

contribute to the function of testicular macrophages which modulate Leydig cell development. The spatiotemporal expression of galectin-3 in the epididymis, especially in the corpus epididymidis, may be of importance for the resorption and secretion processes providing a proper environment for sperm maturation and storage.

9. Literaturverzeichnis

Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim H-RC, Raz A, 1997: Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57:5272-5276

Akama TO, Nakagawa H, Sugihara K, Narisawa S, Ohyama C, Nishimura S, O'Brien DA, Moremen KW, Millan JL, Fukuda MN, 2002: Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cells. *Science* 295:124-127

Albelda SM, Smith CW, Ward PA, 1994: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8:504-512

Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES, 1994: CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269:30761-30764

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH, 1990: Apoptosis - the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136:593-608

Ashwell G and Morell AG, 1974: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol.* 41:99-128

Ashwell G and Harford J, 1982: Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* 51:531-554

Austyn JM and Gordon S, 1981: F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11:805-815

Bagavandoss P, Kunkel SL, Wiggins RC, Keyes PL, 1988: Tumor necrosis factor α (TNF α) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology* 122:1185-1187

Barondes SH, 1988: Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.* 13:480-482

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DNW, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Leffler H, Liu F, Lotan R, Mercurio AM, Monsigni M, Pillai S, Poirier F, Raz A, Rigby PWJ, Rini JM, Wang JL, 1994a: Galectins: a family of animal galactose-binding lectins. *Cell* 76:597-598

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H, 1994b: Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 19:20807-20810

Bauer M, Reibiger I, Spänel-Borowski K, 2001: Leukocyte proliferation in the bovine corpus luteum. *Reproduction* 121:297-305

Bernerd F, Sarasin A and Magnaldo T, 1999: Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11329-11334

Behrman HR, Aten RF, Pepperell JR, 1991: Cell-to-cell interactions in luteinization and luteolysis. In *Ovarian Endocrinology* pp 190-225 Ed. SG Hillier. Blackwell Scientific Publication, London

Best CL, Pudney J, Welch WR, Burger N, Hill JA, 1996: Localization and characterization of white blood cell populations within the human ovary throughout the menstrual cycle and menopause. *Human Reproduction* 11:790-797

Bevilacqua M and Nelson RM, 1993: Selectins. *J. Clin. Invest.* 91:379-387

Boone DL and Tsang BK, 1998: Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol.Reprod.* 58:1533-1539

Bowen JM, Keyes PL, Warren JS, Townson DH, 1996: Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol. Reprod.* 54:1120-1127

Bowen JM, Towns R, Warren JS, Keyes PL, 1999: Luteal regression in the normally cycling rat: apoptosis, monocyte chemoattractant protein-1, and inflammatory cell involvement. *Biol Reprod.* 60:740-746

Bowen-Shauver JM and Telleria CM, 2003: Luteal regression: a redefinition of the terms. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:28

Bradford MM, 1976: A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254

Brännstrom M and Norman RJ, 1993: Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and the corpus luteum function. *Hum. Reprod.* 8:1762-1775

Braissant O and Wahli W, 1998: A simplified in situ hybridisation protocol using non-radioactively labelled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica* 1

Breton C, Mucha J, Jeanneau C, 2001: Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie*, 83:713-718

Britt KL and Findlay JK, 2002: Estrogen actions in the ovary revisited. *J. Endocrinol.* 175:269-276

Caffrey JL, Fletcher PW, Diekman MA, O'Callaghan PL, Niswender GD, 1979: The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions. *Biol. Reprod.* 21:601-608

Canning J, Takai Y, Tilly JL, 2003: Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. *Endocrinology* 144:9-12

Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Tilly JL, Rueda BR, 2002: Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 143:1495-1501

Cavicchia JC and Sacerdote FL, 1991: Correlation between blood-testis barrier development and onset of the first spermatogenic wave in normal and in busulfan-treated rats: a lanthanum and freeze-fracture study. *Anat. Rec.* 230:361-368

Cavicchio VA, Pru JK, Davis BS, Davis JS, Rueda BR, Townsen DH, 2002: Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by endothelial cells of the bovine corpus luteum: regulation by cytokines but not prostaglandin F₂ α . *Endocrinology* 143:3582-3589

Chen Y, Feng Q, Liu Y, 1999: Expression of the steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor and their regulation by tumor necrosis factor- in rat corpora lutea. *Biol. Reprod.* 60:419-427

Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S, 1989: The mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J. Exp. Med.* 170:1959-1972

Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S, 1990: Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 87:7324-7328.

Choe YS, Shim C, Choi D, Lee CS, Lee KK, Kim K, 1997: Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol. Reprod. Dev.* 48:261-266

Colnot C, Fowlis D, Ripoché MA, Bouchaert I, Poirier F, 1998: Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev. Dyn.* 211:306-313.

Colnot C, Sidhu SS, Balmain N, Poirier F, 2001: Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin 3 null mutant bones. *Dev Biol.* 229:203-214.

Cook GMW, 1995: Glycobiology of the cell surface: the emergence of sugars as an important feature of the cell periphery. *Glycobiology* 5:449-461

Cooper TG, 1998: Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53:119-136

Cornwall GA and Hann SR, 1995: Specialized gene expression in the epididymis. *J. Androl.* 16:379-383

Cornwall GA, Lareyre JJ, Matusik RJ, Hinton BT, Orgebin-Crist MC, 2002: Gene expression and epididymal function. In: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* pp 169-200 Eds B Robaire and BT Hinton. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York

Crider-Pirkle S, Billingsley P., Faust C, Hardy DM, Lee V, Weitlauf H, 2002: Cubilin, a binding partner for Galektin-3 in the murine utero-placental complex. *J. Biol. Chem.* 277:15904-15912

Cuasnicu PS, Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, DaRos VG, Morgenfeld MM, 2002: Changes in sperm proteins during epididymal maturation. In: Robaire B, Hinton BT (Eds) *The epididymidis. From molecules to clinical practice.* Plenum Press, NY, pp389-404

Davis JS and Rueda BR, 2002: The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci.* 7:d1949-1978

Detin L, Rubinstein N, Aoki A, Rabinovich GA, Maldonado CA, 2003: Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol. Reprod.* 68:51-59

DIG Application Manual for Filter Hybridization, 2000, Fa. Roche Diagnostics GmbH

Drickamer K, 1995: Increasing diversity of animal lectin structures. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 5:612-616

Drickamer K and Taylor ME, 1993: Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:237-264

Drummond AE and Findlay JK, 1999: The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 151:57-64

Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Jones ME, Kerr JB, O'Donnell L, Simpson ER, Findlay JK, 2002: Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191:27-33

Ferguson TA and Griffith TS, 1997: A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol. Rev.* 156:167-184

Filippini A, Riccioli A, Padula F, Lauretti P, D'Alessio A, De Cesaris P, Gandini L, Lenzi A, Ziparo E, 2001: Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum. Reprod.* 7:444-449

Fukuda M, 1995: Carbohydrate-dependent cell adhesion. *Bioorgan. Med. Chem.* 3:207-215

Fukuda M and Vliegenthart JFG (eds), 1999: Structure and biosynthesis of glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473:1-266

Gabius H-J, 1997: Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243:543-576

Gabius H-J, 2001: Glycohistochemistry: The why and how of lectin localisation. *Anat. Histol. Embryol.* 30:3-31

Gabius H-J, Ed., 2002: Special Issue on Animal Lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1572:163-434

Gabius H-J and Bardosi A, 1991: Neoglycoproteins as tools in glycohistochemistry. *Progr. Histochem. Cytochem.* 22:1-66

Gabius H-J, Siebert H-C, André S, Jiménez-Barbero J, Rüdiger H, 2004: Chemical biology of the sugar code. *ChemBioChem* 5:740-764

Gemmell RT, Stacy BD, Thornburn GD, 1976: Morphology of the regressing corpus luteum in the ewe. *Biol. Reprod.* 14:270-279

Green DR and Ferguson TA, 2001: The role of Fas ligand in immune privilege. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:917-924

Griswold MD, 1995: Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52:211-216

Griswold MD, 1998: The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9:411-416

Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA, Binart N, 2003: Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:12

Hakomori S and Igarashi Y, 1995: Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signalling. *J. Biochem. Tokyo* 118:1091-1101

Hales DB, 2002: Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 57:3-18.

Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, 1997: Association of expression of mRNA encoding the PGF₂ α receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fertil.* 109:45-51

Hedger MP, 2002: Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J. Reprod. Immunol.* 57:19-34

Hedger MP and Meinhardt A, 2000: Local regulation of T-cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J. Reprod. Immunol.* 48:69-80

Hedger MP and Meinhardt A., 2003: Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 58:1-26

Hees H und Sinowatz F, 2000: Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 3. Überarbeitete Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln

Hermo L, Oko R, Morales CR, 1994: Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int. Rev. Cytol.* 154:105-189

Holschbach C and Cooper TG, 2002: A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. *Reproduction* 123:517-525

Hsu DK, Zuberi RI, Liu F-T, 1992: Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J. Biol. Chem.* 267:14167-14174

Hsu DK, Yang R-Y, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung W-P, Liu F-T, 2000: Targeted disruption of the Galectin-3 Gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156:1073-1083

Hughes RC, 1992: Lectins as cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:687-692

Hughes RC, 1999: Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1473:172-185

Hurwitz A and Adashi EY, 1992: Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 84:C19-C23

Jegou B, 1991: Spermatids are regulators of Sertoli cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637:340-353

Jo T, Tomiyama T, Ohashi K, Saji F, Tanizawa O, Ozaki M, Yamamoto R, Yamamoto T, Nishizawa Y, Terada N, 1995: Apoptosis of cultured mouse luteal cells induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Anat. Rec.* 241:70-76

Johnson AL and Bridgham JT, 2002: Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* 124:19-27

Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF, 1993: Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132:249-254

Kaltner H and Stierstorfer B, 1998: Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat.* 161:162-179

Kasai K and Hirabayashi J, 1996: Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.* 119:1-8

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257

Kirchhoff C, 1999: Gene expression in the epididymis. *International Review of Cytology* 188:133-202

Komatsu K, Manabe N, Kiso M, Shimabe M, Miyamoto H, 2003: Changes in localization of immune cells and cytokines in corpora lutea during luteolysis in murine ovaries. *J Exp Zoolog Part A Comp Exp Biol.* 296:152-159

Kopitz J, von Reitzenstein C, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ, 1998: Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J. Biol. Chem.* 273:11205-11211

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A, 1998: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.* 46:327-334

Lee VH, Lee AB, Phillips EB, Roberts JK, Weitlauf HM, 1998: Spatio-temporal pattern for expression of Galectin-3 in the murine utero-placental complex: evidence for differential regulation. *Biol. Reprod.* 58:1277-1282

Liu F-T, 2000: Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin. Immunol.* 97:79-88

Liu F-T, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr, 1995: Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147(4):1016-1028

Liu F-T, Hsu DK, Zuberi RI, Hill PN, Shenhav A, Kuwabara I, Chen S-S, 1996: Modulation of functional properties of galectin-3 by monoclonal antibodies binding to the non-lectin domains. *Biochemistry* 35:6073-6079

Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K, 2004: Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. *Biochem. J.* 380:31-41

Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu F-T, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S, 2000a: Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int. J. Cancer* 85:545-554

Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W, 2000b: Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett.* 473:311-315

Martinez VG, Pellizzari EH, Diaz ES, Cigorraga SB, Lustig L, Denduchis B, Wolfenstein-Todel C, Iglesias MM, 2004: Galectin-1, a cell adhesion modulator, induces apoptosis of rat Leydig cells in vitro. *Glycobiology* 14:127-37

Massa SM, Cooper DNW, Leffler H, Barondes SH, 1993: L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry* 32:260-267

Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL, 2001: Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology* 142:2468-2480

McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC, 1999: Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79:263-323

Metzler M, Gertz A, Sarkar M, Schachter H, Schrader JW, Marth JD, 1994: Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during postimplantation development. *EMBO J.* 13:2056-2065

Mitchell SW, 1860: Researches upon the venom of the rattlesnake. *Smithsonian Contributions to Knowledge* XII:89-90

Moon B-K, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim H-RC, 2001: Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis. Implication of galectin-3 function during metastasis. *Am. J. Pathol.* 159:1055-1060

Morita Y and Tilly JL, 1999: Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology* 213:1-17

Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y, 2002: Determination of cell type specificity and estrous cycle dependency of monocyte chemoattractant protein-1 expression in corpora lutea of normally cycling rats in relation to apoptosis and monocyte/macrophage accumulation. *Biol. Reprod.* 67:1502-1508

Nickel W, 2003: The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* 270:2109-2119

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW, 2000: Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev.* 80:1-29

Ofek I and Doyle RJ, 1994: Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York

Olsen LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A, 1996: Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 137:3531-3539

Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lukas BK, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinett C, Binart N, Kelly PA, 1997: Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 11:167-178

Papanicolaou GN, 1941: Some improved methods for staining vaginal smears. *J. Lab. Clin. Med.* 26:1200-1205

Papanicolaou GN, 1954: Atlas of exfoliative cytology. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.

Parvinen M, 1993: Cyclic function of Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD (eds.), *The Sertoli Cell*, 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press, vol. 1:349-364

Pate JL and Keyes PL, 2001: Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction* 122:665-676

Pedersen T and Peters H, 1968: Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 17:555-557

Penny LA, Armstrong D, Bramley TA, Webb R, Collins RA, Watson ED, 1999: Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrus cycle and after induced luteolysis. *J. Reprod. Fertil.* 115:87-96

Pepling ME and Spradling AC, 2001: Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.* 234:339-351

Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG, 1995: Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736-739

Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG, 1997: Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* 185:1851-1858

Petrovská M, Dimitrov DG, Michael SD, 1996: Quantitative changes in macrophage distribution in normal mouse ovary over the course of the estrous cycle examined with an image analysis system. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36:175-183.

Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD, Dorsett J, Lee V, Weitlauf H, 1996: Differential expression of two beta-galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol. Reprod.* 55:548-558

Poirier F, Robertson EJ, 1993: Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 119:1229-1236

Pöllänen P, von Euler M, Soder O, 1990: Testicular immunoregulatory factors. *J. Reprod. Immunol.* 18:51-76

Powell LD and Varki A, 1995: I-type lectins. *J. Biol. Chem.* 270:14243-14246

Probstmeier R, Montag D, Schachner M, 1995: Galectin-3, a β -galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. *J. Neurochem.* 64:2465-2472

Quirk SM, Harman RM, Huber SC, Cowan RG, 2000: Responsiveness of mouse corpora luteal cells to Fas antigen (CD95)-mediated apoptosis. *Biol. Reprod.* 63:49-56

Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE, 1998: Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J. Immunol.* 160:4831-4840.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu F-T, Iacobelli S, 2002a: Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response. *Trends. Immunol.* 23:313-320

Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L, 2002b: Unlocking the secrets of Galectins: a challenge at the frontiers of glycoimmunology. *J. Leukoc. Biol.* 71:741-752

Reichert F and Rotschenker S, 1999: Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. *Exp. Neurol.* 160:508-514.

Reuter G und Gabius H-J, 1997: Protein-Glykosilierung: Struktur, Funktion und pharmazeutische Bedeutung. *Deutsche Apotheker Zeitung* 137(16):43-61

Reuter G and Gabius H-J, 1999: Eukaryotic glycosylation – whim of nature or multipurpose tool? *Cell. Mol. Life Sci.* 55:368-422

Riley JCM and Behrman HR, 1991: Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198:781-791

Rini JM, 1995: Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:551-577

Risk M and Gibori G, 2001: Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. In: *Prolactin* (Edited by: Horseman ND) Boston, Kluwer Academic Publishers 265-295

Robker RL and Richards JS, 1998: Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip I. *Mol. Endocrinol.* 12:924-940

Robles R, Morita Y, Mann KK, Perez GI, Yang S, Matikainen T, Sherr DH, Tilly JL, 2000: The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. *Endocrinology* 141:450-453

Romeis, 1989: *Mikroskopische Technik*, 17. Auflage, Urban & Schwarz

Rueda BR, Tilly KI, Hansen TR, Hoyer PB, Tilly JL, 1995: Expression of superoxid dismutase, catalase and glutathion peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endocrine* 3:227-232

Rüsse I und Sinowatz F, 1991: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey-Verlag. Berlin, Hamburg

Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N, Yonehara S, 1997: Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol. Reprod. Dev.* 47:11-18

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu F-T, 2000: Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165:2156-2164

Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu F-T, 2003: critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* 112:389-397

Sato M, Nishi N, Shoji H, Kumagai M, Imaizumi T, Hata Y, Hirashima M, Suzuki S, Nakamura T, 2002: Quantification of galectin-7 and its localisation in adult mouse tissue. *J. Biochem. (Tokyo).* 131:255-260

Sato S, Burdett I, Hughes RC, 1993: Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp. Cell Res.* 207:8-18

Sato S and Hughes RC, 1994: Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J. Biol. Chem.* 269:4424-4430

Savill J, 1997: Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British Medical Bulletin* 53:491-508

Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD, 1990: Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF 2α . *Domest. Anim. Endocrinol.* 7:229-238

Schachter H (ed), 1999: Molecular basis of glycoconjugate disease. *Biochim. Biophys. Acta,* 1455:61-418

Seiler P, Wenzel I, Wagenfeld A, Yeung C-H, Nieschlag E, Cooper TG, 1998: The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *International Journal of Andrology* 21:217-226

Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM, 2004: Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. *Circulation*. [Epub ahead of print]

Sharon N and Lis H, 1989: Lectins as recognition molecules. *Science* 246:227-234

Sharon N and Lis H, 1997: Glycoproteins: structure and function. In: *Glycosciences: Status and perspectives*, Gabius H-J and Gabius S (eds) pp. 133-162; Chapman & Hall, London-Weinheim

Shi Y, 2002: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*. 9:459-470

Siebert HC, Andre S, Lu SY, Frank M, Kaltner H, van Kuik JA, Korchagina EY, Bovin N, Tajkhorshid E, Kaptein R, Vliegenthart JF, von der Lieth CW, Jimenez-Barbero J, Kopitz J, Gabius HJ, 2003: Unique conformer selection of human growth-regulatory lectin galectin-1 for ganglioside GM1 versus bacterial toxins. *Biochemistry* 42:14762-14773

Simpson PJ, Fantone JC, Lucchessi BR, 1987: Myocardial ischemia and reperfusion injury: oxygen radicals and the role of the neutrophil. In: *Oxygen Radicals and Tissue Injury*, edited by B. Halliwell. Bethesda, MD: FASEB, 63

Skinner MK, 1993: Secretion of growth factors and other regulatory factors. In: Russel LD, Griswold MD (eds), *The Sertoli Cell*, vol. 1, 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press, 237-248

Stillmark H, 1888: Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen. Dorpat: Schnakenburg's Buchdruckerei, Inaugural-Dissertation

Sylvester SR, Skinner MK, Griswold MD, 1984: A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 31:1087-1101

Takaya R, Fukaya T, Sasano H, Suzuki T, Tamura M, Yajima A, 1997: Macrophages in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Human Reproduction* 127:1508-1512

Terranova PF, 1997: Potential roles of tumor necrosis factor-alpha in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14:1-15

Tilly JL, 1996: The molecular basis of ovarian cell death during germ attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Frontiers in Bioscience*, 1:d1-d11

Tilly JL, 1997: Apoptosis and the ovary: a fashionable trend or food for thought. *Fertil. Steril.* 67:226-228

Tilly JL, 2001: Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:838-848

Timmons PM, Rigby PW, Poirier F, 2002: The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development.* 129:635-647

Townson DH, Warren JS, Flory CM, Naftalin DM, Keyes PL, 1996: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the corpus luteum of the rat. *Biol. Reprod.* 54:513-520

Turek PH, Malkowicz SB, Tomaszewski JE, Wein AJ, Peehl D, 1996: The role of Sertoli cells in active immunosuppression in the human testis. *Br. J. Urol.* 77:891-895

Ullmann SL, Russell AJ, Mason JJ, Selwood L. 2003: Species differences in the ovarian distribution of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta⁵ \rightarrow ⁴ isomerase (3 β -HSD) in two marsupials: the brushtail possum *Trichosurus vulpecula* and the grey, short-tailed opossum *Monodelphis domestica*. *Reproduction* 125:65-73.

Varki A, 1993: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97-130

Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG, Miceli MC 1999: Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 162:799-806

Wollina U, Schreiber G, Gornig M, Feldrappe S, Burchert M, Gabius HJ, 1999: Sertoli cell expression of galectin-1 and -3 and accessible binding sites in normal human testis and Sertoli cell only-syndrome. *Histol. Histopathol.* 14:779-84

Wu XM and Carlson JC, 1990: Alterations in phospholipase A2 activity during luteal regression in pseudopregnant and pregnant rats. *Endocrinology* 127:2464-2468

Yang R-Y, Hsu DK, Liu F-T, 1996: Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6737-6742

Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E, Cooper TG, 1994: Basal cells of the human epididymis - antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.* 50:917-926

Yin Y, Stahl BC, De Wolf WC, Morgentaler A, 1998: p53-Mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev. Biol.* 204:165-171

Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF, Brannian JD 1998: Macrophages are the major source of tumor necrosis factor alpha in the porcine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 59:1385-1391

Zhong L, Parmer TG, Robertson MC, Gibori G, 1997: Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:587-592

Verwendete Geräte:

Brutschrank	Fa. Memmert, Schwabach
Dampfsterilisator	Varioklav [®] , Fa. H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Diafilme	Kodak Ektachrome 64T Tungsten (EPY 135-36), Fa. Kodak Limited, England
Einbettautomat	TISSUE-TEK [®] V.I.P. [™] , SAKURA, Distributed by Bayer Diagnostics, 1992, Made in Japan
Gefriermikrotom	Frigocut E 2800, Reichert-Jung GmbH, Nußloch Messer Original Jung C
Gel Dokumentation Gelkammern	Gel Doc 2000 Software: Quantity One 4.1.1, Fa. Bio-Rad für Northern-Blot: Sub-Cell [®] GT cell für Agarosegelelektrophorese: Wide Mini-Sub [®] Cell GT und Mini-Sub [®] Cell GT, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geltrockner	Gel Dryer Model 543, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasflasche	Pyrex, Fa. Präzisions-Glas & Optik GmbH, Iserlohn
Homogenisator	Ultra-Turrax [®] T8 Dispergierwerkzeug S8N-5G, Dispergierstab S25N-8G, IKA [®] -Werke GmbH & Co KG, Staufen
Hybridisierungsöfen	Fa. WTB Binder, Tuttlingen
Insulinspritzen	Fa. HEILAND VET GmbH & Co. KG, Hamburg
Kamera	Olympus SC 35, Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikroplate-Reader	Model 550, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München Laboratories, München
Mikroskop	Olympus BH-2, Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrotom Klängen	R 35 Feather Safety Razor CO., LTD
Mikrowelle	Model M633, Fa. Samsung, Korea
Orbitalschüttler	Ika-Vibrax-VXR, IKA [®] -Werke GmbH & Co KG, Staufen
Photometer	Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Fa. Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Power-Supply	Power Pac 3000, Fa. Bio-Rad Laboratories, München
Präparierbesteck	Fa. HEILAND VET GmbH & Co. KG, Hamburg
Rotationsmikrotom	Supercut 2050, Reichert-Jung GmbH, Nußloch

Rotator	„Roto-Torque“, Model No. 7637-10, Fa. Cole-Parmer Instrument Company, USA
Scanner	Coolscan 5000, Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf
Schüttler	Fa. Johanna Otto GmbH, Hechingen
SDS-Page Apparatur	Mini-PROTEAN [®] II cell und Mini-PROTEAN [®] 3 cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sicherheitswerkbank	Mikroflow Klasse2, Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Sterilfilter	Spritzenfilter steril, 0,22 µm, Zellulosemischester, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Strecktisch für Objektträger	OTS 30, medite Medizintechnik, Burgdorf
Thermocycler	Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH, Hamburg Cyclone 25, Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV-Crosslinker (BLX-254)	Fa. Vilber Lourmat, Frankreich
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Concentrator, Bachofer, Reutlingen
Wasserbad	Thermostat 2761, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Western Blotting Apparatur	Mini Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D, Fa. Eppendorf AG, Hamburg Centrifuge 5415 C, Fa. Eppendorf AG, Hamburg Kühlzentrifuge Z 382K, Fa. Hermle Labor Technik GmbH, Wehingen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-J. Gabius danke ich für die Überlassung des Themas und für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. H. Kaltner für die ausgezeichnete fachliche Betreuung und den unermüdlichen persönlichen Einsatz.

Herrn Prof. Dr. M. El-Matbouli danke ich für seine immer gewährte freundliche Unterstützung in allen Belangen.

Frau Dr. B. Stierstorfer, Frau S. Mitterer und Frau K. Vogt danke ich für die technische Unterstützung und dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau Dr. C. Böck, Frau L. Mantel und Frau A. Helfrich danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft im Labor und für die moralische Unterstützung.

Martin Knaus danke ich für seinen Einsatz in vielen organisatorischen Dingen.

Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka danke ich für die Betreuung der Tiere.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.