

Aus dem Lehrstuhl für Tieranatomie II
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz
Veterinärwissenschaftliches Department
Ludwig-Maximilians-Universität München

HISTOLOGISCHE, HISTOCHEMISCHE UND
ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN AM
OVAR DER WACHTEL
(*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*)

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität

von
Daniela Rodler
aus München

München 2009

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz
Korreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Korbel Univ.-Prof. Dr. Gehlen Priv.-Doz. Dr. Fischer Priv.-Doz. Dr. Breuer

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Gewidmet

Emmy Dalchau

1	EINLEITUNG.....	5
2	LITERATURÜBERSICHT	6
2.1	Makroskopische Anatomie des Vogelovars	6
2.2	Mikroskopische Anatomie des Vogelovars	8
2.3	Oogenese und Follikulogenese.....	10
2.3.1	Entwicklung des linken aviären Ovars und Oogenese	10
2.3.2	Entwicklung des rechten aviären Ovars	12
2.3.3	Follikulogenese im linken aviären Ovar	12
2.3.4	Follikelatresie.....	17
2.4	Aviäre Perivitellinmembran	19
2.4.1	Definition	19
2.4.2	Aufbau und Struktur der aviären Perivitellinmembran	20
2.4.3	Die Rolle der Perivitellinmembran des Vogels bei der Befruchtung	23
2.5	Lektin histochemie	26
2.6	Immunhistochemie	29
2.6.1	Laminin	29
2.6.2	Konnexin 43	30
2.6.3	Vimentin.....	31
2.6.4	Smooth muscle actin (SMA).....	31
2.6.5	Zytokeratine (CK).....	32
2.6.6	Glykoproteine der Perivitellinmembran.....	33
3	MATERIAL UND METHODEN	34
3.1	Untersuchungsorgane	34
3.2	Materialvorbereitung für die Lichtmikroskopie	34

3.3	Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen	35
3.4	Lektin histochemie	37
3.5	Immunhistochemie	41
3.6	Elektronenmikroskopie.....	45
3.7	RNA-in-situ-Hybridisierung.....	46
4	ERGEBNISSE	49
4.1	Konventionelle histologische Färbungen	49
4.1.1	Übersicht über den Aufbau des Ovars.....	49
4.1.2	Ovarepithel und Tunica albuginea	49
4.1.3	Primordialfollikel	50
4.1.4	Prävitelline Follikel.....	50
4.1.5	Vitelline Follikel	51
4.1.6	Atretische Follikel.....	53
4.2	Glykohistochemische Untersuchungen	59
4.2.1	Bindungsstellen für Canavalia ensiformes Agglutinin (Con A).....	59
4.2.2	Bindungsstellen für Lens culinaris Agglutinin (LCA).....	59
4.2.3	Bindungsstellen für Arachis hypogaea Agglutinin (PNA).....	60
4.2.4	Bindungsstellen für Ricinus communis Agglutinin (RCA)	60
4.2.5	Bindungsstellen für Glycine max Agglutinin (SBA)	61
4.2.6	Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)	61
4.2.7	Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin (WGA)	61
4.2.8	Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin succinyliert (WGAs).....	62
4.2.9	Bindungsstellen für Ulex europaeus Agglutinin (UEA I).....	62
4.2.10	Bindungsstellen für Maacia amurensis Agglutinin (MAL I)	62

4.2.11	Bindungsstellen für Sambucus nigra Agglutinin (SNA).....	63
4.2.12	Bindungsstellen für Viscum album Agglutinin (VAA)	63
4.3	Immunhistochemische Untersuchungen.....	73
4.3.1	Nachweis von Laminin	73
4.3.2	Nachweis von Konnexin 43	76
4.3.3	Nachweis von Vimentin.....	78
4.3.4	Nachweis von smooth muscle actin (SMA).....	82
4.3.5	Nachweis von Pancytokeratin (PCK).....	85
4.3.6	Nachweis von Cytokeratin 5 (CK 5).....	88
4.3.7	Nachweis von Cytokeratin 15 (CK 15).....	91
4.3.8	Nachweis von Cytokeratin 18 (CK 18).....	91
4.3.9	Nachweis von Zona pellucida Protein 1 (ZP1)	93
4.3.10	Nachweis von Zona pellucida Protein A (ZPA, ZP2).....	97
4.3.11	Nachweis von Zona pellucida Protein C (ZPC, ZP3)	101
4.3.12	Nachweis von Zona pellucida Protein D (ZPD).....	104
4.4	RNA-in-situ-Hybridisierung.....	108
4.4.1	Nachweis von ZP1-mRNA in der Leber der Wachtel.....	109
4.4.2	Nachweis von ZP1-mRNA in den Granulosazellen der Wachtel	110
4.4.3	Nachweis von ZPC (ZP3)-mRNA in den Granulosazellen der Wachtel	111
4.5	Elektronenmikroskopie (TEM).....	112
4.5.1	Ultrastruktur der Primordialfollikel und der frühen prävitellinen Follikel	112
4.5.2	Ultrastruktur der späten prävitellinen Follikel und der vitellinen Follikel.....	125
4.5.3	Ultrastruktur des Keimdrüsenepithels.....	134
4.5.4	Ultrastruktur des weiteren Ovarstromas.....	138

5	DISKUSSION.....	147
6	ZUSAMMENFASSUNG	167
7	SUMMARY.....	169
8	VERZEICHNISSE.....	171
8.1	Literaturverzeichnis.....	171
8.2	Verzeichnis der Abkürzungen	205
8.3	Verzeichnis der Abbildungen	210
8.4	Verzeichnis der Tabellen.....	210
8.5	Verzeichnis der Bilder.....	211
9	ANHANG (Methodik).....	217
9.1	Lichtmikroskopie.....	217
9.1.1	Fixierung.....	217
9.1.2	Puffer.....	217
9.1.3	Lösungen.....	218
9.2	Elektronenmikroskopie.....	219
9.2.1	Lösungen.....	219
9.2.2	Puffer.....	220
9.2.3	Einbettung.....	220
9.2.4	Ergänzung.....	221
10	DANKSAGUNG	222

1 EINLEITUNG

In Japan wurden Wachteln schon seit 1595 gezüchtet und als Haustiere gehalten. In der heutigen Zeit sind Japanische Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) auch in Europa als Zuchttiere eingeführt worden. Sie spielen eine wirtschaftliche Rolle wegen ihrer Eier und ihres Fleisches, die als Delikatessen gehandelt werden. Auch in der medizinischen Forschung gewinnen sie zunehmend an Bedeutung, weil sie leicht zu halten sind, die Hennen bereits im Alter von 6 Wochen die Legetätigkeit beginnen und danach 8 - 12 Monate lang alle 16 - 24 Stunden ein Ei legen (Grzimek, 1969).

Im Jahre 1969 verfasste T.C. Fitzgerald das erste komplette Werk über Anatomie und Histologie der Japanischen Wachtel und stellt auch Vergleiche zum Haushuhn (*Gallus domesticus*) an. Verschiedene Arbeiten über die Histologie und die Embryologie des Ovars der Wachtel liegen ebenfalls vor, u.a. haben Kannankeril und Domm (1968) die Entwicklung der Gonaden beschrieben. In den letzten Jahren haben sich vor allem Sasanami et al. mit Struktur und Aufbau der aviären Perivitellinmembran der Japanischen Wachtel auseinandergesetzt, die wie die Zona pellucida der Säugetiere bei der Befruchtung eine wichtige Rolle spielt.

Da noch keine detaillierte Beschreibung der Histologie und Histochemie des Ovars der Japanischen Wachtel existiert und die Art, Herkunft und Kohlenhydratzusammensetzung der Glykoproteine der Perivitellinmembran immer noch kaum bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Organ mit lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, immun- und glykohistochemischen Methoden sowie mit RNA-in-situ-Hybridisierung untersucht, um weitere Erkenntnisse über dessen Aufbau und Funktion zu gewinnen.



Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*)

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Makroskopische Anatomie des Vogelovars

Bei den meisten Vögeln kommt nur das linke Ovar, Ovarium sinistrum, von zwei embryonal angelegten Eierstöcken zur Entwicklung (Ahne et al., 2000). Dies ist bedingt durch die früh einsetzende, die rechte Ovaentwicklung unterdrückende Östrogenproduktion der linken Keimdrüse. Infolge davon wird auch der rechte Eileiter nicht ausgebildet (Rüsse und Sinowatz, 2008). Nur bei manchen Greifvögeln und dem Braunen Kiwi findet sich auch ein rechtes Ovar. Der Habicht bildet damit sogar legereife Eier aus (King und McLelland, 1984).

Vogeloozyten sind die größten Eizellen im gesamten Tierreich. Bereits ab dem 7. Bruttag kann im linken Ovar eine Rindenzone (Cortex ovarii) mit primordiales Keimzellen, eine Markzone (Medulla ovarii) mit gut ausgebildeten Leitungsbahnen und ein die Tunica albuginea bedeckendes Keimepithel unterschieden werden, während einige wenige Ei- und Keimzellen, die in der Markzone des rechten Ovars vorhanden sind, dort lebenslang verbleiben (Nickel et al., 2004). Diese sehr deutliche Trennung von Rinden- und Markzone kann zu Beginn der Geschlechtsreife nicht mehr ausgemacht werden (König et al., 2009). Die Follikel des Vogelovars in der Legereife (6. - 8. Woche), die gestielt sind und in der Gesamtheit dem Organ ein traubenförmiges Aussehen verleihen, sind je nach Entwicklungsstadium unterschiedlich groß. Sie ragen mit zunehmendem Wachstum über die Oberfläche des Ovars hinaus und sind nach außen mit dem Keimdrüsenepithel und einer darunter liegenden dünnen Bindegewebsschicht versehen (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die Follikel sind, außer am Stigma folliculare, gut vaskularisiert. Letzteres ist ein meridional gelegener, heller Bezirk (König et al., 2004), der einen kreis- oder bogenförmigem Umriss aufweist. An dieser Stelle reißt die Follikelwand bei der Ovulation ein (Schwarze und Schröder, 1985). Rinde und Mark haben sich bis zur Pubertät zur Zona parenchymatosa bzw. Zona vasculosa umgewandelt, wobei letztere von Blutgefäßen, Nerven, interstitiellen Zellen (Stromazellen) und glatten Muskelzellen durchzogen ist. Die Zona parenchymatosa enthält zahlreiche -beim erwachsenen Huhn bis zu 1600- unterschiedlich große Follikel (Hummel, 2000), bei der Wachtel sind es nach Fitzgerald (1969) ca. 1000. Embryonal kann die Zahl der Eianlagen jedoch mehrere Millionen betragen. Durch Atresie nimmt im Laufe der Entwicklung die Zahl der Follikel stark ab (Salomon, 1993).

Die Größe eines unreifen Hühnerovars liegt bei ca. 15 x 5 mm bei einem Gewicht von ca. 0,5 g. Nach Eintritt der Geschlechtsreife wiegt das Organ ca. 60 g, was hauptsächlich auf die 4 - 6 größten Follikel zurückzuführen ist (Rüsse und Sinowatz, 2008). Ovarien des Huhns können eine Größe von 100 x 70 mm erreichen, die vor allem durch die Anzahl der dotterreichen sprungreifen Follikel bestimmt wird (Nickel et al., 2004). Das Gewicht eines unreifen Wachtelovars liegt nur bei ca. 0,1 g im Vergleich zu dem eines legenden Tieres, das ca. 5 - 7 g beträgt (Welty, 1962).

Ist der Vogel 28 - 30 Tage alt, nimmt auch das Gewicht des Ovars rapide zu. Es steigt im Vergleich zu den Tagen davor auf das 15 bis 29-fache an (Fitzgerald, 1969). Das in der Fortpflanzungsperiode erheblich vergrößerte Ovar einer Henne, welches auch nach dem Ovulationsvorgang das vollständige Follikelepithel behält, kann dann auch die ganze Bauchhöhle des Tieres ausfüllen (Ahne et al., 2000).

Topographisch liegt der linke Eierstock des Vogels ventral der Aorta descendens und der Vena cava caudalis in der Leibeshöhle. Dort liegt er kranial und auch zu einem Teil ventral des linken kranialen Nierenlappens. Kranial grenzt die Keimdrüse an die Lunge und kaudal an den Muskelmagen des Vogels (Salomon, 1993). Kaudal der Arteria mesenterica cranialis zieht ein gemeinsamer Stamm von der Aorta zum linken Nierenlappen und zum linken Ovar. Von dort zieht die Arteria ovarica sinister, die von der Arteria renalis cranialis sinistra abgeht, nach ventral und versorgt das linke Ovar mit vielen kleinen Ästen. Sie erreicht erst mit zunehmendem Entwicklungsstand des Eierstocks eine stärkere Ausprägung. Der Eileiter wird versorgt durch Äste der Arteria oviductalis cranialis, -cranialis accessoria, -media und -caudalis (Hashimoto et al., 1986). Bei Huhn, Gans und Taube geben die Arteriae oviductales craniales zusätzlich Äste an das Ovar ab. Das Vas lymphaticum ovaricum und die Äste des sympathischen Truncus paravertebralis bzw. des parasymphatischen Nervus vagus erreichen das Ovar durch den Hilus ovarii, der in der Facies dorsalis liegt. Eine Facies ventralis reicht verschieden weit in den Eingeweidebauchfellsack hinein, in dem das Ovar kraniodorsal liegt. Verbindungen zwischen den Facies werden als Margo lateralis bzw. -medialis bezeichnet, sind jedoch in der Form der wechselnden Dotterkugelbildung unterworfen. Da das Ovar in der Bauchhöhle peritoneal liegt, ist sein Gekröse, das Mesovarium, nur wenige Millimeter lang (Nickel et al., 2004). Die Brutdauer der Wachtel (meist keine Naturbrut mehr, da in der heutigen Zeit primär Selektion auf Legeleistung) liegt bei 15 - 16 Tagen. Die Tiere erreichen die Geschlechtsreife mit 1,5 - 2 Monaten. Die Wachtelhenne legt im 1. Jahr ca. 300 Eier (bei sehr guten Bedingungen täglich), wobei das Gewicht eines Eis ca. 10 g beträgt (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die Legetätigkeit der Vögel endet mit der Mauser (Salomon, 1993).

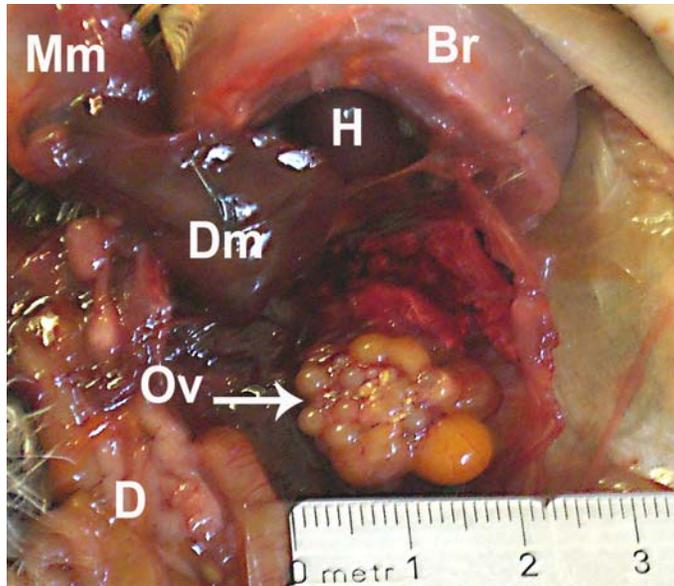


Bild 1 Freipräpariertes Ovar der Wachtel

Das Wachtelovar (Ov) hat hier eine Breite von ca. 20 mm, allerdings sind keine 2 - 3 größeren Dotterkugeln zu sehen, die einen alleinigen Durchmesser von 10 - 20 mm betragen können.

Auch ist das Ovar hier für die bessere Darstellung nach kaudal positioniert worden.

D = Darm, Br = Brustmuskulatur,
Dm = Drüsenmagen, H = Herz,
Mm = Muskelmagen

2.2 Mikroskopische Anatomie des Vogelovars

Das Vogelovar ist außen von Keimdrüsenepithel überzogen. Dieses ist einschichtig und besteht aus weitgehend iso- bis hochprismatischen Zellen, welche über den größeren Follikeln abgeflachter erscheinen, weil sie durch deren Wachstum stärker gedehnt werden. Das Keimdrüsenepithel überzieht die bindegewebige Tunica albuginea (Organkapsel), die sich in das Mesovarium fortsetzt. Die Tunica albuginea besteht vor allem aus kollagenen Fasern, die dicht und flächenhaft angeordnet sind. Eine deutliche Grenze zur darunter liegenden Rinde, Zona parenchymatosa, ist nicht klar auszumachen (Salomon, 1993).

Das Stroma der Rinde enthält neben kollagenen Fasern und Fibroblasten hauptsächlich Blutgefäße, Leukozyten und endokrine Zellen (Salomon, 1993). In der Rinde sind Oogonien und Follikel gelegen, die durch den Einfluss von FSH (Follikelstimulierendes Hormon) aus der Adenohypophyse an Größe zunehmen (Hummel, 2000). Das Mark des Vogelovars, Zona vasculosa, ist bindegewebig und enthält v.a. vegetative Nervenfasern und Blutgefäße (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die Follikel sind von der bindegewebigen Theka folliculi umgeben, die sich bei größeren Follikeln in die Theka folliculi externa und in die Theka folliculi interna aufteilt. Erstere ist von engmaschigen Kapillarnetzen durchzogen, die u.a. den Nährstoff- und Hormontransport zu und von den Follikeln gewährleisten. Diese äußere Thekaschicht erscheint als Netz von konzentrisch angeordneten, spindelförmigen Zellen (Fibroblasten) in Verbindung mit retikulären und kollagenen Fasern. Die Theka folliculi interna ist eher unregelmäßig angeordnet. Sie enthält neben Kollagenfasern und Fibroblasten große polyedrische Zellen, die man als Thekadrüsen(zellen) bezeichnet und die mitverantwortlich sind für die Produktion der Steroidhormone Östrogen und Progesteron (Schwarze und Schröder, 1985).

Die Basalmembran, eine spezialisierte Schicht der extrazellulären Matrix, trennt den Primordialfollikel gegen das Stroma, bzw. den reiferen Follikel von den Thekaschichten ab (van Wezel und Rodgers, 1996). Sie beeinflusst u.a. die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung der darunter liegenden Granulosazellen bzw. regelt die Passage von Molekülen (Rodgers et al., 2000; 2003). Die Basalmembran besteht aus einem Gitternetzwerk aus Kollagen Typ IV und Laminin. Eine Bindung von Entacin oder Nidogen stabilisiert dieses Netzwerk (Rodgers et al., 2000). Ein prominentes Heparansulfat-Proteoglycan, Perlecan, welches in der Basalmembran von Säugetieren vorhanden ist, wurde beim Huhn an dieser Stelle nicht nachgewiesen. Vielmehr ist das „Chicken Perlecan“ in der Theka externa zu finden und wird von den Thekazellen produziert. Es besitzt fünf kugelförmige Domänen und hat eine wichtige Funktion in der Regulation des Transports der Dottervorläufer-Lipoproteine vom Serum zur Oozyte. Das Chicken Perlecan bewirkt eine vorübergehende Zurückhaltung des VLDL „very low density lipoprotein“ (es kann VLDL wie ein Lipoproteinrezeptor binden) und anderer Serumkomponenten, die für den späteren Dotter bestimmt sind (Hummel et al., 2004).

Die zumeist einschichtigen iso- bis hochprismatischen Zellen der Follikelwand (Granulosazellen) bilden lange, mikrovilliartige Fortsätze aus, die einen hohen Gehalt an Zellorganellen und Vakuolen aufweisen und Progesteron produzieren. Diese Fortsätze reichen durch die in ihrer Mitte liegende Perivitellinmembran, Lamina perivitellina, hindurch und bilden gemeinsam mit den membranumgebenen Ooplasmaausläufern der Eizelle die sogenannte Zona radiata (Salomon, 1993). Die Perivitellinmembran, die die reife Eizelle von der Follikelwand abgrenzt, ist das Äquivalent der Zona pellucida der Säugetiere (King, 1975; Stewart et al., 2004). Das Ooplasma der eigentlichen Eizelle ist von einer Membran umgeben und diese umschließt beim reifen Follikel als „Ooplasmaring“ die Eizellbestandteile und das Dottermaterial. Jede Eizelle enthält einen verhältnismäßig großen Nucleus mit Nucleoli (Salomon, 1993).

Es existiert beim Vogel kein Liquor folliculi wie beim Säugetier, da die Eizelle mit dem Dotter den gesamten Raum des Follikels ausfüllt (Fitzgerald, 1969). Der ganze Follikel ist mittels eines Stils im Rindenstroma befestigt. Dieser ist von Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgeben und enthält ein dichtes Kapillarnetz und Nervenfasern (König et al., 2009). Bei der Ovulation, bei der das gefäßlose Stigma folliculare einreißt, wird das Ei von den Fimbrien des Infundibulums aufgenommen und fällt in dessen trichterförmige Öffnung, Ostium infundibulare. Das Infundibulum ist der kraniale Teil des Legedarms der Vögel. Der aviäre Legedarm entspricht dem Eileiter des Säugers. Die Follikelhöhle bleibt schließlich als Kelch, Calix, zurück, welcher sich schnell zurückbildet und beim Huhn bereits nach einer Woche nicht mehr nachweisbar ist (Salomon, 1993). Ob es nach der Ovulation zur Bildung eines Gelbkörpers kommt, der entweder aus Thekazellen der leeren Follikelhöhle oder aus atresierten Follikeln entstehen könnte, ist noch nicht geklärt (Aitken, 1966).

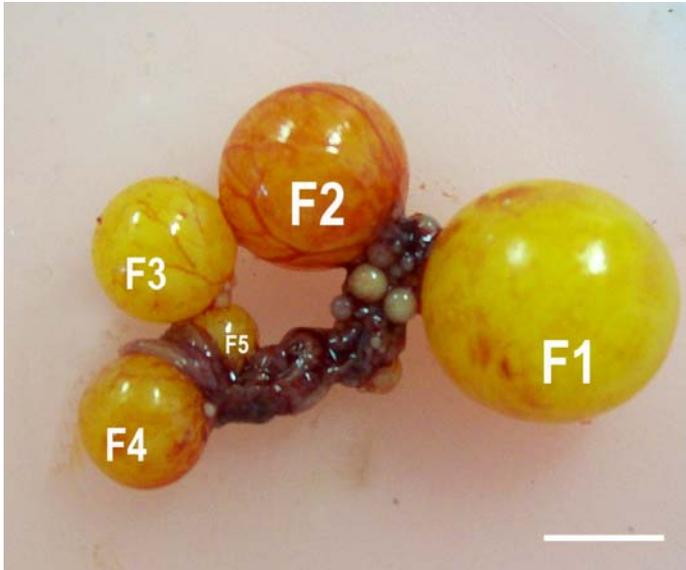


Bild 2 Freipräpariertes Ovar der Wachtel.

Das Ovar enthält die fünf größten Follikel, die in direkter Größen-Hierarchie zur Ovulation bereit stehen (siehe auch Tabelle 1: Einteilung der vitellinen Follikel (Wachtel) nach Sasanami et al. (2004)). SB = 10 mm

F5: 2 - 4 mm

F4: 4 - 8 mm

F3: 8 - 12 mm

F2: 12 - 15 mm

F1: > 15 mm

2.3 Oogenese und Follikulogenese

2.3.1 Entwicklung des linken aviären Ovars und Oogenese

Wie zuvor erwähnt, sind bei den meisten Vogelarten nur das linke Ovar und der linke Eileiter voll entwickelt und funktionsfähig. Gelegentliche Ausnahmen gibt es nur bei manchen Greifvogelarten und beim Braunen Kiwi (King und McLelland, 1984). Die Östrogenproduktion in einem frühen embryonalen Stadium bewirkt eine Unterdrückung der Ausbildung des rechten Ovars und bewirkt zudem einen Größenunterschied der Gonaden schon vor dem Schlüpfen des Kükens (Rüsse und Sinowatz, 2008).

Die Entwicklung der undifferenzierten linken Gonade der Wachtel beginnt ab einer Bebrütungszeit von 48 - 60 Stunden mit der Ankunft von runden bis ovalen Primordialkeimzellen, die extragonadalen Ursprungs sind, in der Gonadenanlage. Nach 3 - 3,5 Bebrütungstagen sind Genitaleisten erkennbar, die aus einem zwei- bis dreischichtigen Keimepithel bestehen, welches ein lockeres Mesenchym bedeckt. Am 4. Bebrütungstag beginnt, als knospenartige Überstände des Keimepithels deutlich erkennbar, die Proliferation der Zellen der medullären Keimstränge (primäre Keimstränge), die hauptsächlich aus Keimepithel und einigen eingebetteten Keimzellen bestehen. Zwischen diese primären Keimstränge schieben sich zahlreiche Mesenchymzellen, welche das Bindegewebsstroma sowie die primäre Tunica albuginea bilden (Kannankeril und Domm, 1968). Das Einwachsen der primären Keimstränge in die Gonadenanlage führt zur Entstehung der Medulla des Eierstocks beim weiblichen Tier bzw. der Tubuli seminiferi beim männlichen Tier (King und McLelland, 1984). Ab dem 6. Bebrütungstag beginnt die Proliferation der kortikalen Keimstränge (sekundäre Keimstränge), die hauptsächlich aus Keimzellen und einigen Zellen des Keimdrüsenepithels bestehen, während sich

besonders die hilusnahen medullären Keimstränge bis zum 8. Tag teilweise auflockern, vakuolisieren oder atrophieren. Am 10. - 11. Bebrütungstag stellt sich die kortikale Proliferation vom medio-ventralen Bereich des Ovars bis in den Kortex ein. Die kortikalen Keimstränge bleiben vom Epithel durch eine Schicht dichteren Bindegewebes getrennt, der Tunica albuginea (Kannankeril und Domm, 1968).

Ein Oogonium ist als eine sich aktiv teilende Ureizelle definiert. Nach mehreren Mitosen entstehen schließlich die Oozyten 1. Ordnung, die letzte Keimzellgeneration dieser proliferativen Phase. Bis zum Zeitpunkt des Schlüpfens verbleiben die Oozyten im Ovar in der Wachstumsphase, d.h. sie vergrößern sich durch Gonadotropin-stimulierte Einlagerung von in der Leber synthetisierten Dotterproteinen und Phospholipiden. Die Oozyten des Kortex befinden sich dabei in Prophase der 1. Meioseteilung und verbleiben bis zum Schlüpfen im Diplotänstadium, in dem die Chromosomen arretiert sind. Die Fortsetzung der 1. Reifeteilung der Meiose und ihr Abschluß erfolgt erst kurz vor der Ovulation (Nickel et al., 2004). Die Anzahl der Oozyten 1. Ordnung bei der sich entwickelnden Wachtel variiert von 28.000 am 9. Entwicklungstag, über 680.000 am 17. Tag und fällt dann auf ca. 480.000 am Tag des Schlüpfens zurück (Johnson, 1986). Das Follikelstimulierende Hormon (FSH) ist hierfür verantwortlich. Es steigert die Proliferationsrate und verzögert die meiotische Prophase (González-Morán, 1998). Durch die sogenannte TUNEL-Reaktion nach Chowdhury und Yoshimura (2002) konnte Apoptose der Keimzellen der Wachtel sowohl in Rinde als auch in Mark von einem 14 Tage alten Embryo und einem Eintagsküken nachgewiesen werden. Bei einem 7 Tage alten Küken war auch der Untergang von Oozyten in Follikeln zu beobachten. Ab einem Alter von 14 Tagen ist jedoch kaum noch Apoptose von Oozyten nachweisbar. Um abnormale Keimzellen zu vermeiden und auch um die Qualität der Oozyten zu sichern, scheint die Apoptose unmittelbar nach dem Schlüpfen eine wichtige Rolle zu spielen (Yoshimura und Nishikori, 2004).

Am 13. - 14. Bebrütungstag lässt sich erkennen, dass nur ein Teil der tatsächlich wachsenden Oozyten 1. Ordnung eine Follikelhülle besitzt. Die anderen verschwinden. Die Medulla, die am 10. - 16. Tag häufig fetthaltige Zellen enthält, wächst stark an, wodurch eine gute Unterscheidung zwischen einer äußeren, kompakten und einer inneren, vakuolisierten Zone möglich wird. Die zunächst ebenfalls in die Meiose eintretenden medullären Keimzellen degenerieren. Bis zum 8. Tag nach dem Schüpfen dehnt sich die Follikelbildung, von der medio-ventralen Seite beginnend, in alle Bereiche der Ovarrinde aus. Einige Epithelzellen der Rinde differenzieren sich zu interstitiellen Zellen, die dann vor allem in der Thekaschicht der jungen Follikel zu liegen kommen. Die retikuläre Zone der Medulla, die hilusnah liegt, enthält normalerweise weder Keimzellen noch fetthaltige Zellen. Sie besteht primär aus lockerem Bindegewebe und eingelagerten Blutgefäßen (Kannankeril und Domm, 1968). Nach vollständiger Beendigung der 1. Reifeteilung der Meiose weisen die Oozyte 2. Ordnung und die Polkörperchen einen haploiden Chromosomensatz auf. Kurz darauf erfolgt die durch das Luteinisierungshormon (LH-Peak) ausgelöste Ovulation des reifen Follikels. Dabei tritt ein Riss im

Bereich des Stigmas auf, was bei der Wachtel nach Kannankeril und Domm (1968) am 45. - 75. Tag geschieht. Danach wird die Oozyte 2. Ordnung in das Infundibulum des Eileiters freigesetzt. Gelegentlich fällt sie in die Leibeshöhle, wo sie dann resorbiert wird. Durch die 2. Reifeteilung der Meiose entsteht das befruchtungsfähige haploide Ei, Ovum, und ein weiteres Polkörperchen. Die 2. Reifeteilung wird vermutlich durch das Eindringen der Spermatozoen ausgelöst. Anders als beim Säuger erfolgt bei Vögeln keine weitere Teilung des ersten Polkörperchens (Nickel et al., 2004).

2.3.2 Entwicklung des rechten aviären Ovars

Die wichtigsten Unterschiede des rechten, rudimentären Ovars der Wachtel zum linken sind das sehr dünne, einschichtige Keimepithel, welches sich kaum vom viszeralem Peritoneum unterscheidet, das Fehlen der kortikalen Keimstrangentwicklung und der Rindenbildung, sowie das Fehlen von Keimzellen im Keimepithel während der Entwicklung. Die medullären Keimstränge weisen große Hohlräume auf, die von einem flachen Epithel ausgekleidet werden. Außerdem bilden sich die medullären Zellen bis zur Reifung des Embryos zu fetthaltigen Zellen um. Die Keimzellen der Medulla treten nicht in die Meiose ein. Das Wachstum des rechten Ovars der Wachtel endet am 8. - 9. Bebrütungstag. Zwischen dem 7. - 10. Tag nach dem Schlupf erreicht es eine Größe von 1 - 2 mm Länge und 0,2 - 0,6 mm Breite (Kannankeril und Domm, 1968).

Das rechte Ovar besteht demnach normalerweise aus einem flachen Epithel, welches das Medullagewebe umschließt. Die Rinde fehlt vollständig. Dieses völlige Fehlen eines Kortex ist im Unterschied zur Wachtel weder beim Huhn noch bei anderen Vögeln beobachtet worden (Kannankeril und Domm, 1964, 1968). Die Medulla setzt sich aus losen epithelartigen Zellen (die sich später auch in fibröse Bindegewebszellen transformieren können), fetthaltigen Zellen, Bindegewebszellen, gelegentlich vorkommenden Lymphozyten und einigen wenigen Blutzellen zusammen. Keimzellen wurden ab dem 4. Tag nach dem Schlüpfen nicht mehr nachgewiesen (Kannankeril und Domm, 1968). Beim Haushuhn wird dieses Stadium erst nach 3 - 4 Wochen erreicht (Kannankeril und Domm, 1964, 1968).

2.3.3 Follikulogenese im linken aviären Ovar

Die Oozyten sind immer von Hüll- bzw. Nährzellen umgeben. Zusammen bilden die beiden Strukturen eine Funktionseinheit, den Follikel (Rüsse und Sinowatz, 2008). Von Guraya (1976), Perry et al. (1978 a) und Gilbert (1979), die die Follikelstadien bei Taube, Türkentaube, Lachtaube, Haushuhn und Wachtel untersuchten, werden die aviären Ovarfollikel nach dem Reifegrad in Primordialfollikel, prävitelline Follikel und vitelline Follikel eingeteilt.

Primordialfollikel: Bis zum 13. Tag nach dem Schlupf lagern sich Follikelzellen um die Oozyten an, woraus die ersten Anlagen der Primordialfollikel entstehen (Salomon, 1993). Diese Granulosazellen sind zunächst flach bis kubisch und ähneln nach Guraya (1976) den sie umgebenden undifferenzierten Stromazellen. Primordialfollikel, die sich normalerweise in der ovarialen Rinde befinden, sind zudem von einer einfachen Schicht von Fibrozyten umgeben (Kimaro, 2005). Chalana und Guraya (1979 a), die die Kerne der Ovarialfollikel von Krähe und Hirtenstar untersuchten, fanden im Primordialfollikel 2 - 6 Nucleoli im Kern, Nucleus, welche mit den kondensierten und gut sichtbaren Chromosomen im Kontakt stehen. Sie erscheinen im Zuge des Oozytenwachstums und sind erst im Diplotän-Stadium voll entwickelt. Die kleinen Nucleoli früher Meiose-Stadien mit kondensiertem Chromatin und fehlenden Kernkörperchen im Nucleoplasma deuten auf geringe Syntheseaktivität im Kern hin. Dies trifft auch für die Kerne der Follikel der Wachtel zu, ebenso die Größenzunahme von Nucleus und Nucleolus in Abhängigkeit von der Follikelgröße (Hartung und Stahl, 1976; Stahl et al., 1975). Auch können mit zunehmendem Wachstum der aviären Oocyte andere Strukturen im Nucleoplasma auftreten, die kleiner sind als die Nucleoli und im Unterschied zu diesen hauptsächlich aus Kohlenhydraten, Proteinen und freien Aminogruppen bestehen. Je nach Vogelart und Oogenesestadium können sie in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Chalana und Guraya, 1979 a).

Prävitelliner Follikel der frühen Phase: Das Hauptcharakteristikum der prävitellinen Follikel ist der intraoplasmatische, paranukleäre Balbiani-Körper (Dotterkern), der sich dicht und rund nahe der Kernmembran bildet und etwa so groß ist wie der Oozytenkern selbst. Häufig liegt er bei Primordialfollikeln halbmondförmig über dem Kern. Er besteht aus RNA, Protein und Lipoprotein, Mitochondrien unterschiedlicher Struktur, Golgi-Feldern und Lipidtröpfchen. Bei der Wachtel wird der Dotterkern in eine innere, mittlere und eine äußere Zone mit abnehmender Dichte eingeteilt. In der Nachbarschaft können "chromatoid bodies" (aus RNA und Proteinen) entdeckt werden. Mit dem Wachstum des Dotterkerns (als Substrat) können sich auch andere Zellorganellen vermehren (Guraya, 1976). Die sich mitotisch teilenden Granulosazellen umgeben als kubische Zellen in einer Schicht die Follikel (Guraya, 1976). Eine Plasmamembran, die die Oocyte umgibt, steht in direktem Kontakt zu den Granulosazellen und unterstützt durch Diffusion, Pinozytose- und Phagozytoseaktivität den Stoffwechsel und den Transport von Substanzen in die Oocyte (Paulson und Rosenberg, 1972). Der Kern der Oocyte enthält „(Vor-)Lampenbürstenchromosomen“, die sich mit zunehmendem Wachstum der Eizelle von den Nucleoli absondern (Chalana und Guraya, 1979 a).

Prävitelliner Follikel der späten Phase: Mit zunehmendem Wachstum der Oocyte bricht der Dotterkern auseinander; er zerfällt in kleinere Teilstücke. Diese verschiedenen Komponenten des Balbiani-Körpers verteilen sich im gesamten Ooplasma. Die Golgi-Felder nehmen an Größe zu und sind nun hauptsächlich in der Peripherie zu finden. Die an Zytoplasma und Organellen zunehmenden Granulosazellen umgeben weiterhin in einer Schicht die Follikel und enthalten einen paranuklearen

Komplex, der dem Balbiani-Körper ähnelt. Die sich ausbildenden Mikrovilli der Oozyte 1. Ordnung, das sich nun ansammelnde Material für die Perivitellinmembran und die Fortsätze der Granulosazellen bilden zusammen die „gestreifte“ Zona radiata (Guraya, 1976). Die Perivitellinmembran, die nach Wyburn et al. (1965 a) beim Haushuhn bei einer Follikelgröße von 7 mm zum ersten Mal erkennbar wird, hat eine Breite von 1 - 2 µm. Eine PAS-positive Basalmembran, die den Follikel vom Stroma abtrennt, ist ebenfalls erkennbar (Guraya, 1976). In diesem Follikelstadium sind eine Theka interna, die hauptsächlich Fibroblasten und undifferenzierte Thekadrüsenzellen enthält und eine Theka externa, die zudem noch differenzierte Thekadrüsenzellen aufweist, unterscheidbar (Kimaro, 2005). Der Nucleus ist vergrößert und der Nucleolus enthält Vakuolen und "dense bodies" (Chalana und Guraya, 1979 a).

Vitelliner Follikel: Der große vitelline Follikel ist definiert durch die Einlagerung von Bläschen mit Dottermaterial im zentralen Ooplasma. Von Gilbert et al. (1983) werden die durch Wachstum und Dottereinlagerung gekennzeichneten vitellinen Follikel beim Huhn auch als „Kleine Dotterkugeln“ (1-8 mm) bzw. als „Große Dotterkugeln“ (>8 mm) bezeichnet. Die letzten 5 - 9 Tage vor der Ovulation kommt der Follikel in die „Rapid Wachstumsphase“, d.h. im Vergleich zu den kleinen „weißen Follikeln“ reift und wächst er in dieser Zeit sehr schnell von 6 mm auf 40 mm (Haushuhn) an und wird durch Dottereinlagerung zunehmend „gelb“ (Wyburn et al., 1965 a). Danach stehen die Follikel zur Ovulation bereit (Gilbert et al., 1983), sie werden dann von den meisten Autoren als „hierarchische Follikelstadien“ bezeichnet.

Tabelle 1: Einteilung der vitellinen Follikel (Wachtel) nach Sasanami et al. (2004).

Follikel 1 (F1)	über 15 mm
Follikel 2 (F2)	12 - 15 mm
Follikel 3 (F3)	8 - 12 mm
Follikel 4 (F4)	4 - 8 mm
Follikel 5 (F5)	2 - 4 mm
Kleine gelbe Follikel (SYF)	1 - 2 mm
Kleine weiße Follikel (SWF)	unter 1 mm

Die äußere Ooplasmazone der Follikel enthält Dotterkernderivate, Mitochondrien, große Golgi-Felder, Fetttröpfchen, periphere Phospholipidkörperchen und Dottergranula von dichter Struktur, die hauptsächlich aus Lipoproteinen, Proteinen und Kohlenhydraten bestehen (Guraya, 1976). In der so genannten flüssigen Dottersphäre (zwischen den Dotterbläschen) befinden sich ungesättigte Triglyzeride, Proteine und einige Kohlenhydrate (Guraya, 1959). Die Proteine und Phospholipide des Dotters werden nicht vom Ovar synthetisiert, sondern werden unter dem Einfluss von Östrogen von der Leber gebildet und von den gut vaskularisierten Follikeln über die Granulosazellen in die Oozyte

transportiert (Rüsse und Sinowatz, 2008). Im Größenbereich der kleinen weißen Follikel wird bei der Wachtel das Dottervorläuferprotein Vitellogenin durch Endozytose in die Granulosazellen aufgenommen. Dabei sind so genannte dreischichtige „lining bodies“ an der Aufnahme von Vitellogenin in die Granulosazellen beteiligt, die von deren Ribosomen produziert werden und die u.a. durch Wanderung zur Granulosazellmembran bei Endozytose und Transport des Vitellogenins assistieren. Von dort wird das Vitellogenin zur Oozyte weitergeleitet und enzymatisch zu Dotterproteinen gespalten, die dann in die Dotterbläschen für die spätere Verwendung eingelagert werden (Wallace 1985; Burley und Vadehra 1989; Yoshizaki 1992; Yoshizaki und Yonezawa 1994, 1996). Die entstehenden Dotterproteine sind Lipovitellin und Phosvitin (Retzek et al., 1992; Elkin et al., 1995). Die Dotterbläschen selbst enthalten außer diesen lipoprotein- und phosvitinhaltigen Granula auch noch Salze, die ihnen kristalline Struktur verleihen, sowie Xanthophylle und Karotinoide, die ihnen die gelbe Farbe verleihen. Eine weitere Hauptkomponente und Dottervorläufer bei der Wachtel ist das „very low density lipoprotein“ (VLDL), das ebenfalls in der Leber synthetisiert wird und nach Aufnahme in die Oozyte in mehrere Fragmente gespalten wird. Dessen Aufnahme in die Granulosazellen der großen gelben Follikel erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Ito et al., 2003).

Mit weiterem Wachstum der Dotterbläschen erscheint das Dottermaterial in seinem Inneren zunehmend homogen. Durch Akkumulation des wässrigen Proteinmaterials, dem „Eigelb“, in dem die fetthaltigen Dotterbläschen schwimmen, bilden sich nun gelbe und weiße Schichten (Guraya, 1976). Die gut differenzierten Granulosazellen, die Lipoproteingranula enthalten, sind nach wie vor einschichtig und werden durch die Streckung zunehmend flacher. Die Thekaschichten, die nun hoch vaskularisiert sind, enthalten Thekadrüsenzellen, Lipoproteingranula, Fibroblasten, Kollagenfasern und glatte Muskelzellen. Die Zona radiata ist eher unauffällig und die Perivitellinmembran erscheint als dünne, durchgehende Schicht (Guraya, 1976) mit einer Breite von ca. 1 μm (Wyburn et al., 1965 a). Beim vitellinen Follikel haben Chalana und Guraya (1979 a) drei zusammen liegende trabekuläre Nucleoli im Kern beobachten können, die unterschiedlich groß und weitgehend vakuolisiert waren, jedoch keine "dense bodies" mehr enthielten.

Zu regelmäßigen Ovulationen kommt es durch die Ausschüttung von Luteinisierungshormon (LH) aus der Hypophyse, dessen Abgabe ins Blut bei der Wachtel etwa 4 - 6 Stunden vor jeder Ovulation erfolgt (Opel, 1967). Die Dauer zwischen Ovulation und Eiablage beträgt bei der Wachtel 24,5 Stunden während der Legeperiode, was etwas kürzer ist als der 25-Stunden-Rhythmus beim Huhn (Wilson und Huang, 1962). Auch ist beim Huhn der LH-Peak nicht mit dem FSH-Peak synchron. Er erfolgt 4 - 6 Stunden, der FSH-Peak 11 - 14 Stunden vor der Ovulation (Imai und Nalbandov, 1971; Scanes et al., 1977). Die Reifung der Eizellen hat wiederum entscheidenden Einfluss auf die Steroidhormonproduktion der Theka- und Granulosazellen. Die Granulosazellen der größten präovulatorischen Follikel produzieren beim Haushuhn auf die Stimulation von LH hin Progesteron

(Etches et al., 1981). Auch steigt mit dem Erreichen des Ovulationsstadiums deren Sensibilität für LH (Hammond et al., 1981 a). Beides ist auch für die Wachtel bestätigt worden (Asem et al., 1985). Die Thekazellen der mittelgroßen Follikel produzieren bei Huhn und Wachtel auf die Stimulation von LH hin den Großteil der Östrogene (Kumagai und Homma, 1974; Asem et al., 1985).

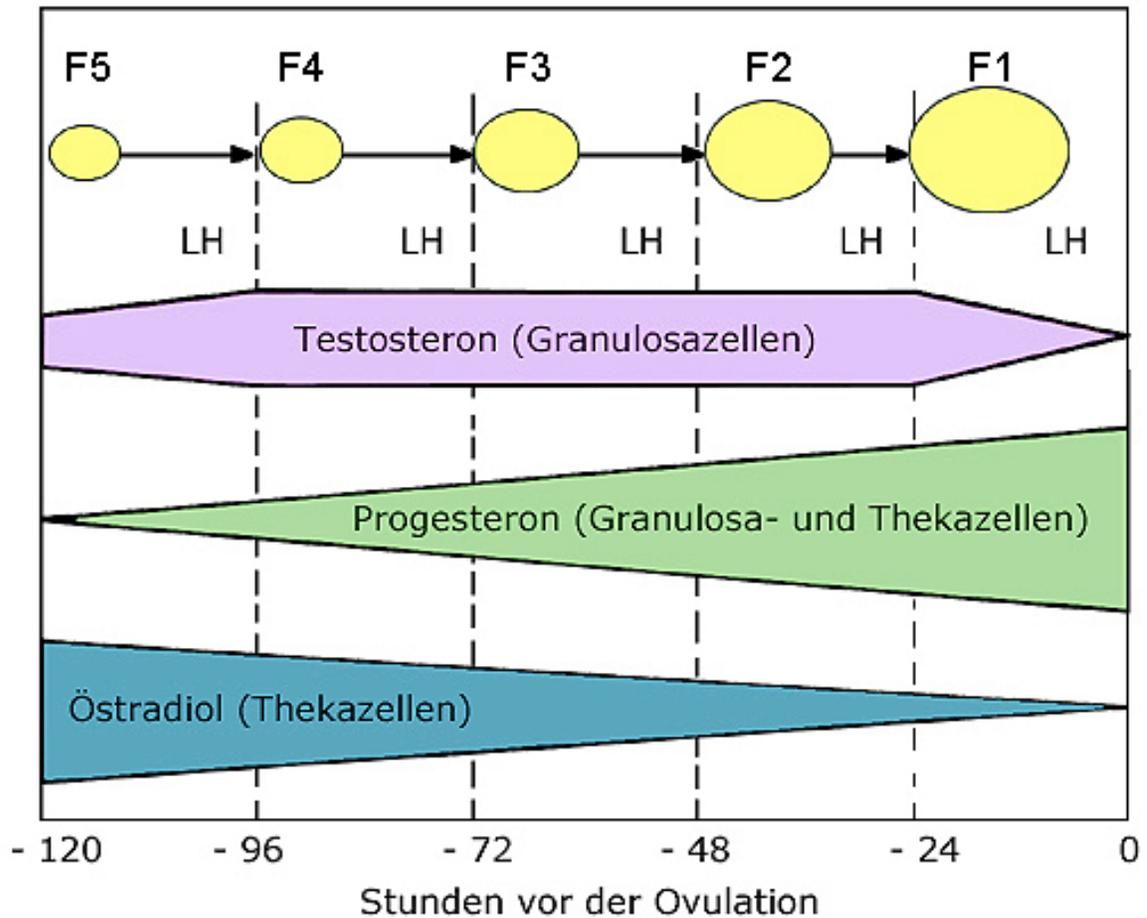


Abb. 1: Hormonverteilung in vitellinen Follikeln (Huhn) vor der Ovulation (nach Bahr et al., 1983) gelb = Hierarchische Follikel für die Ovulation (F5 – F1), LH = Luteinisierendes Hormon

Ein Unterschied zwischen Huhn und Wachtel besteht in der Produktion von LH-stimuliertem Androstendion, welches zwar bei beiden v.a. in den Thekadrüsenzellen der mittelgroßen Follikel gebildet wird, aber in deutlich unterschiedlicher Menge. Die Produktion des Androstendion ist am höchsten bei mittelgroßen, dotterhaltigen Follikeln und nimmt mit zunehmender Follikelreife ab (Kumagai und Homma, 1974). Der Androstendion-Spiegel ist beim Huhn jedoch weniger hoch als bei der Wachtel (Marrone und Hertelendy, 1985). Die Ursache liegt im unterschiedlichen Progesteronmetabolismus der Thekadrüsenzellen der beiden Spezies. Während bei der Wachtel Progesteron hauptsächlich in Androstendion umgewandelt wird (Asem et al., 1985) wird es beim Huhn primär in Dihydroprogesteron metabolisiert (Llewelyn, 1981; Marrone et al., 1985).

2.3.4 Follikelatresie

Im Ovar einer legenden Henne befinden sich mehrere Millionen Follikel (Hutt, 1949), wovon viele Tausend makroskopisch sichtbar sind (Pearl und Schoppe, 1921). Wie bei anderen Vertebraten produziert die Henne wesentlich mehr Oozyten als für die spätere Ovulation gebraucht werden. Diese werden daher durch Atresie eliminiert (Greenwald, 1978; Jones, 1978). Follikelatresie kommt normalerweise hauptsächlich in den kleineren Follikeln vor, jedoch sinkt auch die Wahrscheinlichkeit eines gesunden Follikels mit zunehmendem Wachstum. Die Anzahl der für die Ovulation verfügbaren Follikel ist das Produkt aus den für das Wachstum bereitstehenden Stadien (bis 1 mm) und der Rate der Atresie. Diese findet beim Huhn im Wesentlichen bei Follikeln mit einer Größe von 1 - 8 mm statt, also noch bevor der Follikel große Dottermengen einlagert. Danach kommt es kaum mehr zur Atresie, und die Follikel stehen in direkter „Größenhierarchie“ zur Ovulation bereit (Gilbert et al., 1983).

Über die verschiedenen Arten der Follikelatresie gibt es je nach Autor unterschiedliche Einteilungen. Marshall und Coombs (1957) beschreiben bei der Krähe lipoidale und nicht-lipoidale Atresie, Dominic (1961) und Bhujle et al. (1979) unterscheiden bruchhaft-zystische in-situ Atresie, sowie dotterreiche und glanduläre Atresie bei der Haustaube, Erpino (1969) entdeckte dotterreiche und lipoidale Atresie bei der Elster. Kern (1972) und Silverin (1980) beschreiben normal bruchhafte, lipoidale, lipoglanduläre, glanduläre und verflüssigte Atresie beim Sperling und beim Fliegenschnäpper, während Guraya (1976 a, b) und Guraya und Chalana (1976) die Formen der Atresie nach Follikelstadien einteilen. Shanbhag et al. (1985) beschreiben bei zwei Spezies der Wildwachteln Atresie der Primordialfollikel und bei größeren Stadien glanduläre, dotterreiche und zystische Atresie. Gupta et al. (1988) teilen die Atresie beim Haushuhn in eine nicht-bruchhafte und eine bruchhafte Form der Atresie ein. Danach erfahren kleine, dotterfreie Follikel unter 1 mm den nicht-bruchhaften Untergang. Diese Form ist hauptsächlich gekennzeichnet durch die Schrumpfung der Oozyte, wobei die Thekaschicht, deren Elemente lose erscheinen, von der unregelmäßig gefalteten Granulosaschicht durch einen Hohlraum getrennt wird. Der Balbiani-Körper ist nur mehr undeutlich zu erkennen. Die Follikelwand ist jedoch nicht rupturiert. Die Resorption der atretischen Masse erfolgt in-situ. Im Vergleich dazu sind Follikel, die sich in der bruchhaften Atresie befinden und über 1 mm groß sind, durch eine Ruptur der Follikelwand gekennzeichnet die jedoch außerhalb der Stigmaregion erfolgt. Dadurch laufen Inhalte des Ooplasmas in das Stroma aus. Auch ist die Anwesenheit von Granulosazellen, Thekadrüsenzellen und Blutzellen im Ooplasma beschrieben worden; der Kern ist degeneriert. Eine Vakuolisierung der Theka interna ist erkennbar und ebenso eine allgemeine Hypertrophie und fortgeschrittene Kollagenisierung der Thekaschichten. Die Basalmembran und die Perivitellinmembran verlaufen getrennt vom übrigen Gewebe. Hauptkriterium ist hier jedoch die Resorption der atretischen Masse außerhalb des Follikels.

Madekurozwa und Kimaro (2006) teilen die Follikelatresie beim Strauß nach folgendem Schema ein:

Tabelle 2: Atresiestadien beim Strauß (Madekurozwa und Kimaro, 2006).

	Frühes Stadium	Spätes Stadium	Sehr spätes Stadium
Primordialfollikel und Prävitelliner Follikel	Schrumpfen der Oozyte Mehrschichtige Granulosaschicht Innerste Granulosaschicht hat vakuolisierte Zellen, die das Ooplasma infiltrieren Große Vakuolen in Ooplasma-Peripherie	Infiltration des Follikels vom Stroma	
Vitelliner Follikel Atresie Typ 1	Unterbrochene und verbogene Granulosaschicht Theka interna hat vakuolisierte Zellen Theka externa ist hyalinisiert	Einwanderung von vakuolisierten Granulosazellen ins Ooplasma (+Makrophagen) Fibroblastenartige Zellen in Oozytenmitte	Ganzer Follikel ausgefüllt mit hyalinisiertem Bindegewebe (+Blutgefäße)
Vitelliner Follikel Atresie Typ 2	Proliferation von Granulosazellen und Zellen der Theka interna Theka externa aus losem Bindegewebe	Granulosazellen und Zellen der Theka interna differenzieren sich zu Stromadrüsenzellen, die die ganze Oozyte ausfüllen (+Blutgefäße)	Fragmentation der Stromadrüsenmasse Resultat: Ausbreitung von Stromadrüsen- Zellverbänden im Interstitium

Zwei Mitglieder der BCL-2-Genfamilie, die als Enzyme eine Rolle bei der Apoptose spielen, wurden bei der Wachtel immunhistochemisch nachgewiesen: BCL-2, das in den Granulosazellen von prähierarchischen Follikeln exprimiert wird und BAX, welches sich in den Granulosazellen von atretischen Follikeln und in den Kernen von Oozyten mit Vor-Lampenbürstenschromosomen nachweisen lässt. Dies zeigt, dass die Atresie der Follikel nicht allein durch den Untergang der Granulosazellen bewirkt wird, sondern wahrscheinlich durch degenerative Veränderungen an der Oozyte eingeleitet wird (Van Nassauw et al., 1999). Ein weiteres immunhistochemisch nachweisbares Enzym, die Kaspase CPP32, welche sich v.a. in den Granulosazellen von atretischen Follikeln befindet, dürfte für die proteolytische Aufspaltung vieler Schlüsselproteine im Follikel verantwortlich sein (Cohen, 1997). Es bewirkt vor allem den Abbau des Zytoskelettes der Granulosazellen durch eine CPP32-katalysierte Fodrin-Proteolyse (Maravei et al., 1997). Cheng et al. (1997) sprechen weiterhin von einer Feedback-Schleife zwischen BCL-2 und CPP32 in der Regulation des Zelltodes.

2.4 Aviäre Perivitellinmembran

2.4.1 Definition

Die Plasmamembran der Eizelle aller Vertebraten ist von einer Glykoproteinschicht umgeben, die je nach Spezies unterschiedlich benannt wird: „Zona pellucida“ bei Säugetieren, „Chorion“ bei Knochenfischen, „Vitellinmembran“ bei Amphibien und Knorpelfischen und schließlich „Perivitellinmembran“ bei Reptilien und Vögeln (King, 1975; Spargo und Hope, 2003; Stewart et al., 2004; Menkhorst und Selwood, 2008). In Form und Funktion jedoch sind sich die genannten Strukturen ähnlich (Spargo und Hope, 2003). Die Perivitellinmembran der Vögel stellt das Äquivalent der Zona pellucida der Säugetiere dar (King, 1975; Stewart et al., 2004). Sie besteht wie diese aus Glykoproteinen, die ein dreidimensionales, azelluläres Netzwerk bilden und vor der Ovulation zwischen der Granulosazellschicht und der Plasmamembran in der Zona radiata der Oozyte der größeren Follikel zu finden sind (Wyburn et al., 1965 a). Nach der Ovulation wird die Perivitellinmembran als innerste Schicht der aviären Vitellinmembran beschrieben, die später zusammen mit der dünnen, granulohaltigen mittleren Continuaschicht und der mehrfach unterteilten, aus gitterartig feinen Fibrillen bestehenden äußeren Schicht das Vogelei direkt umgibt (Bain und Hall, 1969).

Die Zona pellucida und ihre Äquivalente bei anderen Vertebraten unterscheiden sich zunächst durch ihre Dicke, die 1 - 2 μm (Opossum) bis 27 μm (Rind) betragen kann (Dunbar et al., 1994). Sie ist von poröser Natur und durchlässig für relativ große Proteine wie z.B. Immunglobuline, hindert aber im Gegenzug auch kleine Proteine wie z.B. Heparin an der Passage. Das zeigt, dass nicht in erster Linie die Größe der Partikel beim Durchschreiten der Zona entscheidend ist, sondern vielmehr deren

biochemische oder physiochemische Eigenschaften (Shivers und Dunbar, 1997). Die Auflösung oder erneute Zusammenlagerung der Zona-pellucida-Strukturen erfolgt in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und von der Anwesenheit von Proteinasen oder Reduktionsmitteln (Dunbar et al., 1991).

Insgesamt bilden die Glykoproteine und die groben Fasern eine Matrix, die eine wichtige Rolle im Fertilisationsprozess spielt, sei es die speziesspezifische Spermium-Ei-Bindung, die darauf folgende Akrosomenreaktion oder die Prävention der Polyspermie bei Säugetieren (McLeskey et al., 1998). Bei Vögeln dagegen ist die Polyspermie nach Befruchtung physiologisch und stört die weitere Entwicklung nicht (Nickel et al., 2004).

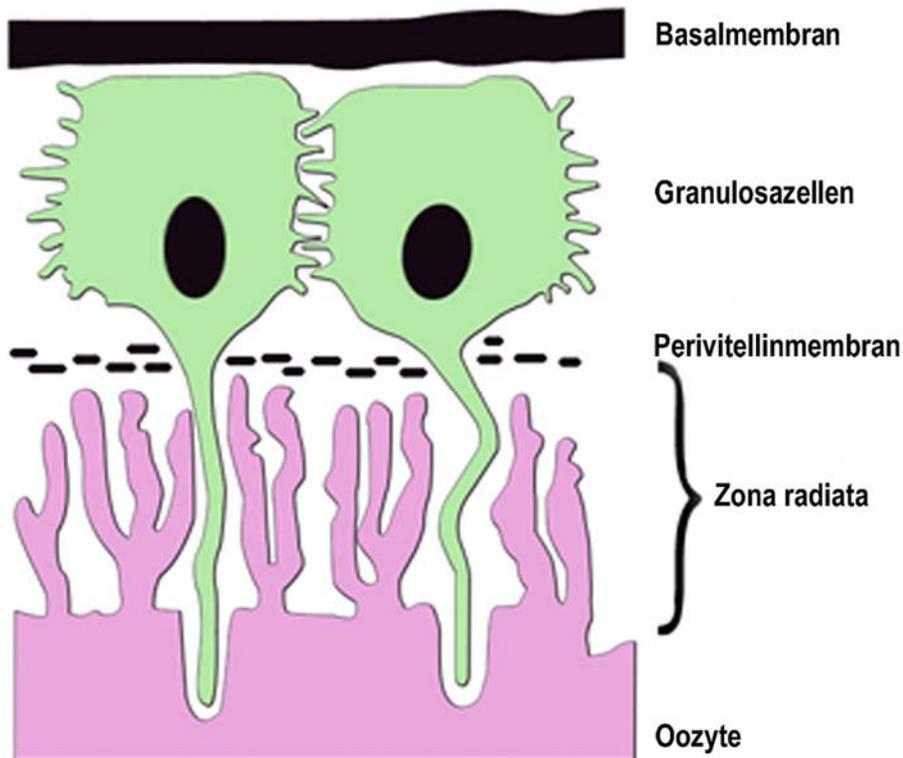


Abb. 2: Schema der aviären Zona radiata (nach King, 1975)

2.4.2 Aufbau und Struktur der aviären Perivitellinmembran

In früheren Studien an den Zonae pellucidae, die man an der Hausmaus, *Mus musculus*, und an der Wanderratte, *Rattus norvegicus*, durchführte, identifizierte man unter Verwendung der SDS-PAGE drei Glykoproteine, die man nach absteigendem Molekulargewicht ZP1, ZP2 und ZP3 benannte (Repin und Akimova, 1976; Bleil und Wassarman, 1980). Später wurden die ZP-Glykoproteine von Harris et al. (1994) als Produkte von drei großen Genfamilien mit den Namen ZPA, ZPB und ZPC versehen, die in absteigender Reihenfolge von der Länge ihrer cDNA zu unterscheiden sind. Nach

diesem System wäre die vorherige Benennung in die Reihenfolge ZP2, ZP1 und ZP3 geraten und um Konfusion zu vermeiden, benannte man die Glykoproteine schließlich folgendermaßen: ZP2>ZPA, ZP1>ZPB, ZP3>ZPC. Keine der beiden Nomenklaturen hat sich jedoch allgemein durchgesetzt (Kubo et al., 2000; Vo und Hendick, 2000). Allerdings kann man die Namen ZPB und ZP1 nicht synonym für das gleiche Gen verwenden, weil eine Untergruppe der ZP1-Genfamilie paralog zu anderen ZPB-Genen ist. Das "Harris-System" bietet keine Möglichkeit für Paralogen innerhalb einer Unterfamilie. Spargo und Hope (2003) schlagen eine etwas andere Nomenklatur nach folgendem Schema vor: zuerst wird der Name des Gens mit einem großen Buchstaben angegeben, danach die Gruppenparalogen innerhalb der gleichen Unterfamilie in Abhängigkeit der Länge der Kodierungssequenz mit einer Zahl und zum Schluss die Paralogen unter dem Gruppenaspekt der Phylogenetik, ebenfalls in Abhängigkeit der Kodierungssequenz, mit einem kleinen Buchstaben.

Die Zona pellucida der Säugetiere besitzt im Wesentlichen drei Glykoproteinkomponenten, während die Eihaut vom Krallenfrosch, *Xenopus laevis*, aus sechs Glykoproteinen besteht, wobei drei davon ein Säugetierortholog besitzen (Tian et al., 1999; Kubo et al., 1997; Yang und Hendick, 1997). Zwei davon haben kein bekanntes Säugetieräquivalent: ZPAX (Lindsay et al., 2001) und ZPA (Lindsay et al., 2002). Auch beim Japankärpfling, *Oryzias latipes*, wurde ein zusätzliches Gen identifiziert, welches ebenfalls ZPA benannt wurde und eine hohe Sequenzhomologie mit ZPAX aufweist (Lindsay et al., 2001). Die biologische Bedeutung dieses Unterschieds ist noch weitgehend unklar. Möglicherweise hängen sie mit der speziesspezifischen Morphologie der Eihülle oder der Spermium-Ei-Interaktion zusammen (Okumura et al., 2004).

In der Perivitellinmembran der Wachtel wurden zunächst die Glykoproteine ZP1 und ZPC (ZP3) nachgewiesen (Mori und Masuda, 1993; Pan et al., 2001; Sasanami et al., 2003 a). ZP1 hat eine Masse von 175 kDa und das ZPC eine solche von 33 kDa. Durch Western Blot Analyse konnte auch ein Vorläuferprotein des ZPC, das proZPC, entdeckt werden, welches eine Masse von 43 kDa besitzt und noch vor dem Einbau in die Perivitellinmembran in das reife, oben erwähnte ZPC umgewandelt wird (Sasanami et al., 2002). Vor kurzem konnte bei der Japanischen Wachtel durch Immunhistochemie und Western Blot ein weiteres Glykoprotein, ZPD, nachgewiesen werden. Es hat eine Masse von 40 kDa. Dieses Glykoprotein wurde bisher noch nicht beim Säuger gefunden. Auch konnte in jüngster Zeit das Vorkommen von ZPA, das eine Masse von 80 kDa besitzt, sowie ZP4 bei der Wachtel bestätigt werden (Sasanami, 2009, persönliche Kommunikation, Kinoshita et al., 2009).

Beim Huhn wurden die Glykoproteine ZP1 (ZPB1), ZPB (ZPB2), ZPA (ZP2), ZPC (ZP3) und ZPD beschrieben (Waclawek et al., 1998; Bausek et al., 2000; Smith et al., 2005; Okumura et al., 2004). Durch Untersuchungen der Hühnerrasse „White leghorn“ haben Okumura et al. (2004) in der Perivitellinmembran durch PCR und Gelelektrophorese das ZPD entdeckt, welches ebenfalls Mitglied der ZP-Familie ist. Der Name ZPD bei Vögeln wurde gewählt, weil sich die Peptidsequenz außerhalb der ZP-Domäne dieses Glykoproteins von jenen der Glykoprotein-Unterfamilien ZPA, ZPB oder ZPC

unterscheidet. Das ZPD des Huhnes hat aber nur beschränkte Homologie mit dem ZPD des *Xenopus laevis* (Lindsay et al., 2002). Desweiteren kann das Hühner-ZPD leicht von der Matrix der Perivitellinmembran gelöst werden. Es ist nur lose verbunden mit der vergleichsweise kompakten Matrix der Perivitellinmembran, die aus den anderen monomeren und dimeren Glykoproteinen besteht. Außerdem wurde festgestellt, dass die dimeren Formen von ZP1 und ZPD Auslöser der Akrosomenreaktion bei der Befruchtung sind (Okumura et al., 2004). Dieses konnte auch für das ZP1 der Japanischen Wachtel nachgewiesen werden (Sasanami et al., 2007). Der Syntheseort der Zona pellucida-Glykoproteine ist einerseits die Oozyte (Epifano et al., 1995), andererseits sind aber bei vielen Spezies auch die Granulosazellen beteiligt (Lee und Dunbar, 1993). Nach Yamaguchi et al. (1989) wird die Vitellinmembran der Amphibien nur von der Eizelle gebildet, Wassarman und Mortillo (1991) beschreiben dies auch für die Maus. Die Glykoproteine des Chorions der Fische (Japankärpfling) werden in der Leber synthetisiert und von dort mit dem Blutkreislauf zum Ovar befördert (Hamazaki et al., 1989). Das ZPC der Wachtel wird von den Granulosazellen des heranwachsenden Follikels gebildet, unter Einfluss von FSH (Sasanami et al., 1999; Pan et al., 2003) und Testosteron (Pan et al., 2001). Das ZP1 dagegen wird von der Leber der legenden Wachtelhenne synthetisiert.

Die Expression der mRNA des ZP1 konnte durch eine in-vivo-Behandlung mit Diethylstilbestrol stimuliert werden (Sasanami et al., 2003 b). Das ZPD wird von den Granulosazellen von großen Follikeln (über 2 mm) gebildet, mit der höchsten Expression in den größten Follikeln (Sato et al., 2009). Auch beim Huhn wird ZPD von den Granulosazellen gebildet (Okumura et al., 2004), während es beim *Xenopus laevis* von der Oozyte allein hergestellt wird (Lindsay et al., 2002).

Die Eihülle der verschiedenen Spezies besteht aus hoch konservierten Glykoproteinen, die eng miteinander verbunden sind (Jovine et al., 2005). Diese Glykoproteine enthalten ein N-terminales Signalpeptid, das man als Zona-pellucida-Domäne bezeichnet und welches aus 260 Aminosäuren besteht. Es weist 8 - 10 konservierte Cysteinreste auf (Bork und Sander, 1992). In der Nähe des C-Terminus des Glykoproteins befindet sich eine „furin cleavage site“ (Kanamori et al., 2003). Diese hat man zumindest im ZPC aller bisher untersuchten Säugetiere und Vögel feststellen können, jedoch ist die Homologie der Aminosäuresequenz nicht vollständig. Durch intrazelluläres Processing an der „furin cleavage site“ erfolgt die Umwandlung vom unreifen zum reifen Zona-Glykoprotein (McLeskey et al., 1998; Takeuchi et al., 1999). Beim ZPD der Wachtel konnte zusätzlich eine „furin cleavage site“ am N-Terminus identifiziert werden. (Sato et al., 2009). Weiter wurde festgestellt, dass sich am C-Terminus der Glykoproteine von Japankärpfling und Regenbogenforelle und beim ZP1 von Wachtel und Huhn (die beide von der Leber produziert werden) keine so genannte „Transmembran-Domäne“ befindet wie bei verschiedenen anderen Spezies (Sugiyama et al., 1999; Bausek et al., 2000; Sasanami et al., 2003 a; Darie et al., 2004). Zusätzlich enthält das ZP1 der Wachtel eine „Glutamin Repeat Sequence“ (QRR), die sich vor der Zona-pellucida-Domäne befindet (Sasanami et al., 2006). Eine

QRR wurde auch im Chorion von Knochenfischen gefunden (Kanamori et al., 2003). Bei der Wachtel wurde durch das selektive Entfernen bestimmter Abschnitte des ZP1 festgestellt, dass die spezifische Aufnahme des zweiten Glykoproteins ZPC in hohem Maße von der Anwesenheit der C-terminalen Hälfte der Zona-pellucida-Domäne von ZP1 abhängig ist, jedoch nicht von der N-terminalen Hälfte oder der QRR-Region. Die C-terminale Hälfte der Zona-pellucida-Domäne scheint auch bei der Bildung der unlöslichen Fibrillenformation der Perivitellinmembran der Wachtel eine Rolle zu spielen (Sasanami et al., 2006). Durch einen Versuch mit einem in-vitro-Kultursystem wurde zunächst lösliches ZPC gefunden (Sasanami et al., 2002; Pan et al., 2003). Nach Inkubation mit den Bestandteilen der Perivitellinmembran wandelt es sich jedoch in ein wasserunlösliches Protein um. Der Mechanismus der Umwandlung ist noch unbekannt.

Der Einbauprozess von neusynthetisiertem ZPC in die Perivitellinmembran wird vermutlich durch eine Interaktion zwischen ZP1 und ZPC bewirkt (Ohtsuki et al., 2004). In einem weiteren Versuch, bei dem Anti-ZP1-Antiserum eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass das ZPC sowohl an die monomere Form des ZP1 (97 kDa) als auch an dessen dimere Form (175 kDa) bindet. Die Frage nach der spezifischen Aufnahme des ZP1 in die Perivitellinmembran ist noch offen. Es existieren jedoch verschiedene Hypothesen über eine rezeptorvermittelte Aufnahme (Sasanami et al., 2006). Das ZPD der Wachtel ist ein eher kleiner Bestandteil der Perivitellinmembran. Es besitzt vermutlich vier N-terminale Glykosylierungsstellen. Diese variieren bei den verschiedenen Isoformen des ZPDs. Im Unterschied zu anderen Zona-Glykoproteinen besitzt ZPD zwei Spaltungsstellen für Peptidasen. ZPD spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Bildung der wasserunlöslichen Fasern der Perivitellinmembran (Sato et al., 2009).

2.4.3 Die Rolle der Perivitellinmembran des Vogels bei der Befruchtung

Um eine Befruchtung einzuleiten, werden beim Vogel zunächst die Spermien in den Uterovaginaldrüsen des Eileiters gespeichert. Von dort werden sie bei der Ovulation zu den sekundären Speicherorten, den Infundibulardrüsen transportiert. Hier werden sie vorübergehend gelagert. Bei der Passage des nächsten ovulierten Eies werden sie freigesetzt und die Befruchtung wird vollzogen (Wishart und Horrocks, 2000).

Die Befruchtung ist wie bei anderen Vertebratenspezies das Endergebnis einer Reihe von fein abgestimmten, aufeinander folgenden Schritten, die die Spermium-Ei-Bindung und die Akrosomenreaktion mit einer anschließenden Fusion von Spermium und Eizelle beinhaltet. Bei den Säugetieren spielt bei diesem Prozess die Zona pellucida eine bedeutende Rolle, da sie speziesspezifische Rezeptoren besitzt, die Akrosomenreaktion einleitet und durch strukturelle Veränderung eine Polyspermie verhindert (Flormann und Ducibella, 2006). Die Penetration der Zona

pellucida durch die Spermien ist abhängig vom physiologischen Milieu im Eileiter, extrazellulärem Kalzium und der Stimulation der Spermienaktivität (Robertson et al., 1997). Das Durchdringen der Zona pellucida hängt von der Aktivität der hydrolytischen Enzyme ab, die aus dem Akrosom freigesetzt werden, sowie von der speziesspezifischen Dicke der Zona. Geringen Einfluss hat dagegen die Größe des Eies (Stewart et al., 2004). Da das Ei zum Zeitpunkt der Befruchtung nur von der Perivitellinmembran umgeben ist, untersuchten Stewart et al. (2004) zunächst die Speziesspezifität der Spermien-Eizell-Interaktion verschiedener Vogelspezies durch heterologe Inkubation der Perivitellinmembran von Truthahn, Wachtel, Pfau, Fasan und Perlhuhn mit Hühnerspermien.

Bei der Ordnung *Galliformes* (zu der auch die Wachtel gehört) entsprach das Eindringungsvermögen der Spermien nahezu dem der Kontrollreaktion, bei der die Perivitellinmembran des Huhnes mit Hühnerspermien inkubiert wurde. Schwächer war sie bei der Ordnung der *Anseriformes* (Gans, Ente) und die geringste hydrolytisch vermittelte Penetration der Perivitellinmembran erfolgte mit Spermien der *Passeriformes* (Zebrafink), *Columbiformes* (Taube), *Falconiformes* (Adler) oder *Sphenisciformes* (Pinguin). Die Ergebnisse der heterologen Inkubation entsprechen in etwa dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der untersuchten Vogelarten. Die Speziesbarriere bei der Fertilisation ist bei Vögeln niedriger als bei Säugetieren und marinen Vertebraten. Kreuzreaktionen sind oft möglich. Deswegen wird auch eine höhere Rate an aviären Hybriden beschrieben (Gray, 1958; Sibley, 1994).

In der Perivitellinmembranen aller bisher untersuchten Vogelspezies konnten Stewart et al. (2004) Homologa von chkZP1 und chkZP3 finden (chk = chicken, Huhn).

Um herauszufinden, welche der beiden Komponenten der Japanischen Wachtel verantwortlich für die Auslösung der Akrosomenreaktion ist, haben Sasanami et al. (2007) die Perivitellinmembran eines präovulatorischen Follikels mit Spermatozoen in-vitro inkubiert. Nach einer vorgehenden Inkubation der Spermatozoen mit gereinigtem ZPC (97 kDa), dimerem ZP1 (175 kDa) und monomerem ZP1 (97 kDa) konnte gezeigt werden, dass ZPC keinen Effekt zeigte, jedoch sowohl monomeres als auch dimeres ZP1 die Akrosomenreaktion auslösen konnte. Um die Frage zu beantworten, ob eventuell der Kohlenhydratanteil von ZP1 für diese Reaktion verantwortlich sein könnte, wurden mit dem Enzym PNGase die N-verbundenen Oligosaccharide von ZP1 abgetrennt. Bei der anschließenden Inkubation der Spermatozoen mit der Perivitellinmembran wurde eine starke Abschwächung der Akrosomenreaktion registriert. Dies weist darauf hin, dass N-verbundene Oligosaccharide eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Spermien mit der Perivitellinmembran spielen. Gleiches wurde auch für dimeres ZP1 festgestellt. Okumura et al. (2004) beschreiben eine durch dimeres ZP1 ausgelöste Akrosomenreaktion beim Huhn, finden jedoch keine positive Reaktion bei monomerem ZP1. Dies führen sie auf dessen „ungeordnete Sekundärstruktur“ zurück. Obwohl sowohl ZP1 als auch ZPC an die Perivitellinmembran binden, scheint nur ZP1 die Fähigkeit zur Auslösung der Akrosomenreaktion zu haben.

Aus einer weiteren Studie wurde bekannt, dass der bevorzugte Ort für das Eindringen der Spermien der animale Pol der Eizelle ist. Hier wurden lichtmikroskopisch ca. 14 - 20 mal so viele Penetrationsstellen entdeckt als im mittleren und vegetativen Pol der Eizelle vom Huhn (Bramwell und Howarth, 1992; Bakst und Howarth, 1977; Wishart, 1997), Truthahn (Wishart, 1997) und der Wachtel (Birkhead und Fletcher, 1994). Die Bevorzugung des animalen Pols dürfte aufgrund chemotaktischer Anlockung der Spermien zu erklären sein (Howarth und Digby 1973).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Befruchtung spielen die sogenannten „sperm associated bodies“ (SAB), die bei der Wachtel untersucht wurden. Durch Röntgenmikroanalyse konnte festgestellt werden, dass sie Kalziumkarbonat enthalten (Rabbani et al., 2006). Bei der Befruchtung sind Ca^{2+} -Ionen für die Stimulierung der Spermienmotilität und die Auslösung der Akrosomenreaktion wichtig (Bramwell und Howarth, 1992; Ashizawa et al., 2004). Die SAB haben eine runde Form. Ihre Grundsubstanz wird von einem 570 kDa-Protein gebildet. Ähnliche SAB mit einer Durchschnittsgröße von 20 μm konnten auch beim Huhn gefunden werden (Rabbani et al., 2007). Stereomikroskopisch sind die SAB als kleine weiße Punkte in der Perivitellinmembran der Wachtel erkennbar. Sie befinden sich in 96% der Fälle in der Nähe der „Löcher“, die durch die Penetration der Spermien in der Perivitellinmembran gebildet werden und mit einem Anti-ZPC-Antiserum dargestellt werden können (Rabbani et al., 2006). SAB befinden sich auch im distalen Abschnitt des Infundibulums (Sultana et al., 2004). Durch in-vitro-Experimente konnte festgestellt werden, dass nach einer Inkubation der Spermien mit SAB, diese zu mehr als 90% an das hintere Ende des Spermischwanzes binden. Weiter konnte festgestellt werden, dass die SAB auch die Fähigkeit haben, an die Perivitellinmembran zu binden. Sie unterstützen die Spermien beim Binden und Penetrieren der Perivitellinmembran: Wurde eine Perivitellinmembran mit SAB und Spermien inkubiert, dann wies diese „Löcher“ und „Scheiben“ in ihrer Struktur auf. Eine Inkubation mit Spermien allein verursachte keine „Löcher“, eine Inkubation mit SAB allein verursachte weder „Löcher“ noch „Scheiben“ (Rabbani et al., 2006). „Scheiben“ in der Perivitellinmembran sind dabei elektronenmikroskopisch nachweisbare Strukturveränderungen im Fasernetzwerk der Perivitellinmembran. Sie erscheint in diesen Bereichen gelockert, jedoch noch nicht völlig aufgelöst, wie dies bei den „Löchern“ der Fall ist (Sultana et al., 2004).

Aus Untersuchungen über Polyspermie bei Vögeln ist es bekannt, dass mehrere Spermatozoen im Bereich einer einzigen „Scheibe“ penetrieren können (Rabbani et al., 2006). Die meisten der eingedrungenen Spermien degenerieren bald (Nickel et al., 2004), und nur ein Spermium, welches die Keimscheibe penetriert hat, verschmilzt mit dem Eikern und trägt so zum Embryo bei (Wishart und Horrocks, 2000).

2.5 Lektin histochemie

Die ersten Lektine wurden von Hermann Stillmark (1888) in Extrakten von Rizinusamen entdeckt. Da sie Fähigkeit aufwiesen, Erythrozyten zu agglutinieren, wurden sie zunächst als Hämagglutinine bezeichnet. Der Begriff „Lektin“ wurde erst 1954 von Boyd und Shapleigh eingeführt, die mit einer Benennung, die vom lateinischen Wort „legere“ (auswählen) stammt, die Eigenschaft mancher Lektine, sich spezifisch an bestimmte Blutgruppenantigene zu binden, betonen wollten (Rüdiger und Gabius, 1993). Das erste Agglutinin, das aus den Samen von *Canavalia ensiformes* isoliert worden ist, wurde von dem amerikanischen Biochemiker James B. Sumner „Conacavalin A“ benannt (Sumner, 1919). Er entdeckte, dass Con A nicht nur Erythrozyten agglutinieren kann, sondern auch Stärke, Glykogen und Muzine, und dass eine Hemmung der Agglutination durch Zucker wie z.B. Glukose möglich ist (Sumner und Howell, 1936). Dies zeigte zum ersten Mal, dass Lektine die Fähigkeit besitzen, selektiv bestimmte Kohlenhydrate zu binden. Mit diesen Eigenschaften waren sie hervorragend geeignet, die Kohlenhydratverteilung in Zellmembranen zu untersuchen (Rüdiger und Gabius, 2001). Lektine kommen in Pflanzen (Samenextrakten), Tieren, Mikroorganismen und Pilzen vor (Rüdiger und Gabius, 1993). Die meisten Lektine befinden sich in den Speicherorganen der Pflanzen. Außer in Samen befinden sie sich auch in Wurzeln, Knollen, Zwiebeln, Rinden und Blättern. In den Zellen werden Lektine hauptsächlich in Proteinkörperchen (Speichervakuolen) gefunden, die vom endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden (Rüdiger und Gabius, 2001).

Chemisch sind die meisten Lektine Glykoproteine, die bestimmte Zucker selektiv binden ohne enzymatischen Einfluss auf diese zu nehmen. Im Vergleich zu zuckerbindenden Immunglobulinen werden Lektine nicht vom Immunsystem beeinflusst (Rüdiger und Gabius, 2001). Ihre Synthese wird auch nicht durch einen antigenen Stimulus ausgelöst (Kocourek und Hořejší, 1983). Somit werden alle zuckerbindenden Proteine als „Lektine“ definiert, mit Ausnahme von Antikörpern und Enzymen (Barondes, 1988). Mit dieser Definition von Lektinen werden Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Enzyme, die z.B. eine Sulfatgruppe an Zucker anhängen, vom Begriff „Lektin“ ausgeschlossen (Shannon et al., 1981). Lektinmoleküle, die eine sehr heterogene Proteinklasse darstellen und nach Lis und Sharon (1986) mehrere Untereinheiten besitzen, haben zwei oder mehrere Bindungsstellen für Kohlenhydratketten, an die sie andocken können. Das Lektin WGA (Wheat Germ Agglutinin) besteht beispielsweise aus zwei 18-kDa-Untereinheiten, die aus jeweils vier unabhängig gefalteten und helikal angeordneten Domänen bestehen. Sie werden von vier Disulfidbrücken zusammengehalten und stabilisiert. Die vier Kohlenhydrat-Bindungsstellen des WGA für N-Acetyl-Glukosaminsäure (GlcNAc) oder 5-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) befinden sich im Bereich zwischen den Untereinheiten (Wright, 1977). Lektine reagieren meist mit endständigen, nicht-reduzierenden Zuckern, manche von ihnen können aber auch innere Kohlenhydratsequenzen erkennen (Gabius und Gabius, 1993). So können Lektine u.a. als Sonden für die Untersuchung von Zelloberflächenstrukturen

eingesetzt (Stryer, 1995), oder als Marker für maligne Zellen benutzt werden (Gabius und Gabius, 1997). Die Kohlenhydrate der Glykoproteine und Glykolipide genauer zu untersuchen ist deshalb von Bedeutung, weil sie u.a. an Zelladhäsion, Wachstum und Differenzierung beteiligt sind (Fukuda, 2000).

Auch liegt der Vorteil bei der Verwendung von Lektinen zur Identifikation von Glykokonjugaten im Vergleich zu anderen Methoden (z.B. Alcianblau oder Schiff-Reagenz) darin, dass man sowohl die Präsenz des Glykans bestimmen als auch gleichzeitig häufig Informationen über dessen Struktur gewinnen kann (Gabius, 2001). Von den Lektinen stellen die Pflanzenlektine die größte und bestuntersuchtete Gruppe dar (Rüdiger und Gabius, 1993). In der Medizin werden Lektine u.a. eingesetzt, um krankheitsbedingte Veränderungen der Glykansynthese zu bestimmen, um Anomalien der Zelloberflächenglykan-Präsentation zu erkennen, oder als Marker für bestimmte infektiöse Agentien (Rüdiger und Gabius, 2001). In der letzten Zeit galt ein besonderes Interesse den sialinsäurespezifischen Lektinen, die an terminale Sialinsäurereste der Zuckereinheiten binden. Sialinsäuren, die Derivate der Neuraminsäuren sind, besitzen große Bedeutung bei verschiedenen Infektionskrankheiten, bei der Tumorbildung oder in der Immunologie. Das Verständnis über die sialinsäurebindenden Proteine mit ihren zugehörigen Rezeptoren und den sich daraus ergebenden Signalen hat v.a. in der biomedizinischen Forschung stark an Bedeutung gewonnen (Lehmann et al., 2006).

Die Lektin histochemie wurde im Ovar zur Analyse der Zuckerstrukturen der *Zonae pellucidae* von Maus, Ratte und Hamster (Nicholson et al., 1975; Wu et al., 1984; Avilés et al., 1994) von Katzen, Hunden und Schweinen (Skutelski et al., 1994) sowie von Schafen, Ziegen und Wasserbüffeln (Parillo et al., 1996; 1998) eingesetzt. Beim Vogel wurden Lektine u. a. verwendet, um Zuckerketten in Primordialkeimzellen von Hühner- und Wachtelembyos näher analysieren zu können. Damit wurden gleichzeitig Informationen über Migration, Kolonisation, und Differenzierung der Primordialkeimzellen während verschiedener Stadien der aviären Entwicklung gewonnen, sowie die Unterschiede der primordialen Keimzellen zwischen den Spezies Huhn und Wachtel deutlich gemacht (Yoshinaga et al., 1992; Gheri et al., 2000; Armengol et al., 2007). Weiter spielen die Glykoprotein-Zucker der Perivitellinmembran beim Vogel eine wichtige Rolle für Spermium-Eizell-Interaktionen (Robertson et al., 2000). Die O- und N-gebundenen Zuckerseitenketten dieser Glykoproteine sind überaus heterogen und stellen speziesspezifische Liganden für korrespondierende Proteine in der Membran der Spermien dar (Tulsiani et al., 1997).

Für die lichtmikroskopische Untersuchung von Bindungsstellen können Lektine mit Fluorochromen (Fluoreszein-Isotiozyanat), Enzymen (Horseradish Peroxidase) oder kolloidalem Gold konjugiert werden, und ihre Bindungsstellen können dann direkt oder indirekt (z.B. Avidin-Biotin-Methode) dargestellt werden (McCoy, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Pflanzenlektine eingesetzt, um Einblicke in die Zuckerzusammensetzung der Glykokonjugate im Ovar

der Wachtel zu gewinnen. Die Spezifität der Lektinbindung wurde durch eine Kontrollreaktion mit dem jeweiligen Hemmzucker des Lektins überprüft.

Tabelle 3: Zuckerspezifität der Lektine, Einteilung nach Goldstein und Poretz (1986)

Zuckerspezifität	Bezeichnung des Lektins	Ursprung
I. D-Mannose / D-Glukose	Conacavalin A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>
	Lens culinaris Agglutinin (LCA)	<i>Lens culinaris</i>
	Pisum sativum Agglutinin (PSA)	<i>Pisum sativum</i>
II. D-Galaktose	Peanut Agglutinin (PNA)	<i>Arachis hypogaea</i>
	Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSA I)	<i>Griffonia simplicifolia I</i>
	Ricinus communis Agglutinin (RCA I / II)	<i>Ricinus communis I / II</i>
	Erythrina cristagalli Agglutinin (ECA)	<i>Erythrina cristagalli</i>
III. N-Acetyl-D-Galaktosamin	Lima Bean Agglutinin (LBA)	<i>Phaseolus limensis</i>
	Soybean Agglutinin (SBA)	<i>Glycine max</i>
	Helix pomatia Agglutinin (HPA)	<i>Helix pomatia</i>
	Bauhinia purpurea Agglutinin (BPA)	<i>Bauhinia purpurea</i>
	Maclura pomifera (MPA)	<i>Maclura pomifera</i>
	Visea villosa Agglutinin (VVA)	<i>Visea villosa</i>
	Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)	<i>Dolichos biflorus</i>
IV. N-Acetyl-D-Glukosamin	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgare</i>
	Ulex europaeus Agglutinin II (UEA II)	<i>Ulex europaeus II</i>
	Griffonia simplicifolia Agglutinin II (GSA II)	<i>Griffonia simplicifolia II</i>
	Laburnum alpium Agglutinin (LAA)	<i>Laburnum alpium</i>
	Solanum tuberosum Agglutinin (STA)	<i>Solanum tuberosum</i>
V. L-Fukose	Ulex europaeus Agglutinin I (UEA I)	<i>Ulex europaeus I</i>
	Lotus tetragonolobus Agglutinin (LTA)	<i>Lotus tetragonolobus</i>
VI. Sialinsäure	Limulus polyphemus Agglutinin (LPA)	<i>Limulus polyphemus</i>
	Limax flavus Agglutinin (LFA)	<i>Limax flavus</i>
	Maacia amurensis Agglutinin (MAL I)	<i>Maacia amurensis I</i>
	Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	<i>Sambucus nigra</i>
	Viscum album Agglutinin (VAA)	<i>Viscum album</i>
VII. Lektine mit komplexen Kohlenhydratbindungsstellen	Phaeseolus vulgaris Agglutinine (PHA E / PHA L)	<i>Phaeseolus vulgaris</i>
	E = Erythroagglutinin L = Leukoagglutinin	

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Laminin

Basalmembranen gehören zur extrazellulären Matrix. Über sie läuft der Austausch von Makromolekülen zwischen den Geweben. Sie bestehen aus einer Lamina lucida (rara) und einer Lamina densa. Die unter ihnen gelegene Lamina fibroreticularis wird dem Bindegewebe zugerechnet. Meist werden die Lamina lucida und die Lamina densa, die von den Epithelzellen produziert werden, als „Basalmembran“ zusammengefasst (Kefalides et al., 1979; Laurie und Leblond, 1985; Inoue und Leblond, 1988). Die Basalmembran der Granulosazellen ist eine Barriere für den Transport von Wachstumsfaktoren zwischen der Theka interna und den Granulosazellen (Rodgers et al., 2000).

Basalmembranen bestehen aus einem Netzwerk, das von Kollagen IV und dem nicht-kollagenen Matrixprotein Laminin gebildet wird, und an das sich Heparansulfatproteoglykane, Entacin oder Nidogen (Timpl, 1989; Yurchenko und Schittny, 1990), Fibronectin (Yoshimura et al., 1985), Wachstumsfaktoren (Folkman et al., 1988; Vigny et al., 1988), Metalloproteinasen (Mackey et al., 1993) und ihre Hemmstoffe (Leco et al., 1994) binden können. Beim Vogel konnten neben Matrixproteinen auch noch Zytokine, Osteonektin, hämatopoetische Faktoren und deren Bindungsproteine in der Basalmembran identifiziert werden. Die Frage nach dem Ursprung der verschiedenen Basalmembran-Komponenten im Ovar der Wachtel sind aber noch weitgehend ungeklärt (Asem et al., 2000). Bei den Follikeln des Vogels liegt die Basalmembran wie bei anderen Spezies außen der Granulosazellschicht an (Wyburn et al., 1965 a; Perry et al., 1978 a).

Laminin ist eine wichtige Komponente der Basalmembranen im Ovar von Vertebraten und Wirbellosen. Es hat die Fähigkeit, Wachstum, Wanderung und Differenzierung von Zellen zu beeinflussen (Watt, 1986). Die verschiedenen Isotypen von Laminin und Kollagen IV binden über Integrin oder Dystroglykan-Rezeptoren an die Zellmembranen, und können von dort auch auf das Zytoskelett einwirken (Colognato et al., 1999). Das Lamininmolekül ist vergleichsweise groß. Es hat ein Molekulargewicht von 850 kDa und besitzt eine kreuzförmige Struktur mit einer langen Polypeptidkette (C-terminales Ende) und drei kurzen (N-terminales Ende) Polypeptidketten (Martin und Timpl, 1987), die sowohl globuläre als auch lineare Domänen enthalten. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden (Beck et al., 1990). Die lange Achse des Kreuzes beträgt ca. 105 nm (Fessler und Fessler, 1989; Timpl, 1989; Beck et al., 1990). Jedes Lamininmolekül besteht aus einer α -, einer β - und einer γ -Kette, die von verschiedenen Genen kodiert werden (Burgeson, 1994). Es gibt fünf verschiedene α -Ketten, drei verschiedene β -Ketten und drei verschiedene γ -Ketten. Die Laminin3-Komponenten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 1$ konnten bisher in der folliculären Basalmembran des Rinds nachgewiesen werden (Rodgers et al., 2003). Beim Rind hat man die Laminin1-Komponenten $\alpha 1$, $\beta 1$, und $\gamma 1$ (van Wezel et al., 1998) auch in der Theka interna identifizieren können, extrazellulär, aber ohne Verbindung zu einer Basalmembran. Dieses Material, welches man auch in der Theka und im

interstitiellen Bindegewebe von wachsenden Ovarien der Mäuse und Ratten gefunden hat, wird „Thekamatrix“ genannt. Ihr Bildungsort und ihre Funktion sind noch unbekannt (Rodgers et al., 2000). Während der Entwicklung der Follikel nimmt der Gehalt der Basalmembran an Kollagen IV ab (Bedeutung des Verlusts für die Funktion der Basalmembran ist noch unklar), die Menge des Laminins dagegen zu, wodurch sie dehnbarer wird. Desweiteren findet sich Laminin in den Basalmembranen der ovariellen Blutgefäße (Liebich, 2004). Zur immunhistochemischen Darstellung von Laminin im Ovar der Wachtel wurde in meiner Arbeit ein polyklonaler Laminin-Antikörper aus dem Kaninchen verwendet.

2.6.2 Konnexin 43

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Kommunikation zwischen den Granulosazellen des Ovars: durch Zytokine (Adashi, 1992), Wachstumsfaktoren (Adashi et al., 1991) oder durch Zell-zu-Zell-Kanäle, den „Gap Junctions“. Diese Kanäle bestehen aus jeweils zwei Hemikanälen, den Konnexonen. Diese setzen sich aus jeweils sechs Untereinheiten, den Konnexinen, zusammen. Jedes Konnexin enthält vier Transmembran-Domänen, eine intrazelluläre und zwei extrazelluläre Schleifen (Bruzzone et al., 1996; Munari-Silem und Rousset, 1996; Trosko und Runch, 1998). Die Kanalproteine werden Konnexine oder Pannexine bei Vertebraten und Innexine bei Wirbellosen genannt, welche als Bestandteile der Gap Junctions den schnellen Austausch von Ionen und hydrophilen Metaboliten bis zu einer molekularen Masse von 1 kD gewährleisten (Hervé, 2005). Zu den Stoffen, die über die „Gap Junctions“ ausgetauscht werden, gehören „second messenger“, wie cAMP, Ca²⁺, Inositolphosphat und ATP (Kumar und Gilula, 1996). Zur Signalübermittlung und somit zur Kommunikation zwischen den Gap Junctions werden die Proteine phosphoryliert. Auch intrazelluläre Aktionen der Konnexine, die Zusammenlagerung und Trennung von Konnexonen, die Degradation von Konnexinen und das Schließen von Gap-Junction-Kanälen werden auf diese Weise geregelt (Hervé, 2005). Gap Junctions spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Luteinisierung von Granulosazellen (Kidder und Mhawi, 2002). Auch bei der Apoptose der Granulosazellen sind sie wichtig und regeln die Übertragung von Zelltod-Signalen (Krysko et al., 2004). Konnexin 43 ist ein prominentes Gap-Junction-Protein. Es wird von den Granulosazellen exprimiert und trägt einen großen Teil zur Kopplung der Zellen bei (Dekel, 1987; Grazul-Bilska et al., 1997; Farioli-Vecchioli et al., 2000; Sommersberg et al., 2000; Rosenfeld et al., 2001; Gittens et al., 2003).

Durch immunzytochemische Lokalisation von Konnexin 43 kann die Verteilung von Gap Junctions gut dargestellt werden (Grazul-Bilska et al., 1997). Zur immunhistochemischen Darstellung von Konnexin 43 im Ovar der Wachtel wurde in dieser Arbeit ein monoklonaler Konnexin 43-Primärantikörper aus der Maus verwendet.

2.6.3 Vimentin

Vimentin gehört zu der Gruppe der Intermediärfilamente (Lazarides, 1980). Es ist ein Phosphoprotein und ist im Zytoskelett von eukariotischen Zellen zu finden, die mesenchymalen Ursprungs sind (Cabral und Gottesman, 1979; Gard und Lazarides, 1982). Seine Größe beträgt 10 nm (Steinert et al., 1984). Neben seiner Funktion im Zytoskelett (Lazarides, 1980; Traub, 1985) gibt es Anzeichen dafür, dass Vimentin eine Rolle in der DNA-Replikation, -Rekombination, -Reparatur und in der Genexpression spielen könnte (Geiger, 1987; Georgatos und Blodel, 1987 a, b; Oudega und Marani, 1991). Im Allgemeinen sind die Intermediärfilamente an Zellaktivitäten wie Differenzierung, Proliferation und Zellinteraktionen eingebunden. Im Ovar kommt Vimentin z.B. in den Granulosazellen der Primordialfollikel und prävitellinen Follikel beim Strauß vor, die stark proliferieren. Bei Follikelatresie wird Vimentin (und Desmin) abgebaut (Madekurozwa und Kimaro, 2006). Die Verteilung der aviären ovariären Intermediärfilamente und damit auch Vimentin wurden in der Vergangenheit u.a. bei der Japanischen Wachtel (van Nassauw und Callebaut, 1991), beim Strauß (Madekurozwa und Kimaro, 2006) und beim Emu (Madekurowza, 2007) untersucht. Vimentin dient auch als Marker bei (ovariären) Tumoren (Giles et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Darstellung von Vimentin im Ovar der Wachtel ein monoklonaler Vimentin-Antikörper aus der Maus verwendet.

2.6.4 Smooth muscle actin (SMA)

In den Wänden von präovulatorischen Follikeln kommen spindelförmige Zellen vor, die Charakteristika von glatten Muskelzellen aufweisen, wie Aktin- und Myosinfilamente, Gap Junctions und stabförmige Kerne (van Nassauw et al., 1992). Diese mit kontraktilen Elementen ausgestatteten Thekazellen sind beim Haushuhn nach ultrastrukturellen Untersuchungen als Fibroblasten bezeichnet worden (Rothwell und Solomon, 1977; Perry et al., 1978 a). Ähnliche Zellen mit Mikrofilamenten wurden bei der Wachtel in Zellen der Tunica albuginea, in den „Chordae“ und ebenfalls in der Theka externa des Ovars gefunden. Diese Zellen stehen miteinander in Kontakt und formen zusammen den „ovariären Aufhängeapparat“. Manchmal beinhalten Perizyten der Sinusoide in der Theka interna ebenfalls Mikrofilamente aus SMA (van Nassauw et al., 1992).

Die Gesamtheit dieser kontraktilen Zellen, die bevorzugt in der Theka externa vorkommen, spielen nach Schroeder und Talbot (1985) eine wichtige Rolle bei der Ovulation und werden als ein dem Säuger ähnliches „thekales kontraktils System“ bezeichnet. Dieses System beeinflusst wahrscheinlich die Regulation des Dottervorläufermaterials in den Theka-interna-Kapillaren (Callebaut et al., 1990) und reguliert zusammen mit den glatten Muskelzellen der Chordae und der Tunica albuginea den ovariären Blutfluss (van Nassauw et al., 1992). Unter den „Chordae“ versteht man dichte Stränge

glatter Muskelzellen, die Teile des von Callebaut (1988) beschriebenen Chordolacunarsystems sind, von Hohlräumen (Lacunae) umgeben sind und mit der Peritonealhöhle in Verbindung stehen. Durch Kontraktion sind die Chordae vermutlich fähig, Peritonealflüssigkeit in die Lacunae zu leiten (Callebaut, 1979; Gonzalez del Pliego et al., 1988). Diese Stränge glatter Muskelzellen zeigen sich vom Hilus des Ovars ausgehend bis in die Follikelwände, sie können auch Zweige an die Tunica albuginea abgeben (van Nassauw et al., 1992). α -Smooth-muscle-actin (α -SMA) ist ein spezifischer Marker für kontraktile Zellen. Bei der Wachtel wurde es durch immunohistochemische Studien in der Tunica albuginea, in den Chordae und in der Theka externa (sowie in den Perizyten der Theka interna) aller reifenden Follikel gefunden. Die Menge der muskelartigen Zellen nimmt mit ansteigender Follikelreife zu (Callebaut und van Nassauw, 1986; van Nassauw und Callebaut, 1991; van Nassauw et al., 1989, 1990, 1992). In dieser Arbeit wurde zur Lokalisation der kontraktilen Zellen im Ovar der Wachtel ein monoklonaler Antikörper gegen α -SMA aus der Maus verwendet.

2.6.5 Zytokeratine (CK)

Zytokeratine sind eine bedeutende Komponente des Zytoskeletts von Epithelzellen und spielen bei verschiedenen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Der immunzytochemische Nachweis von Zytokeratinen hat bei der Klassifizierung ovarialer Tumoren große Bedeutung: Beim serösen Oberflächenpapillom, muzinösen Zystadenom und serösen Papillarzystadenom werden CK 7, CK 8 und CK 18 als Marker für differenzierte Epithelzellen verwendet, während CK 5 und CK 14 als Marker für Basalzellen angesehen werden (Perez-Martinez et al., 2001). Bei der Maus gilt CK 13 als Marker für eine maligne Transformation von Epithelzellen (Klein-Szanto, 1997), während es im Reproduktionstrakt beim Rind normales Gewebe (negativ) vom Tumorgewebe (positiv) differenziert, jedoch keine Unterscheidung zwischen gutartigem und bösartigem Tumor zulässt (Perez-Martinez et al., 2001). Perez-Martinez et al. (2001) haben im gesunden Ovar des Rindes die Zytokeratine 6, 7, 8, 14, 18 und PanCK nachgewiesen.

Das Ovar des Haushuhns wird als Modell für Untersuchungen von Ovarialtumoren des Menschen herangezogen. 24% aller White leghorn Hennen entwickeln ein altersabhängiges, bösartiges Ovarialkarzinom. Seinen Ursprung dürfte es im Keimdrüsenepithel oder in der Theka der Follikel nehmen. Vieles spricht jedoch dafür, dass es, ähnlich wie beim Menschen, v.a. vom Keimdrüsenepithel seinen Ausgang nimmt (Fredrickson, 1987).

In meiner Arbeit wurden zur Darstellung von Zytokeratinen im Ovar der Wachtel ein polyklonaler Antikörper gegen CK 5 aus dem Meerschweinchen und monoklonale Antikörper gegen CK 15, CK 18 und PanCK aus der Maus verwendet.

2.6.6 Glykoproteine der Perivitellinmembran

Die Glykoproteine, ihr Aufbau und ihre Rolle in der Perivitellinmembran wurden bereits im Kapitel „2.4. Aviäre Perivitellinmembran“ beschrieben. Zur Identifikation der bereits beschriebenen Glykoproteine ZP1, ZPA, ZPC und ZPD in der ovariellen Perivitellinmembran der Wachtel wurden in dieser Arbeit polyklonale (anti-quail-) Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Zur Darstellung der zytoplasmatischen mRNA wurde bei ZP1 und ZPC zusätzlich eine RNA-in-situ-Hybridisierung mit biotinmarkierten Oligonukleotid-Sonden durchgeführt, um damit ihren Syntheseort bestimmen zu können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsorgane

Als Untersuchungsorgane dienten die linken Ovarien von 18 Japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*). Physiologischerweise war nur die jeweils linke Gonade ausgebildet. Die Tiere waren ca. 6 Monate alt und wurden als Legewachteln im Stall gehalten. Sie stammen aus dem Institut für Tierernährung, Oberwiesefeld.

Spezies:	Alter:	Entnahmedatum:
6 Japanische Wachteln	6 Monate	März 2006
5 Japanische Wachteln	6 Monate	November 2006
2 Japanische Wachteln	6 Monate	Januar 2008
5 Japanische Wachteln	6 Monate	Dezember 2008

Die genauen Zusammensetzungen der in diesem Kapitel nicht näher beschriebenen Lösungen, Puffer, Chemikalien sowie nicht angeführte Firmen und weitere Arbeitsmaterialien befinden sich unter „Kapitel 9 Anhang (Methodik)“.

3.2 Materialvorbereitung für die Lichtmikroskopie

Die Ovarien wurden unmittelbar nach der Tötung der Tiere (Dekapitation nach CO₂-Anästhesie) gewonnen. Mittels einer Skalpellklinge wurden die Organe der Länge nach halbiert, um möglichst viele Follikelstadien zu erhalten. Die Ovarien wiesen keinerlei Anzeichen einer pathologischen Veränderung auf. Unter dem Stereoskop wurden geeignete Gewebelöcher (Kantenlänge 5 mm) entnommen und in Bouin'scher Lösung (Romeis, 1989) bzw. in Phosphate Buffered Saline Solution (PBS)-gepufferte 4% Formalin-Lösung (Romeis, 1989) 24 Stunden immersionsfixiert. Die in Bouin'scher Lösung eingelegten Proben wurden danach in 70% Alkohol eingebracht, der im Abstand von 48 Stunden zusätzlich zweimal gewechselt wurde. Die PBS-gepufferte Formalin-Lösung wurde einmal gewechselt bevor die Proben in PBS-Puffer und anschließend ebenfalls in 70% Alkohol eingebracht wurden. Die weitere Entwässerung für alle Proben mittels aufsteigender Alkoholreihe (70% Alkohol, 96% Alkohol, Isopropanol, Xylol) und die anschließende Durchtränkung mit Paraplast® (Fa. Monoject Scientific Inc., Kildare, Irland) erfolgte in einem Einbettungsautomaten Shandon Duplex Processor® (Fa. Shandon, Frankfurt) für 24 Stunden. Die so vorbereiteten Präparate

wurden danach an einem Histostat Tissue Embedding Center® (Fa. Reichert-Jung, Wien) einzeln in gleich große Paraplast®-Blöcke ausgegossen. Nach mindestens einer Stunde Abkühlzeit wurden dann unter Verwendung eines Rotationsmikrotoms Mikrom®Typ HM340E (Fa. Leitz, Wetzlar) von jedem Block 30 - 50 Schnitte mit einer Schichtdicke von ca. 5 µm angefertigt, welche in Reihenfolge auf durchnummerierte, je nach Verwendungszweck beschichtete (SupraFrostUltraPlus adhäsiv®) oder unbeschichtete (SuperFrost®) Objektträger aus Glas (Fa. Menzel, Braunschweig) aufgetragen wurden. Für die vollständige Trocknung der Schnitte wurden sie für mindestens 24 Stunden in einen Wärmeschrank (Fa. Bender & Hobein, Karlsruhe), der auf eine innere Temperatur von 30 - 40°C eingestellt war, verbracht. Die Schnitte wurden nach Durchsicht ihrer Eignung für konventionelle, glykohistochemische und immunhistochemische Untersuchungen sowie für die RNA-in-situ-Hybridisierung verwendet.

3.3 Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen

Nach Vorbehandlung der Schnitte durch Entparaffinierung in Xylol und einer Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe wurden sie den unten im Detail beschriebenen konventionellen Färbemethoden unterzogen. Anschließend wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und danach kurzzeitig in Xylol gestellt. Mit xylolverdünntem Eukitt® (Fa. Riedel de Haen AG, Seelze) und dünnen Deckglasplättchen (Fa. Menzel, Braunschweig) wurden die Schnitte schließlich eingedeckelt und dadurch langfristig fixiert.

Folgende Färbemethoden (Methoden nach Romeis, 1989) wurden angewandt:

Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) nach Mayer:

- Kernfärbung mit Hämalaun: 20 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Bläuen in fließendem Leitungswasser: 20 Minuten
- Eosin: 10 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Ergebnis: Kerne stellen sich blauviolett, das übrige Gewebe rosa dar.

Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) nach McManus, mit und ohne Amylasevorbehandlung:

- Mit Amylasevorbehandlung: 0,5% Amylase auf Schnitte geben, bei 37°C in einer feuchten Kammer in einen Brutschrank geben: 10 Minuten
Ohne Amylasevorbehandlung: diesen Schritt auslassen
- 5% wässrige Perjodsäure-Lösung: 5 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Schiff'sches Reagenz (Fuchsinschweflige Säure): 15 Minuten
- Waschen in Schwefeldioxid-Wasser: 3 x 2 Minuten
- Fließendes Leitungswasser: 5 Minuten
- Hämalaun für Kernfärbung: 1 – 2 Minuten
- Bläuen in fließendem Leitungswasser: 15 Minuten
- Ergebnis: Glykole werden durch Perjodsäure oxidiert. Die dadurch entstehenden Aldehydgruppen bilden mit der Schiff'schen Reagenz purpurrote Farbkomplexe. So werden kohlenhydratreiche Glykoproteine und Glykogen gut dargestellt. Bei Verwendung von Amylase: Glykogen wird verdaut, die verbleibenden positiven Ergebnisse schließen demnach Glykogen aus.

Trichromfärbung nach Masson und Goldner (Goldner-Färbung):

- Eisenhämatoxin nach Weigert: 1 Minute
- 3 x Spülen in Aqua dest.
- Fließendes Leitungswasser: 10 Minuten
- Azophloxin: 5 Minuten
- Spülen in 1% Essigsäure
- Phosphormolybdänsäure-Orange: 15 Sekunden – 30 Minuten (Kontrolle unterm Mikroskop!)
- Spülen in 1% Essigsäure
- Gegenfärbung mit Lichtgrün: 5 – 10 Minuten
- Ergebnis: Die Kerne sind durch das Eisenhämatoxin braunschwarz gefärbt, das Zytoplasma ist ziegelrot. Die Erythrozyten stellen sich gelb-orange dar, das Hauptcharakteristikum ist jedoch die grüne Anfärbung der kollagenen Bindegewebsfasern (und des Schleims).

Alcianblau 8GX-Färbung (Alcianblau-Färbung): bei pH-Wert 2,5 und bei pH-Wert 1,0:

- 3% Essigsäure (pH-Wert 2,5) bzw. 0,1N Salzsäure (pH-Wert 1,0): 3 Minuten
- 1% Alcianblau 8GX in 3% Essigsäure (pH-Wert 2,5) bzw. 0,1 N Salzsäure (pH-Wert 1,0): 30 Minuten
- Spülen in 3% Essigsäure (pH-Wert 2,5) bzw. 0,1 N Salzsäure (pH-Wert 1,0)
- Spülen in Aqua dest.
- Kernechtrot: 3 - 5 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Ergebnis: saure Mukosubstanzen färben sich leuchtend blau an, während sich der Hintergrund zartrosa darstellt. Die Kerne sind hellrot gefärbt. Alle sauren Mukosubstanzen färben sich bei einem pH-Wert von 2,5 positiv an, um jedoch zusätzlich zwischen Karboxyl- und Sulfatgruppen unterscheiden zu können, dient die gleiche Färbung bei einem pH-Wert von 1,0, bei welcher sich nur noch die sulfatierten Mukosubstanzen positiv darstellen.

Die lichtmikroskopische Auswertung und Photodokumentation erfolgte an einem Lichtmikroskop Aristoplan® (Fa. Leitz, Wetzlar) mit angeschlossener Kamera Lumenera USB Camera® Release 3.8 (Fa. Lumenera Corporation, Ontario, Kanada) sowie an einem Photomakroskop (Fa. Wild, Heerbrugg) in Kombination mit einer angeschlossenen Digitalkamera Canon-Powershot® A95 (Fa. Canon, Krefeld).

Die Messungen der Granulosazellhöhen in Abhängigkeit vom Follikeldurchmesser erfolgten mit Hilfe des Morphometrieprogrammes „ImageJ“ (Image Processing and Analysis in Java). Es wurden pro Follikelstadium (Primordialfollikel, prävitelline Follikel, SYF, F5, F4, F3, F2) 15 verschiedene Granulosazellhöhen ausgemessen. Daraus wurden dann der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Gleiches Verfahren gilt für die im Ergebnistext erwähnten Kerndurchmesser der Oozyten. Es wurden hier ebenfalls 15 verschiedene Kerne pro Follikelstadium ausgemessen.

3.4 Lektin histochemie

Für den Nachweis spezifischer Kohlehydratstrukturen wurden 12 verschiedene Lektine (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in unterschiedlicher Konzentration (siehe Tabelle 4) eingesetzt, welche mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert waren. Weiter wurden die drei sialinsäurespezifischen Lektine MAL I, SNA und VAA (Fa. Vector, Burlingame, USA) die mit Biotin konjugiert waren, eingesetzt.

Für die Lektin histochemie wurden sowohl Bouin- als auch Formalin-fixierte Schnitte verwendet.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lektine

Lektingruppe	Abk.	Ursprung	Zuckerspezifität	Konz.	Hemmung
I. D-Mannose/ D-Glukose-bindende Lektine	Con A	Schwertbohne	α -D-Man \gt α -D-Glc	10 μ g/ml	Methyl- α -Manno-Pyranoside 0,2 Molar
	LCA	Linse	α -D-Man	10 μ g/ml	
II. D-Galaktose-bindende Lektine	PNA	Erdnuss	β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc	10 μ g/ml	Methyl- α -D-Galacto-Pyranoside 0,2 Molar
	RCA	Rizinusstaude	β -D-Gal	10 μ g/ml	
III. N-Azetyl-D-Galaktosamine-bindende Lektine	SBA	Sojabohne	α -D-GalNAc, α -D-Gal	10 μ g/ml	N-Acetyl-Galaktosamine 0,2 Molar
	DBA	Pferdebohne	α -D-GalNAc(1-3)GalNAc	10 μ g/ml	
IV. N-Azetyl-D-Glukosamine-bindende Lektine	WGA	Weizenkeim	(D-GlcNAc) ² NeuNAc	10 μ g/ml	N-Acetyl-Galaktosamine 0,5 Molar
	WGA succ.	Weizenkeim	(D-GlcNAc) ² NeuNAc	10 μ g/ml	
V. L-Fukose-bindende Lektine	UEA I	Stechginster-Samen	α -L-Fuc	10 μ g/ml	α -L-Fukose 0,05 Molar
VI. Sialinsäure-bindende Lektine (biotinyliert)	MAL I	Asiatisches Gelbholz	NeuNAc	10 μ g/ml	Vorinkubation mit Neuraminidase von <i>V. cholerae</i> (Fa. Roche, Mannheim)
	SNA	Holunder	NeuNAc	5 μ g/ml	
	VAA	Mistel	NeuNAc	5 μ g/ml	

Um die ausgewählten Schnitte für die Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie zu verwenden, mussten zuerst folgende Schritte durchgeführt werden:

Biotinylierte Lektine:

1. Schnitte entparaffinieren in Xylol
2. Schnitte rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
3. Spülen in PBS-Puffer (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), pH-Wert 7,2 - 7,6: 3 x 5 Minuten
4. Schnitte in feuchte Kammer legen, Protein Block Serum-Free® (Fa. Dako, Hamburg) auftropfen: 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
5. Beschichten der Schnitte mit ca. 40 µl des jeweiligen PBS-gepufferten biotinylierten Lektins mit der entsprechenden Konzentration
6. Spülen in PBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
7. Beschichten der Schnitte mit PBS-Puffer verdünntem Streptavidin/FITC bei einer Konzentration von 1:500
30 Minuten in der feuchten Kammer stehen lassen
8. Spülen in PBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
9. Gepuffertes DAPI auftröpfeln (für die Kernfärbung) bei einer Konzentration von 1:500
10 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer belassen
10. Kurz Spülen in PBS-Puffer
11. Fließend wässern, danach in Aqua dest.; Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe; Xylol
12. Eindeckeln der fertigen Schnitte mit einem Polyvinylalkohol-Ethylenglycol-Gel (Fa. Serva, Heidelberg)
13. Abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren (Fluoreszenz ca. 6 Wochen, abhängig vom Gebrauch)

FITC-markierte Lektine:

14. Schnitte entparaffinieren in Xylol
15. Schnitte rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
16. Spülen in PBS-Puffer, pH-Wert 7,2 - 7,6: 3 x 5 Minuten
17. Schnitte in feuchte Kammer legen und ca. 40 µl Lektin mit entsprechender Konzentration aufpipettieren
18. Abgedunkelt 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
19. Spülen in PBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
20. Gepuffertes DAPI auftröpfeln (für die Kernfärbung) bei einer Konzentration von 1:500: 10 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer belassen
21. Spülen in PBS-Puffer; dunkel halten
22. Fließend wässern, danach in Aqua dest.; Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe; Xylol
23. Eindeckeln mit Polyvinylalkohol-Ethylenglycol-Gel (Fa. Serva, Heidelberg)
24. Abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren (Fluoreszenz ca. 6 Wochen, abhängig vom Gebrauch)

Kontrollen:

Um eine mögliche Eigenfluoreszenz im Ovargewebe zu erkennen, wurden Schnitte statt mit einem markierten Lektin als Negativkontrolle ausschließlich mit PBS-Puffer inkubiert

Eine Positivkontrolle eines Gewebes ähnlicher Art mit bekannter positiver Reaktion ist empfehlenswert.

Kompetitive Hemmung der Lektinbindung:

Zur Überprüfung der Spezifität der Lektine wurde eine kompetitive Hemmung mit den jeweiligen korrespondierenden Zuckern (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) durchgeführt.

Dazu wird der Hemmzucker in PBS-Puffer gelöst (Molarität s.u.) und anschließend mit dem entsprechenden Lektin inkubiert. Die Inkubationslösung muss 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen werden. Anschließend wird die Hemmzuckerlösung, wie für ein FITC-markiertes Lektin im Protokoll angegeben, eingesetzt.

Auswertung:

Die Auswertung der mit Lektinen gefärbten Schnitte wurden mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop Dialux 20® (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) mit angeschlossener ProgRes® Kamera (Fa. Jenoptik, Jena) durchgeführt. Die semiquantitative Beurteilung erfolgte nach folgendem Schema:

- = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ =stark positiv, +++ = sehr stark positiv

3.5 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde sowohl in Bouin´scher Lösung als auch in gepuffertem Formalin fixiertes Material verwendet. Hierzu wurde die ABC-Methode („Avidin-Biotin-Complex“) nach Hsu et al. (1981) ausgewählt. Avidin besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität zu Biotin und kann vier Moleküle von Biotin binden. Desweiteren kann Avidin durch Streptavidin ersetzt werden, ein biotechnologisch entwickeltes Produkt, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird. Der Primärantikörper, der an das gesuchte Antigen bindet, wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an einen Komplex aus Streptavidin und einer biotinylierten Peroxidase (ABC) gebunden. Die Peroxidase spaltet das zugegebene H_2O_2 in H_2O und O_2 . Das O_2 oxidiert zugegebenes und zunächst farbloses 3,3-Diaminobenzidin (DAB-Hydrogenperoxidlösung, Fa. Sigma-Adrich, Steinheim) zu einem braunen Farbkomplex, durch den eine positive Reaktion sichtbar wird.

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Antikörper-liefernde Tierart	Verdünnung und Inkubation	Hersteller des Primär-AK	Sekundärantikörper	Verdünnung und Inkubation
Laminin (polyklonal)	Kaninchen	1:500 über Nacht (6°C)	Fa. Serotec, Düsseldorf	Anti-Kaninchen IgG biot. vom Schwein Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Konnexin 43 (monoklonal)	Maus	1:200 über Nacht (6°C)	Fa. BD Biosciences, Heidelberg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Vimentin (monoklonal)	Maus	1:500 über Nacht (6°C)	Fa. Dako, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
α -SMA (monoklonal)	Maus	1:40 60 Minuten bei Raumtemperatur	Fa. Dako, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Panzytokeratin (PanCK) (monoklonal)	Maus	1:100 über Nacht (6°C)	Fa. Biocarta, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Zytokeratin 5 (CK 5) (polyklonal)	Meer-schwein-chen	1:50 über Nacht (6°C)	Fa. Progen, Heidelberg	Anti-Meerschwein IgG biot. von der Ziege Fa. Vector, Burlingame, USA	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Zytokeratin 15 (CK 15) (monoklonal)	Maus	1:100 über Nacht (6°C)	Fa. Dianova, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Zytokeratin 18 (CK 18) (monoklonal)	Maus	1:20 über Nacht (6°C)	Fa. Progen, Heidelberg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Zona-pellucida-Glykoproteine (ZP1; ZPA; ZPC; ZPD) (polyklonal)	Kaninchen	1:600 (ZP1) 1:1000 (ZPA) 1:800 (ZPC) 1:1000 (ZPD) über Nacht (6°C)	Dr. Sasanami, Universität Shizuoka, Japan	Anti-Kaninchen IgG biot. vom Schwein Fa. Dako, Hamburg	1:300 30 Minuten, Raumtemp.

Spülen in PBS-Puffer: 3 x 5 Min.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Complex (ABC-Lsg.): 30 Min. (Fa. Dako, Hamburg)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Spülen in PBS-Puffer: 3 x 5 Min.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DAB-Lösung: ca. 8 Min. (abgedunkelt!) (Fa. Dako, Hamburg)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fließendes Leitungswasser: 1 Min.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kerne mit Hämalaun gegenfärben: 30 Sek.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fließendes Leitungswasser: 10 Min. + Aqua dest.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe + Xylol + Eindeckeln mit Eukitt® (Fa. Riedel de Haen AG, Seelze)	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Kontrollen:

Um unspezifische Anfärbungen im Ovargewebe zu erkennen wurden Schnitte als Negativkontrolle anstelle mit einem Primärantikörper nur mit der Antikörper-Verdünnungslösung Dako Diluent® (Fa. Dako, Glostrup) inkubiert. Als Positivkontrollen wurden Gewebe verwendet, von denen aus früheren Untersuchungen bzw. aus der Literatur eine positive Reaktion bekannt war.

Auswertung:

Für die Auswertung der so behandelten Proben stand ein Lichtmikroskop Aristoplan® (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) mit angeschlossener Kamera Lumenera USB Camera® Release 3.8 (Fa. Lumenera Corporations, Ontario, Kanada) zur Verfügung. Die semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen erfolgte nach folgendem Schema:

- = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

3.6 Elektronenmikroskopie

Proben aus dem Ovar, die unter einem Stereomikroskop entnommen wurden, wurden mittels einer scharfen Rasierklinge in kleine Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge geteilt, wobei Quetschungen des Gewebes zu vermeiden waren. Es wurden Proben aus der Ovarrinde (Follikel in verschiedenen Stadien, Keimdrüsenepithel) und der Medulla ovariae entnommen.

Fixierung:

- Fixierung der Proben in Karnovsky-Lösung bei 4°C für 24 Stunden (siehe Kapitel 9. Methodik)
- Spülen der Proben: 3 x 60 Minuten in Natriumcacodylat-Puffer (0,1M, pH-Wert 7,4)
- Kontrastierung: 2 Stunden in Osmiumtetroxid(1%)-Kaliumferrocyanid(1,5%)-Lösung im Dunkeln
- Spülen: 3 x 20 Minuten in Natriumcacodylat-Puffer (0,1M, pH-Wert 7,4)
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: 20 Minuten in 30% und 50% Alkohol, 30 Minuten in 70% und 90% Alkohol, 3x in absolutem Alkohol
- Einbettung in Kunstharz:
 - 2 x 15 Minuten in Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt)
 - 1 Stunde in ein Propylen-Polyembed-Gemisch im Verhältnis 2:1
 - 24 Stunden in ein Propylen-Polyembed-Gemisch im Verhältnis 1:1
 - 1 Stunde in Polyembed (Fa. Polysciences, Eppelheim)
- Verlagerung der Proben in flache Einbettungsgießformen
- 48 Stunden Polymerisierung im Wärmeschrank bei 60°C
- Zum Auffinden gesuchter Bereiche im Gewebe: Anfertigen von 1 µm dicken Semidünnschnitten an einem Ultramikrotom Ultracut E® (Fa. Reichert-Jung, Wien) und anschließende Färbung mit Methylenblau
- Anfertigen von 60 nm-Ultradünnschnitten (Interferenzfarbe: grau)
- Aufziehen der Schnitte auf Kupfergrids (Standard-Copper-150mesh)
- Nachkontrastierung: 10 Minuten in 2 % Uranylacetat und 3 Minuten in Bleicitratlösung nach Reynolds (siehe Kapitel 9. Anhang (Methodik))

Auswertung:

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Fa. Zeiss, Oberkochen) fotografiert und ausgewertet. Die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV.

3.7 RNA-in-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung wurde mit Oligonucleotid-DNA-Sonden durchgeführt, die von der Fa. Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt wurden.

Unter der Datenbank NCBI (Gene) werden spezifische (Wachtel) RNA-Sequenzen für die Zonapellucida-Glykoproteine ZP1 und ZPC herausgesucht. Das Display NCBI „FASTA“ zeigt die gesamte Sequenz an. Diese wird anschließend in die Web-Seite „Primer 3“ hineinkopiert. Das Programm bietet hier eine mögliche Sequenz für eine Oligonucleotid-Sonde an. Um deren Spezifität für die mRNA der gesuchten Strukturen im Gewebe zu überprüfen und gegebenenfalls eine neue Suche zu starten, wird das Display NCBI „BLAST“ eingesetzt. Die Sondensequenz mit der höchstmöglichen Spezifität für die gesuchte mRNA wird ausgewählt. Die Sequenz der Antisense (Sonde für die gesuchte mRNA) ist dabei immer ein „reverse compliment strand“ zu jener der Sense.

ZP1_Quail_Sense: 5' gctagtctatgagaaccagctcatct 3' (GenBank Nr. AB061520)

ZP1_Quail_Antisense: 5' agatgagctggttctcatagactagc 3'

ZPC_Quail_Sense: 5' attgaagtcaatgatggcgtagt 3' (GenBank Nr. AY630569)

ZPC_Quail_Antisense: 5' actagccatcattgacttcaat 3'

Fixierung:

Die Proben wurden in PBS-gepufferter 4% Formalin-Lösung immersionsfixiert und danach in Paraplast® eingebettet (siehe Punkt 3.2.). Anschließend wurden Schnitte von 5 µm hergestellt.

Arbeitsschritte:

Bei allen Arbeitsschritten ist stets auf RNase-freie Bedingungen beim Schneiden zu achten, (v.a. Handschuhe), bei allen Verdünnungen DEPC-Wasser, siehe „Kapitel 9. Anhang (Methodik)“, zu benutzen, sowie sterilisiertes Arbeitsmaterial zu verwenden.

- Entparaffinierung in Xylol: 3 x 10 Minuten
- Ethanol: 2 x 10 Minuten
- Lufttrocknung der Schnitte
- Einbringen in 2fach-konzentrierten Saline Sodium Citrate Puffer (SSC)-Puffer (pH-Wert 8,3) (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) auf 80°C vorgeheizt: 10 Minuten
- Abkühlen lassen bei Raumtemperatur: 20 Minuten
- Spülen in Aqua dest.: 2 x 5 Minuten
- Spülen in Trizma® Hydrochloride Buffer Solution (Tris)-Puffer (pH-Wert 8,3) (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim): 2 x 5 Minuten
- Inkubieren der Schnitte mit Tris-gepufferter 0,1% Proteinase Pronase E® (Fa. VWR, Ismaning) bei Raumtemperatur (Ovar: 0,00125%, Leber: 0,05%)
- Spülen in Tris-Puffer: 2 x 5 Minuten
- Spülen in Aqua dest.: 2 x 5 Minuten
- Dehydrieren der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe
- Lufttrocknung der Schnitte
- Aufbringen von 40 µl der Sense bzw. Antisense der Oligonukleotid-Sonde, die im Verhältnis 1:20 mit in-situ-hybridisation-solution (Fa. Dako, Hamburg) verdünnt wird; die Nullprobe wird ausschließlich mit in-situ-hybridisation-solution behandelt. Anschließende Inkubation aller Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei ca. 10 - 15°C unterhalb der spezifischen genetischen Schmelztemperatur der verwendeten Sonde
- Waschen in 2fach-konzentriertem, ca. 38°C warmem SSC-Puffer: 2 x 15 Minuten
- Kurz spülen in Aqua dest.
- Spülen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4): 2 x 5 Minuten

- Aufbringen der ABC-Lösung Vectastain®-Elite ABC (Fa. Vektor, Burlingame, USA):
30 Minuten
- Spülen in PBS-Puffer: 2 x 5 Minuten
- Aufbringen der DAB-Lösung: DAB+Chromogen®, gelöst in DAB+Substrate Buffer® (beide Fa. Dako, Hamburg): unter Kontrolle 1 - 3 Minuten (dunkel!)
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe, danach Xylol
- Eindeckeln mit Eukitt® (Fa. Riedel de Haen AG, Seelze)

Auswertung:

Für die Auswertung der so behandelten Proben stand ein Lichtmikroskop Aristoplan® (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) mit angeschlossener Kamera Lumenera USB Camera® Release 3.8 (Fa. Lumenera Corporations, Ontario, Kananda) zur Verfügung.

Eine positive Reaktion wurde als solche identifiziert bei folgender Voraussetzung:

Antisense: deutlich sichtbare, ortsspezifische braune Farblagerung

Sense: keine oder nur schwache Hintergrundfärbung

Nullprobe: keine Hintergrundfärbung

4 ERGEBNISSE

4.1 Konventionelle histologische Färbungen

4.1.1 Übersicht über den Aufbau des Ovars

Bilder zu den konventionellen histologischen Färbungen befinden sich auf den Seiten 54 – 58.

Bei der Wachtel hat das Ovar eine runde bis ovale Form. Seine Länge beträgt ohne die größten Follikel 15 - 20 mm. Es enthält 20 - 30 kleinere weiße und 5 - 7 größere gelbe Follikel, die traubenförmig angeordnet sind (Bild 3). Das Ovar nimmt damit einen großen Teil der Bauchhöhle ein. Gelegentlich ist ein bereits ovuliertes, aber noch unpigmentiertes Ei im Magnum des Eileiters zu finden, bzw. ein schon weiterentwickeltes Ei in den weiter distalen Bereichen. Die Oberfläche der Follikel ist relativ glatt. Bei den großen gelben Follikeln sind hier deutlich Gefäße erkennbar. Rinde und Mark des Ovars können gut voneinander unterschieden werden. Die meist lappenförmig gefaltete Rinde ist dichter und enthält zahlreiche helle, runde bis elliptische Follikel aller Entwicklungsstadien. Die Breite der Rinde wird von der Größe der reiferen Follikel bestimmt. Primordialfollikel und sehr frühe prävitelline Follikel sind meist nur im äußersten Rand der Rinde erkennbar (Bild 6), reifere Stadien können auch weiter nach innen reichen. Sehr große Follikel dagegen liegen so weit außen, dass sie oft weitgehend „abgeschürt“ vom restlichen Ovar erscheinen. Obwohl häufig noch in kugelförmiger Erscheinung, sind die gelben vitellinen Follikel in überwiegender Anzahl atretisch. Deutliche Atresie kann man hauptsächlich an der „eingedrückt-deformierten“ Oberfläche der Follikel erkennen.

Die Bereiche zwischen den Follikeln werden hauptsächlich durch kollagenes und elastisches Bindegewebe (Bild 21 und Bild 22), Fibroblasten, Stromazellen und Stromadrüsen-Zellverbände (Bild 13) ausgefüllt. Das Mark erscheint lose zusammengefügt und enthält primär lockeres Bindegewebe, wobei sich vor allem die zahlreichen Mastzellen mit der Alcianblau-Färbung gut tiefblau darstellen lassen. Daneben kommen große Blutgefäße mit kernhaltigen Erythrozyten und Nerven vor.

4.1.2 Ovarepithel und Tunica albuginea

Das Keimdrüsenepithel besteht aus einschichtigen, kubischen Epithelzellen. Die straffen kollagenen Bindegewebsfasern der darunter gelegenen Tunica albuginea verlaufen im äußeren Bereich als schmales Band primär parallel zur Oberfläche, zweigen sich jedoch in der inneren Lage zur Ovarmitte hin ab. Die kollagenen Fasern strahlen in das zentralere Bindegewebe des Ovars ein.

4.1.3 Primordialfollikel

Die Primordialfollikel (Bild 4) haben einen Durchmesser von 40 - 65 μm und besitzen eine dünne Basalmembran. Sie lässt sich bereits durch PAS-, Goldner- und Alcianblaufärbung gut darstellen und wird mit zunehmender Reife der Follikel deutlich breiter. Die Oozyte wird von mindestens acht flach bis kubischen, in die Breite gezogenen Granulosazellen umgeben. Die Follikelwand ist durchschnittlich 4 μm breit.

Der Kern der Eizelle ist mit einem Durchmesser von 14 - 30 μm relativ groß und liegt exzentrisch. Das Chromatin in der Mitte des Oozytenkernes stellt sich als kondensierte und dunkle Ansammlung von „Fäden“ und „Perlenschnüren“ dar (Bild 4). In Kontakt mit der Kernmembran erkennt man im Ooplasma den Balbiani-Körper, der halbmondförmig neben dieser liegt und der sich durch die H.E.-Färbung in einem dunkleren Farbton anfärbt als das übrige Ooplasma.

Die Primordialfollikel sind von einem schmalen Ring aus Fibroblasten umgeben (in den Bildern als „Thekaschicht“ bezeichnet), die in ihren Kernen die für die Wachtel charakteristisch strukturierte und tiefblau gefärbte Nucleoli besitzen.

Desweiteren erkennt man in der Nähe der kleinen Follikel dicht zusammengelagerte epitheloide Stroma- bzw. Thekazellen, die Zellverbände bilden. Sie haben eine durchschnittliche Größe von 30 μm und besitzen außen PAS- und Alcianblau-positive, sehr dünne Basallamina.

4.1.4 Prävitelline Follikel

Die prävitellinen Follikel (Bild 5 - Bild 9) haben einen Durchmesser von 65 - 445 μm . Sie sind von einschichtigen, kubischen (frühe Follikelstadien) bis hochprismatischen (späte Follikelstadien) Granulosazellen umgeben, deren Zytoplasma sich in der H.E.-Färbung oft in unterschiedlicher Helligkeit darstellt. Sie besitzen einen runden Kern und dunkle Nucleoli.

Die Follikelwand ist durchschnittlich 10 μm breit. Die Basalmembran lässt sich u.a. durch die PAS-Färbung darstellen (Bild 8). Die Perivitellinmembran ist nur bei späten prävitellinen Follikelstadien durch die PAS- oder Alcianblau-Färbung als sehr dünne linienförmige Struktur erkennbar. Das Ooplasma der Oozyte erscheint durch die HE-Färbung einheitlich rosa, mit einer leicht intensiveren Anfärbung zur Follikelwand hin.

Im Unterschied zu den Primordialfollikeln ist der Balbiani-Körper der frühen prävitellinen Follikelstadien kugelförmig und etwa kerngroß (Bild 5). Er steht in Kontakt mit der Kernmembran. In späteren Stadien erscheint er fragmentiert (Bild 7) oder ganz aufgelöst (Bild 9). Der Zellkern der frühen Follikel hat eine durchschnittliche Größe von 25 μm , ähnlich dem der Primordialfollikel. Die

Kerngrößen der späten prävitellinen Stadien messen 40 - 110 μm . Das Chromatin ist in frühen Stadien noch teilweise zu „Fäden“ und „Punkten“ kondensiert, das jedoch weniger dicht als das der Primordialfollikel erscheint (Bild 8). Mit zunehmender Reife der Follikel stellt sich der Kern homogen gefärbt dar (Bild 9). Auch ist erstmals bei diesen späten Stadien, wie auch bei den vitellinen Follikeln, eine schmalere Theka interna und eine breitere Theka externa unterscheidbar, die beide hauptsächlich aus Fibroblasten, undifferenzierten und differenzierten Thekazellen bestehen. Beide Schichten der Theka werden von dichten, Goldner-positiven, kollagenen Bindegewebsfasern durchzogen.

4.1.5 Vitelline Follikel

Der Durchmesser der vitellinen Follikel (Bild 10 - Bild 12) beträgt mehr als 445 μm . Außen ist das gefäßarme Stigma folliculare als heller Streifen erkennbar. Die Theka externa und die Theka interna sind deutlich unterscheidbar, sie enthalten kollagene Fasern, Fibroblasten und Thekazellen (Bild 11). Gesunde vitelline Follikel sind von einer Schicht aus hochprismatischen Granulosazellen umgeben, die mit zunehmendem Follikelwachstum wieder kubisch und in die Breite gezogen werden. Die Breite der Follikelwand beträgt 3 - 30 μm .

Die Zona radiata, in der die 1 - 3 μm breite Perivitellinmembran liegt, ist durch die zytoplasmatischen Ausstülpungen von Granulosazellen und Ooplasmamembran sehr deutlich erkennbar und hat je nach Follikelgröße eine Breite von 1 - 4,5 μm (Bild 10). Zur spezifischen Anfärbung eignen sich PAS oder Alcianblau, beide Reaktionen sind jedoch eher schwach (Bild 12). Mit zunehmendem Follikelwachstum scheint die Zona radiata schmäler und unauffälliger zu werden, die Perivitellinmembran stellt sich dagegen breiter und strukturell zusammenhängender dar.

Der Kerndurchmesser der Oozyte beträgt im Durchschnitt 150 μm , kondensiertes Chromatin ist nur noch vereinzelt zu sehen. Ein Balbiani-Körper ist ebenfalls nicht mehr zu erkennen.

Hauptcharakteristikum der vitellinen Follikel ist, dass das Ooplasma von zahlreichen hellen, runden bis ovalen oder eckigen Dottervesikeln, welche oft dunkle Granula enthalten (Bild 21), ausgefüllt wird. Zur Peripherie hin sind zahlreiche Fetttröpfchen und kortikale Granula im Ooplasma erkennbar (Bild 10). Der äußerste Bereich des Ooplasmas wird durch H.E. intensiv rosa gefärbt. Die kortikalen Granula lassen sich mit der Lektinfärbung gut darstellen.

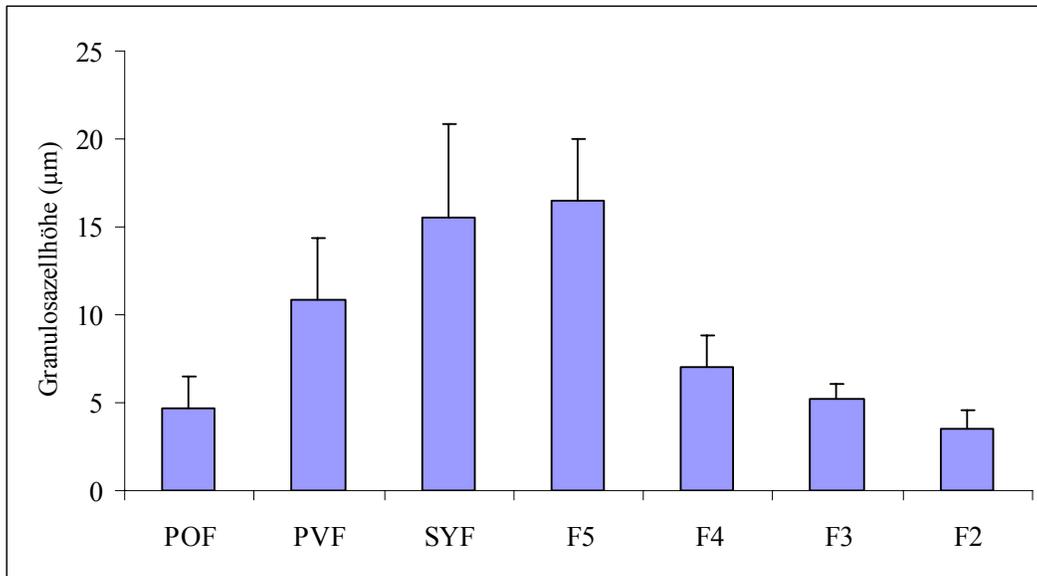


Abb. 3: Höhe der Granulosazellen (Follikelepithel) im Vergleich zum Follikelstadium

POF = Primordialfollikel (40 - 65 µm), PVF = Prävitelline Follikel (65 - 445 µm),

SYF = Kleine gelbe Follikel (445 - 2000 µm), F5 (2000 - 4000 µm), F4 (4000 - 8000 µm),

F3 (8000 - 12000 µm), F2 (12000 - 15000 µm), F1 (≥ 15000 µm, hier nicht vorhanden)

4.1.6 Atretische Follikel

Follikel können in jedem Stadium ihrer Entwicklung atretisch werden.

Primordialfollikel: Atretische Primordialfollikel haben, verglichen mit den gesunden, ein deformiertes Erscheinungsbild. Auch der Kern der Eizelle ist meist nicht mehr rund. In späteren Stadien der Atresie stellen sich auch die Granulosazellen je nach Resorptionsstadium „verwaschen“ und aufgelöst dar, ihr Zytoplasma ist unterschiedlich hell und dunkel gefärbt.

Prävitelline Follikel: Atretische prävitelline Follikel erscheinen deformiert, geschrumpft und sind vom Stroma abgetrennt (Bild 13). Manchmal sind die Thekaschichten, soweit sie vorhanden sind, ebenfalls von den Granulosazellen abgetrennt. Die Granulosa- und / oder Thekazellen sind meist hochgradig proliferiert und vakuolisiert im Ooplasma zu finden (Bild 14). Oft ist zunächst die innerste Schicht der Granulosazellen vakuolisiert und neben anderem Stromagewebe und eingewanderten Gefäßen im Ooplasma zu finden (Bild 16). Meist sind dünne, helle „Risse“ in der Granulosawand sichtbar. Das die untergehenden Follikel umgebende kollagene Bindegewebe erscheint dichter angeordnet, wodurch die Follikelwand zusätzlich stark verbreitert wirkt (Bild 17). Das Ooplasma der späteren prävitellinen Follikel hat in der Anfangsphase der Atresie zunächst seine einheitliche Färbung verloren, es erscheint „brüchig“ und ist vakuolisiert (Bild 15). Danach erfolgt ebenfalls eine Einwanderung der Stromazellen ins Ooplasma (Bild 17).

Vitelline Follikel: Die atretischen vitellinen Follikel sind ebenfalls stark deformiert. Mit der Granulosaschicht verhält es sich wie bei den prävitellinen Follikeln, die Zellen sind proliferiert, vakuolisiert und in das Ooplasma eingewandert. Die Zona radiata ist wellenförmig gefaltet. Im Inneren der Eizelle ist die Masse der Dotterbläschen aufgelöst und das randständige Ooplasma, das brüchig erscheint, löst sich von der Follikelwand, bzw. von der Zona radiata ab. In fortgeschrittenen Atresiestadien findet man im Inneren des Follikels meist Vakuolen, Erythrozyten, Gefäße, Granulosa- und Thekazellen, Fibroblastenartige Zellen, Bindegewebe, Makrophagen und auch Mastzellen (Bild 18). In späteren Atresiestadien ist der ganze Follikel mit Blutgefäßen und hyalinisiertem Bindegewebe (Atresie Typ 1) ausgefüllt (Bild 19), das seinen Ursprung in der Theka externa zu haben scheint. Auf der anderen Seite konnte die Beobachtung einer nicht-hyalinisierten Atresieform gemacht werden (Atresie Typ 2), hier ist es so, dass sich Theka- und Granulosazellen, beide vakuolisiert, zu sogenannten Stromadrüsenzellen differenzieren und in das Ooplasma einwandern (Bild 20). Nach der Zerteilung der atretischen Masse lagern sie sich, durch Bindegewebsfasern getrennt, zu „Verbänden“ zusammen und verteilen sich im Stroma, dort v.a. in den Randbereichen der Ovarrinde.

Da die Zellwand eines atretischen Follikels im Allgemeinen keine Bruchstellen aufweist und auch kein „ausgelaufenes“ Dottermaterial im Stroma entdeckt wurde, nehme ich an, dass es sich im Ovar der Japanischen Wachtel zumindest um nicht-bruchhafte Formen der Atresie handelt.

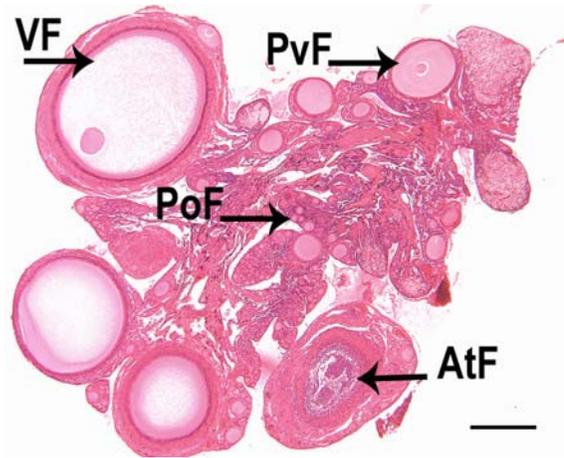


Bild 3 Übersicht über das gesamte Ovar, HE-Färbung

SB = 300 µm

VF = Vitelliner Follikel, PvF = Prävitelliner Follikel, PoF = Primordialfollikel, AtF = Atretischer Follikel

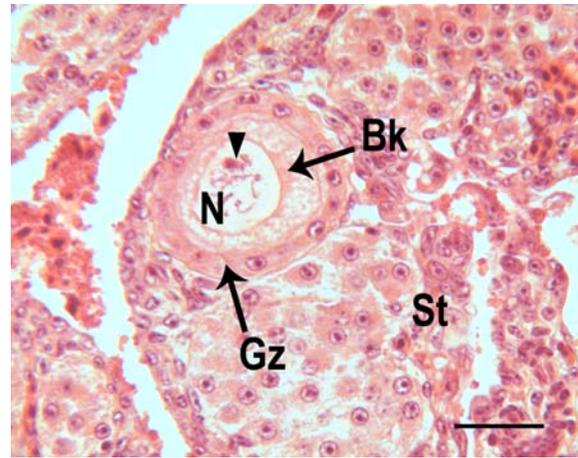


Bild 4 Ovar Wachtel, Primordialfollikel, HE-Färbung

SB = 25 µm

Der Balbiani-Körper (Bk) liegt kappenförmig im Ooplasma in der Nähe des Zellkerns (N), die Granulosazellen (Gz) sind flach. Der Kern (N) enthält kondensierte Chromosomen (Pfeilspitze). St = Stroma

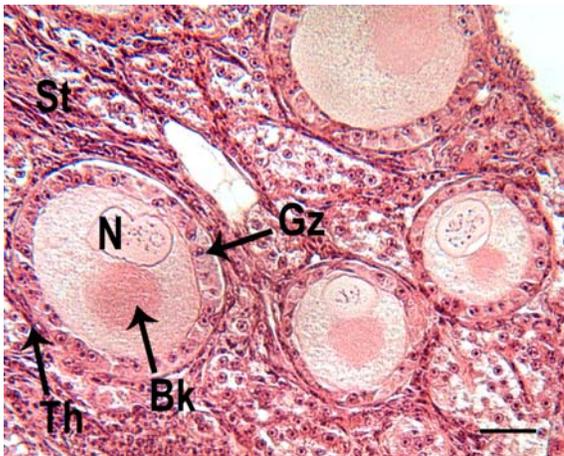


Bild 5 Ovar Wachtel, frühe prävitelline Follikel, HE-Färbung

SB = 25 µm

Der Balbiani-Körper (Bk) im Ooplasma ist kugelförmig, aber noch in Kontakt mit der Kernmembran, die Granulosazellen (Gz) sind isoprismatisch. N = Nucleus, St = Stroma, Th = Thekaschicht

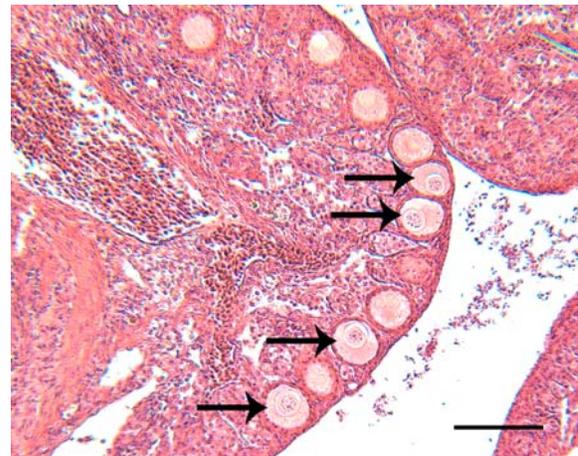


Bild 6 Ovar Wachtel, frühe prävitelline Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Die kleinen frühen prävitellinen Follikel (Pfeile) liegen hauptsächlich in den Randzonen der Ovarrinde.

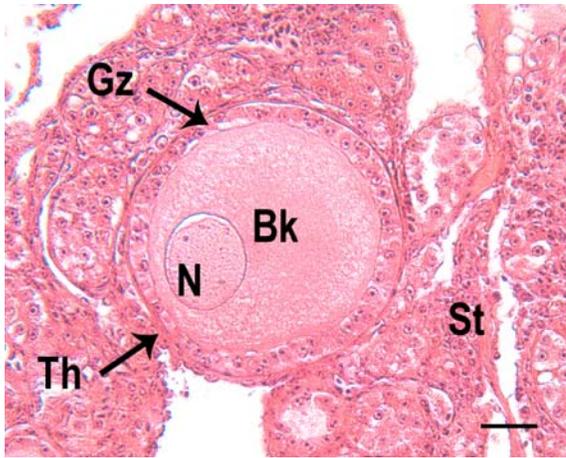


Bild 7 Ovar Wachtel, prävitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 25 µm

Der Balbiani-Körper (Bk) beginnt sich im Ooplasma aufzulösen. Gz = Granulosazellen, N = Nucleus, St = Stroma, Th = Thekaschicht

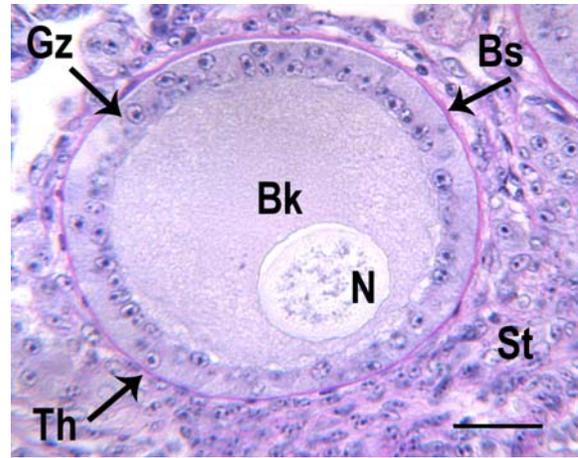


Bild 8 Ovar Wachtel, prävitelliner Follikel, PAS-Färbung nach Amylase-Verdau

SB = 25 µm

Mit dieser Färbung lässt sich die Basalmembran (Bs) besonders deutlich darstellen (rosa). Bk = Balbiani-Körper, Gz = Granulosazellen, N = Nucleus, St = Stroma, Th = Thekaschicht

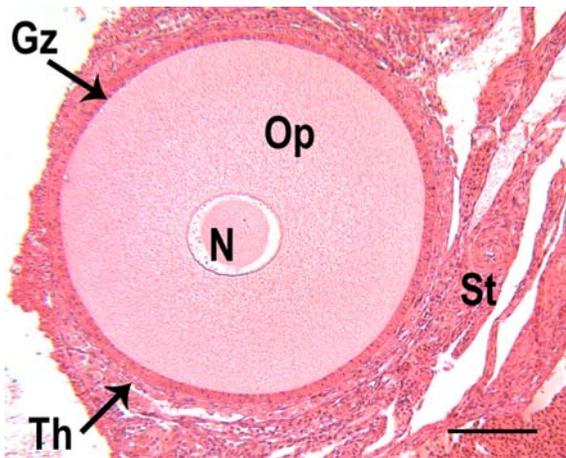


Bild 9 Ovar Wachtel, später prävitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Der Balbiani-Körper ist im Ooplasma (Op) aufgelöst, die Granulosazellen (Gz) sind hochprismatisch. N = Nucleus, St = Stroma, Th = Thekaschichten

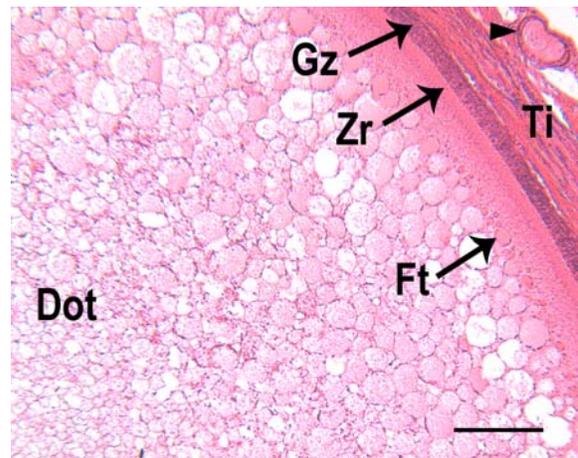


Bild 10 Ovar Wachtel, vitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Die Granulosazellen (Gz) sind isoprismatisch, unter ihnen hat sich eine Zona radiata (Zr) herausgebildet. Das Ooplasma enthält u.a. Dotterpartikel (Dot), peripher liegende Fett-Tröpfchen (Ft) und kortikale Granula. Die Pfeilspitze zeigt einen Primordialfollikel. Ti = Theka interna

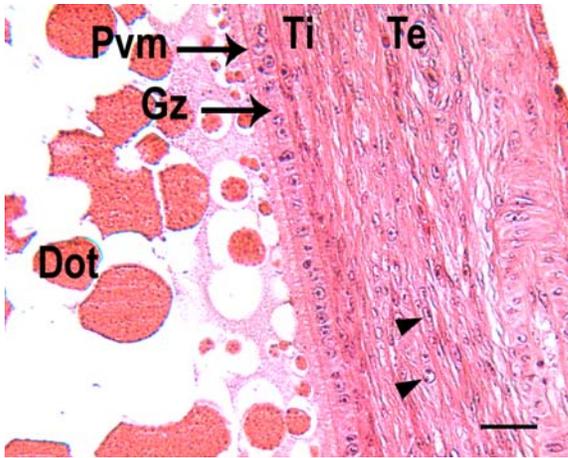


Bild 11 Ovar Wachtel, großer vitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 25 µm

Bei vitellinen Follikeln lassen sich eine zellreiche Theka interna (Ti) und eine faserreiche Theka externa (Te) unterscheiden, die beide u.a. aus Bindegewebe, länglichen Fibroblasten (obere Pfeilspitze) und spindelförmigen Thekazellen (untere Pfeilspitze) bestehen. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Pvm = Perivitellinmembran

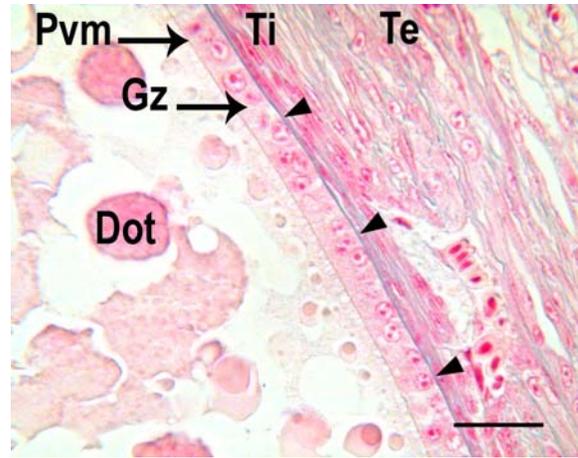


Bild 12 Ovar Wachtel, großer vitelliner Follikel, Alcianblau-Färbung, pH-Wert 2,5

SB = 25 µm

Mit der Alcianblau-Färbung lässt sich die folliculäre Basalmembran deutlich darstellen (Pfeilspitzen), sowie einige Bindegewebsfasern. Schwach positiv zeigt sich die Perivitellinmembran (Pvm). Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Ti = Theka interna, Te = Theka externa

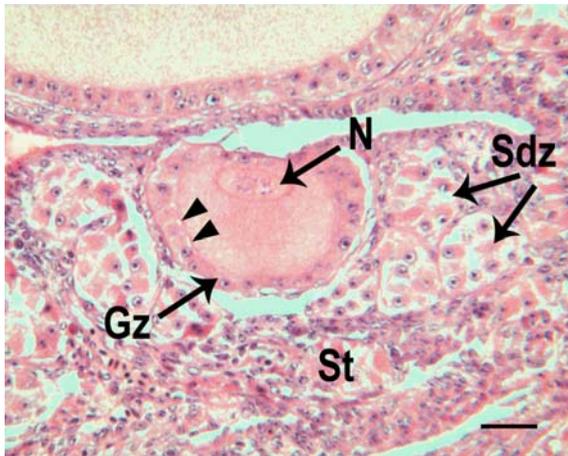


Bild 13 Ovar Wachtel, atretischer früher prävitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 25 µm

Bei Atresie im frühesten Stadium beginnen Follikel und Kern (N) sich zu deformieren und zu schrumpfen, die Granulosazellschicht (Gz) löst sich vom umgebenden Stroma (St) ab, das Ooplasma trennt sich meist auch von den Granulosazellen ab (Pfeilspitzen). Atretische Follikel sind meist von Verbänden der Stromadrüsenzellen (Sdz) umgeben.

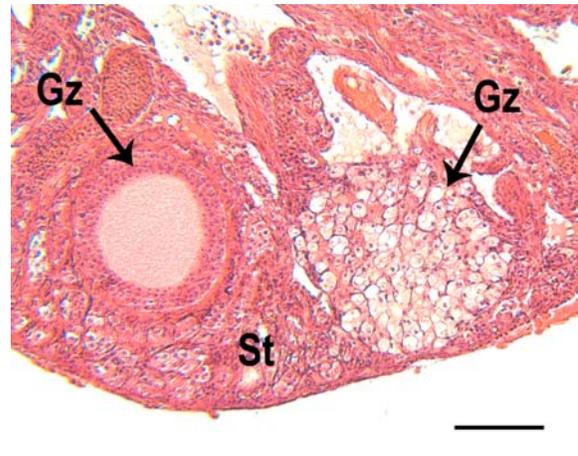


Bild 14 Ovar Wachtel, atretische Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Bei Atresie im frühen Stadium eines prävitellinen Follikels (links) beginnen die Granulosazellen (Gz) zu proliferieren, bei einem vitellinen Follikel (rechts) sind sie in einem späterem Stadium vakuolisiert und füllen die gesamte Oozyte aus (rechts). St = Stroma

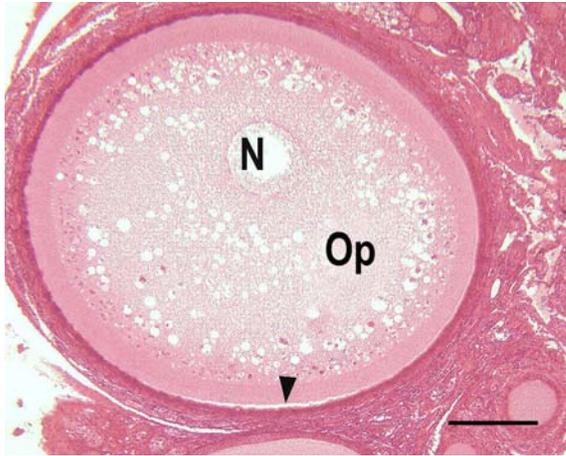


Bild 15 Ovar Wachtel, atretischer später prävitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Späte prävitelline Follikel beginnen im frühen Stadium der Atresie mit der Vakuolisierung ihres Ooplasmas (Op) und mit seiner Abtrennung von der Granulosazellschicht (Pfeilspitze). N = Nucleus

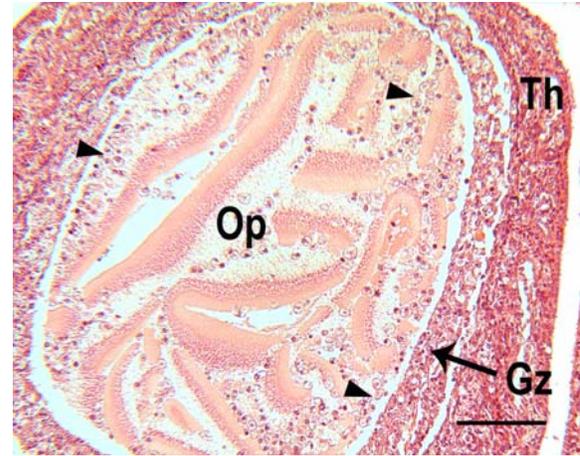


Bild 16 Ovar Wachtel, atretischer später prävitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Die innerste Lage der proliferierten Granulosazellen (Gz) ist vakuolisiert und wandert in das Ooplasma (Op) der Oozyte ein (Pfeilspitzen). Die Thekaschichten (Th) sind verstärkt von Bindegewebsfasern durchsetzt.

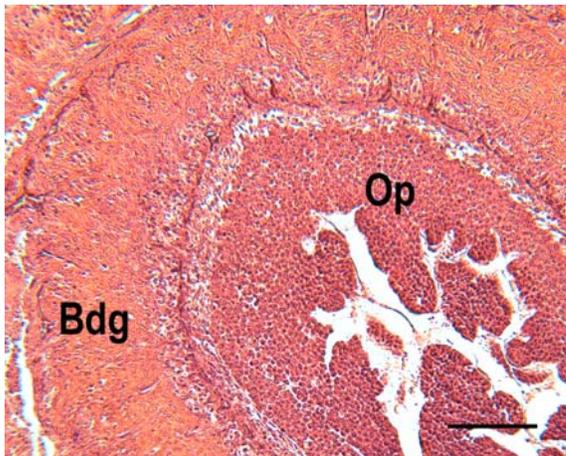


Bild 17 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Im späten Stadium der Atresie dringen Fibroblasten in den ehemaligen Bereich des Ooplasmas (Op) ein. Der atretische Follikel wird von einer verbreiterten Schicht Bindegewebe (Bdg) umgeben.

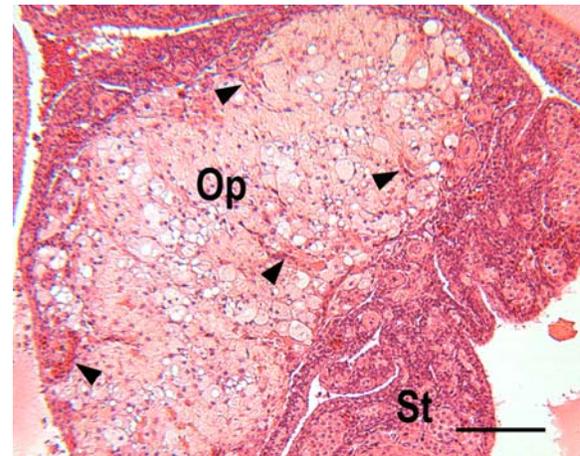


Bild 18 Ovar Wachtel, atretischer vitelliner Follikel, HE-Färbung

SB = 100 µm

Vakuolisierte und differenzierte Granulosazellen infiltrieren das gesamte ehemalige Ooplasma (Op) im späteren Stadium der Atresie Typ 1. Zahlreiche Gefäße, die ihren Ursprung im Stroma (St) haben, sprossen in die atretische Masse ein (Pfeilspitzen).

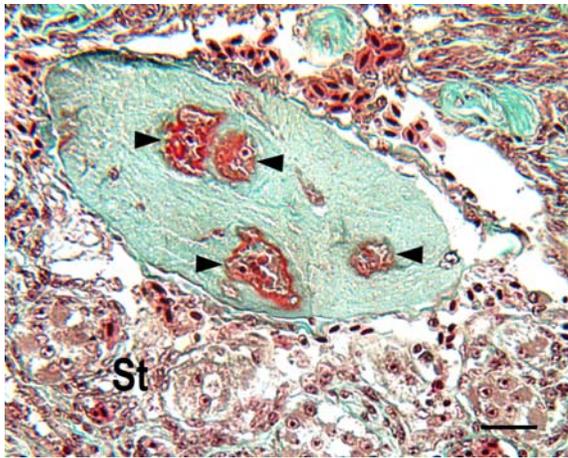


Bild 19 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Goldner-Färbung

SB = 25 µm

Der Follikel befindet sich in sehr spätem Stadium der Atresie Typ 1 und ist komplett hyalinisiert. Im Inneren befinden sich Blutgefäße (Pfeilspitzen). St = Stroma

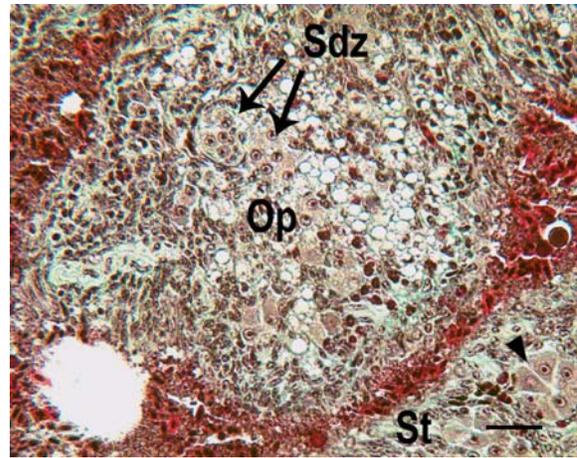


Bild 20 Ovar Wachtel, atretischer vitelliner Follikel, Goldner-Färbung

SB = 25 µm

Der Follikel befindet sich im späten Stadium der Atresie Typ 2. Granulosazellen und Zellen der Theka interna füllen das gesamte ehemalige Ooplasma (Op) aus. Sie haben sich zu Stromadrüsenzellen (Sdz) differenziert, die bereits durch das Bindegewebe in kleine Verbände aufgeteilt werden und später außerhalb des Follikels weiterexistieren (Pfeilspitze). St = Stroma

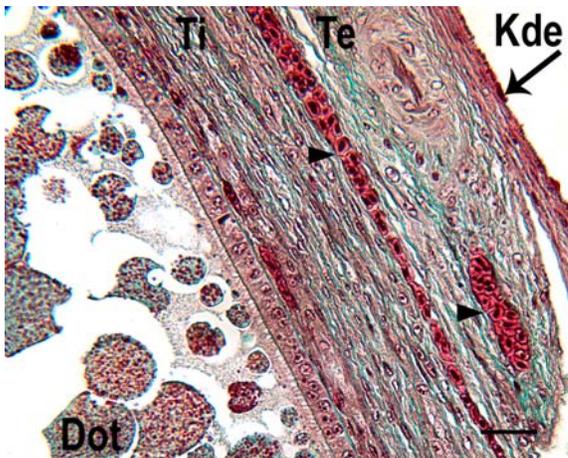


Bild 21 Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Goldner-Färbung

SB = 25 µm

Sowohl die Theka interna (Ti) als auch die Theka externa (Te), die meist durch größere Gefäße (Pfeilspitzen) getrennt werden, enthalten Goldner-positive kollagene Bindegewebsfasern. Dot = Dotterpartikel, Kde = Keimdrüsenepithel

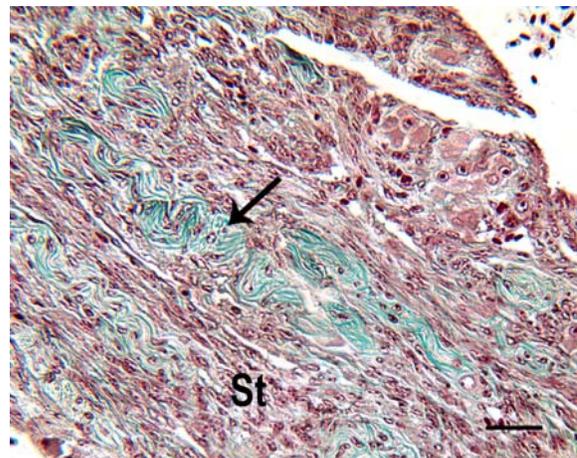


Bild 22 Ovar Wachtel, Stroma, Goldner-Färbung

SB = 25 µm

Im ovariellen Stroma (St) befinden sich auch Goldner-positive, gut darstellbare elastische Fasern (Pfeil).

4.2 Glykohochemische Untersuchungen

4.2.1 Bindungsstellen für *Canavalia ensiformes* Agglutinin (Con A)

Zuckerspezifität: α -D-Man > α -D-Glc

Bilder zu den glykohochemischen Untersuchungen befinden sich auf den Seiten 65 -72.

Das Keimdrüsenepithel des Ovars zeigt eine stark positive Reaktion nach Inkubation mit FITC-markiertem Con A. Das Ooplasma der Primordialfollikel und der kleinen prävitellinen Follikel weist granuläre Fluoreszenz auf, bei reifen Follikelstadien sind einige Dotterpartikel und die kortikalen Granula positiv. Die Fibroblasten des ovariellen Stromas weisen eine größere Zahl für Bindungsstellen für Con A auf. Die kollagenen Fasern des Bindegewebes reagieren jedoch im Allgemeinen nur schwach positiv. Die Granulosazellen mit ihren Golgi-Feldern zeigen in kleineren Follikelstadien bei Nachweis von Con A-Bindungsstellen schwache Fluoreszenz. Die Perivitellinmembran und die Zona radiata der vitellinen Follikel bleiben dagegen negativ (Bild 32).

4.2.2 Bindungsstellen für *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)

Zuckerspezifität: α -D-Man

LCA-Bindungsstellen gibt es hier vor allem im Keimdrüsenepithel, im Stroma (Fibroblasten und kollagene Fasern) und in der Theka der reifen Follikel. Starke granuläre Fluoreszenz zeigt auch das Ooplasma der Primärfollikel und der prävitellinen Follikel, wo sie sich feinkörniger und follikelmittig darstellt sowie bei einigen Dotterpartikeln in den vitellinen Stadien. Eine deutliche Reaktion weist auch die Basalmembran bei allen Follikeln auf (Bild 29). Die Granulosazellen reagieren bei den frühen Follikeln positiv, mit zunehmender Follikelgröße wird die Intensität der LCA-Bindung jedoch schwächer.

Die LCA-positiven Golgi-Felder im Zytoplasma der Granulosazellen erscheinen kugelförmig und mit zunehmender Follikelgröße werden ihre LCA-positiven Granula nach apikal verlagert und dann in den Extrazellulärraum abgegeben, wo sie in die sich formierende Perivitellinmembran eingebaut werden. Die gesamte Zona radiata und die voll ausgebildete Perivitellinmembran zeigen ebenfalls deutliche Bindung von LCA-FITC (Bild 30).

4.2.3 Bindungsstellen für *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA)

Zuckerspezifität: β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc

Das Keimdrüsenepithel reagiert stark positiv (Bild 33), deutlich reagieren auch manche Stromazellen, einige Bereiche des Bindegewebes (Bild 36) und die Theka interna der vitellinen Follikel. Die Gefäße im Ovar reagieren ebenfalls positiv (Bild 35), wobei vor allem das Endothel der Kapillaren eine intensive Fluoreszenz aufweist. Bei Primordialfollikeln und frühen prävitellinen Follikeln ist eine stark positive Reaktion mit PNA im Ooplasma der Oozyte erkennbar. In reiferen Stadien wird die PNA-Reaktion im Ooplasma schwächer und scheint häufig im Zentrum konzentriert zu sein. Es reagieren v.a. die kortikalen Granula stark positiv. Die Granulosazellen, v.a. deren Golgi-Felder, zeigen hier bei allen Follikelstadien nur minimale Fluoreszenz bzw. sind negativ (Bild 34). Gleiches gilt für die folliculären Basalmembranen. Die Zona radiata und die Perivitellinmembran der vitellinen Follikel weisen dagegen zahlreiche Bindungsstellen für PNA auf, deren Anzahl mit zunehmender Follikelgröße zunimmt.

4.2.4 Bindungsstellen für *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

Zuckerspezifität: β -D-Gal

Eine deutliche Bindung von RCA-FITC ist am Keimdrüsenepithel und in den Fibroblasten erkennbar. Auch die kollagenen Fasern des äußeren Ovarbereichs und einige andere Bereiche des Stromas reagieren deutlich positiv. Die Theka verhält sich negativ. Das Ooplasma der Primordialfollikel besitzt viele fein- bis grobkörnige RCA-positive Areale. Die Bindung von RCA wird hier jedoch mit zunehmender Follikelgröße schwächer und schließlich ist nur bei einigen Dotterpartikeln der späten Stadien eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen (Bild 31). Bei sehr kleinen Follikeln ist die Granulosazellschicht schwach positiv, gleiches gilt für ihre Basalmembran. Diese Strukturen sind bei den großen Follikelstadien vollkommen negativ. Eine relativ starke Bindung von RCA ist an der Perivitellinmembran erkennbar, und mit schwächerer Ausprägung an der Zona radiata.

4.2.5 Bindungsstellen für *Glycine max* Agglutinin (SBA)

Zuckerspezifität: α -D-GalNAc, α -D-Gal

Bindungsstellen für SBA finden sich vor allem im Bindegewebe (Fibroblasten) und in Gefäßendothelien. Bei den größeren Follikeln (prävitelline und vitelline Follikel) reagieren die Zona radiata und die Perivitellinmembran deutlich bis stark positiv, dies gilt auch für die Basalmembranen aller Follikelstadien, die ebenfalls Bindungsstellen für SBA-FITC aufweisen (Bild 37). Die kortikalen Granula im Ooplasma der großen Follikel reagieren SBA-positiv, während das Keimdrüsenepithel an manchen Stellen positiv, das Ooplasma selbst und die Dotterpartikel jedoch negativ bleiben. Die restlichen Strukturen des Ovars zeigen ebenfalls keine Bindung von SBA.

4.2.6 Bindungsstellen für *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA)

Zuckerspezifität: α -D-GalNA(1-3)GalNAc

Die wellenförmig angeordneten kollagenen Fasern, vor allem in der Tunica albuginea, reagieren mit DBA-FITC deutlich positiv. Eine schwache DBA-Reaktion ist außerdem in den Thekaschichten erkennbar. Einige Stellen des Ooplasmas (hier besonders um den Bereich des Kerns) haben Bindungsstellen für DBA (Bild 38). Desweiteren sind einige Dotterpartikel positiv. Die Perivitellinmembran und die Zona radiata zeigen sich dagegen negativ.

4.2.7 Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

Zuckerspezifität: (D-GlcNAc)²NeuNAc

WGA bindet schwach an das Keimdrüsenepithel, stark jedoch an Fibroblasten und kollagenen Fasern des gesamten Ovarstromas. Schwächer WGA-positiv reagiert das Endothel der Gefäße. Das Ooplasma der Primordialfollikel und prävitellinen Follikel zeigt eine starke granuläre Fluoreszenz, die in späteren Stadien in der Mitte der Oozyten zu einem größer umschriebenen Bereich zusammenfließt (Bild 27, oben rechts). Der Dotter enthält ebenfalls WGA-positive Granula. Die Granulosazellschicht zeigt bei allen Entwicklungsstufen eine deutliche Bindung von WGA-FITC, das Golgi-Feld und seine nach apikal wandernden Granula sind kontinuierlich positiv (Bild 25 und Bild 28). Die Basalmembran der Follikel reagiert nur schwach positiv, während die Basallamina der Stromadrüsen-Zellverbände eine deutliche bis starke Reaktion aufweisen (Bild 28). WGA bindet intensiv an die Perivitellinmembran und an die Zona radiata der prävitellinen und vitellinen Follikel (Bild 25).

4.2.8 Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin succinyliert (WGAs)

Zuckerspezifität: (D-GlcNAc)²NeuNAc

Das Keimdrüsenepithel stellt sich hier eher negativ dar. Deutlich positiv ist dagegen die Reaktion an den Endothelien der Gefäße. Die Theka interna reagiert schwach positiv mit WGAs-FITC, eine Bindung ist v.a. in den Fibroblasten des Bindegewebes zu erkennen. Eine schwache Reaktion ist auch an den Basalmembranen aller Follikelstadien und an den Basallamina der Stromadrüsen-Zellverbände zu erkennen. Das Ooplasma der kleineren Follikel weist eine starke granuläre Fluoreszenz auf. Die Intensität der WGAs-Bindung nimmt hier während des Follikelwachstums ab, wobei die kortikalen Granula jedoch deutlich positiv bleiben. Eine besonders intensive Bindung von WGAs-FITC erfolgt an der Perivitellinmembran und der Zona radiata der prävitellinen und vitellinen Follikel (Bild 24). Ebenfalls stark positiv stellen sich die Golgi-Felder mit ihren je nach Follikelgröße nach apikal wandernden Granula im Zytoplasma der Granulosazellen dar (Bild 23).

4.2.9 Bindungsstellen für *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA I)

Zuckerspezifität: α -L-Fuc

Bindungsstellen für UEA I lassen sich lediglich an den Fibroblasten des ovariellen Stromas sowie der Theka externa und an den kollagenen Fasern der Tunica albuginea beobachten. Die anderen Strukturen des Ovars reagieren negativ mit UEA-FITC.

4.2.10 Bindungsstellen für *Maacia amurensis* Agglutinin (MAL I)

Zuckerspezifität: NeuNAc

Deutlich positiv reagiert MAL I mit dem Keimdrüsenepithel, der Perivitellinmembran und der Zona radiata. Granuläre Fluoreszenz ist im Ooplasma der kleinen Follikel erkennbar, in den späten prävitellinen Stadien wird die Reaktion schwächer und konzentriert sich in der Mitte der Oozyte. Einzelne Dotterpartikel der vitellinen Follikel sind MAL I-positiv. Die Kerne der Vogelerythrozyten lassen sich mit MAL I ebenfalls gut darstellen.

4.2.11 Bindungsstellen für Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

Zuckerspezifität: NeuNAc

Das Keimdrüsenepithel, das Bindegewebe im äußeren Ovarbereich und das Gefäßendothel zeigen eine deutlich positive Reaktion mit SNA. Die Dotterbläschen und die kortikalen Granula der vitellinen Follikel weisen ebenfalls Bindungsstellen für dieses Lektin auf. Kollagene Fasern und Fibroblasten des Stromas zeigen positive Reaktion. Eine mit der Follikelgröße zunehmende positive Reaktion ist in den Granulosazellen zu beobachten, die Perivitellinmembran von sehr großen Follikeln reagiert ebenfalls positiv mit SNA, die Zona radiata dagegen bleibt negativ.

4.2.12 Bindungsstellen für Viscum album Agglutinin (VAA)

Zuckerspezifität: NeuNAc

Dieses Lektin weist Bindung mit dem Keimdrüsenepithel, den Fibroblasten des ovariellen Stromas sowie mit verschiedenen Dotterstrukturen der vitellinen Follikel auf. Gut darstellen lassen sich auch hier die kernhaltigen Vogelerythrozyten. Die Perivitellinmembran und die Zona radiata reagieren negativ.

Tabelle 7: Bindungsstellen der verwendeten Lektine im Ovar der Wachtel

Lektin	Primordialfollikel				Prävitelline Follikel				Vitelline Follikel				Weitere Ovargewebe					
	Bs	Gz	Op	Bk	Bs	Gz	Op	Bk	Th	Bs	Gz	Pvm+Zr	Dot	Kde	Gef	Bdg	Bdgz	
Con A	-	-/+	+	-/+	-	-/+	+	-/+	-	-	-	-	++	+	-	-/+	++	++
LCA	+	+	++	-	+	+	-	-	+	-/+	-	+	-/+	+	-	++	++	++
PNA	-	-	++	-	-	+	-	-	-/+	-	+	++	+	++	++	+	++	++
RCA	-/+	-/+	-/+	-	-/+	-/+	-	-	-	-	+	+	+	-/+	-/+	-/+	+	++
SBA	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	++	-	-/+	++	+	++	++
DBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	+	-	-	++	-	-
WGA	-/+	+	++	-	-/+	+	-	-	-	-/+	+	++	+	-/+	-/+	+	++	++
WGAs	-/+	+	++	-	-/+	+	-	-	-/+	-/+	+++	-	-	-	+	-/+	+	+
UEA I	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
MAL I	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-/+	+	-	-	-	-
SNA	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
VAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	-	-	-	-/+

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

Die Fixation der Proben erfolgte in Bouin und Formalin. Die Ergebnisse waren sich bei Verwendung dieser beiden Fixationsmittel prinzipiell ähnlich, jedoch fiel die Fluoreszenz bei den Präparaten nach Formalin-Fixierung etwas schwächer aus.

Bdg = Bindegewebe, Bdgz = Bindegewebszellen (v.a. Fibroblasten), Bk = Balbiani-Körper, Bs = Basalmembran, Dot = Dotter, Gef = Gefäße, Gz = Granulosazellen, Kde = Keimdrüsenepithel, Op = Ooplasma, Pvm = Perivitellinmembran, Th = Thekaschichten, Zr = Zona radiata

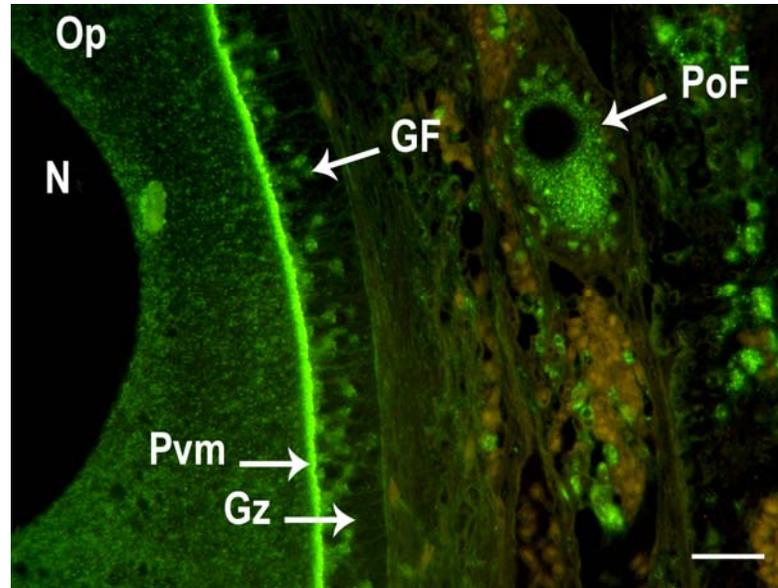


Bild 23 Ovar Wachtel, Wand später prävitelliner Follikel und Primordialfollikel, Bindung mit WGA suc.
SB = 25 µm

Die Perivitellinmembran (Pvm) weist eine sehr stark positive Reaktion mit WGAs auf, in den Granulosazellen (Gz) kann man die nach apikal wandernden WGAs-positiven Granula der Golgi-Felder (GF) im Zytoplasma erkennen. Primordialfollikel (PoF) sowie auch frühe prävitelline Follikel zeigen positive granuläre Fluoreszenz im Ooplasma und in den Granulosazellen. N = Nucleus, Op = Ooplasma

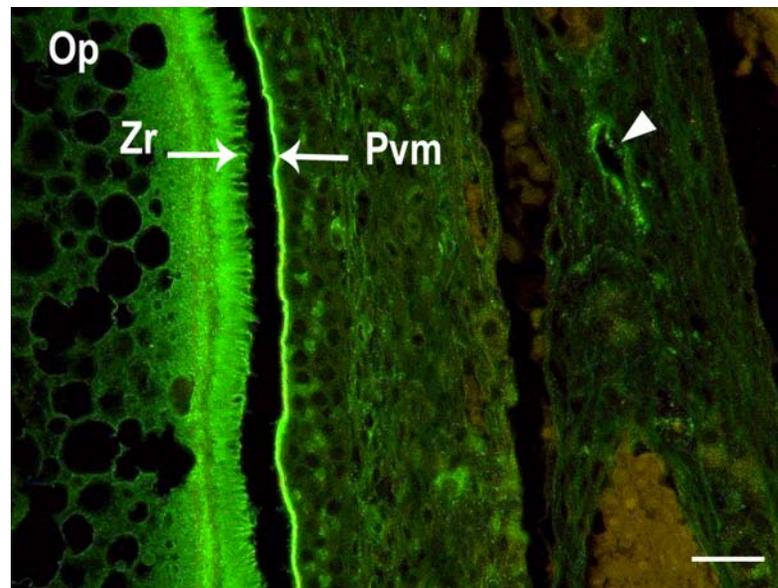


Bild 24 Ovar Wachtel, Wand atretischer vitelliner Follikel, Bindung mit WGA suc.
SB = 25 µm

Durch den durch Atresie verursachten Abriss der Zona radiata (Zr) von der Perivitellinmembran (Pvm) lassen sich diese beiden WGAs-positiven Strukturen gut einzeln darstellen. Die Pfeilspitze zeigt die Bindungsstellen eines kleineren Gefäßes. Op = Ooplasma

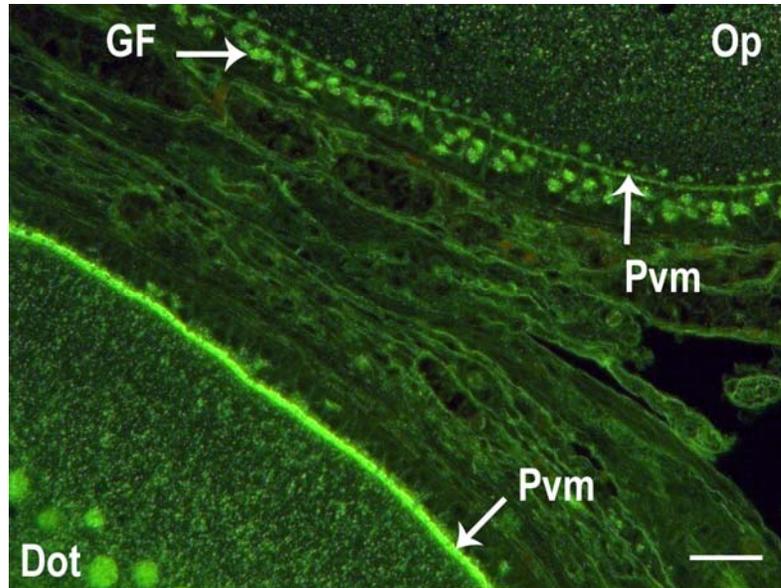


Bild 25 Ovar Wachtel, prävitelline und vitelline Follikelwand, Bindung mit WGA
 SB = 25 µm

Die Perivitellinmembran (Pvm) des prävitellinen Follikels (oben) ist noch im Aufbau, die Golgi-Felder (GF) und ihre Granula befinden sich noch mitten im Zytoplasma der Granulosazellen, während sich dieses „Material“ im vitellinen Follikel (unten) schon fast vollständig in den extrazellulären Raum begeben hat.
 Dot = Dotterpartikel, Op = Ooplasma

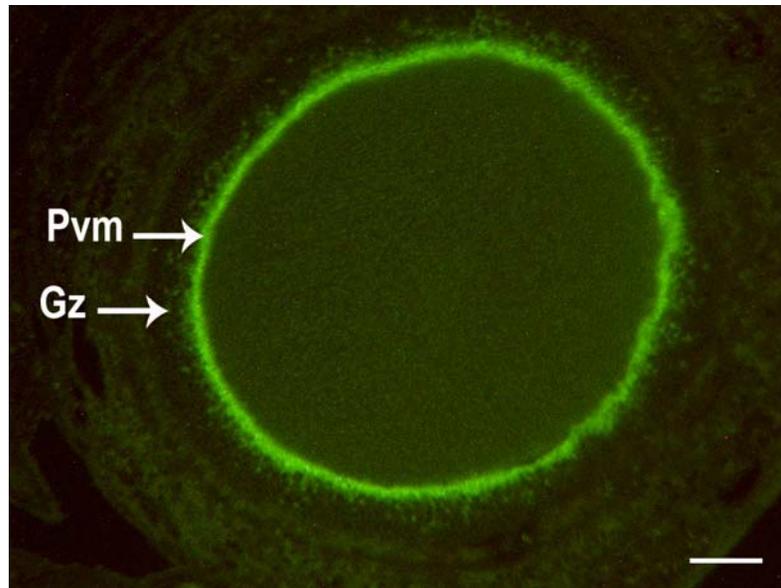


Bild 26 Ovar Wachtel, atretischer später prävitelliner Follikel, Bindung mit WGA
 SB = 50µm

Das WGA-positive Glykoprotein- „Material“ für die Perivitellinmembran (Pvm) liegt im atretischen Follikel diffus und gelöst vor, wodurch die Reaktion stark verbreitert erscheint. Gz = Granulosazellen

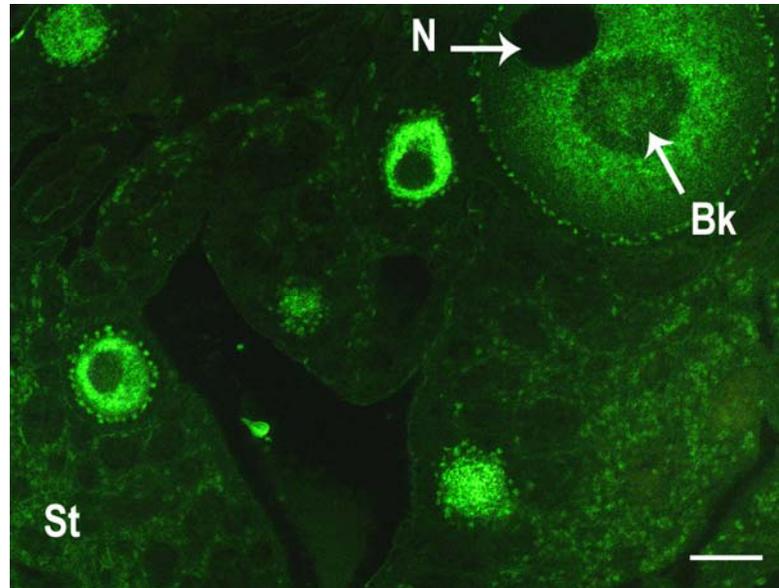


Bild 27 Ovar Wachtel, prävitelline Follikel verschiedener Reife, Bindung mit WGA
SB = 25µm

Die kleinen prävitellinen Follikel weisen eine stärker positive Reaktion mit WGA in ihrem Ooplasma auf als der reifere Follikel (oben rechts), bei dem die positive Reaktion schwächer und eher nach zentral verlagert ist. Deutlich hebt sich in dort der negative Balbiani-Körper (Bk) ab. N = Nucleus, St = Stroma

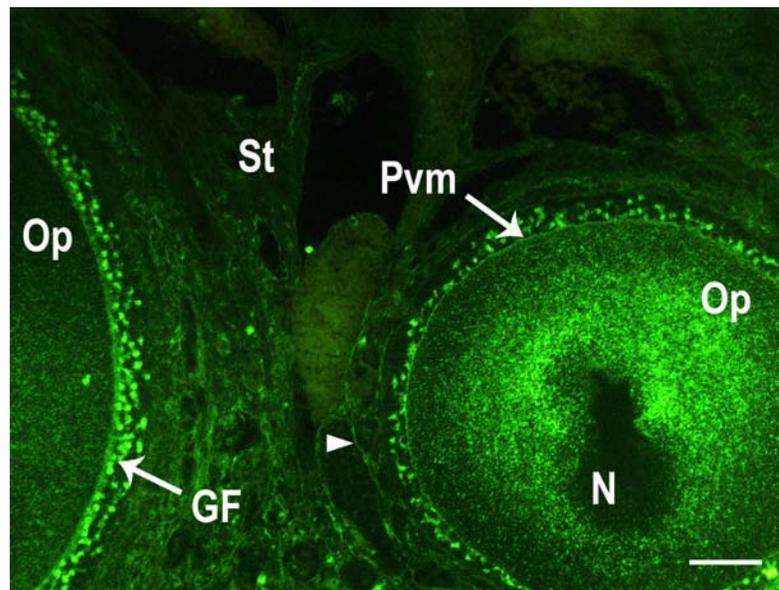


Bild 28 Ovar Wachtel, späte prävitelline Follikel, Bindung mit WGA
SB = 25 µm

Der prävitelline Follikel (rechts) weist bereits eine zarte Perivitellinmembran (Pvm) auf, das Ooplasma (Op) hat seine positive Reaktion im zentralen Bereich konzentriert. Der Follikel ist von Stromadrüsen-Zellverbänden umgeben, deren Basallamina ebenfalls Bindungsstellen mit WGA aufzeigen (Pfeilspitze). GF = Golgi-Felder, N = Nucleus, St = Stroma

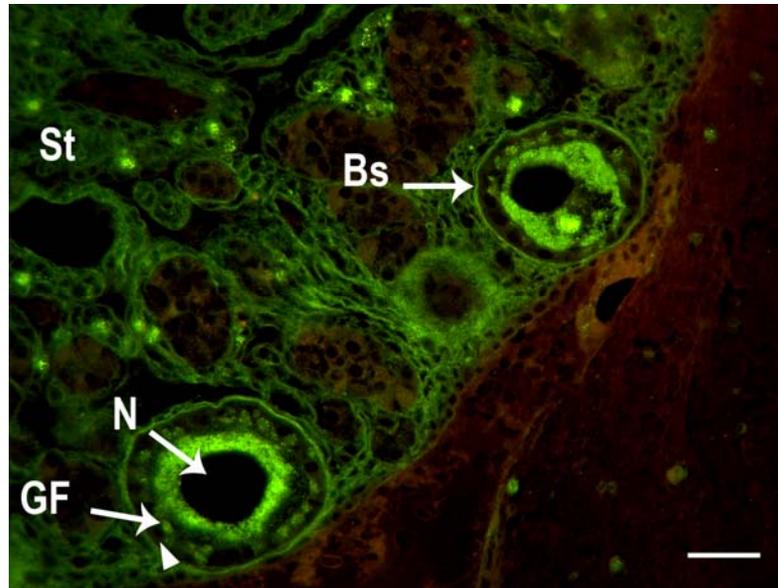


Bild 29 Ovar Wachtel, sehr frühe prävitelline Follikel, Bindung mit LCA
 SB = 25 µm

Die den Granulosazellen aufliegende Basalmembran (Bs) der Follikel zeigt eine deutliche Reaktion mit LCA. In größeren Stadien ist diese durch das ebenfalls stark reagierende Bindegewebe, v.a. das der Theka interna, nicht mehr isoliert darzustellen. Das Ooplasma der Follikel stellt sich intensiv positiv dar. Die Golgi-Felder (GF), die nah am Zellkern (Pfeilspitze) der Granulosazellen liegen, reagieren ebenfalls stark positiv mit LCA.
 N = Nucleus, St = Stroma

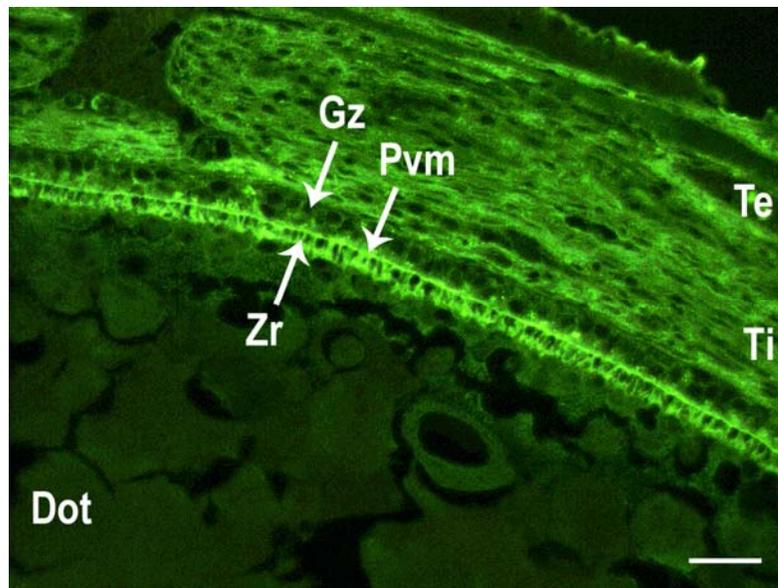


Bild 30 Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Bindung mit LCA
 SB = 25µm

Die Zona radiata (Zr) mit der Perivitellinmembran (Pvm) des vitellinen Follikels weist deutliche Bindungsstellen für LCA auf. Auch die Theka interna (Ti) und die Theka externa (Te) stellen sich positiv dar.
 Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen

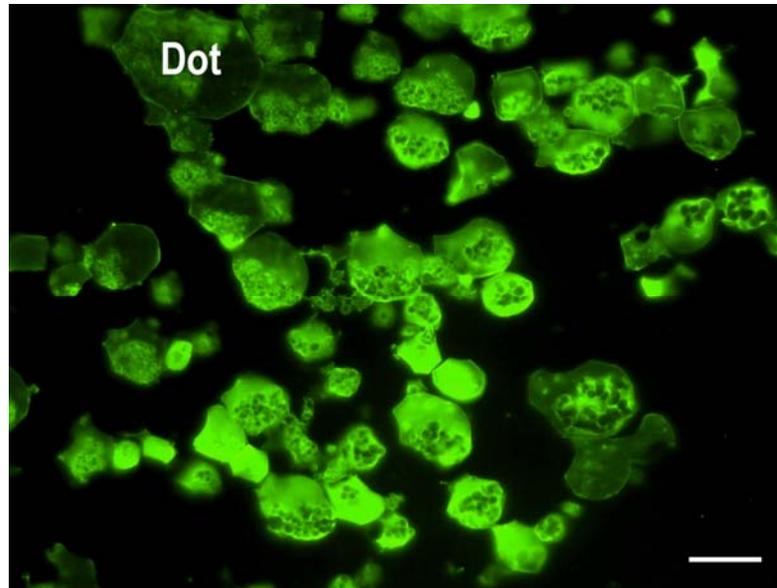


Bild 31 Ovar Wachtel, Dotterpartikel im vitellinen Follikel, Bindung mit RCA
SB = 25 μ m

Die Dotterpartikel (Dot) und ihre Granula enthalten im vitellinen Follikel zahlreiche Bindungsstellen für RCA.

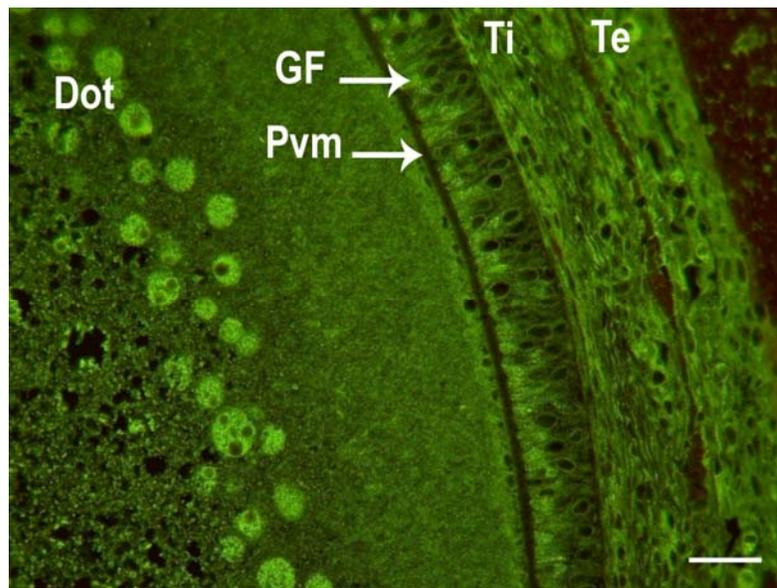


Bild 32 Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Bindung mit Con A
SB = 25 μ m

Obwohl die Golgi-Felder (GF) der Granulosazellen eine leicht positive Reaktion mit Con A zeigen, reagieren die Perivitellinmembran (Pvm) sowie die Zona radiata negativ. Sehr schwach positiv zeigen sich auch die Theka interna (Ti) und die Theka externa (Te) sowie einige Vesikel des Dotters (Dot).

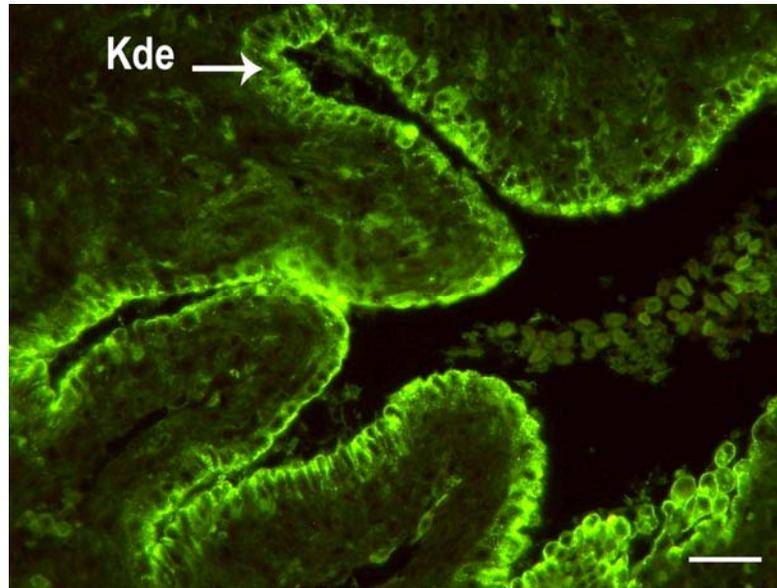


Bild 33 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel des Ovars, Bindung mit PNA

SB = 25 μ m

Das Keimdrüsenepithel (Kde) des Ovars zeigt an allen Stellen eine gleichmäßige, stark positive Reaktion mit PNA.

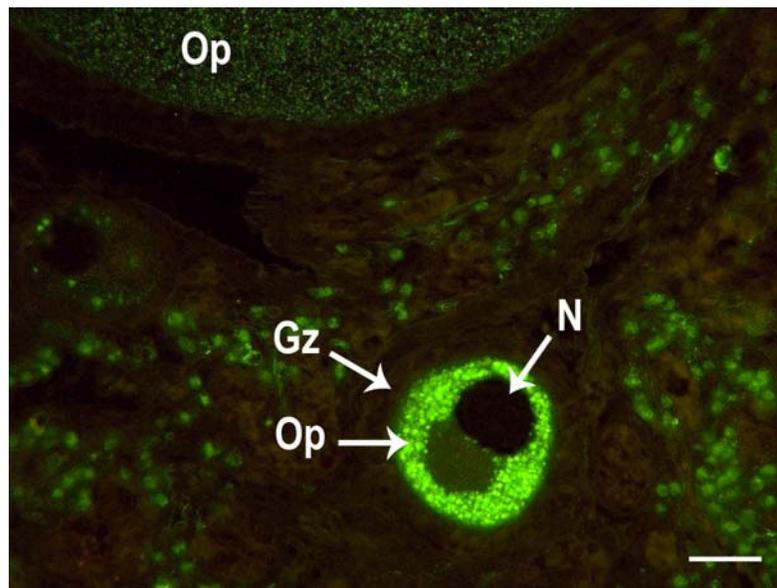


Bild 34 Ovar Wachtel, sehr früher prävitelliner Follikel, Bindung mit PNA

SB = 25 μ m

Der Follikel weist eine starke körnige Reaktion mit PNA in seinem Ooplasma (Op) auf, bei größeren Stadien (oben) hat das Ooplasma (Op) dagegen schon an Intensität eingebüßt. Im Vergleich zu den meisten anderen Lektinfärbungen weisen die Golgi-Felder der Granulosazellen (Gz) nur sehr schwache bis gar keine Reaktion mit PNA auf. N = Nucleus

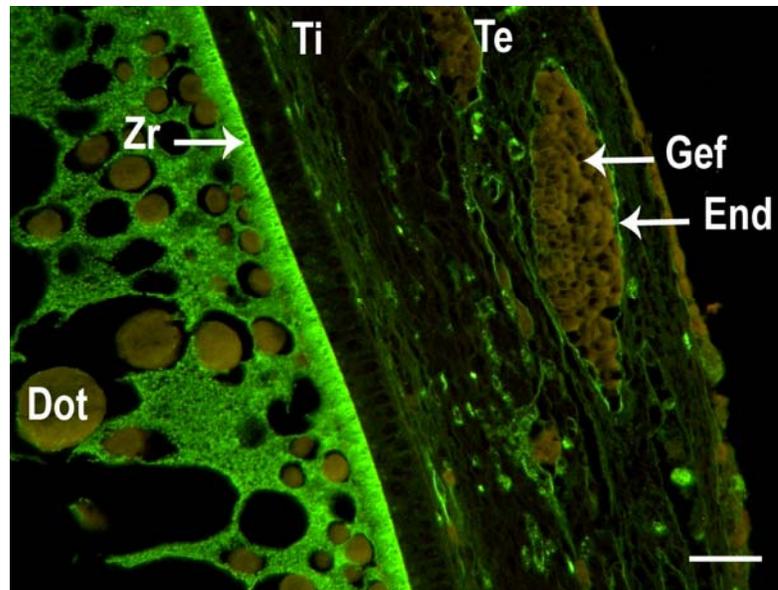


Bild 35 Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Bindung mit PNA

SB = 25 µm

Neben der stark positiv reagierenden Zona radiata (Zr) kann man vereinzelt Bindungsstellen für PNA in der Theka interna erkennen. Auffällig sind die stark positiven Reaktionen von Kapillaren und Gefäßen (Gef) aller Größen, die eine intensive Fluoreszenz ihres Endothels (End) aufweisen. Dot = Dotterpartikel, Ti = Theka interna, Te = Theka externa

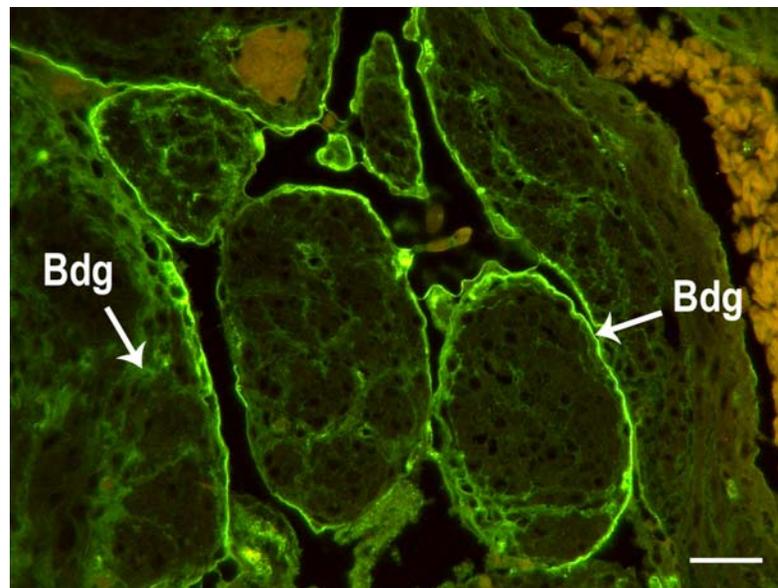


Bild 36 Ovar Wachtel, Interstitium (Stroma), Bindung mit PNA

SB = 25 µm

Die Fasern des lockeren Bindegewebes (Bdg) im Ovarstroma, hier um und zwischen den Stromadrüsen-Zellverbänden, weisen deutliche Reaktionen mit PNA auf.

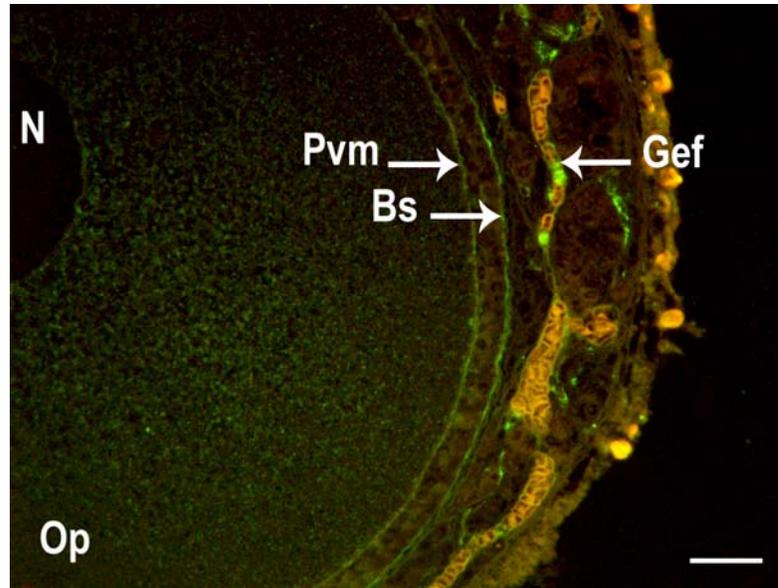


Bild 37 Ovar Wachtel, Wand prävitelliner Follikel, Bindung mit SBA

SB = 25 µm

Der Follikel zeigt an seiner Perivitellinmembran (Pvm) sowie an der Basalmembran (Bs) deutliche Bindungsstellen für SBA. Die Gefäße (Gef) sind ebenfalls stark SBA-positiv. N = Nucleus, Op = Ooplasma

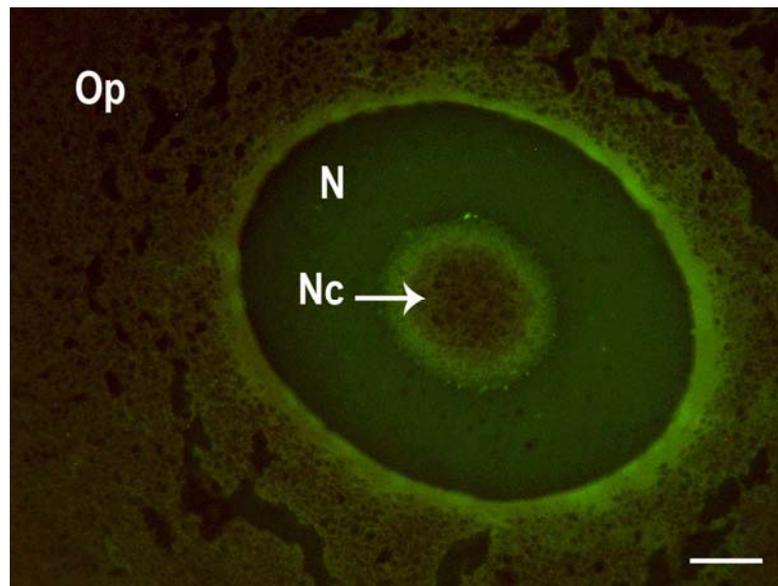


Bild 38 Ovar Wachtel, Kern prävitelliner Follikel, Bindung mit DBA

SB = 25 µm

Das Ooplasma (Op) des Follikels zeigt eine deutliche Reaktion mit DBA im Bereich um den Kern, Nucleus (N). Auch der Nucleolus (Nc) besitzt hier eine DBA-positive „Umrandung“.

4.3 Immunhistochemische Untersuchungen

4.3.1 Nachweis von Laminin

Bilder der immunhistochemischen Untersuchungen befinden sich auf den Seiten 74 – 106.

Bindungsstellen für den Laminin-Antikörper konnten in den Basalmembranen aller Follikelstadien gefunden werden (Bild 39). Die zunächst schwächere Reaktion an den Primordialfollikeln und den prävitellinen Follikeln ist an den großen vitellinen Stadien deutlich stärker ausgeprägt. Die kollagenen Fasern und die Zellen des Bindegewebes zeigen sich ebenfalls positiv. Mit zunehmender Follikelgröße färbt sich besonders die Thekaschicht der prävitellinen Follikel (Bild 40) und Theka interna der vitellinen Stadien stark an. Eine durchgehend starke Immunreaktion für Laminin ist an den Basalmembranen der Gefäße (Bild 41) und den Bindegewebsfasern um die ebenfalls leicht positiven Basallamina der Stromadrüsen-Zellverbände zu beobachten. Eine schwächere, aber dennoch deutlich positive Reaktion für Laminin zeigen die Basalmembranen der glatten Muskelzellen und die Nerven mit ihrem Perineurium (Bild 42).

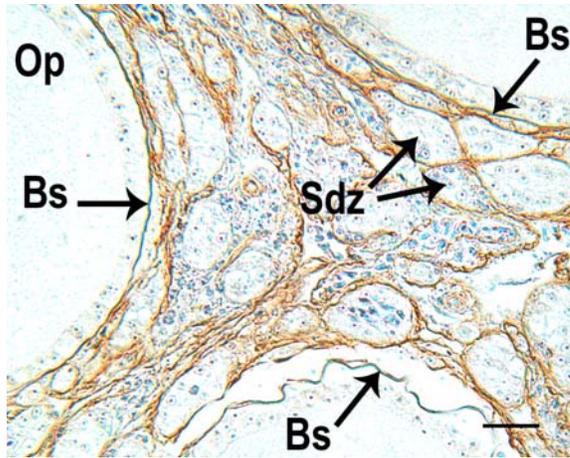


Bild 39 Ovar Wachtel, prävitelline Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Laminin

SB = 25 µm

Die Basalmembranen (Bs) der drei Follikel zeigen deutliche Reaktion mit dem Laminin-Antikörper. Gleiches gilt für die kollagenen Fasern und die Basallamina, die die Stromadrüsen-Zellverbände (Sdz) umschließen. Op = Ooplasma

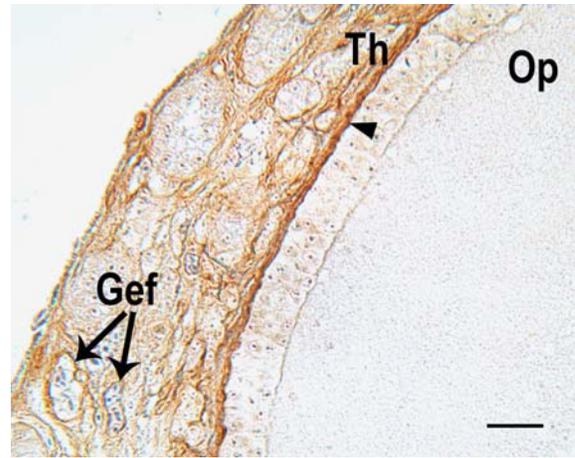


Bild 40 Ovar Wachtel, später prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Laminin

SB = 25 µm

Bereits bei prävitellinen Follikeln zeigt sich eine stark positive Reaktion (Pfeilspitze) der Thekaschicht (Th), der späteren Theka interna. Die Basalmembranen der Gefäße (Gef) sind ebenfalls stark Laminin-positiv. Op = Ooplasma

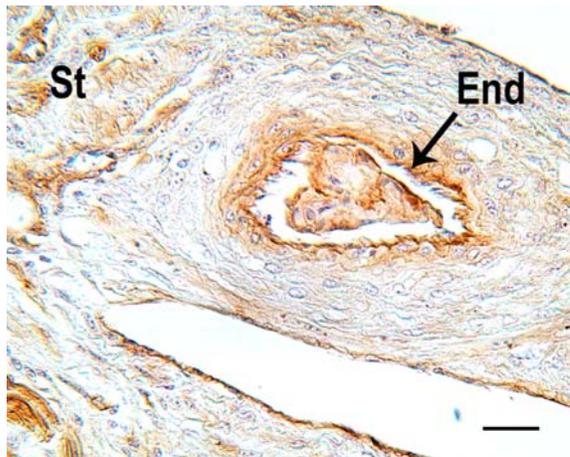


Bild 41 Ovar Wachtel, Gefäß im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von Laminin

SB = 25 µm

Die Basalmembran aller Gefäßendothelien (End) zeigt eine stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Laminin. St = Stroma

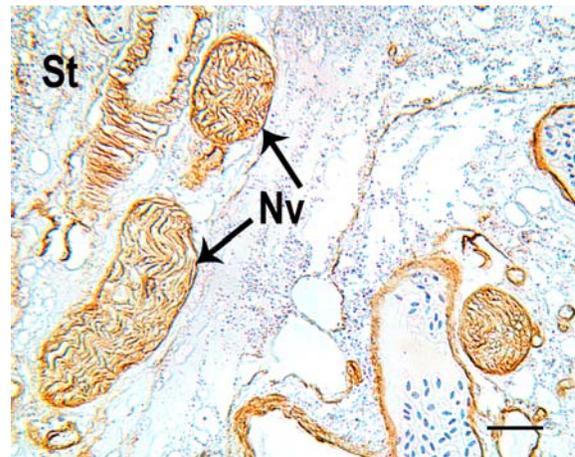


Bild 42 Ovar Wachtel, Nerven im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von Laminin

SB = 25 µm

Neben den Gefäßen zeigen im Stroma (St) vor allem die Nerven (Nv) mit ihrem Perineurium eine stark positive Reaktion mit dem Laminin-Antikörper.

Tabelle 8: Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-/+	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	
	Balbiani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	+	
	Basalmembran	+	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	+	
	Theka interna	++	
	Basalmembran	++	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	-	
	Kollagene Fasern	+	Besonders positiv um Stromadrüsen-Zellverbände
	Elastische Fasern	+	
	Glatte Muskelzellen	-/+	
	Gefäße	++	Basalmembran
	Stromadrüsen	-/+	Basallamina
	Nerven	++	Perineurium
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.2 Nachweis von Konnexin 43

Immunreaktivität auf Konnexin 43 konnte zwischen den ovariellen Stromadrüsenzellen (Bild 43) gefunden werden. Sie deuten auf Gap Junctions in diesen Bereichen hin. Eine gleichfalls stark positive Immunreaktion zeigen die lumenseitigen Zellbereiche größerer Stromadrüsen (Bild 44).

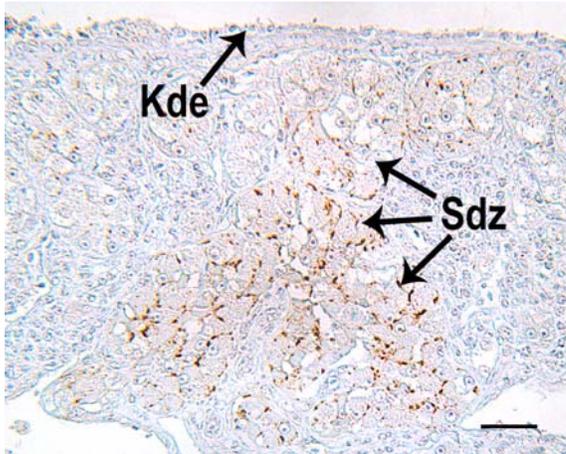


Bild 43 Ovar Wachtel, Stromadrüsen, Immunhistochem. Nachweis von Konnexin 43

SB = 25 µm

Zwischen den einzelnen Stromadrüsenzellen (Sdz) der zusammengelagerten Verbände befinden sich Gap Junctions, die deutlich positiv mit dem Antikörper gegen Konnexin 43 reagieren.
Kde = Keimdrüsenepithel

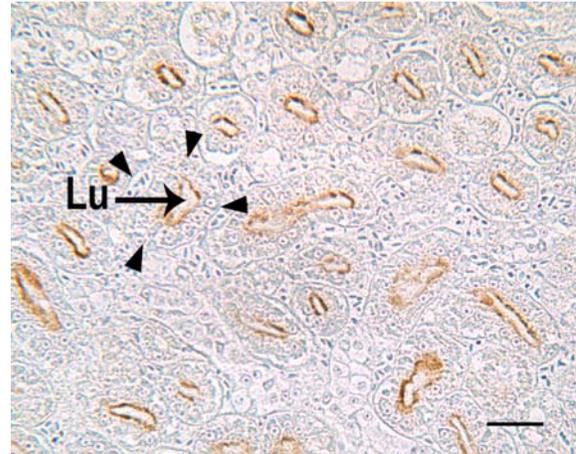


Bild 44 Ovar Wachtel, Drüsen-Lumen, Immunhistochem. Nachweis von Konnexin 43

SB = 25 µm

Die Stromadrüsen (Darstellung einer einzelnen Stromadrüse durch Pfeilspitzen) zeigen eine deutlich immunpositive apikale Reaktion an der Grenze zu ihrem Lumen (Lu) in der Mitte.

Tabelle 9: Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	
	Balbani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	-	
	Theka interna	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	-	
	Kollagene Fasern	-	
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	
	Stromadrüsen	++	Interzellulär und lumenseitig
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.3 Nachweis von Vimentin

Die stärkste Reaktion mit dem Vimentinantikörper zeigt sich im Zytoplasma der Granulosazellen der Primordialfollikel und der frühen prävitellinen Follikel (Bild 45). Bei den gesunden, späten prävitellinen Stadien sind zwar noch sehr deutliche Spuren einer positiven Reaktion auf Vimentin im Zytoplasma erkennbar, jedoch ist sie mit zunehmendem Wachstum eher auf die basale Seite der Granulosazellen konzentriert (Bild 46). Bei sehr großen Stadien ist kaum noch Antikörperbindung erkennbar. Ähnliches ist bei atretischen Follikeln zu beobachten: die Reaktion mit Vimentin ist insgesamt schwächer, bei Proliferation ist nur die äußerste Lage der mehrschichtigen Granulosawand noch angefärbt (Bild 49). Bei den kleinen Follikeln ist eine deutliche Immunreaktion auf Vimentin im Bereich des Balbiani-Körpers zu beobachten (Bild 45). Ebenfalls deutlich immunpositiv ist das Keimdrüsenepithel (Bild 47), die Leukozyten, das Endothel aller Gefäße (Bild 48), sowie die Nerven mit ihrem Perineurium (Bild 46, unten rechts), die glatten Muskelzellen und die Fibroblasten im interstitiellen Bindegewebe. Besonders gut darstellbar sind die elastischen Fasern. Die beiden Thekaschichten (viele Fibroblasten des spinozellulären Bindegewebes) reagieren gut mit dem Vimentinantikörper. Bei atretischen Follikeln ist die Immunreaktion in der Theka interna jedoch deutlich reduziert. Die ins Ooplasma eingewanderten, vakuolisierten Theka- und Granulosazellen der atretischen prävitellinen und vitellinen Follikel stellen sich mit dem Antikörper ebenfalls positiv dar (Bild 51). Bei den Stromadrüsen reagieren die Myoepithelzellen positiv, gelegentlich ist auch das Zytoplasma einiger vermutlich sekretorischer Zellen angefärbt.

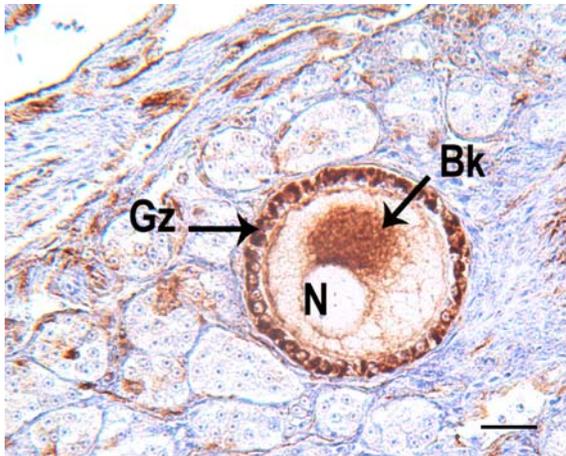


Bild 45 Ovar Wachtel, früher. prävit. Follikel.
Immunhistochem. Nachweis von Vimentin.

SB = 25 µm.

Eine sehr starke Reaktion mit dem Vimentin-Antikörper ist im gesamten Bereich der Granulosazellen (Gz) des Follikels zu erkennen. Der Balbiani-Körper (Bk) zeigt ebenfalls eine deutliche Reaktion. N = Nucleus

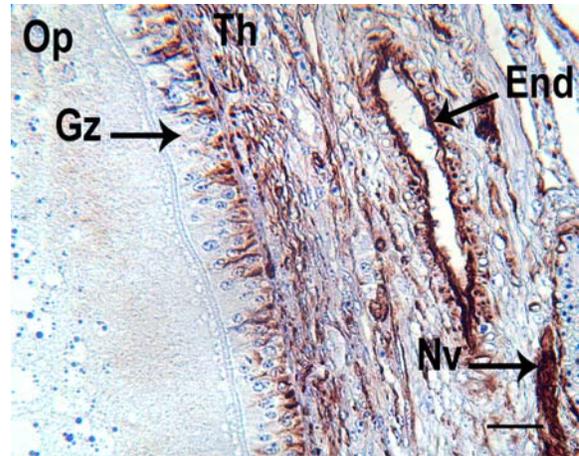


Bild 46 Ovar Wachtel, Wand spät. prävit. Follikel.
Immunhistochem. Nachweis v. Vimentin

SB = 25 µm

Die Granulosazellen (Gz) zeigen eine infranukleäre positive Reaktion, die mit zunehmendem Follikelwachstum weiter nach basal zieht. Das Endothel (End) der Gefäße sowie die bindegewebigen Strukturen von Nerven (Nv) reagieren stark positiv. Auch die Fibroblasten der Thekaschicht (Th) zeigen deutliche Reaktion. Op = Ooplasma

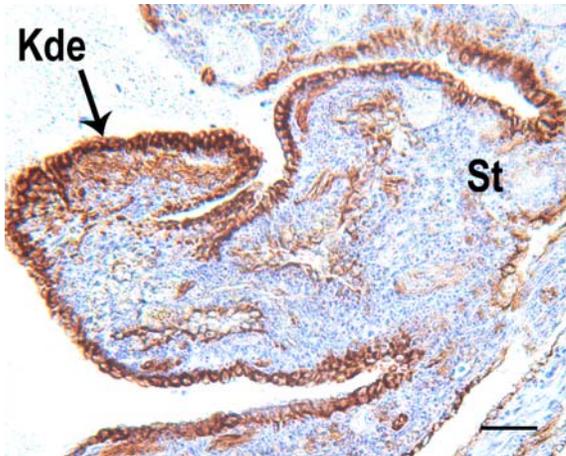


Bild 47 Ovar Wachtel, Rindenstroma,
Immunhistochem. Nachweis von Vimentin

SB = 25 µm

Das Keimdrüsenepithel (Kde) des Ovars zeigt eine durchgehend stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Vimentin. St = Stroma

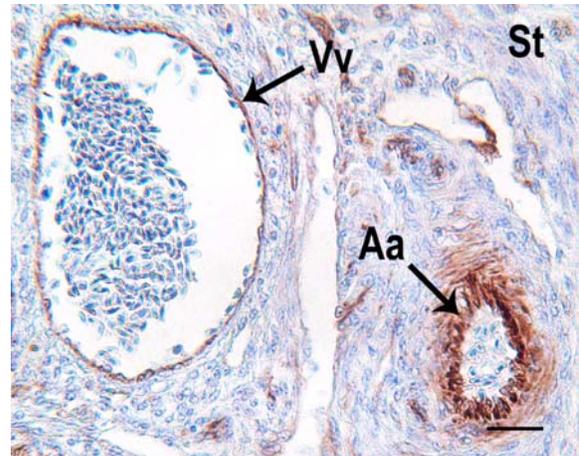


Bild 48 Ovar Wachtel, Gefäße im Stroma,
Immunhistochem. Nachweis von Vimentin

SB = 25 µm

Durch den Antikörper gegen Vimentin kann man die Unterschiede der positiven Gefäßendothelien zwischen Vene (Vv) und Arterie (Aa) gut darstellen. St = Stroma

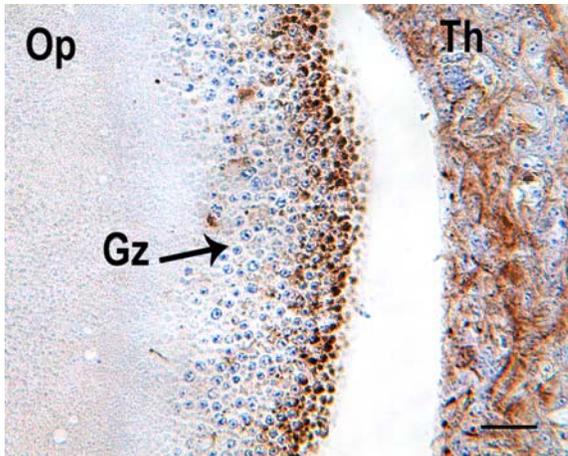


Bild 49 Ovar Wachtel, atret. prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Vimentin

SB = 25 µm

Die proliferierten Granulosazellen (Gz) eines atretischen Follikels zeigen nur noch in ihrer basalen Schicht positive Reaktion mit dem Vimentin-Antikörper. In der Thekaschicht (Th) sind weiterhin positive Fibroblasten zu erkennen. Op = Ooplasma

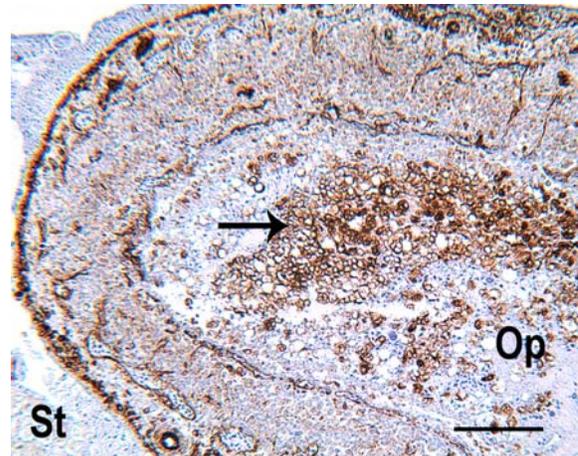


Bild 50 Ovar Wachtel, atret. vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Vimentin

SB = 100 µm

Die vakuolisierten Theka- und/oder Granulosazellen (Pfeil) sind in das Ooplasma (Op) eingewandert. Sie zeigen eine gleichbleibend deutlich positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Vimentin. St = Stroma

Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	+++	
	Ooplasma	-/+	
	Balbani-Körper	+	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	+	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	++	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	+	Fibroblasten
	Theka interna	+	Fibroblasten, bei Atresie vakuolisierte Thekazellen
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	++	Reaktion vor allem infranukleär
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	+	
	Kollagene Fasern	-/+	
	Elastische Fasern	+	
	Glatte Muskelzellen	+	
	Gefäße	++	Endothel und Perizyten; Leukozyten
	Stromadrüsen	+	Basale Umrandung und / oder Zytoplasma angefärbt
	Nerven	++	Nervengewebe sowie Perineurium
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	++	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.4 Nachweis von smooth muscle actin (SMA)

Bei den gesunden, späten, prävitellinen Follikeln ist eine stark positive Reaktion an den Thekaschichten zu beobachten, jedoch ist die innerste Lage, welche direkt an die Granulosazellschicht angrenzt, immer negativ (Bild 52, oben). Dieser negative innere Ring bleibt bei den vitellinen Stadien bestehen, zudem ist eine starke immunhistochemische Anfärbung auf SMA in der Theka externa zu verzeichnen (Bild 53). Die Fibroblasten beider Schichten besitzen also immunreaktives SMA und dürften damit kontraktile Eigenschaften besitzen („kontraktile Follikelkapsel“). Bei großen atresierenden Follikeln bilden die proliferierten Thekazellen einen stark positiven, verbreiterten Ring um den untergehenden Follikel. Die Granulosazellen jedoch bleiben stets immunnegativ. Eine starke Bindung des SMA-Antikörpers ist an der Tunica media aller Gefäße zu beobachten (Bild 52, Mitte und Bild 54, rechts) sowie am Perineurium der Nerven. Stark immunpositiv auf SMA sind die glatten Muskelfaserstränge (Chordae) in den Zellschichten, welche die äußeren großen Follikel umhüllen und direkt unter dem Keimdrüsenepithel liegen, ebenso reagiert die Tunica albuginea. Das Keimdrüsenepithel ist hier dagegen durchgehend negativ. Mittels des SMA-Antikörpers lässt sich der Verlauf der glatten Muskelfaserbündel auch in der Medulla ovarii gut verfolgen (Bild 51).

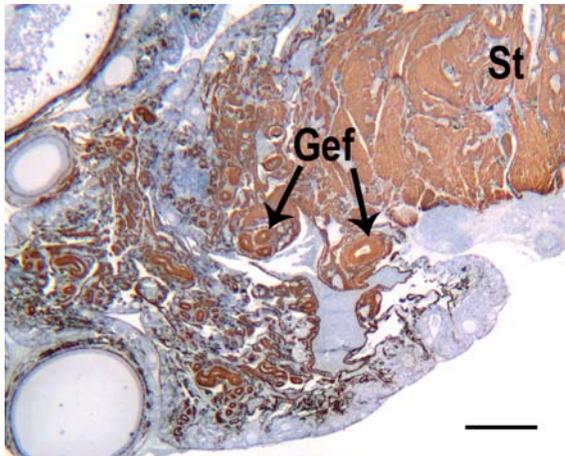


Bild 51 Ovar Wachtel, Übersicht Stroma, Immunhistochem. Nachweis von SMA

SB = 500 µm

In der Übersicht kann man deutlich die Verteilung der glatten Muskelzellen und der anderen Zellen mit kontraktiven Eigenschaften im Ovar verfolgen. Gef = Gefäße, St = Stroma

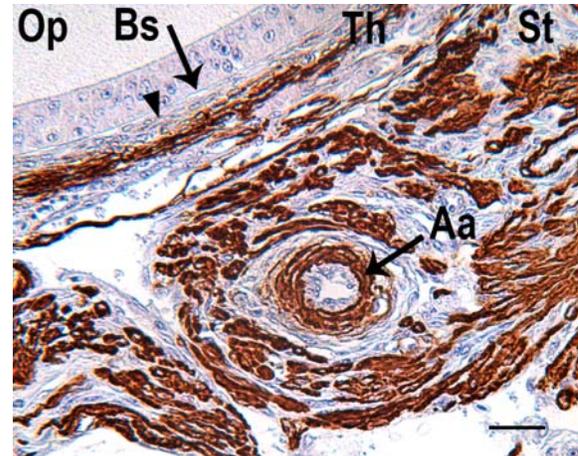


Bild 52 Ovar Wachtel, Follikel und. Arterie, Immunhistochem. Nachweis von SMA

SB = 25 µm

Der prävitelline Follikel (oben links) zeigt zwischen seiner Basalmembran (Bs) und den stark positiven Fibroblasten der Thekaschicht (Th) einen negativen „Inneren Ring“ (Pfeilspitze). Die Tunica media der Arterie (Aa) zeigt ebenfalls starke Bindung mit dem SMA-Antikörper. Sie wird außerdem von zahlreichen SMA-positiven Zellbündeln umgeben. St = Stroma, Op = Ooplasma

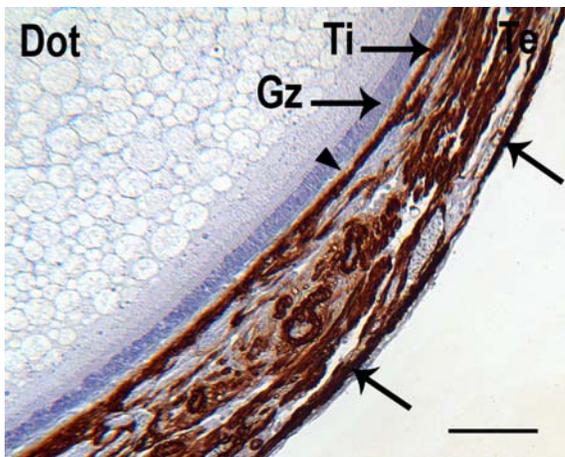


Bild 53 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von SMA

SB = 100 µm

Auch beim vitellinen Follikel reagieren die äußere Lage der Theka interna (Ti) und die Fibroblasten der Theka externa (Te) stark positiv mit dem SMA-Antikörper. Der „Innere Ring“ (Pfeilspitze) bleibt dagegen negativ. Sehr stark positiv reagieren die Chordae der äußeren Follikelwand und die Tunica albuginea (Pfeile), direkt unter dem Keimdrüsenepithel. Gz = Granulosazellen, Dot = Dotterpartikel

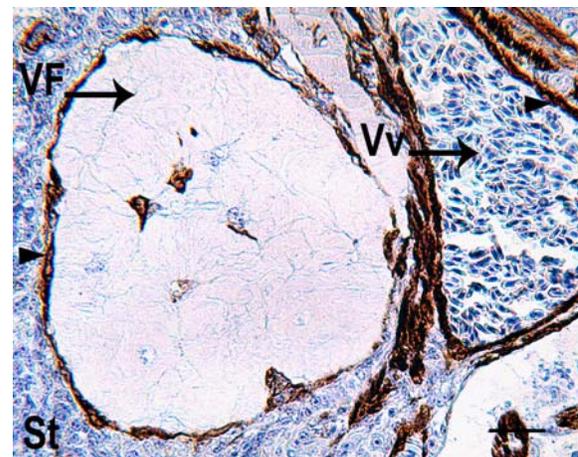


Bild 54 Ovar Wachtel, atret. Follikel und Vene, Immunhistochem. Nachweis von SMA

SB = 25 µm

Dieser atresierte und komplett mit hyalinisiertem Bindegewebe ausgefüllte vitelline Follikel (VF) ist außen (Pfeilspitze links) von fibroblastenartigen, stark positiven Zellen umgeben, die auch vereinzelt im inneren Bereich vorkommen können. Rechts ist eine Vene (Vv) zu erkennen, die mit Blutzellen angefüllt ist und deren Tunica media (Pfeilspitze rechts) ebenfalls eine starke Immunreaktion mit SMA aufweist. St = Stroma

Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von SMA

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	
	Balbani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	++	Fibroblasten, "Innerster Ring" bleibt negativ
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	++	Fibroblasten bzw. bei Atresie fibroblastenartige Zellen
	Theka interna	++	Fibroblasten, "Innerster Ring" bleibt negativ
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	+	
	Kollagene Fasern	+	
	Elastische Fasern	+	
	Glatte Muskelzellen	++	Sehr stark positiv in den Muskelfasersträngen (Chordae) der äußeren Follikelwände
	Gefäße	++	Tunica media, Perizyten
	Stromadrüsen	+	Positive Umrandung
	Nerven	+	Perineurium
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	++	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.5 Nachweis von Pancytokeratin (PCK)

Das Keimdrüsenepithel des Ovars reagiert stark positiv mit dem Pancytokeratin-Antikörper (Bild 55 - Bild 57). Die braune Anfärbung dieser Epithelzellen liegt charakteristischerweise in den äußeren Bereichen ihres Zytoplasmas. Desweiteren ist eine positive Immunreaktion in den Zellen der Theka externa der größeren vitellinen Follikel zu beobachten (Bild 58), die aber deutlich schwächer als im Keimdrüsenepithel ist.

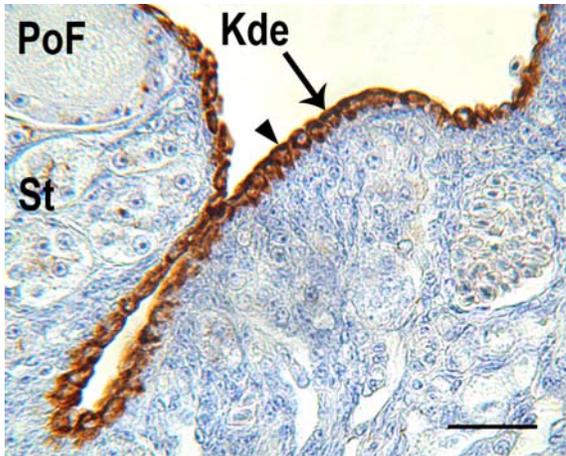


Bild 55 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von PCK

SB = 25 µm

Das Keimdrüsenepithel (Kde) des Ovars reagiert durchgehend stark positiv mit dem Antikörper gegen PCK. Die Reaktion ist an basaler Seite stärker (Pfeilspitze). PoF = Primordialfollikel, St = Stroma

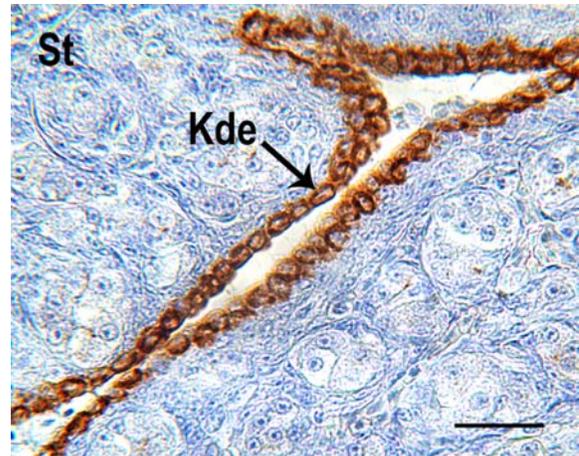


Bild 56 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von PCK

SB = 25 µm

Durch das stark positive Keimdrüsenepithel (Kde) kann man die Rindenlappung des Ovars gut verfolgen. Die Zytoskelette der Keimdrüsenepithelzellen sind im gesamten Zytoplasma stark positiv, immer mit einer leichten Verstärkung nach basal. Einzig die Kerne bleiben negativ. St = Stroma

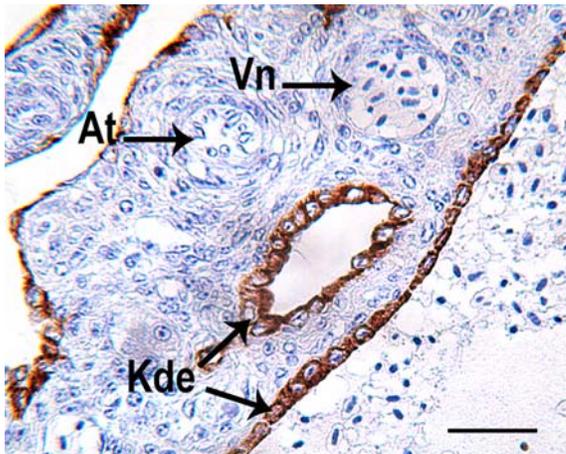


Bild 57 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von PCK

SB = 25 µm

Das Keimdrüsenepithel (Kde) weist an manchen Stellen im Stroma Einstülpungen auf (Mitte), die sich wie Hohlräume darstellen. At = Arteriole, Vn = Venole

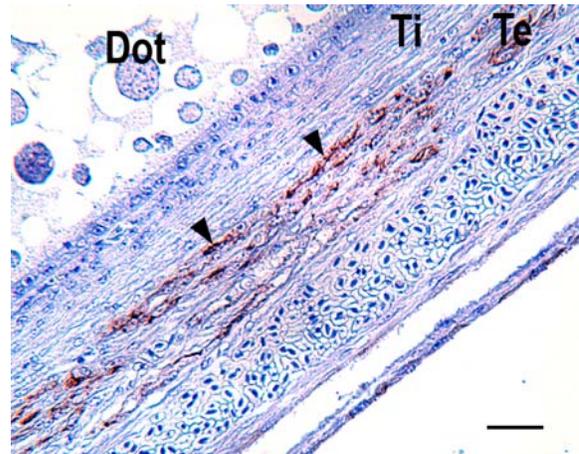


Bild 58 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von PCK

SB = 25 µm

Einige Zellen der Theca externa (Te) weisen in ihrem Zytoplasma deutliche Reaktionen mit dem PCK-Antikörper auf (Pfeilspitzen). Dot = Dotterpartikel, Ti = Theca interna

Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von PCK

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	
	Balbiani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-/+	Äußere Thekaschicht
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	+	Punktförmig und / oder länglich angefärbte Zellen
	Theka interna	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	-	
	Kollagene Fasern	-	
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	
	Stromadrüsen	-	
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	++	Äußere Zytoplasmagrenze, „Ring“
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.6 Nachweis von Cytokeratin 5 (CK 5)

Die Reaktion mit diesem Antikörper ist jener mit Pancytokeratin ähnlich. Wieder ist das Keimdrüsenepithel stark positiv (Bild 59 - Bild 61). In den Zellen der Theka externa und der Organwand im Follikelbereich kann man längliche immunpositive Strukturen beobachten (Bild 62). Gelegentlich färben sich die Bindegewebsfasern des Ovars unspezifisch an. Auch der Balbiani-Körper der kleinen Follikel zeigt oftmals eine schwache Reaktion mit dem Antikörper gegen Cytokeratin 5.



Bild 59 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel schräg, Immunhistochem. Nachweis von CK 5

SB = 25 µm

Dieses schräg angeschnittene Keimdrüsenepithel (Kde), das stark positiv reagiert, zeigt eine homogene Anfärbung mit dem CK-5-Antikörper. Sdz = Stromadrüsen-Zellverbände

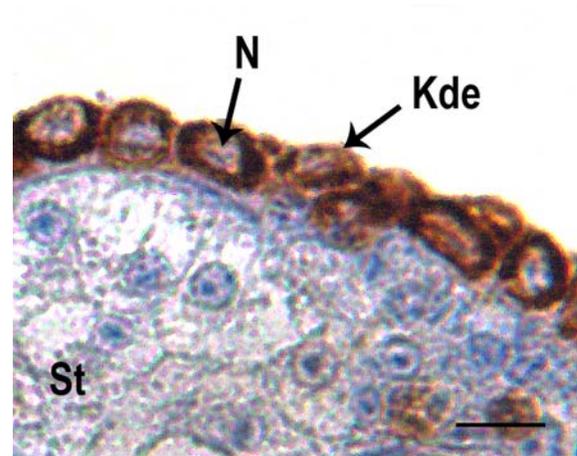


Bild 60 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel groß, Immunhistochem. Nachweis von CK 5

SB = 100 µm

Die stark positive Reaktion des Zytoskeletts der Zellen des Keimdrüsenepithels (Kde) mit dem CK-5-Antikörper füllt deren gesamtes Zytoplasma aus. Der Kern (N) bleibt negativ. St = Stroma

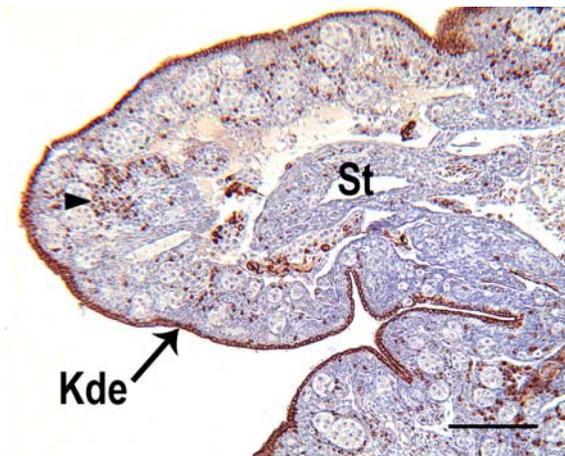


Bild 61 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von CK 5

SB = 100 µm

Das Keimdrüsenepithel (Kde) zeigt eine gleichmäßig stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen CK 5. Daneben befinden sich im Stroma (St) eine größere Anzahl CK-5-positiver Zellen (Pfeilspitze).

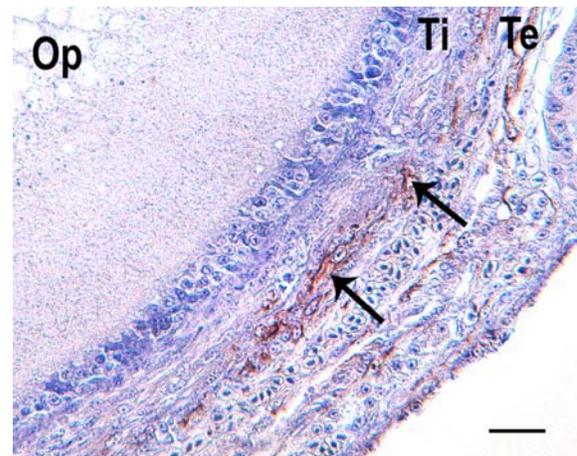


Bild 62 Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von CK 5

SB = 25 µm

Das Zytoplasma einiger Zellen der Theca externa (Te) zeigt eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen CK 5. Ti = Theca interna, Op = Ooplasma

Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 5

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	
	Balbiani-Körper	-/+	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	+	Punktförmig und / oder länglich angefärbte Zellen
	Theka interna	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	-/+	Unspezifisch
	Kollagene Fasern	-	
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	Leichte Anfärbung der Erythrozyten
	Stromadrüsen	-	
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	++	Äußere Zytoplasmagrenze, „Ring“
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.7 Nachweis von Cytokeratin 15 (CK 15)

Das Keimdrüsenepithel reagiert in dieser Arbeit durchgehend negativ mit dem Antikörper gegen Cytokeratin 15. Als einzige Immunreaktion sind an den Dotterpartikeln von untergehenden Follikeln Umrandungen zu erkennen, die sich in der atretischen Masse hervorheben.

4.3.8 Nachweis von Cytokeratin 18 (CK 18)

Das Keimdrüsenepithel reagiert zwar positiv mit dem Antikörper, jedoch ist die Reaktion von unterschiedlicher Intensität (schwach bis deutlich positiv). Gruppen von Zellen mit deutlicher Reaktion wechseln mit Zellen, die keine Immunreaktion aufweisen (Bild 63). Gelegentlich ist das Zytoplasma auch unscharf und „verwaschen“ angefärbt (Bild 64).

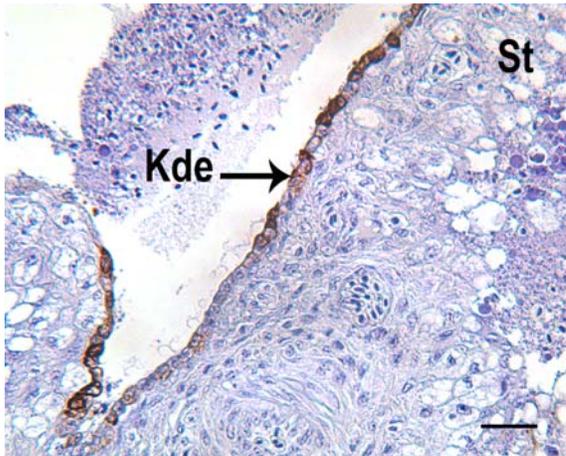


Bild 63 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von CK 18.

SB = 25 μ m

Das Keimdrüsenepithel (Kde) reagiert mit ungleicher Intensität mit dem Antikörper gegen CK 18. Manche Zellen zeigen starke Reaktion, andere dagegen sind komplett negativ. St = Stroma

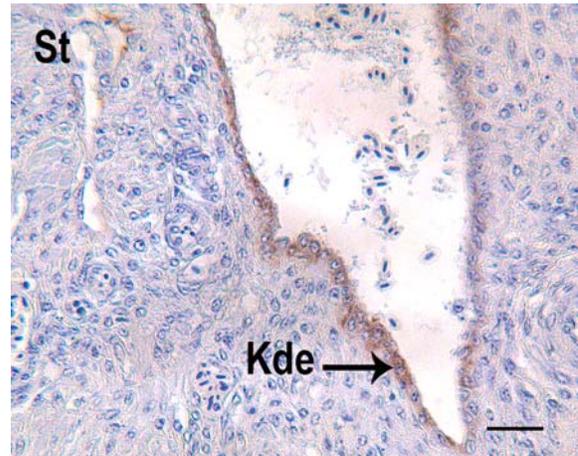


Bild 64 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von CK 18

SB = 25 μ m

Die Zellen des Keimdrüsenepithels (Kde) zeigen eine schwache, undeutliche und „verwaschene“ Reaktion mit dem CK-18-Antikörper in ihrem Zytoplasma. St = Stroma

Tabelle 14: Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18.

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	
	Balbiani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	-	
	Theka interna	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Perivitellinmembran	-	
	Dotter	-	
Interstitium	Bindegewebszellen	-	
	Kollagene Fasern	-	
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	
	Stromadrüsen	-	
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	- bis ++	Gruppen von Zellen positiv
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.9 Nachweis von Zona pellucida Protein 1 (ZP1)

Die Perivitellinmembran stellt sich mit dem Antikörper gegen ZP1 bei prävitellinen und vitellinen Follikeln positiv dar, bei letzteren mit sehr starker Intensität (Bild 66 und Bild 67). Bei sehr großen, hierarchischen Follikeln (direkte Hierarchie der Follikel zur Ovulation), bei welchen die positive Reaktion mit dem ZP1-Antikörper bestehen bleibt, zieht sich die Struktur der Perivitellinmembran zusätzlich zwischen die Granulosazellen ein (Bild 69). Ebenfalls deutlich positiv reagiert das Endothel der Blutgefäße. Im Zytoplasma der Granulosazellen von Primordial- und frühen prävitellinen Follikeln finden sich kugelförmige, immunpositive Strukturen (Bild 68), die bei den späten prävitellinen Follikeln vor allem im apikalen Zellbereich zu finden sind (Bild 65). Auch bei Follikelatresie bleiben diese immunpositiven Strukturen im Zytoplasma der Granulosazellen erhalten (Bild 70). Die Theka interna der vitellinen Follikel ist eher negativ, bei hierarchischen Follikelstadien dagegen reagiert sie positiv mit dem ZP1-Antikörper, und auch in der Theka externa sind dann einzelne ZP1-positive Fibroblasten zu finden. Deutlich angefärbt stellen sich auch die vakuolisierten ehemaligen Theka- bzw. Granulosazellen dar, die außerhalb des Follikels liegen. Das Ooplasma der kleinen Follikel färbt sich leicht an, gelegentlich sind auch positive Granula zu finden. Gleiches gilt auch für den Dotter der großen Stadien, dessen kortikale Granula sich aber farblich stärker von anderen Strukturen abheben. Bei atresierten Follikeln lässt sich durch den ZP1-Antikörper ihr stark angefärbtes hyalinisiertes Bindegewebe gut darstellen.

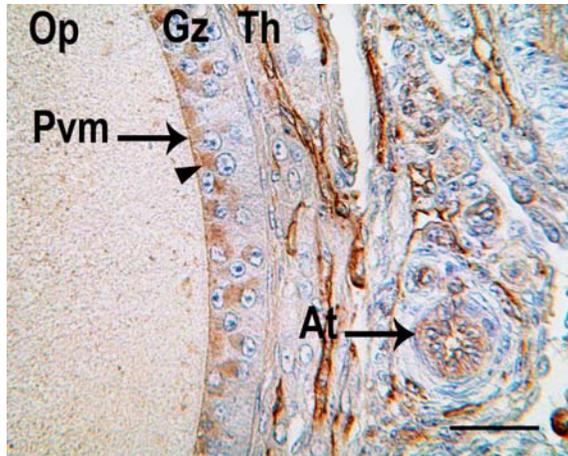


Bild 65 Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1

SB = 25 µm

Neben dem stark positiven Endothel der Gefäße und auch der etwas schwächer reagierenden Tunica media einer Arteriole (At) sind im Zytoplasma der Granulosazellen (Gz) ZP1-positive, kugelförmige Strukturen (Pfeilspitze) zu beobachten, die dem Golgi-Feld zuzuordnen sind. Die Perivitellinmembran (Pvm) ist hier eine kaum sichtbare, dünne Linie. Th = Thekaschicht, Op = Ooplasm

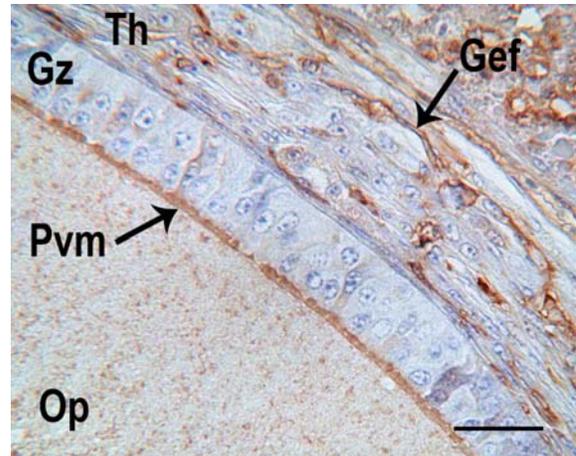


Bild 66 Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1

SB = 25 µm

Bei diesem Follikel sind bereits fast keine Golgi-Felder mehr in den Granulosazellen (Gz) zu sehen, das Glykoprotein-Baumaterial für die Perivitellinmembran (Pvm) scheint aber noch nicht vollständig in den extrazellulären Raum zwischen den Granulosazellen und der Oozytenmembran eingebaut zu sein. Gef = Gefäß, Th = Thekaschicht, Op = Ooplasm

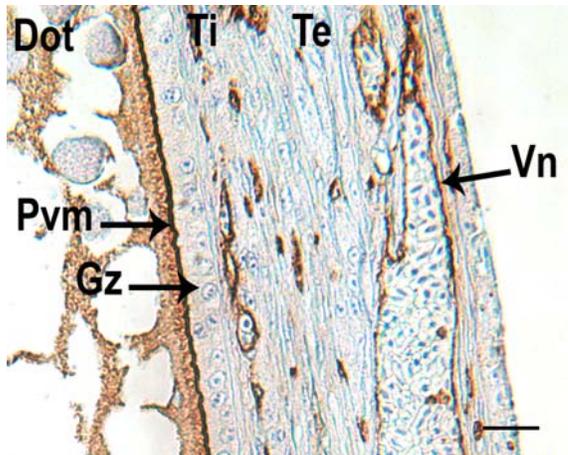


Bild 67 Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1

SB = 25 µm

Die durchgehende Perivitellinmembran (Pvm) eines vitellinen Follikels zeigt eine stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen ZP1. Deutlich zeigen sich hier auch stark positive Gefäßendothelien, wie das einer Venole (Vn) in der Follikelwand. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna

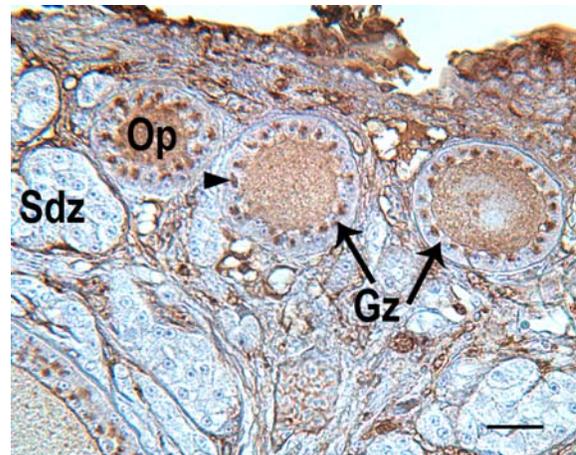


Bild 68 Ovar Wachtel, Follikel im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von ZP1

SB = 25 µm

Diese sehr frühen prävitellinen Follikel zeigen neben ihrem auf den ZP1-Antikörper reagierenden Ooplasm (Op) kugelförmige, deutlich positive Strukturen (Pfeilspitze) im Zytoplasma ihrer Granulosazellen (Gz), die dem Golgi-Feld entsprechen. Sdz = Stromadrüsen-Zellverbände

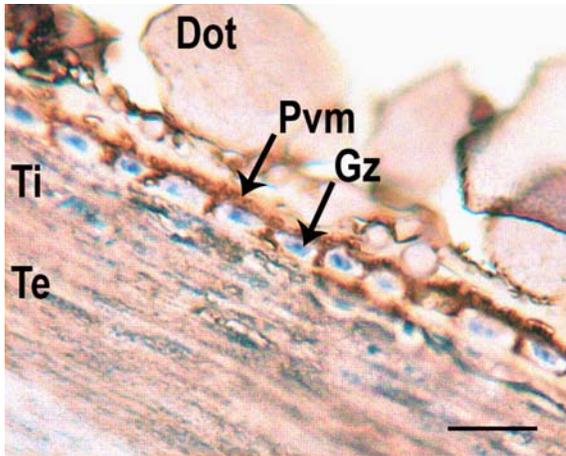


Bild 69 Ovar Wachtel, Wand F2-Follikel (15mm), Immunhistochem. Nachweis von ZP1

SB = 25 µm

Bei sehr großen vitellinen Follikeln findet sich ZP1-positives Material auch zwischen den Granulosazellen (Gz). Dot = Dotter, Pvm = Perivitellinmembran, Te = Theka externa, Ti = Theka interna

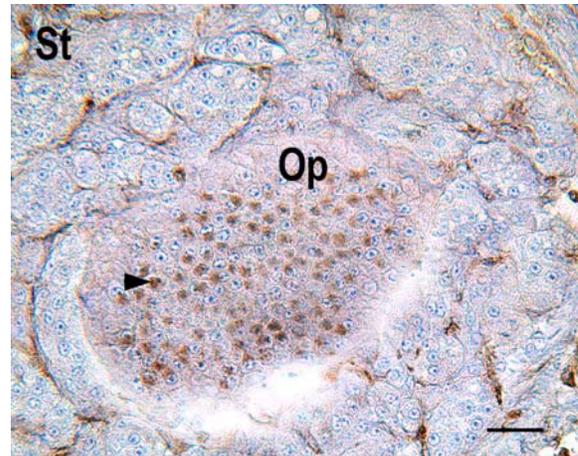


Bild 70 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1

SB = 25 µm

Bei diesem atresierten Follikel sind Granulosazellen ins ehemalige Ooplasma (Op) der Oozyte eingewandert. Diese Annahme liegt nahe, da die Zellen weiterhin ein ZP1-positives Golgi-Feld (Pfeilspitze) kernnah in ihrem Zytoplasma aufweisen. St = Stroma

Tabelle 15: Immunhistochemischer Nachweis von ZP1

	Struktur	Reaktion	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	+	Kugelförmige Anfärbung
	Ooplasma	-/+	Granula
	Balbiani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	+	Fibroblasten
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	+	Kugelförmige, nach apikal ziehende Anfärbung
	Perivitellinmembran	+	
	Ooplasma	-/+	Granula
Vitelline Follikel	Theka externa	+	Vereinzelt Fibroblasten
	Theka interna	+	Fibroblasten
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-/+	
	Perivitellinmembran	++	
	Dotter	+	
Interstitium	Bindegewebszellen	+	Zwischen den Stromadrüsenzellen
	Kollagene Fasern	-	Hyalinisiertes Bindegewebe: +
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	++	Endothel
	Stromadrüsen	-	
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.10 Nachweis von Zona pellucida Protein A (ZPA, ZP2)

Die Perivitellinmembran der vitellinen Follikel stellt sich mit dem ZPA-Antikörper stark positiv dar. Sie bildet hier eine durchgehende, scharf abgegrenzte immunpositive Struktur (Bild 73). Die positive Immunreaktion mit ZPA scheint jedoch mit zunehmender Größe der vitellinen Follikel abzunehmen. Eine erste Reaktion in Form einer dünnen, unregelmäßigen Linie ist bei Follikeln von ca. 1 mm zu beobachten, die stärkste, gleichmäßige Anfärbung der Perivitellinmembran zeigt sich bei Stadien bis ca. 2 mm. Das Glykoproteinmaterial, das sich bei prävitellinen Follikeln noch in den Granulosazellen befindet um später in die Perivitellinmembran eingebaut zu werden, stellt sich in Form von unregelmäßig geformten Granula dar (Bild 71). Diese befinden sich, nach apikal wandernd, im Zytoplasma der Granulosazellen (Bild 72) oder befinden sich bereits in der Zona radiata. In noch früheren Stadien der Follikel liegen die ZPA-positiven Granula im Zytoplasma der Granulosazellen verteilt vor, bei Primordialfollikeln enthält auch der Balbiani-Körper einige dieser ZPA-positiven Granula (Bild 74). Bei frühen vitellinen Follikeln („small white follicles“) färben sich gelegentlich einige kortikale Granula im Ooplasma mit dem ZPA-Antikörper an (Bild 77), ansonsten bleiben Dotter bzw. Ooplasma der Eizelle negativ. Eine wahrscheinlich unspezifische Antikörperbindung zeigt das hyalinisierte Bindegewebe der atresierten Follikel (Bild 78).

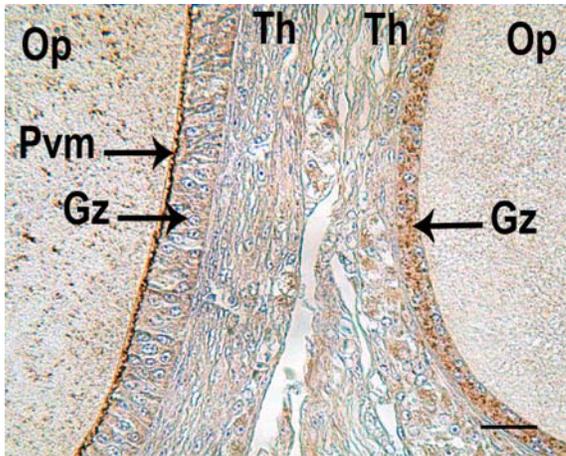


Bild 71 Ovar Wachtel, Wände prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 25 µm

Bei dem rechten Follikel zeigt das Zytoplasma der Granulosazellen (Gz) deutlich ZPA-positive Granula. Bei dem linken Follikel ist das ZPA-positive Glykoprotein-Material schon zu einer extrazellulären, aber noch unzusammenhängenden Perivitellinmembran (Pvm) zusammengefügt. Diese Granulosazellen (Gz) weisen keine positiven Granula mehr auf. Im Ooplasma (Op) der Oozyte zeigen sich positive, kortikale Granula. Th = Thekaschicht(en)

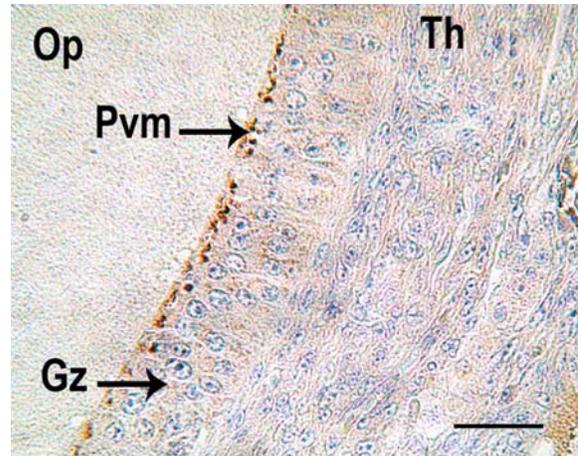


Bild 72 Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 25 µm

Das Anfangsstadium der Perivitellinmembran (Pvm) im Detail: Einzelne granulaförmige, ZPA-positive Substanzen scheinen sich apikal lokalisiert im Zytoplasma der Granulosazellen (Gz) zu sammeln, um von dort aus in den Extrazellularraum abgegeben und in die Perivitellinmembran eingebaut zu werden. Th = Thekaschicht, Op = Ooplasma

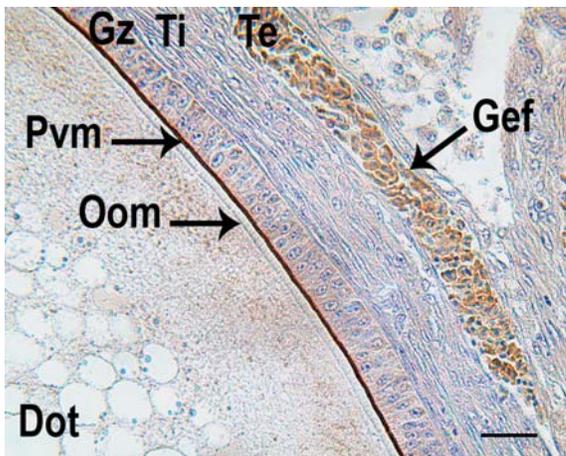


Bild 73 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 25 µm

Die durchgehende Perivitellinmembran (Pvm) eines vitellinen Follikels zeigt sich als stark positive, einheitlich gefärbte Linie. Das Endothel der Gefäße (Gef), die Theka interna (Ti) sowie die Theka externa (Te) bleiben negativ. Gleiches gilt für die Ooplasmamembran (Oom), die die Zona radiata basal begrenzt. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen

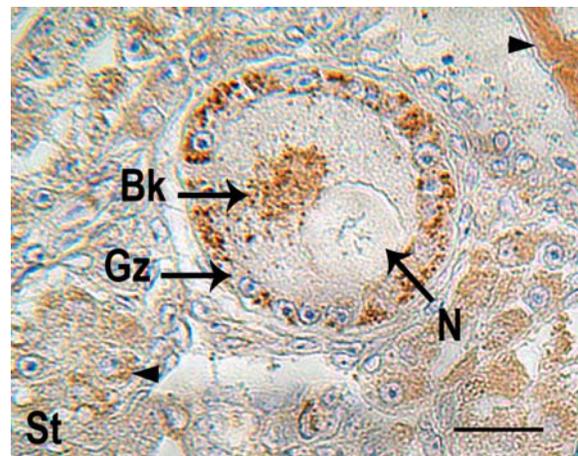


Bild 74 Ovar Wachtel, kleiner Follikel im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 25 µm

Der sehr frühe, prävitelline Follikel zeigt eine granuläre, deutlich positive Reaktion mit dem ZPA-Antikörper im Zytoplasma der Granulosazellen (Gz) und im Balbiani-Körper (Bk). Eine leichte Anfärbung ist im Zytoplasma einiger Drüsenzellen im Stroma (St) zu erkennen (Pfeilspitze links). N = Nucleus, Pfeilspitze rechts = Nerv

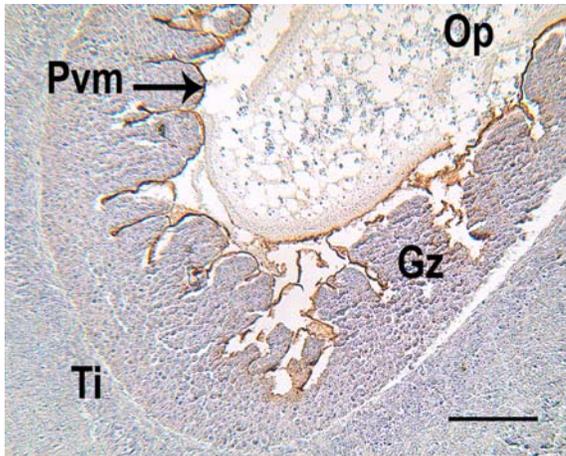


Bild 75 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 100 µm

Die Perivitellinmembran (Pvm) wird bei Atresie vom Ooplasma (Op) der Oozyte abgetrennt und wird dabei zwischen den hochgradig proliferierten Granulosazellen (Gz) eingelagert. Ti = Theka interna

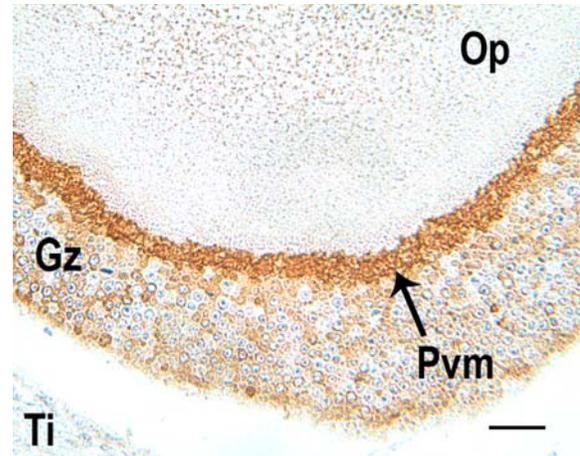


Bild 76 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 25 µm

Das auch im atretischen Follikel stark positiv bleibende Glykoproteinmaterial der späteren Perivitellinmembran (Pvm) scheint in der apikalen Lage der proliferierten Granulosazellen (Gz) konzentriert zu sein. Ti = Theka interna, Op = Ooplasma

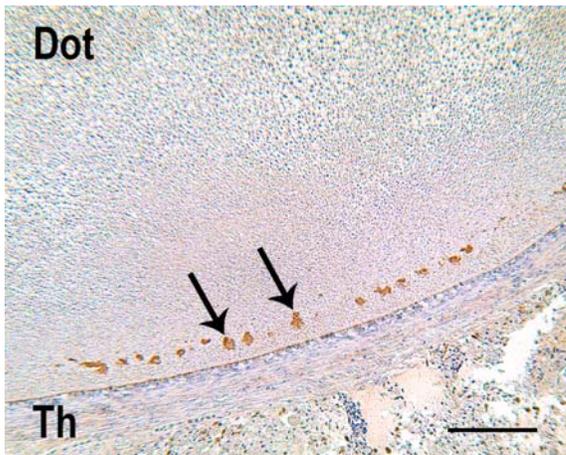


Bild 77 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 100 µm

Bei vitellinen Follikeln reagieren einzelne kortikale Ooplasmmainhalte (Pfeile) im Dotter (Dot) immunpositiv mit dem Antikörper gegen ZPA. Die Reaktion an der Perivitellinmembran scheint hier jedoch schwächer zu sein als die der anderen Glykoproteine bei Follikeln vergleichbarer Größe. Th = Thekaschicht(en)

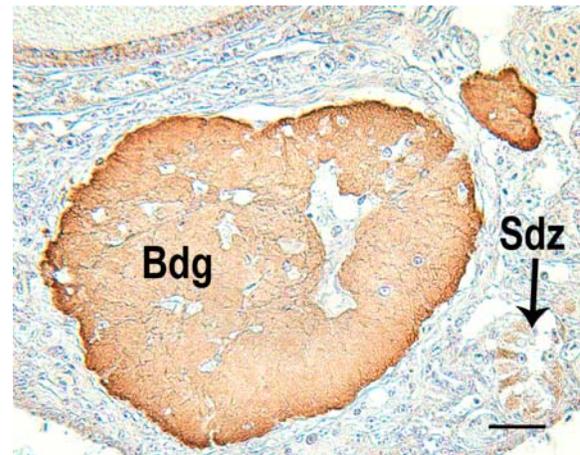


Bild 78 Ovar Wachtel, hyalinisierter Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA

SB = 25 µm

Dieser ehemalige Follikel ist komplett mit hyalinisiertem Bindegewebe (Bdg) durchsetzt, das ZPA-positiv reagiert. Ein Verband Stromadrüsenzellen (Sdz) zeigt eine leicht positive Reaktion im Zytoplasma.

Tabelle 16: Immunhistochemischer Nachweis von ZPA (ZP2)

	Struktur	Reaktion	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	+	Granula im Zytoplasma
	Ooplasma	-	
	Balbani-Körper	+	Granula im Balbani-Körper
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	+	Granula im Zytoplasma
	Perivitellinmembran	+	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	-	
	Theka interna	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-/+	
	Perivitellinmembran	++	Reaktion abnehmend im Laufe des Follikelwachstums
	Dotter	-	Einzelne kortikale Ooplasmainhalte: +
Interstitium	Bindegewebszellen	-	
	Kollagene Fasern	-	Hyalinisiertes Bindegewebe: +
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	
	Stromadrüsen	-/+	
	Nerven	+	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.11 Nachweis von Zona pellucida Protein C (ZPC, ZP3)

Die Perivitellinmembran färbt sich mit dem ZP3-Antikörper zunächst schwach positiv und unregelmäßig in den prävitellinen Follikeln an (Bild 79). Die Reaktion wird dann mit zunehmendem Wachstum der Follikel sehr stark (Bild 80 und Bild 81). Diese stark positive Reaktion bleibt auch bei sehr großen, hierarchischen Follikelstadien bestehen. Das Zytoplasma der Granulosazellen ist negativ bis zum Erreichen später prävitelliner und vitelliner Follikelstadien, bei welchen es sich zunehmend positiv anfärbt. Gelegentlich sind auch einige kortikale Strukturen im Dotter ZPC-positiv. Die atretischen Follikel sind häufig von hyalinisiertem Bindegewebe durchwachsen und zeigen mit dem ZP3-Antikörper eine unspezifische, positive Reaktion. Im basalen Zytoplasmabereich der Stromadrüsenzellen sind ZPC-positive, punktförmige Areale zu beobachten (Bild 82), die dem Golgi-Feld entsprechen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Verdünnung des ZPC-Antikörpers (bis 1:800) war eine positive (wahrscheinlich unspezifische) Anfärbung der Zellkerne zu beobachten (Bild 79).

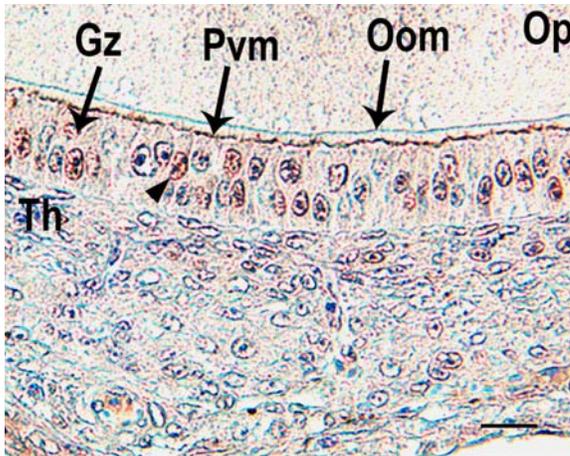


Bild 79 Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPC

SB = 25 µm

Bei diesem späten prävitellinen Follikel ist die Perivitellinmembran (Pvm) bereits als dünne, unregelmäßige Linie sichtbar, die aber bereits ZPC-positiv ist. Gelegentlich färben sich die Kerne (Pfeilspitze) der Granulosazellen (Gz) mit dem Antikörper gegen ZPC an.

Oom = Ooplasmamembran, Th = Thekaschicht, Op = Ooplasma

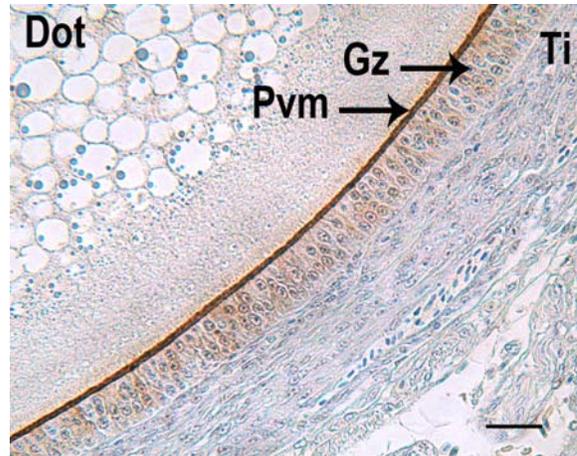


Bild 80 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPC

SB = 25 µm

Bei vitellinen Follikeln ist die Perivitellinmembran (Pvm) als regelmäßige und durchgehende Linie sichtbar, die eine stark immunpositive Reaktion mit dem ZPC-Antikörper aufweist. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Ti = Theka interna

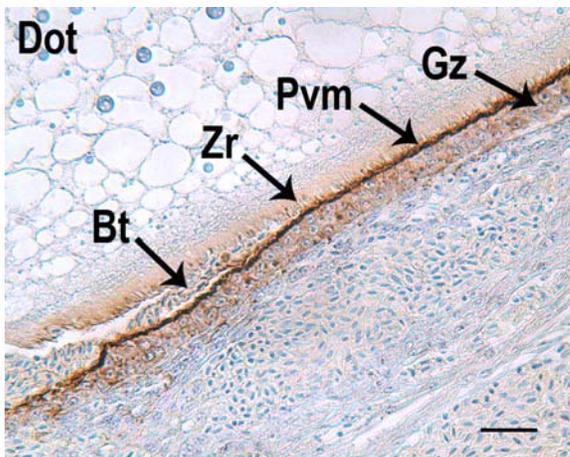


Bild 81 Ovar Wachtel, atret. vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPC

SB = 25 µm

Bei diesem atretischen Follikel wird die stark positive Perivitellinmembran (Pvm) durch einwandernde Blutzellen (Bt) von der gut sichtbaren Zona radiata (Zr) abgetrennt. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen

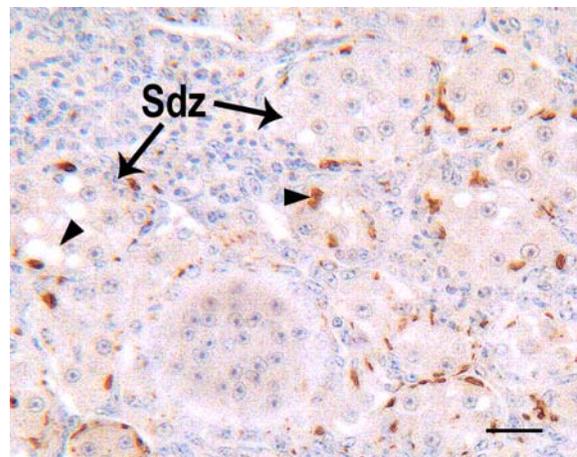


Bild 82 Ovar Wachtel, Stromadrüsenzellen, Immunhistochem. Nachweis von ZPC

SB = 25 µm

Es sind punktförmige, ZPC-positive Areale in den zu Verbänden zusammengelagerten Stromadrüsenzellen (Sdz) zu erkennen, die dem Golgi-Feld entsprechen könnten (Pfeilspitze rechts). Diese Zellen sind meist vakuolisiert (Pfeilspitze links).

Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis von ZPC (ZP3)

	Struktur	Reaktionsintensität	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-	
	Ooplasma	-	Eizellkern: +
	Balbani-Körper	-	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-/+	Kerne: +
	Perivitellinmembran	+	
	Ooplasma	-	Eizellkern: +
Vitelline Follikel	Theka externa	-	Kerne der Thekazellen: -/+
	Theka interna	-	Kerne der Thekazellen: -/+
	Basalmembran	-	Unregelmäßig dunkle Punkte sichtbar
	Granulosazellen	+	Kerne: -/+
	Perivitellinmembran	++	
	Dotter	-/+	Kortikaler Bereich
Interstitium	Bindegewebszellen	-	Kerne: +
	Kollagene Fasern	-	Hyalinisiertes Bindegewebe: +
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	
	Stromadrüsen	-	Unregelmäßig dunkle Punkte sichtbar
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.3.12 Nachweis von Zona pellucida Protein D (ZPD)

Sehr stark positiv reagiert die Perivitellinmembran mit dem ZPD-Antikörper bei großen, vitellinen Follikeln (Bild 85), meist erst ab einer Größe von 1 - 2 mm, bei den prävitellinen Stadien ist selten eine Reaktion zu verzeichnen. Gemäß dieser Immunreaktion findet der Einbau von ZPD in die Perivitellinmembran langsamer und später statt als bei den anderen Zona-Proteinen. Erst in sehr späten Stadien der prävitellinen bzw. in vitellinen Follikeln wird eine dünne ZPD-positive Linie in der Perivitellinmembran sichtbar (Bild 84). Bei hierarchischen Stadien ist die Reaktion sehr stark und gleichmäßig (Bild 86). Die Granulosazellen aller Follikelstadien erscheinen schwach ZPD-positiv, oft enthalten sie positive Granula in ihrem Zytoplasma (Bild 83). Gleiches gilt für die Balbiani-Körper der kleinen Follikel. Die Dotterpartikel der großen Follikel enthalten gelegentlich ZPD-positive Granula. Bei atretischen Follikeln färbt sich, wie bei den anderen Zona-Proteinen, unspezifisch das hyalinisierte Bindegewebe deutlich an (Bild 87). Die Stromadrüsenzellen enthalten in ihrem Zytoplasma leicht immunpositive Areale, die dem Golgi-Feld entsprechen könnten (Bild 88).

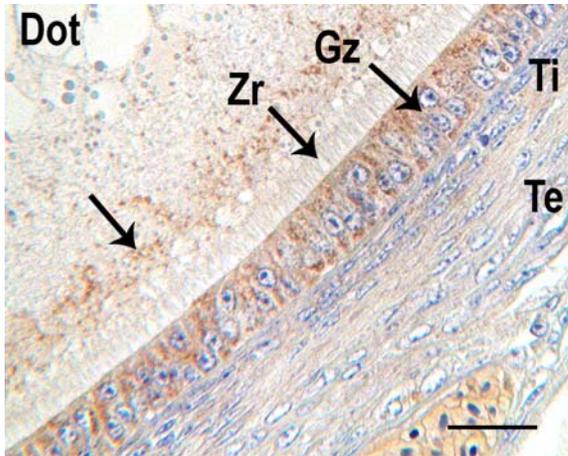


Bild 83 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD

SB = 25 µm

Obwohl sich dieser Follikel bereits im vitellinen Stadium befindet, ist dennoch keine eindeutig sichtbare Perivitellinmembran auszumachen, das ZPD-positive Material scheint sich noch in den Granulosazellen (Gz) zu befinden. Eine Zona radiata (Zr) ist aber bereits vorhanden und im Ooplasma befinden sich ZPD-positive Granula (Pfeil). Dot = Dotterpartikel, Te = Theka externa, Ti = Theka interna

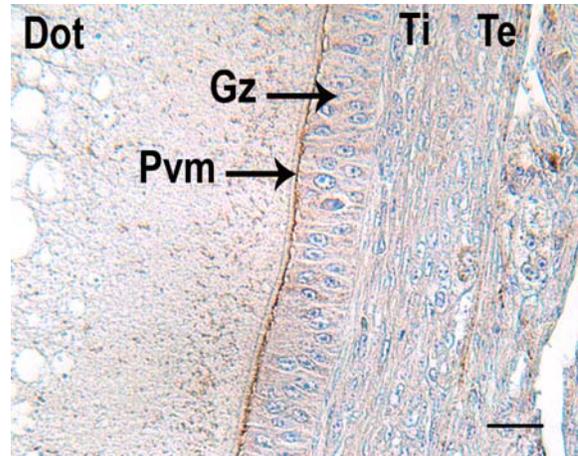


Bild 84 Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD

SB = 25 µm

Meist ist erst in späteren Stadien der vitellinen Follikel die sich aufbauende Perivitellinmembran (Pvm), die deutlich positiv mit dem ZPD-Antikörper reagiert, als dünne Linie auszumachen. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Te = Theka externa, Ti = Theka interna

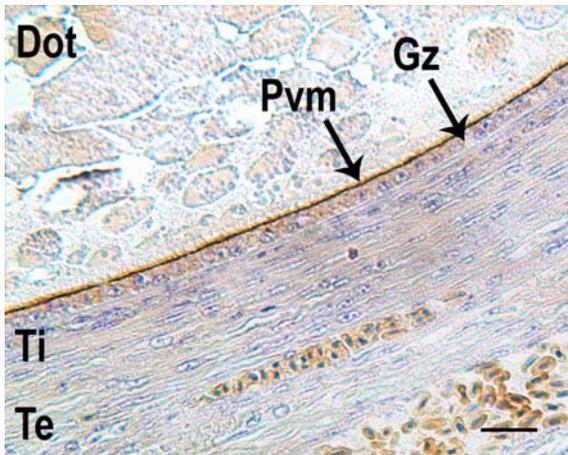


Bild 85 Ovar Wachtel, Wand großer vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD

SB = 25 µm

In fortgeschrittenem Stadium weist der vitelline Follikel eine stark ZPD-positive, durchgehende und gleichmäßig geformte Perivitellinmembran (Pvm) auf, die im Laufe des Follikelwachstums aber noch breiter wird. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Te = Theka externa, Ti = Theka interna

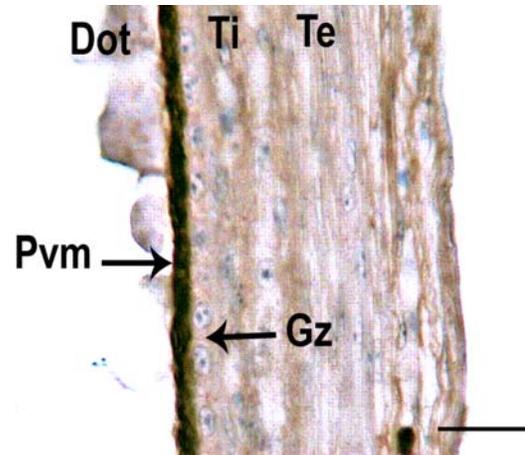


Bild 86 Ovar Wachtel, Wand F2-Follikel (ca 15mm), Immunhistochem. Nachweis von ZPD

SB = 25 µm

Mit zunehmender Größe des Follikels verbreitert sich auch die Perivitellinmembran (Pvm), und ihre Reaktion mit dem ZPD-Antikörper scheint in diesen hierarchischen Follikelgrößen sogar noch stärker zu sein. Dot = Dotterpartikel, Gz = Granulosazellen, Te = Theka externa, Ti = Theka interna

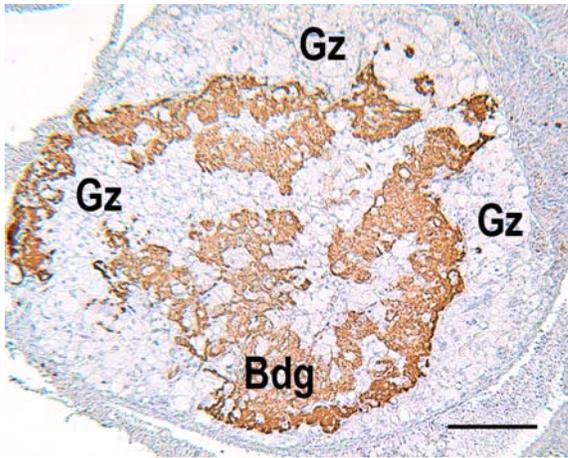


Bild 87 Ovar Wachtel, atretischer vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD

SB = 100 µm

ZPD-positives, hyalines Bindegewebe (Bdg) dieses atretischen Follikels wandert, vermutlich von der Theka externa stammend, in die Oozytenmitte ein, nachdem Granulosazellen (Gz) bzw. Zellen der Theka interna, die proliferiert und vakuolisiert sind, ebenfalls das Ooplasma infiltrieren.



Bild 88 Ovar Wachtel, Stromadrüsen-Zellverbände, Immunhistochem. Nachweis von ZPD

SB = 25 µm

Die zu kugelförmigen Verbänden zusammengelagerten Stromadrüsenzellen (Sdz) zeigen in ihrem Zytoplasma eine leicht positive Immunreaktion mit dem Antikörper gegen ZPD. Da die Areale kernnah liegen, lässt sich hier wiederum eine Entsprechung des Golgi-Feldes vermuten.

Tabelle 18: Immunhistochemischer Nachweis von ZPD

	Struktur	Reaktion	Besonderheiten
Primordialfollikel	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-/+	
	Ooplasma	-	
	Balbiani-Körper	-/+	
Prävitelline Follikel	Thekaschicht	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-/+	
	Perivitellinmembran	-	
	Ooplasma	-	
Vitelline Follikel	Theka externa	-	
	Theka interna	-	
	Basalmembran	-	
	Granulosazellen	-/+	
	Perivitellinmembran	++	Stärker werdend im Laufe des Follikelwachstums
	Dotter	-/+	Granula in den Dotterpartikeln und kortikale Granula
Interstitium	Bindegewebszellen	-/+	
	Kollagene Fasern	-/+	
	Elastische Fasern	-	
	Glatte Muskelzellen	-	
	Gefäße	-	
	Stromadrüsen	-/+	Zytoplasma
	Nerven	-	
Sonstige Gewebe	Keimdrüsenepithel	-	
	Tunica albuginea	-	

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

4.4 RNA-in-situ-Hybridisierung

Durch die Methode der in-situ-Hybridisierung wurden spezifisch ausgewählte RNA-Sequenzen (mRNA) in den Geweben Leber und Ovar der Japanischen Wachtel nachgewiesen, um den Synthesort der Perivitellinmembran-Glykoproteine ZP1 und ZPC (ZP3) bestimmen zu können. Als Sonden wurden Oligonukleotide verwendet, die komplementär zur mRNA der Glykoproteine ZP1 bzw. ZPC der Wachtel sind und sich im positiven Fall durch den mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex verbundenem Biotin als braune Niederschläge darstellen. Da sich die mRNA der gesuchten Glykoproteine im Zytoplasma befindet, stellt sich eine positive Reaktion folglich ausschließlich zytoplasmatisch dar.

ZP1: Mit dieser Methode wurde die mRNA von ZP1 positiv in der Leber der Wachtel identifiziert. Die Reaktion war gleich bleibend stark in den Hepatozyten nachzuweisen, jedoch häufiger im inneren Bereich der Leber auszumachen. Die Randareale wiesen insgesamt weniger positive Hepatozyten auf. Der Nachweis in den Granulosazellen aller Follikelstadien war dagegen als negativ zu werten.

ZPC: Die Identifikation der mRNA von ZPC wurde als positiv in den Granulosazellen der Wachtel befunden. Die Intensität der Reaktion reichte von einer leichten Anfärbung der späten prävitellinen Follikel bis hin zu kräftiger Farbe in den großen vitellinen Stadien.

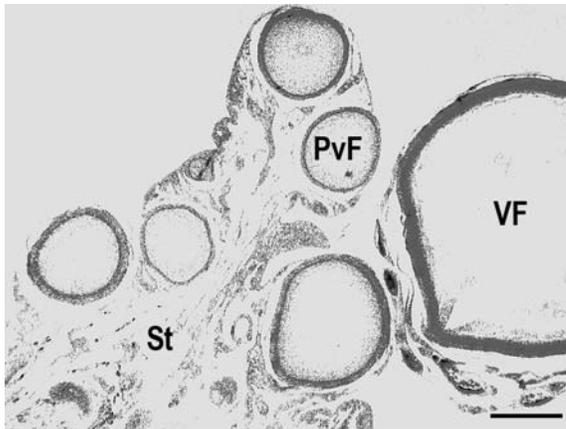


Bild 89 Ovar Wachtel, Nachweis von ZPC-mRNA, Antisense-Sonde

SB = 500 μ m

In diesem Überblick über das Ovar der Wachtel ist die spezifische Reaktion der Sonde an den Granulosazellen zu beobachten, die sich als dunkle Ringe gegen das Stroma (St) abzeichnen. Kleine Follikel zeigen keinerlei Reaktion. Die breiteren Ringe deuten auf Proliferation der Granulosazellen und damit auf Atresie hin. PvF = Prävitelliner Follikel, VF = Vitelliner Follikel

Die nachfolgenden Bilder zeigen jeweils eine Antisense- im Vergleich zu einer Sense-Reaktion an der gleichen Stelle im Gewebe, um die im positiven Fall bestehenden Unterschiede in der Anfärbung ausmachen zu können. Damit ist es möglich, die spezifische Bindung der molekularen Sonde und die Präsenz der gesuchten mRNA nachzuweisen und somit den Expressionsort des Glykoproteins.

4.4.1 Nachweis von ZP1-mRNA in der Leber der Wachtel

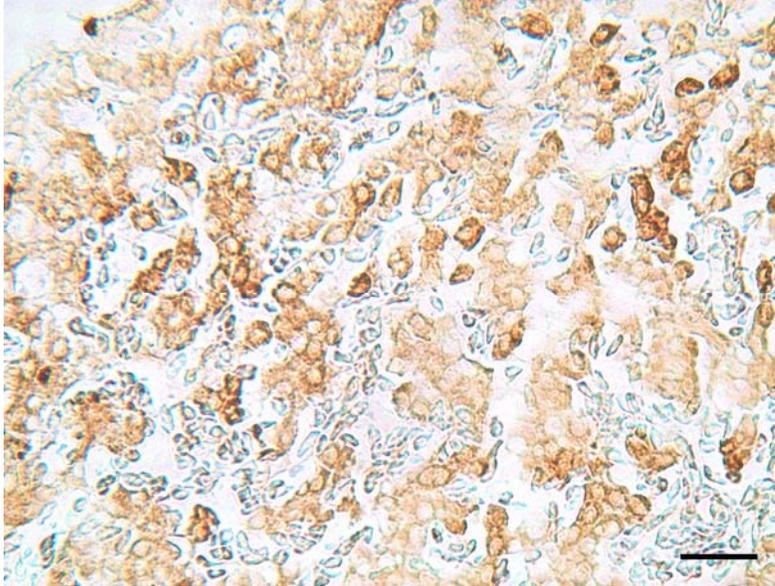


Bild 90 Leber Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Hepatozyten, Antisense-Sonde

SB = 25 μ m

Das Zytoplasma der Hepatozyten weist eine positive Reaktion mit der komplementären Nukleinsonde auf. Dies ist v.a. daran zu erkennen, dass der Farbstoff spezifisch und begrenzt im Zytoplasma verbleibt und dass die Felder der Zellkerne farbfrei geblieben sind.

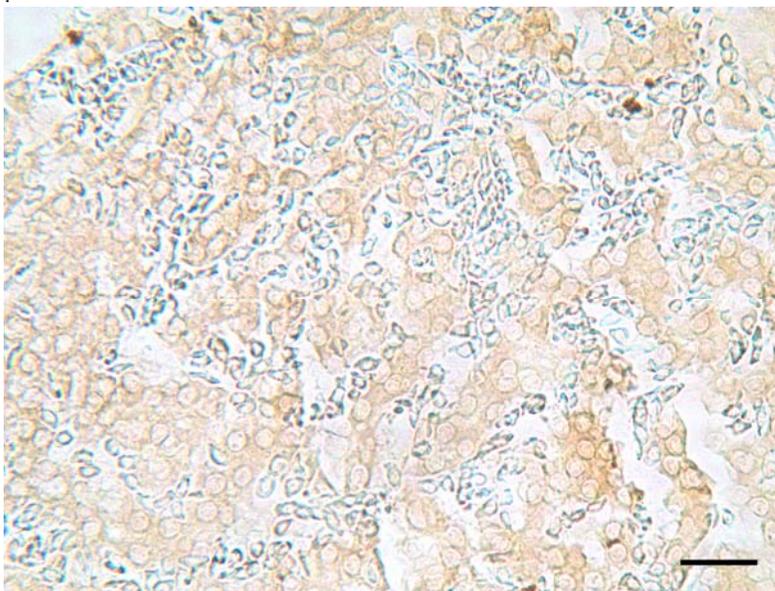


Bild 91 Leber Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Hepatozyten, Sense-Sonde

SB = 25 μ m

Die Reaktion der Sense-Sonde stellt sich deutlich negativ dar, die Hepatozyten sind weisen zwar Farbstoff auf, jedoch ist die Reaktion unspezifisch und „verwaschen“ und ist somit als negativ zu werten.

4.4.2 Nachweis von ZP1-mRNA in den Granulosazellen der Wachtel

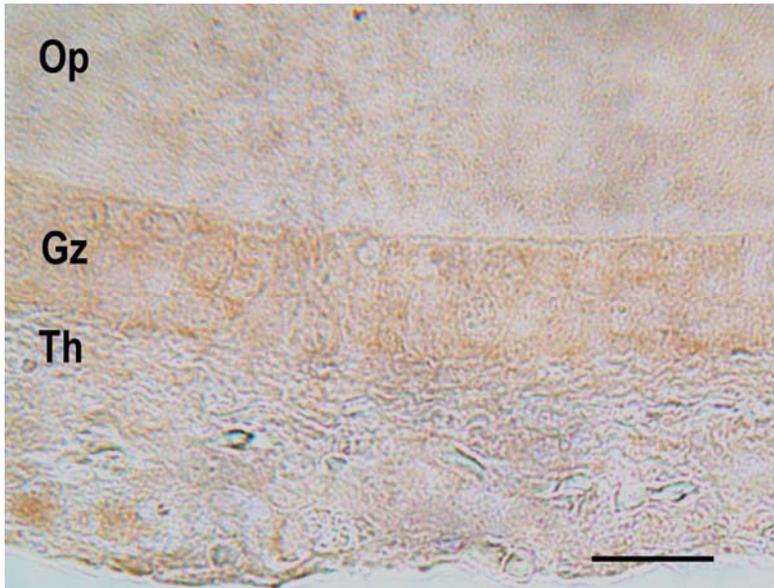


Bild 92 Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Granulosazellen, Antisense-Sonde

Die Reaktion stellt sich als insgesamt „verwaschen“ und unspezifisch in den Granulosazellen (Gz) dar, das Zytoplasma ist nur fleckenweise und schwach angefärbt. Der Nachweis nach ZP1-mRNA ist also, in Kombination mit der Sense (unten), als negativ zu bewerten. Op = Ooplasma, Th = Thekaschicht; SB = 25 μ m

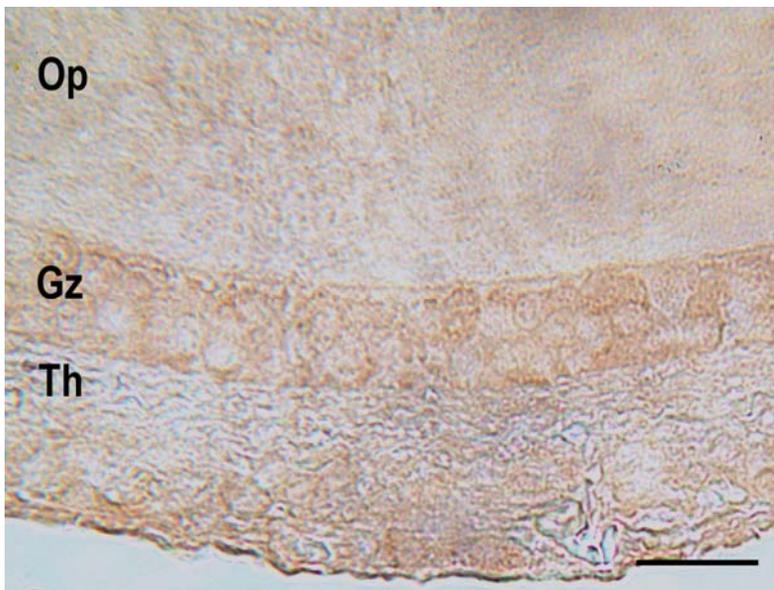


Bild 93 Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Granulosazellen, Sense-Sonde

Die Reaktion der Sense-Sonde gleicht jener der Antisense in Bezug auf die „verwaschene“ und unspezifische Reaktion in den Granulosazellen (Gz). Diese Gleichheit der Anfärbemuster lässt ebenfalls auf eine insgesamt negative Reaktion und damit auf die Abwesenheit von ZP1-mRNA in den Granulosazellen des Ovars schließen. Op = Ooplasma, Th = Thekaschicht; SB = 25 μ m

4.4.3 Nachweis von ZPC (ZP3)-mRNA in den Granulosazellen der Wachtel

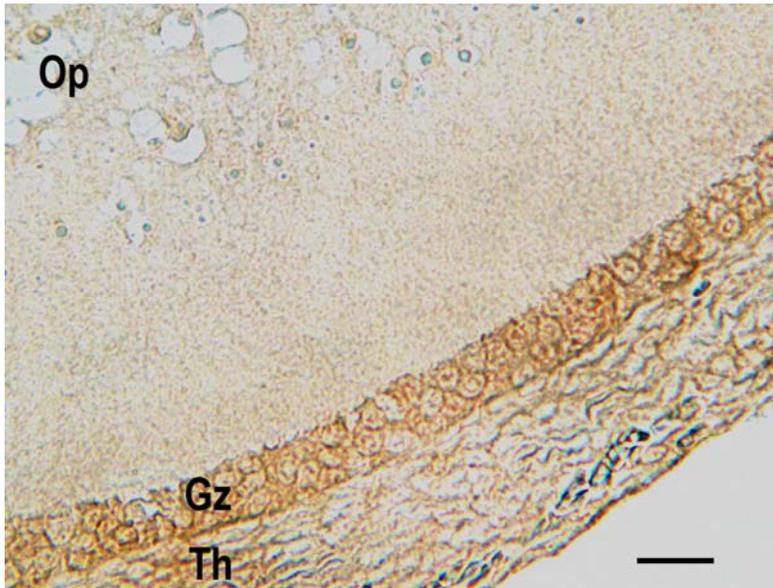


Bild 94 Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZPC-mRNA in den Granulosazellen, Antisense-Sonde

Mit der Antisense-Sonde gegen ZPC-mRNA kann man hier eine positive Reaktion verzeichnen. Das Zytoplasma der Granulosazellen (Gz) stellt sich spezifisch angefärbt und deutlich gezeichnet dar, der negative Kern ist farblich klar umrandet. Op = Ooplasma, Th = Thekaschicht; SB = 25 µm



Bild 95 Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZPC-mRNA in den Granulosazellen, Sense-Sonde

Die Reaktion der Sense-Sonde gegen ZPC-mRNA stellt sich in den Granulosazellen (Gz) schwach und unspezifisch dar. Die Färbung ist relativ einheitlich und ohne Zeichnung. Bedingt durch diese Unterschiede von Sense und Antisense ist der Nachweis von ZPC-mRNA in den Granulosazellen des Ovars insgesamt als positiv zu sehen. Op = Ooplasma, Th = Thekaschicht; SB = 25 µm

4.5 Elektronenmikroskopie (TEM)

4.5.1 Ultrastruktur der Primordialfollikel und der frühen prävitellinen Follikel

Bilder von Primordialfollikeln und frühen prävitellinen Follikel befinden sich auf Seite 113 – 124. Die Primordialfollikel werden von einer homogenen, schmalen Basalmembran und einer Schicht flacher Granulosazellen umgeben, bei den prävitellinen Follikeln der frühen Phase sind die Granulosazellen kubisch.

Die Granulosazellen enthalten in beiden Fällen in ihrem Zytoplasma Mitochondrien, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Komplexe und Lysosomen (Bild 96). Sie besitzen einen ovalen Kern mit charakteristischen Nucleoli. Diese zeigen einen hellen, inneren Bereich, das sogenannte fibrilläre Zentrum, eine elektronendichtere fibrilläre Schicht und einen stark elektronendichten äußeren Bereich, der aus Heterochromatin besteht (Bild 98). Pro Kern können meist zwei dieser im Anschnitt ringförmig aussehenden Nucleoli beobachtet werden (Bild 107). Meist enthält das Nucleoplasma des Kerns noch weitere dichte, klumpenartige Heterochromatinansammlungen.

Die lateralen Zell-zu-Zell-Verbindungen der Granulosazellen weisen Interdigitationen, lining bodies (= Transosomen), Desmosomen, Tight- und Gap Junctions auf. Lining bodies sind meist in den lateralen Invaginationen der Granulosazellen zu finden (Bild 105). Sie sind von ovaler Form, besitzen eine doppelte Membran und elektronendichte Granula in der inneren Membranlage. Apikal zeigen die Granulosazellen unterschiedlich ausgebildete, zytoplasmatische Fortsätze als Kontakt zur Ooplasmamembran, die sich mit dieser verzahnen. Desweiteren sind hier ebenfalls lining bodies und Gap Junctions zu beobachten.

Das Ooplasma der Oozyten beider Follikelstadien enthält kleine Fett-Tröpfchen, die eher in den äußeren Bereichen der Zelle liegen, Mitochondrien, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Vesikel, multivesikuläre Vakuolen, dense core particles, Vakuolen, die Membranstapel enthalten und unterschiedlich geformte Granula (Bild 104). Der Kern der Oozyte ist euchromatinreich, mit vereinzelt kleinen elektronendichteren Heterochromatinansammlungen.

Ein Balbiani-Körper konnte in beiden Follikelstadien identifiziert werden. Er liegt kernnah und stellt sich als dichte, dunklere Zusammenlagerung von Mitochondrien, Fett-Tröpfchen, rauem und glattem endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Vesikeln und weiteren Organellen dar (Bild 101). Lipidvakuolen sind dabei vor allem in den äußeren Bereichen des Balbiani-Körpers lokalisiert.

Die Thekaschicht dieser kleinen Follikel besteht aus einigen lose arrangierten Schichten von Fibroblasten, mit dazwischen liegenden Kollagenfibrillen. Die ovalen Kerne der Fibroblasten zeigen zwei prominente Nucleoli, die manchmal ein helleres Zentrum aufweisen. Auch weitere Nucleoli-ähnliche Heterochromatinansammlungen sind im Kern zu beobachten (Bild 98).

Atretische Primordialfollikel und prävitelline Follikel der frühen Phase zeigen eine deformierte, meist von der Thekaschicht abgetrennte Basalmembran (Bild 106). Die Granulosazellen zeigen aufgelöste Kerne, Fett-Tröpfchen und elektronendichte Granula in ihrem Zytoplasma. Gleiches gilt für das Ooplasma. Es zeigt sich zusätzlich vakuolisiert.

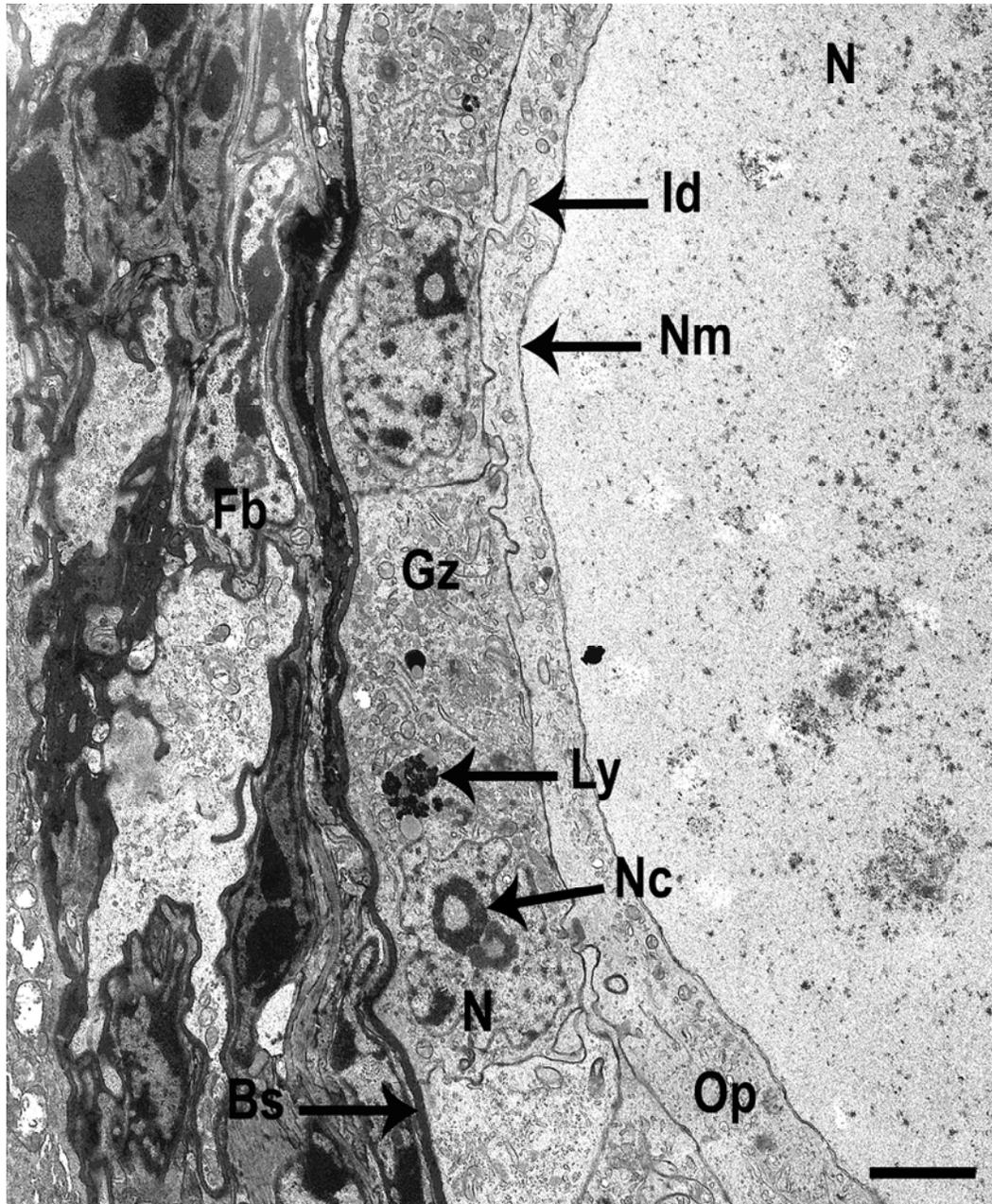


Bild 96 Ovar Wachtel, Primordialfollikel, TEM

SB = 2 μ m

Die Granulosazellen (Gz) sind flach und enthalten neben dem charakteristischen Kern (N) mit seinen Nucleoli (Nc) an Fettvakuolen orientierte sekundäre Lysosomen (Ly). Interdigitationen (Id) der Granulosazellen mit dem Ooplasma (Op) sind häufig. Im Oozytenkern (N) liegt neben dem Euchromatin vereinzelt elektronendichtes Heterochromatin vor. Bs = Basalmembran, Fb = Fibroblast, Nm = Nuclearmembran

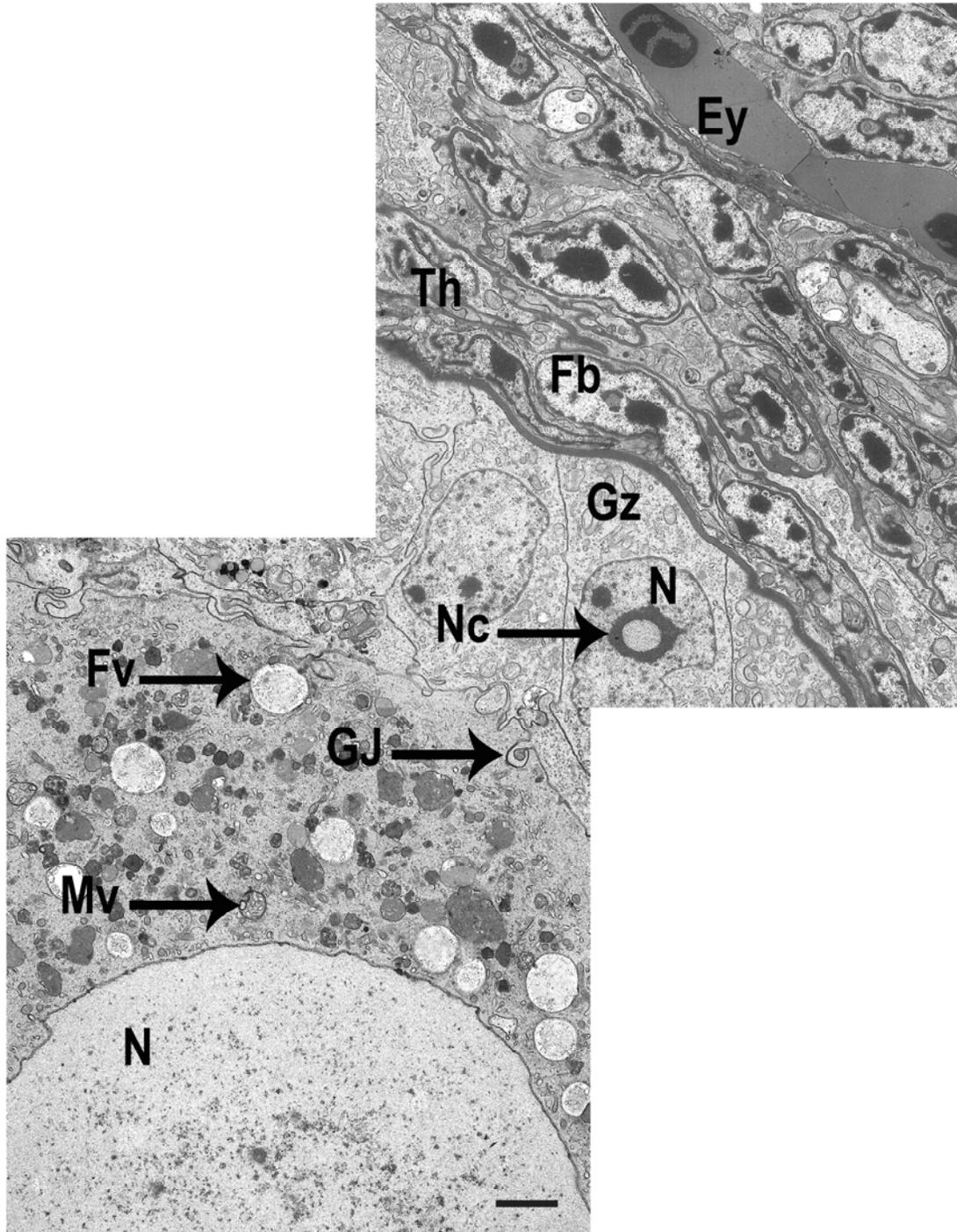


Bild 97 Ovar Wachtel, früher prävitelliner Follikel, TEM

SB = 2 µm

Der frühe prävitelline Follikel zeigt kubische bis hochprismatische Granulosazellen (Gz). Die apikalen Interdigitationen weisen oft Gap Junctions (GJ) auf. Das Ooplasma enthält hauptsächlich Fettvakuolen (Fv), multivesikuläre Körperchen (Mv), sowie diverse weitere Vakuolen und Granula. Ey = Erythrozyt, Fb = Fibroblast, N = Nucleus; Nc = Nucleolus, Th = Thekaschicht

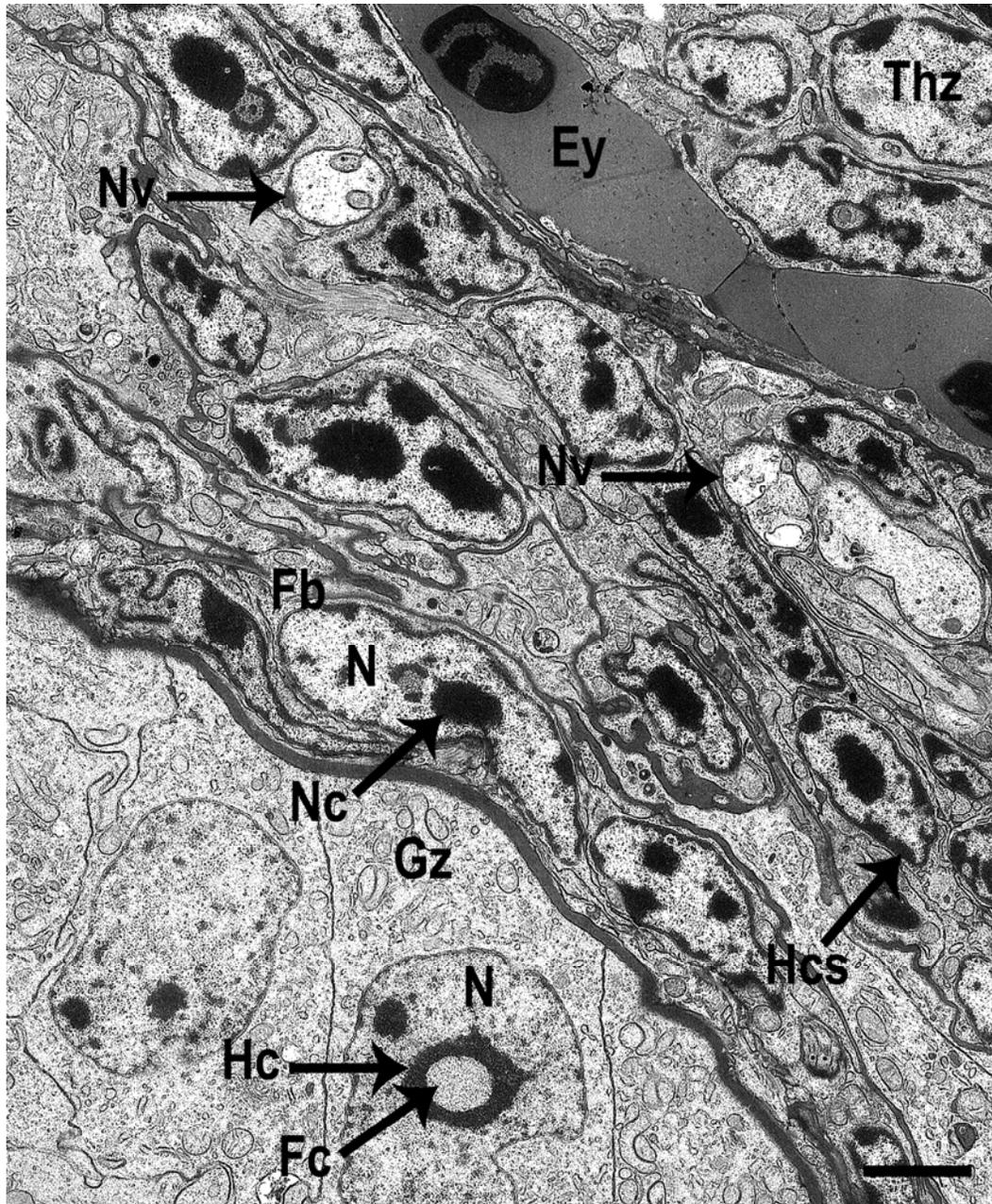


Bild 98 Ovar Wachtel, prävitelline Follikelwand, TEM

SB = 2 µm

Der Nucleolus des Kerns (N) einer Granulosazelle (Gz) zeigt ein helles, fibrilläres Zentrum (Fc). Die elektronendichte fibrilläre Schicht ist hier nicht eindeutig vom umgebenden Heterochromatin (Hc) abzugrenzen. Die Kerne (N) der Fibroblasten (Fb) in der Thekaschicht zeigen prominente Nucleoli (Nc), in ihren äußeren Bereichen ist zudem ein Heterochromatinsaum (Hcs) erkennbar. Bs = Basalmembran, Ey = Erythrozyt, Nv = Nerv, Thz = Thekazelle

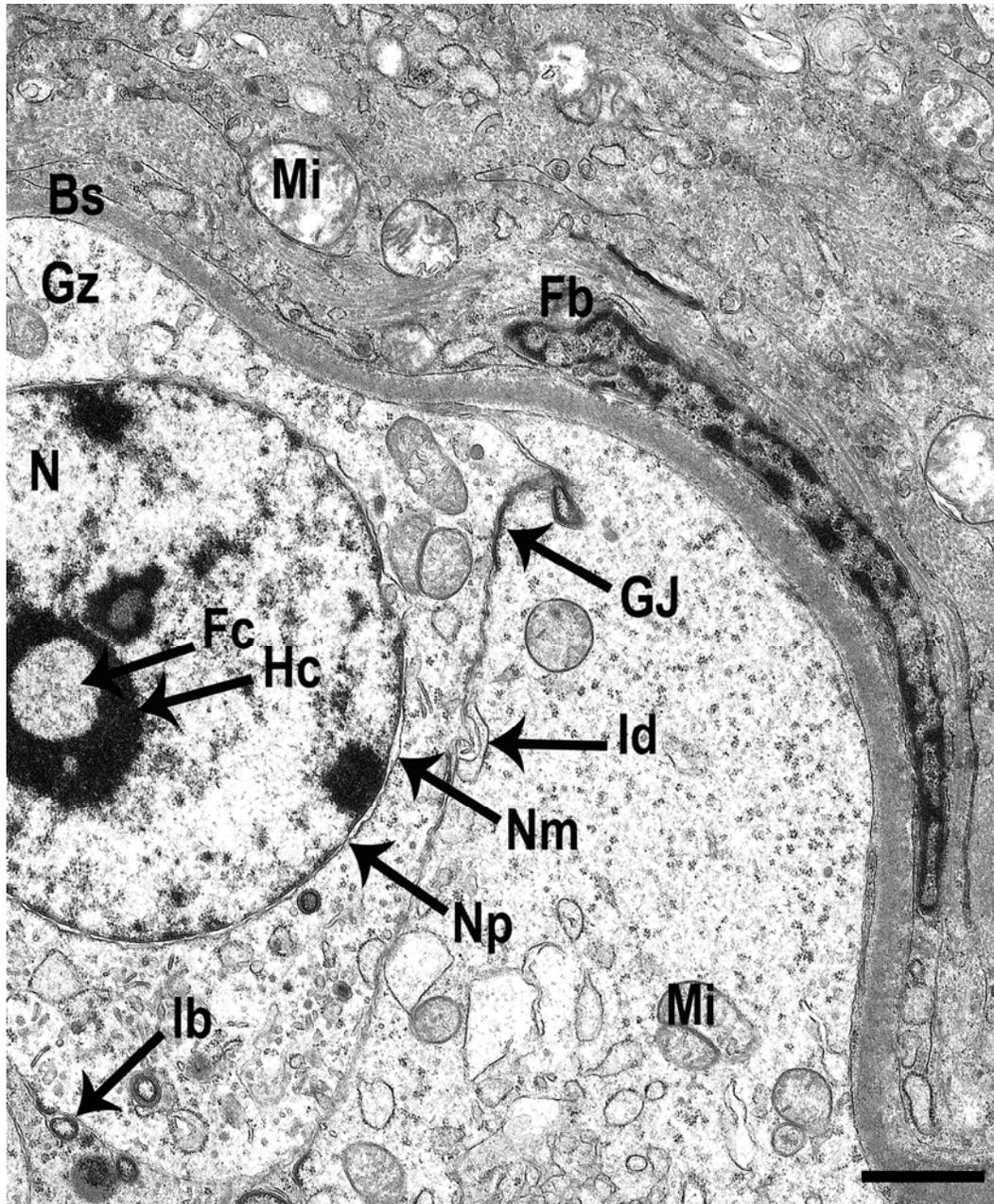


Bild 99 Ovar Wachtel, Granulosazellen im Detail, TEM

SB = 1 μ m

Im Zellkern (N) der Granulosazelle (Gz) sind neben dem Nucleolus, der ein fibrilläres Zentrum (Fc) und ihn umgebendes Heterochromatin (Hc) aufweist, noch weitere elektronendichte Heterochromatin-Bezirke zu erkennen. Der Kern (N) wird von einer doppelagigen Nuclearmembran (Nm) umgeben, die an manchen Stellen deutlich erkennbare Kernporen (Np) aufweist. Die laterale Zellwandverbindung enthält häufig Gap Junctions (GJ) und Interdigitationen (Id). Auch lining bodies (lb) sind häufig an der lateralen oder apikalen Zellmembran vorhanden. Bs = Basalmembran, Fb = Fibroblast, Mi = Mitochondrium

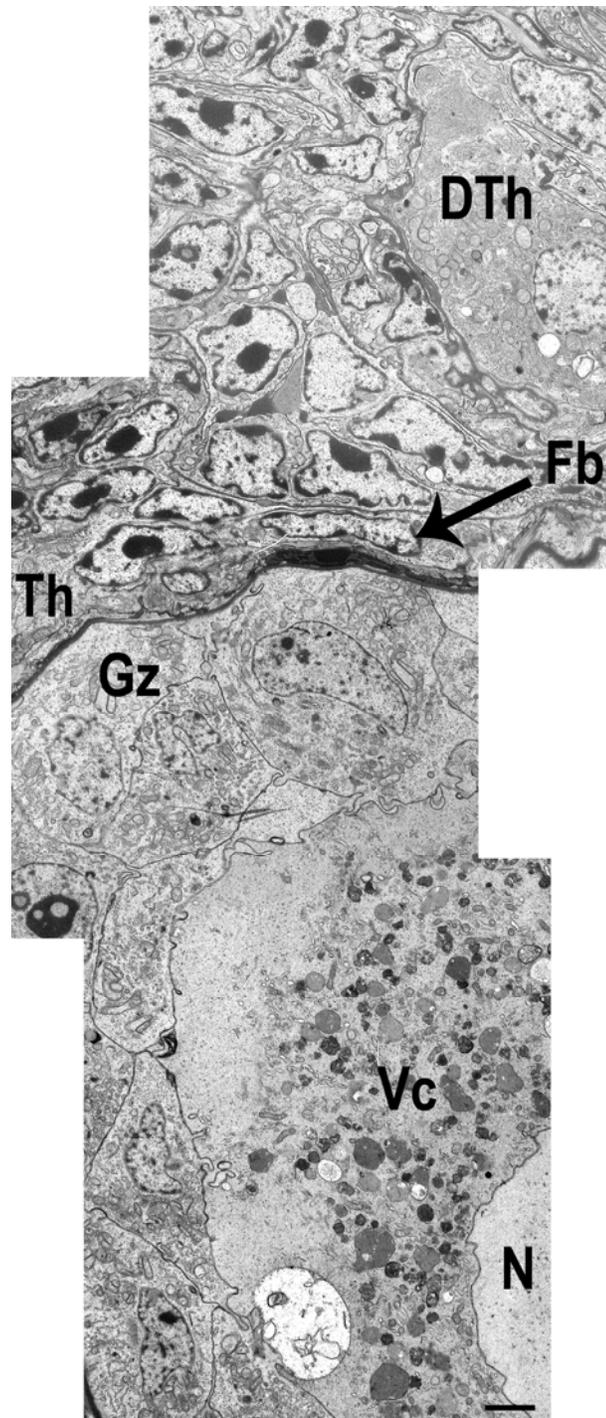


Bild 100 Ovar Wachtel, Übersicht sehr früher prävitelliner Follikel, TEM

SB = 2 μ m

Im Ooplasma liegen zahlreiche Vakuolen (Vc) und Organellen vor. Da sich der Follikel in beginnender Atresie befindet, ist in der Thekaschicht (Th) eine vakuolierte, differenzierte Thekazelle (DTh) zu erkennen.

Fb = Fibroblast, Gz = Granulosazelle, N = Nucleus

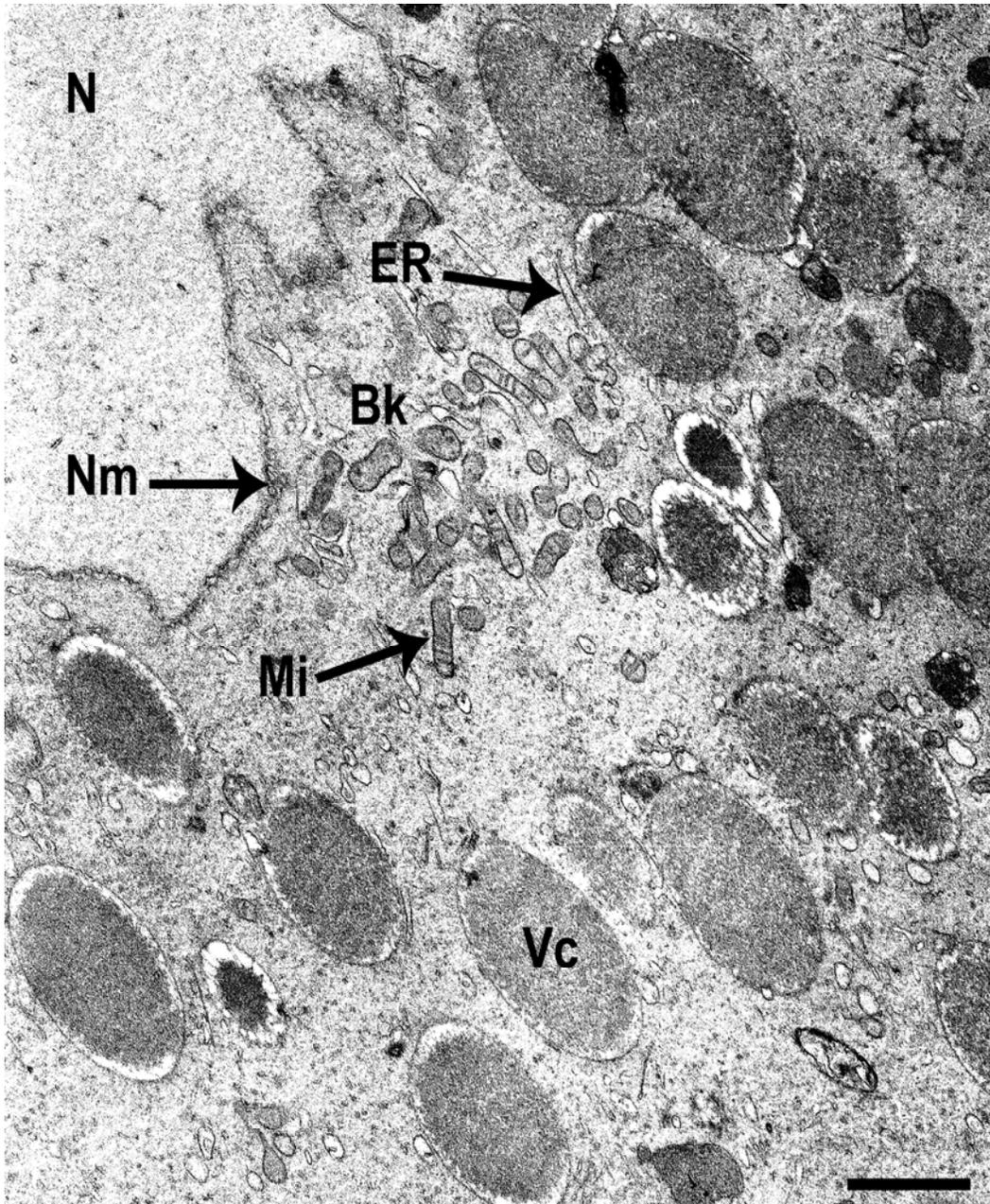


Bild 101 Ovar Wachtel, Balbiani-Körper, TEM

SB = 1 μm

Der Balbiani-Körper (Bk) der hauptsächlich bei Primordialfollikeln und frühen prävitellinen Follikeln vorkommt, stellt sich kernnah als dichte Ansammlung von Mitochondrien (Mi), rauem und glattem endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Vesikeln und weiterer Granula dar. Meist ist er außen von lipidhaltigen Vakuolen (Vc) umgeben. N = Nucleus, Nm = Nuclearmembran

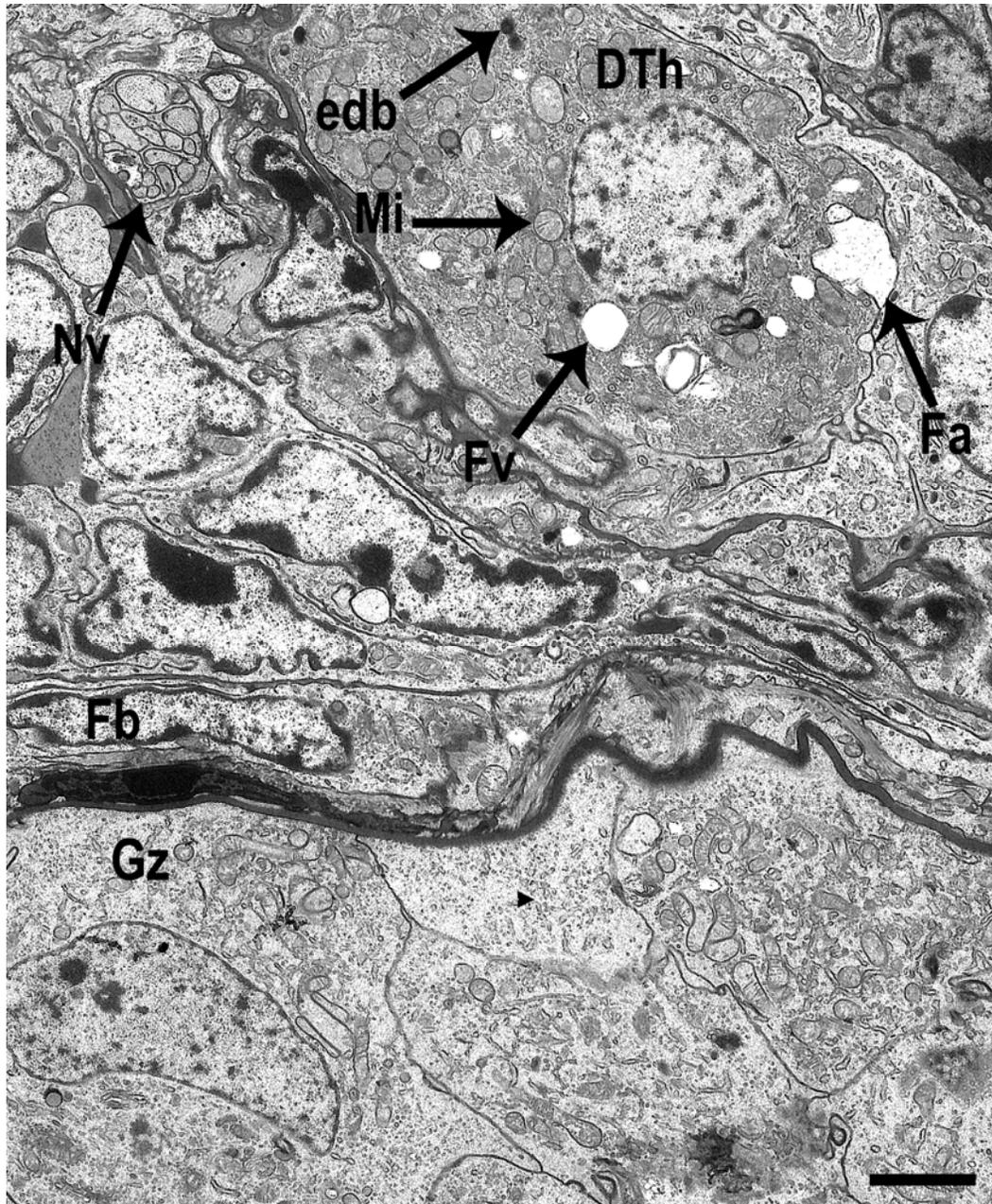


Bild 102 Ovar Wachtel, differenzierte Thekazelle, TEM

SB = 2 μ m

Die differenzierte Thekazelle (DTh) enthält neben zahlreichen großen Mitochondrien (Mi) Fettvakuolen (Fv) und größeren Bereichen von Fettansammlungen (Fa) zudem noch einige electron dense bodies (edb). In ihrer Nachbarschaft liegt ein markloser Nerv (Nv). Fb = Fibroblast, Gz = Granulosazelle

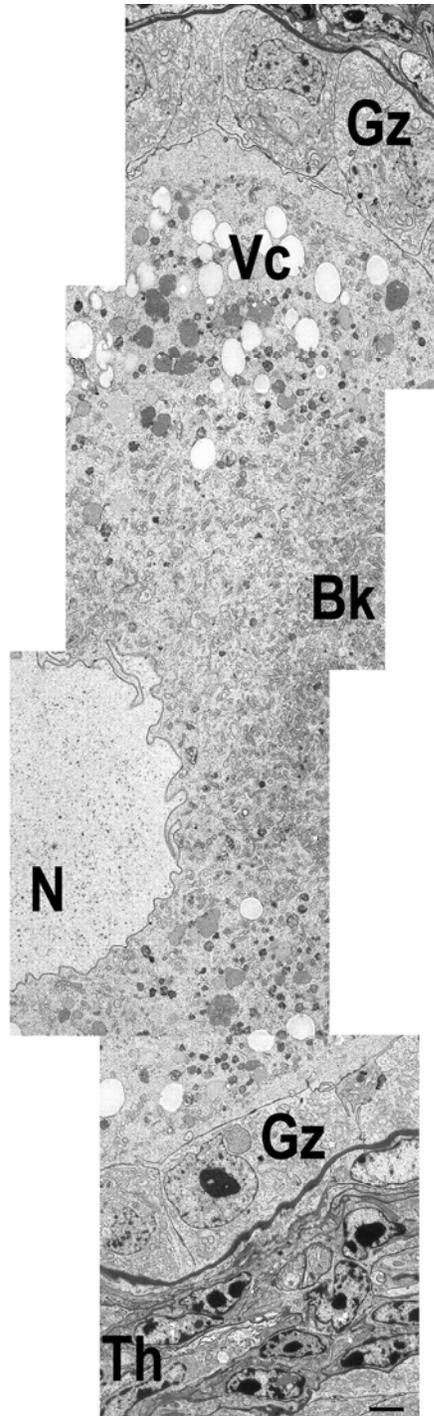


Bild 103 Ovar Wachtel, Übersicht prävitelliner Follikel, TEM

SB = 2 μm

Die großen Vakuolen (Vc) liegen bei diesem Follikel in den äußeren Bereichen des Ooplasmas. Außerdem bildet das Ooplasma Interdigitationen mit der Membran des Kerns (N). Bk = Balbiani-Körper, Gz = Granulosazelle, Th = Thekaschicht

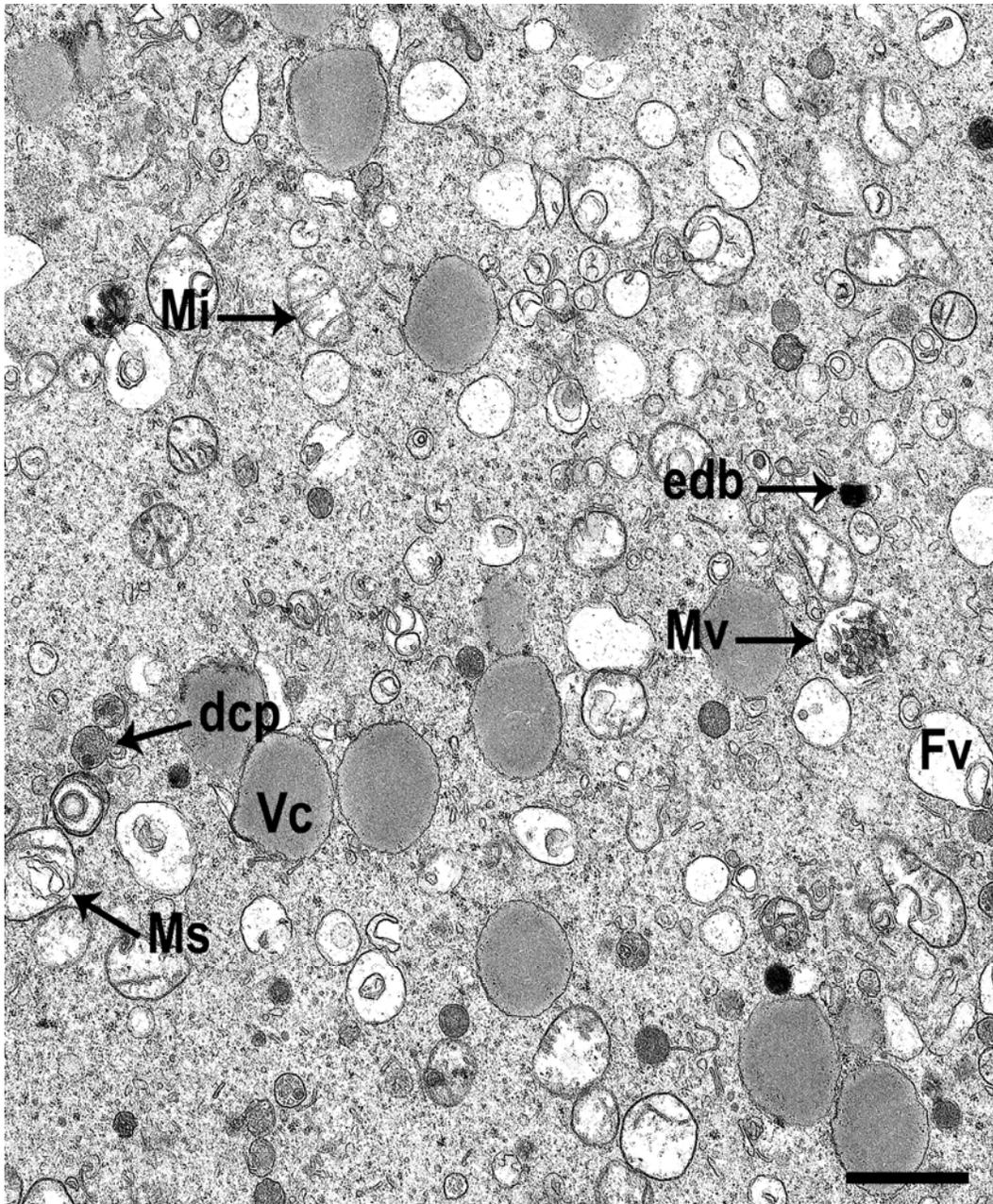


Bild 104 Ovar Wachtel, Ooplasmahalt prävitelliner Follikel, TEM

SB = 1 μ m

Das Ooplasma enthält neben zahlreichen Ribosomen, Golgi-Vesikeln, rauem und glattem endoplasmatischen Retikulum lipidhaltige Vakuolen (Vc), reine Fettvakuolen (Fv), Mitochondrien, (Mi), elektron dense bodies (edb), multivesikuläre Vakuolen (Mv), dense core particles (dcp) und Vakuolen, die Membranstapel enthalten (Ms), sowie verschiedene weitere Granula.

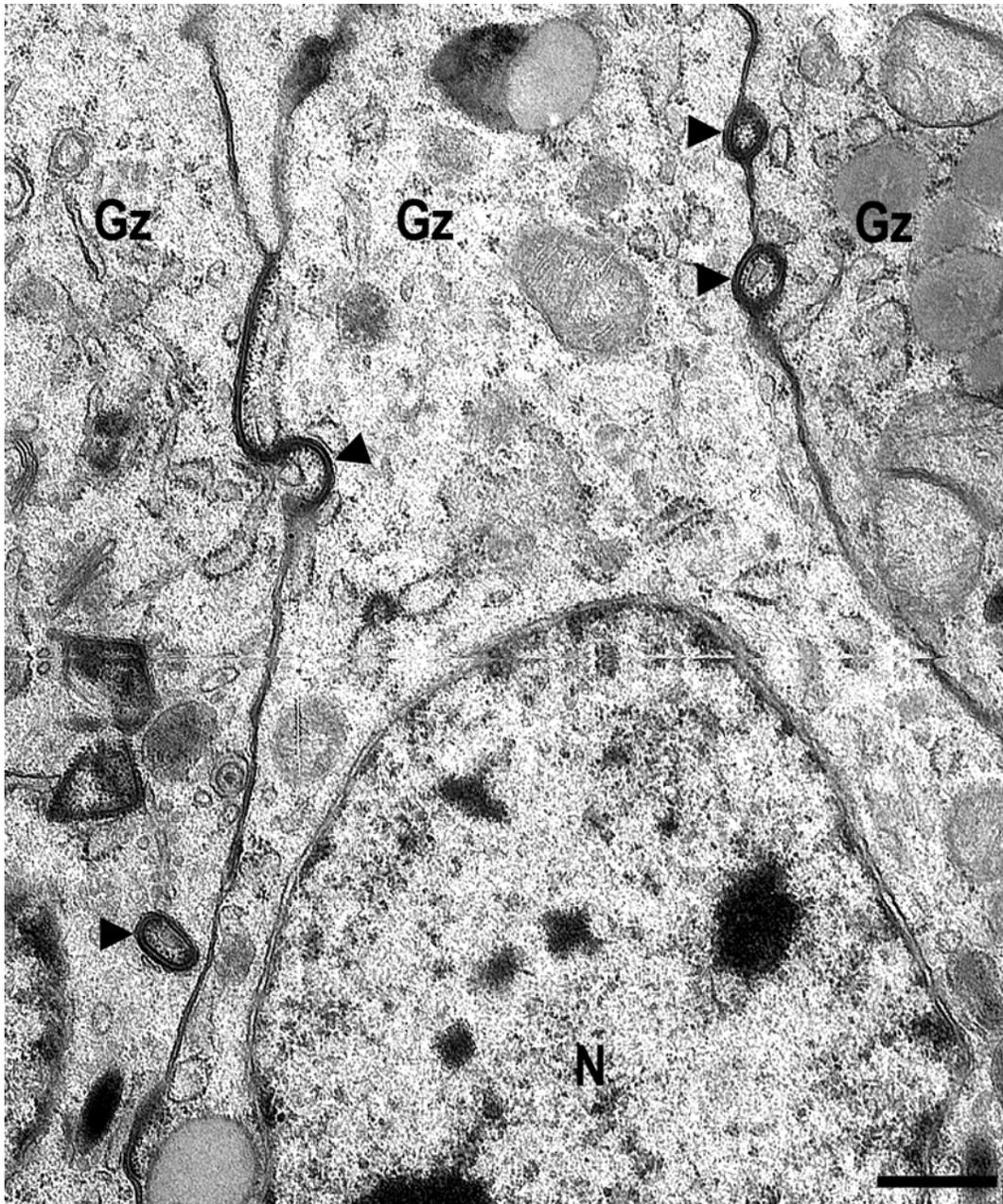


Bild 105 Ovar Wachtel, lining bodies an lateralen Zellmembranen, TEM

SB = 0,5 μ m

In den lateralen Wänden der Granulosazellen (Gz) befinden sich lining bodies (Pfeilspitzen), die auch Transosomen genannt werden. Sie sind häufig in Invaginationen der Membran zu finden (Pfeilspitze links). Die lining bodies enthalten in ihrer inneren Membran elektronendichte Granula, die Ribosomen ähneln. N = Nucleus

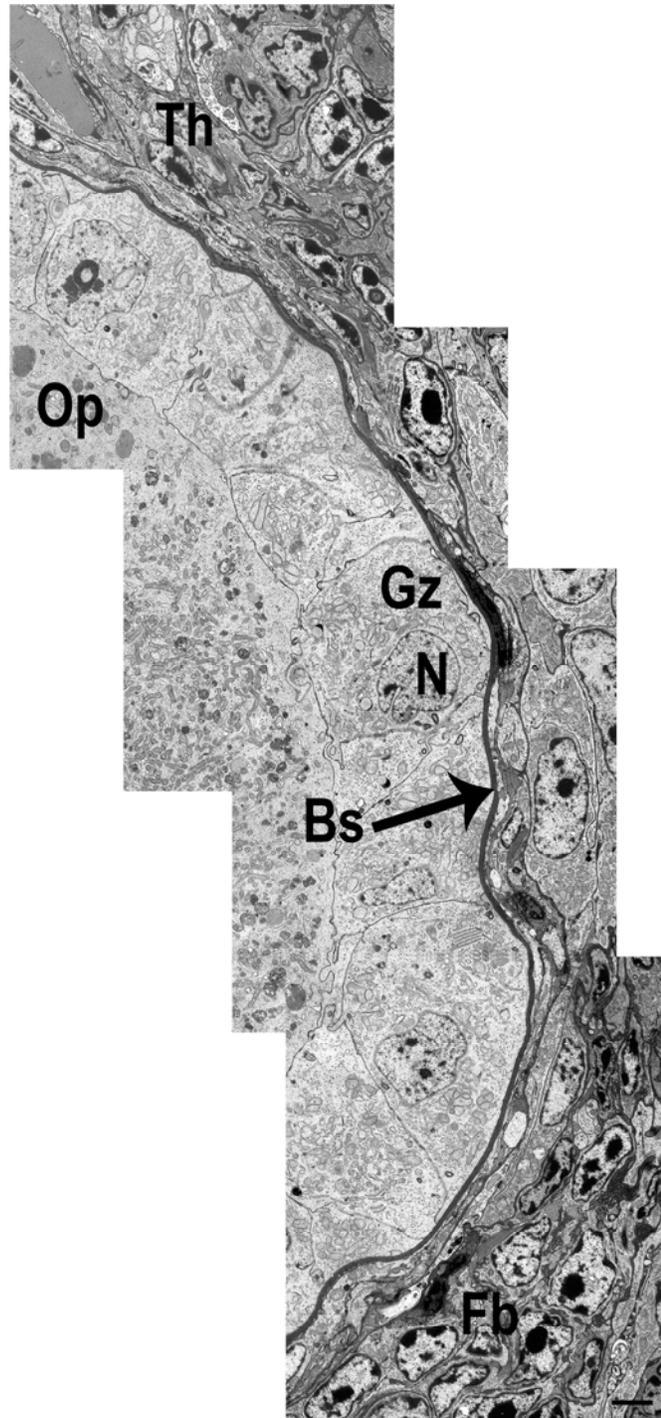


Bild 106 Ovar Wachtel, Übersicht früher prävitelliner Follikel, TEM

SB = 2 μm

In frühem Stadium der Atresie verformt sich die Basalmembran (Bs) und löst sich von der sie umgebenden Thekaschicht (Th) ab. Fb = Fibroblast, Gz = Granulosazelle, N = Nucleus, Op = Ooplasma

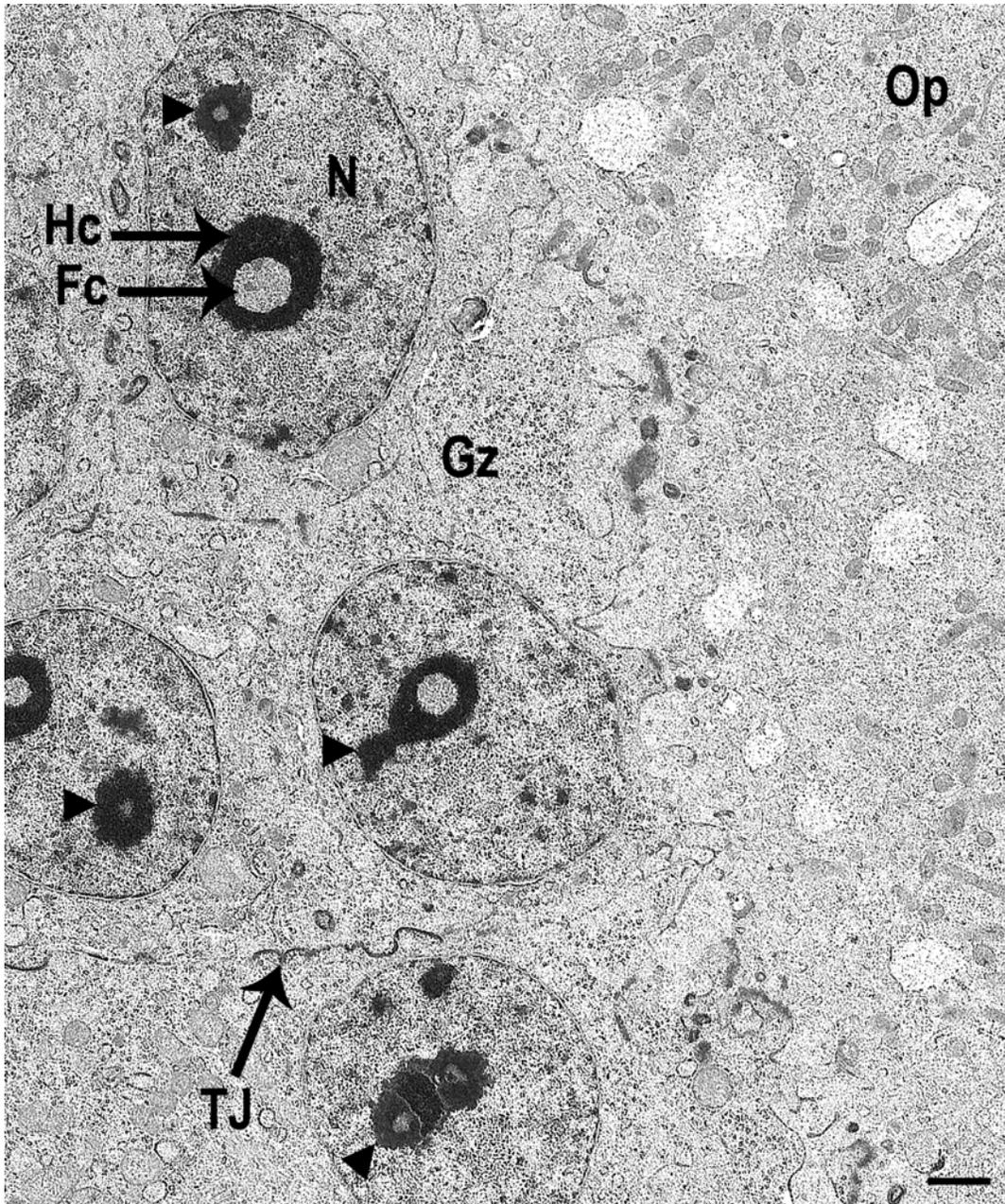


Bild 107 Ovar Wachtel, Kerne der Granulosazellen, TEM

SB = 1 μ m

Auffällig ist an den Nucleoli, dass sehr häufig eine größere Portion mit hellem, fibrillärem Zentrum (Fc) vorhanden ist und daneben eine kleinere (Pfeilspitzen). Diese kleineren Portionen enthalten ebenfalls einen hellen, zentralen Bereich. Als Zellmembranverbindungen sind Tight Junctions (TJ) zu erkennen.

Hc = Heterochromatin, Op = Ooplasma

4.5.2 Ultrastruktur der späten prävitellinen Follikel und der vitellinen Follikel.

Bilder von späten prävitellinen Follikel und vitellinen Follikeln befinden sich auf Seite 127 – 133. Die späten prävitellinen Follikel werden von hochprismatischen Granulosazellen umgeben. Oft sind Zellen mit hellem und dunklem Zytoplasma zu beobachten, wobei die helleren häufiger vorhanden sind. Außer den oben bereits beschriebenen Zellorganellen der Granulosazellen enthalten die „dunklen“ Formen zusätzlich elektronendichte Granula und Fett-Tröpfchen. Sie besitzen zudem tentakelförmige Zytoplasmafortsätze (Bild 109 und Bild 110).

Die apikalen zytoplasmatischen Fortsätze der Granulosazellen bilden mit der Ooplasmamembran die Zona radiata. Oft sind an den Spitzen dieser fingerförmigen Ausstülpungen lining bodies zu entdecken.

Das Glykoproteinmaterial der Perivitellinmembran ist als mäßig elektronendichte, amorphe Schicht in den apikalen Bereichen der Granulosazellen bzw. im extrazellulären Raum zu erkennen. Es ist auch im äußeren Bereich des Ooplasmas zu beobachten.

Das Ooplasma enthält Fett-Vakuolen, unterschiedlich geformte weitere Vakuolen mit einem mäßig bis stark elektronendichten Inhalt, Dottergranula, Mitochondrien, Golgi-Vesikel, lining bodies und raues endoplasmatisches Retikulum. Ein Balbiani-Körper ist nicht mehr identifizierbar.

Bei Oozyten unter 700 μm („Vor-Lampenbürsten-Stadium“) konnte im Ooplasma eine schmale Schicht von Fibrillen entdeckt werden, die das Ooplasma, das sich zwischen die Granulosazellen einstülpt, in das „Exoplasma“ und den unter ihr liegenden Bereich in das „Endoplasma“ aufteilt (Bild 108).

Die Thekaschicht, die von der gleichbleibend homogenen Basalmembran abgetrennt wird, teilt sich in eine Theka interna und Theka externa auf. Die Theka interna enthält hauptsächlich längliche, schmale Fibroblasten mit elongiertem Zellkern. Die Kerne enthalten prominente Nucleoli, die äußeren Zellkernbereiche zeigen meist einen deutlichen Heterochromatinsaum. Das Zytoplasma der Fibroblasten enthält Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Felder sowie gelegentlich auftretende Fettvakuolen. Zwischen den Fibroblasten liegen Bündel von Kollagenfibrillen, die sich bei Atresie als breite Areale zwischen den Fibroblasten ausdehnen (Bild 114). Als Zellmembranverbindungen können Tight Junctions entdeckt werden. Außerdem sind sowohl in der Theka interna als auch in der Theka externa undifferenzierte und differenzierte Thekazellen zu entdecken. Beide sind von ovaler Form und besitzen runde Kerne mit zwei Nucleoli, die kleiner sind als die der Fibroblasten. Die undifferenzierten Zellen weisen Mitochondrien, Golgi-Vesikel, raues endoplasmatisches Retikulum, aber weniger Zytoplasma auf. Die differenzierten Thekazellen liegen im Vergleich zu den Stromadrüsenzellen meist einzeln vor. Sie enthalten große Fettvakuolen- und Anhäufungen, zahlreiche Mitochondrien, Golgi-Vesikel, raues endoplasmatisches Retikulum und

zudem electron dense bodies (elektronendichte Körperchen) (Bild 102). In der Theka externa sind weiterhin Gefäße und marklose Nerven zu erkennen.

Atretische späte prävitelline Follikel zeigen proliferierte, vakuolisierte Granulosazellen mit teilweise vergrößerten Mitochondrien. Das Ooplasma enthält electron dense bodies, große Mitochondrien und ist unterschiedlich stark vakuolisiert. Zwischen den Zellen der Theka sind, wie oben erwähnt, verbreiterte Bereiche von Kollagenfibrillen zu erkennen (Bild 114).

Die Oozyten der vitellinen Follikel werden von einer Schicht flacher bis kubischer Granulosazellen umgeben. Mitochondrien, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Vesikel und verschiedene Vakuolen können in ihrem Zytoplasma entdeckt werden. Die apikalen Fortsätze scheinen insgesamt kürzer zu sein als in den prävitellinen Stadien. Die Häufigkeit des Vorkommens der lining bodies, vor allem in den lateralen Zellmembranen, nimmt ebenfalls ab.

Die Perivitellinmembran stellt sich als heteromorphe, mehrschichtige, mäßig elektronendichte Schicht zwischen den Fortsätzen der Granulosazellen und der Oozyte dar (Bild 112 und Bild 113).

Die Hauptinhalte des Ooplasmas sind neben anderen oben erwähnten Organellen hauptsächlich die sich dunkel darstellenden Dottergranula und die Dottervesikel.

Die Theka interna und die Theka externa verhalten sich ähnlich denen der prävitellinen Follikelstadien.

In atretischen Follikeln sind wiederum im Vergleich zu gesunden Follikelstadien electron dense bodies im Zytoplasma von Granulosazellen und Oozyte zu erkennen (Bild 111). Desweiteren differenzieren sich die Thekazellen zu den sogenannten „Thekadrüsenzellen“ oder differenzierten Thekazellen, deren Hauptmerkmal die Einlagerung von Fettvakuolen darstellt. Bei fortgeschrittener Atresie wandern Theka- und Granulosazellen in das Ooplasma ein und differenzieren sich dort zu „Stromadrüsenzellen“ (siehe 4.5.4. *Stroma*).

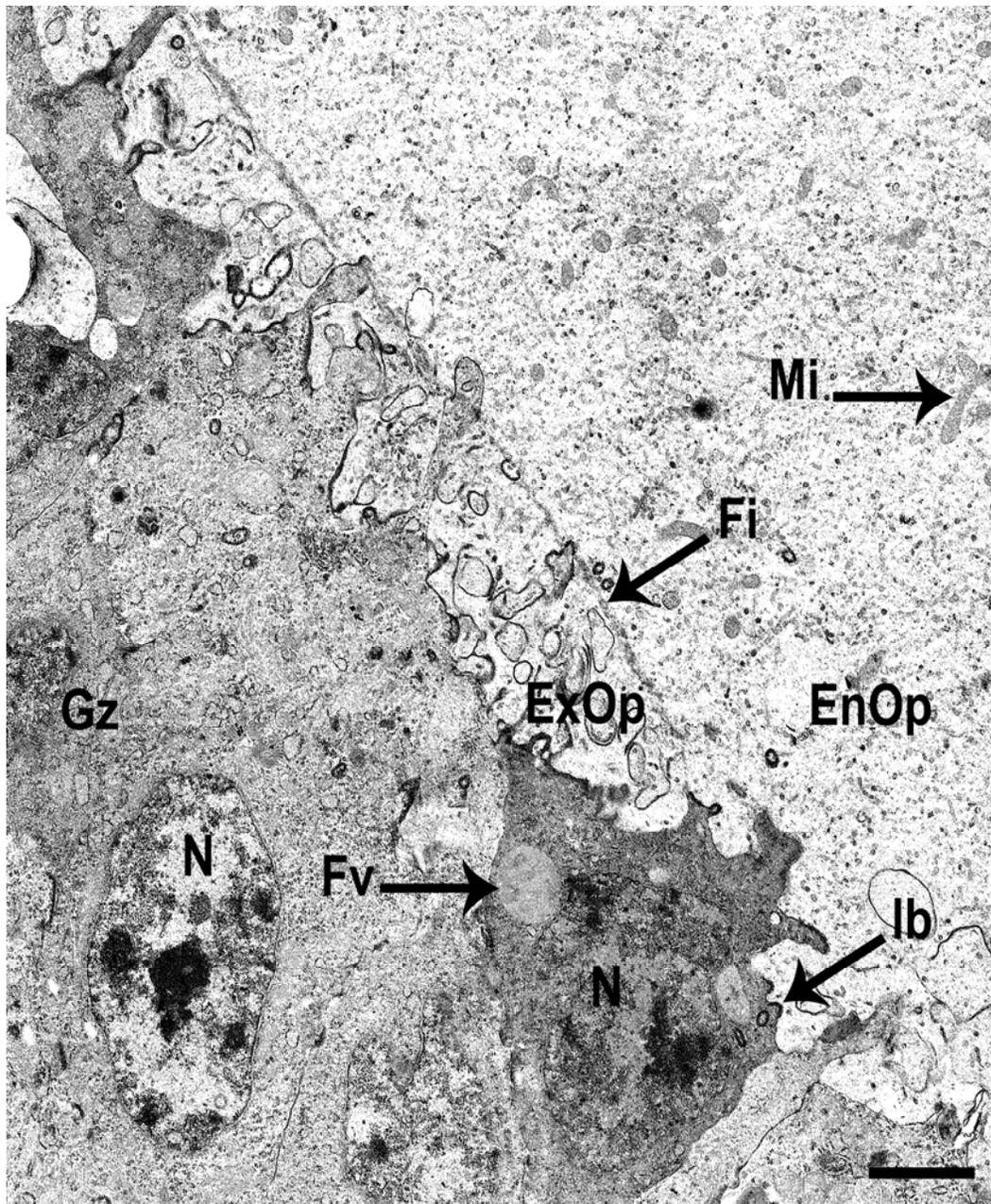


Bild 108 Ovar Wachtel, Filamente im Ooplasma, TEM

SB = 2 μ m

Die im Ooplasma liegenden Filamentstrukturen (Fi), die bei Follikeln unter 700 μ m auftreten, teilen dieses auf in das Exoplasma (ExOp) zwischen den Fortsätzen der Granulosazellen (Gz), und das Endoplasma (EnOp). Die apikalen Granulosazell-Fortsätze enthalten häufig lining bodies (lb). Mi = Mitochondrien, N = Nucleus

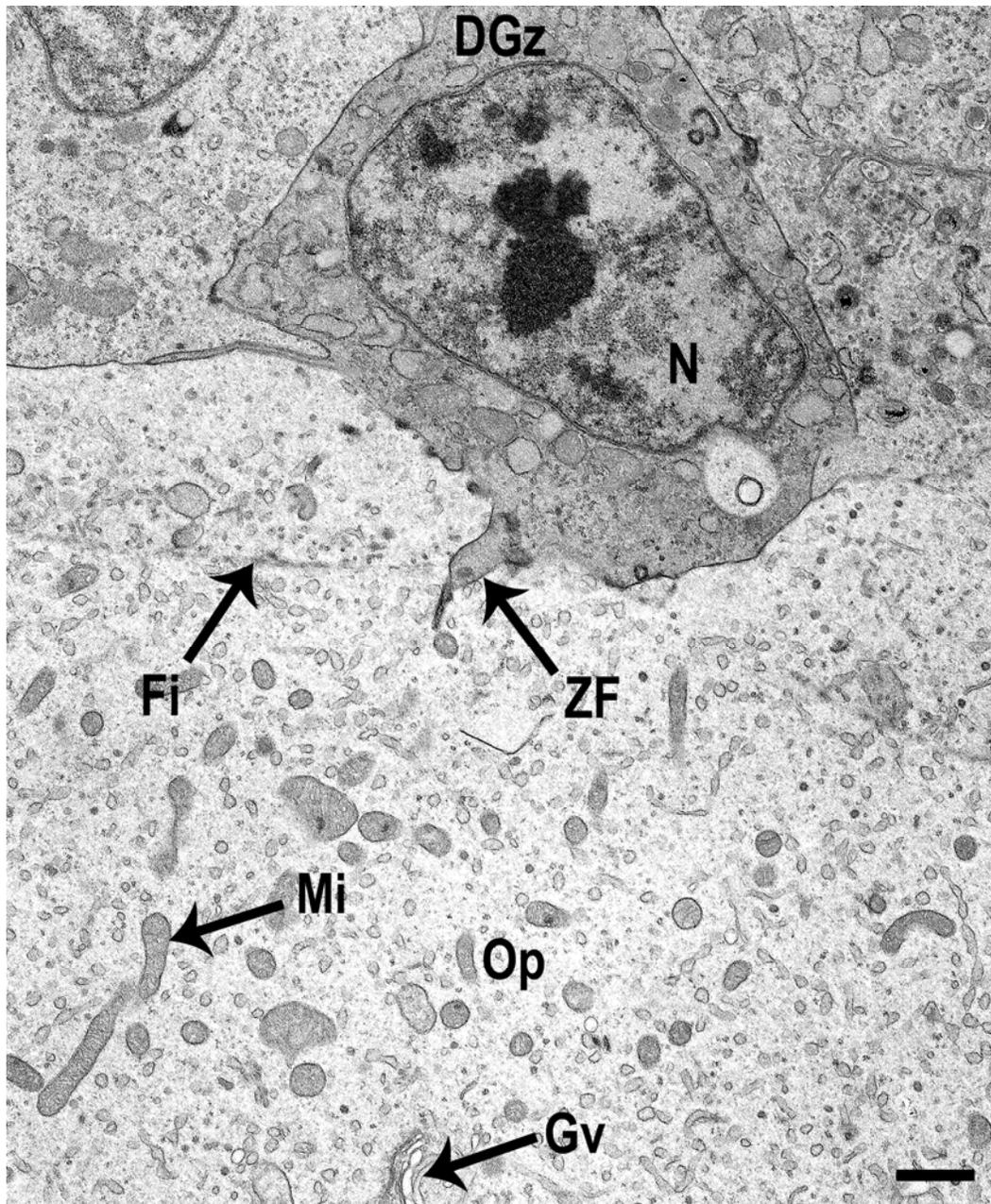


Bild 109 Ovar Wachtel, Granulosazelle mit dunklem Zytoplasma, TEM

SB = 1 μm

Diese "dunkle Granulosazelle" (DGz) weist ein deutlich elektronendichteres Zytoplasma als ihre Nachbarzellen auf. Ihre zytoplasmatischen Fortsätze (ZF) reichen bis in den Endoplasmabereich des Ooplasmas (Op) hinein, das durch eine schmale Schicht Filamente (Fi) begrenzt wird, bzw. verbinden sich mit der Membran der linken Nachbarzelle. Gv = Golgi-Vesikel, Mi = Mitochondrium, N = Nucleus

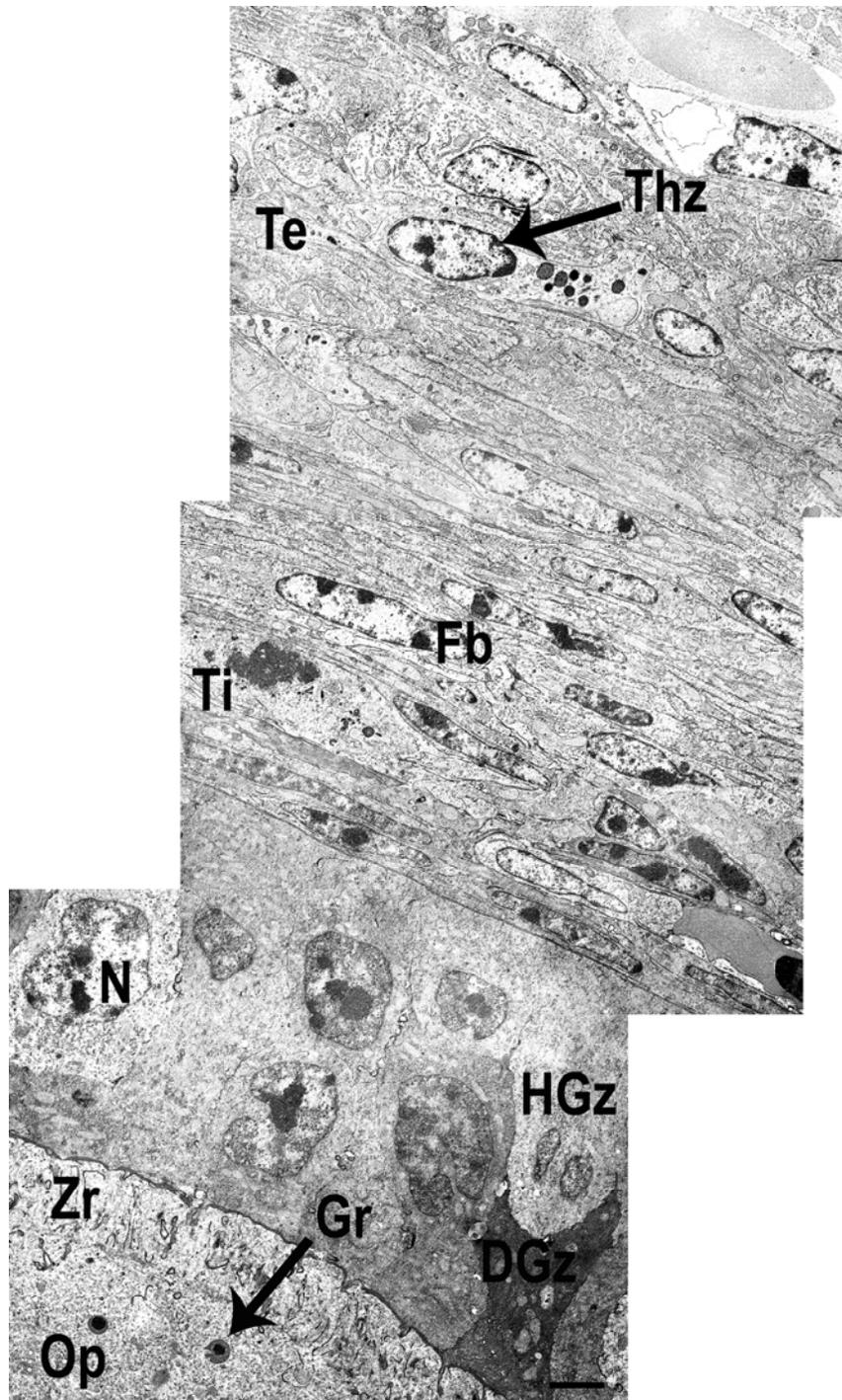


Bild 110 Ovar Wachtel, Wand eines prävitellinen Follikels, TEM

SB = 2 μ m

Die Granulosazellschicht enthält Zellen mit hellem (HGz) und dunklem (DGz) Zytoplasma. Die Granulosazelle mit dunklem Zytoplasma besitzt tentakelförmige zytoplasmatische Fortsätze, die sich mit den Membranen der Nachbarzellen und mit der Oozyte verbinden. Fb = Fibroblast, Gr = Granulum, N = Nucleus, Op = Ooplasm, Te = Theka externa, Th = Thekazelle, Ti = Theka interna, Zr = Zona radiata

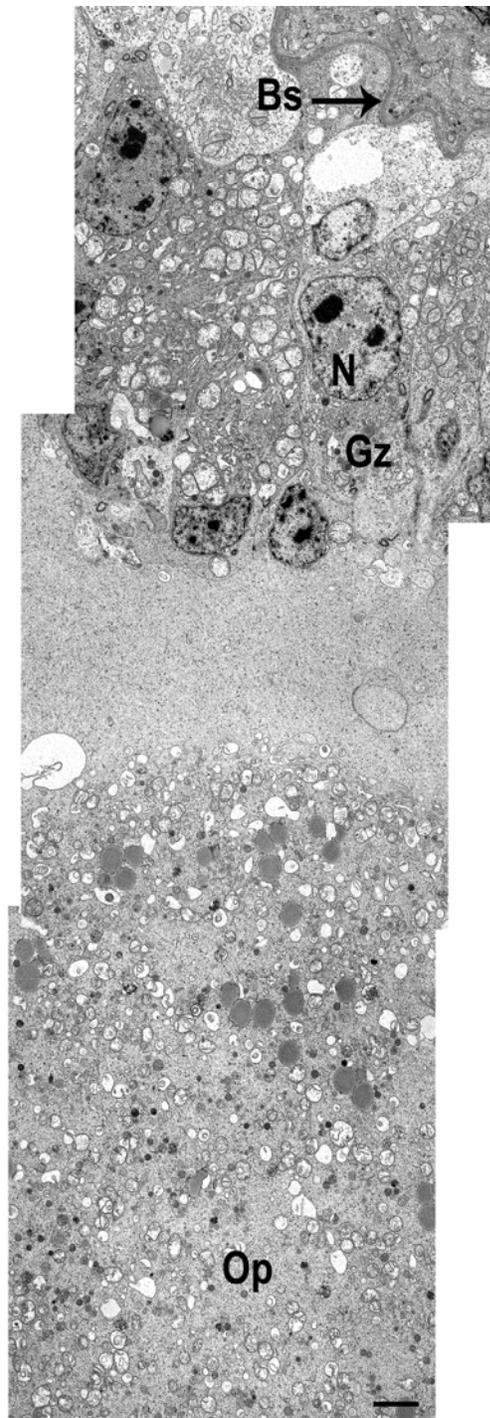


Bild 111 Ovar Wachtel, fortgeschrittene Atresie eines prävitellinen Follikels, TEM
SB = 2 μ m

Die Granulosazellen dieses atretischen Follikels unter einer deformierten Basalmembran (Bs) sind proliferiert und enthalten zahlreiche Mitochondrien, Fettvakuolen und electron dense bodies. Oft ist eine organellenfreie Zone zwischen organellenhaltigem Ooplasma (Op) und Granulozyten (Gz) zu beobachten. N = Nucleus

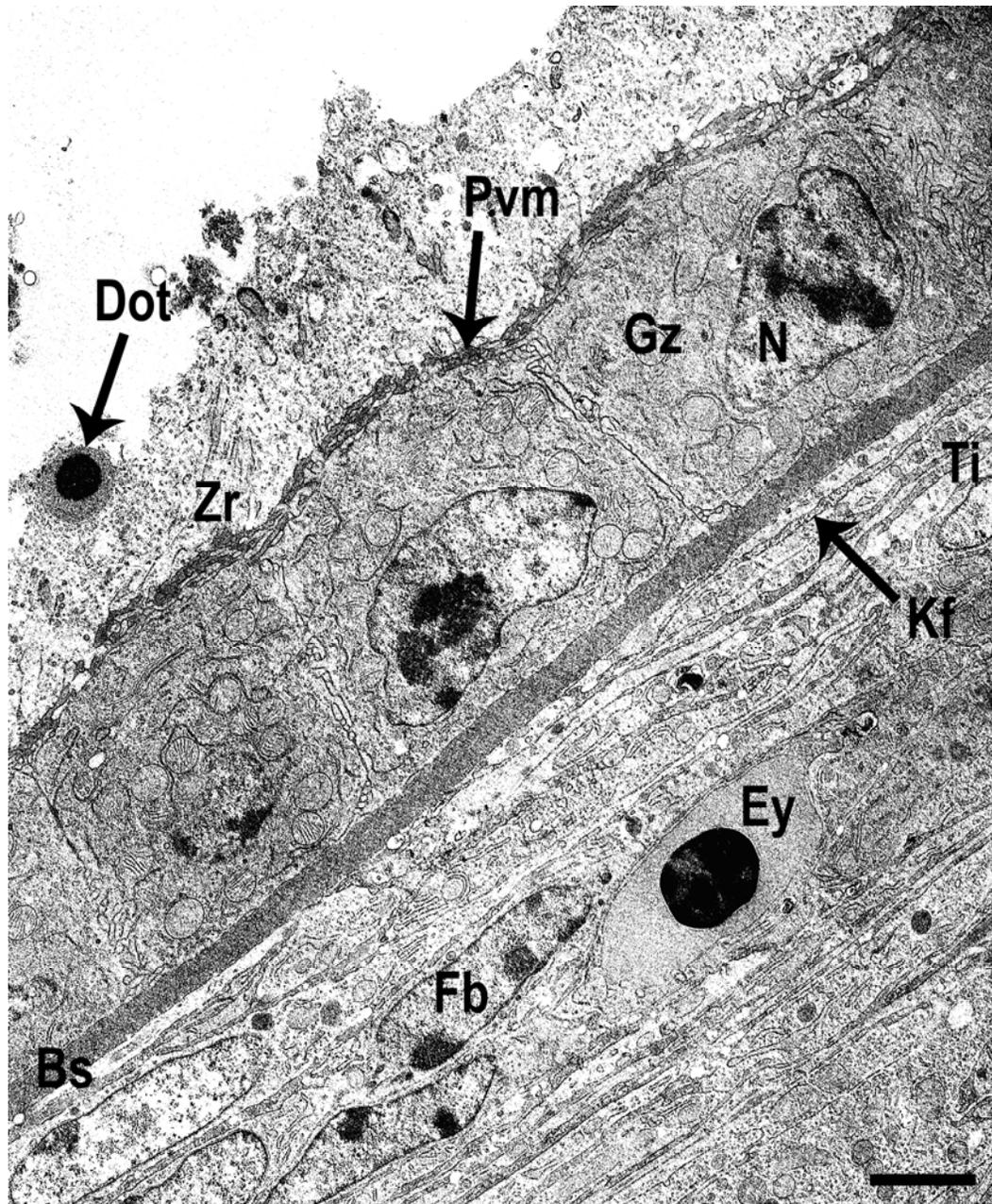


Bild 112 Ovar Wachtel, vitelline Follikelwand mit Perivitellinmembran, TEM

SB = 2 μ m

Die Perivitellinmembran (Pvm) ist als netzwerkartige Schicht unter den Granulosazellen (Gz) zu erkennen. Die Basalmembran (Bs) hat im Vergleich zu den prävitellinen Stadien an Breite zugenommen. Dot = Dotterpartikel, Ey = Erythrozyt, Fb = Fibroblast, Kf = Kollagenfibrille, N = Nucleus, Ti = Theka interna, Zr = Zona radiata

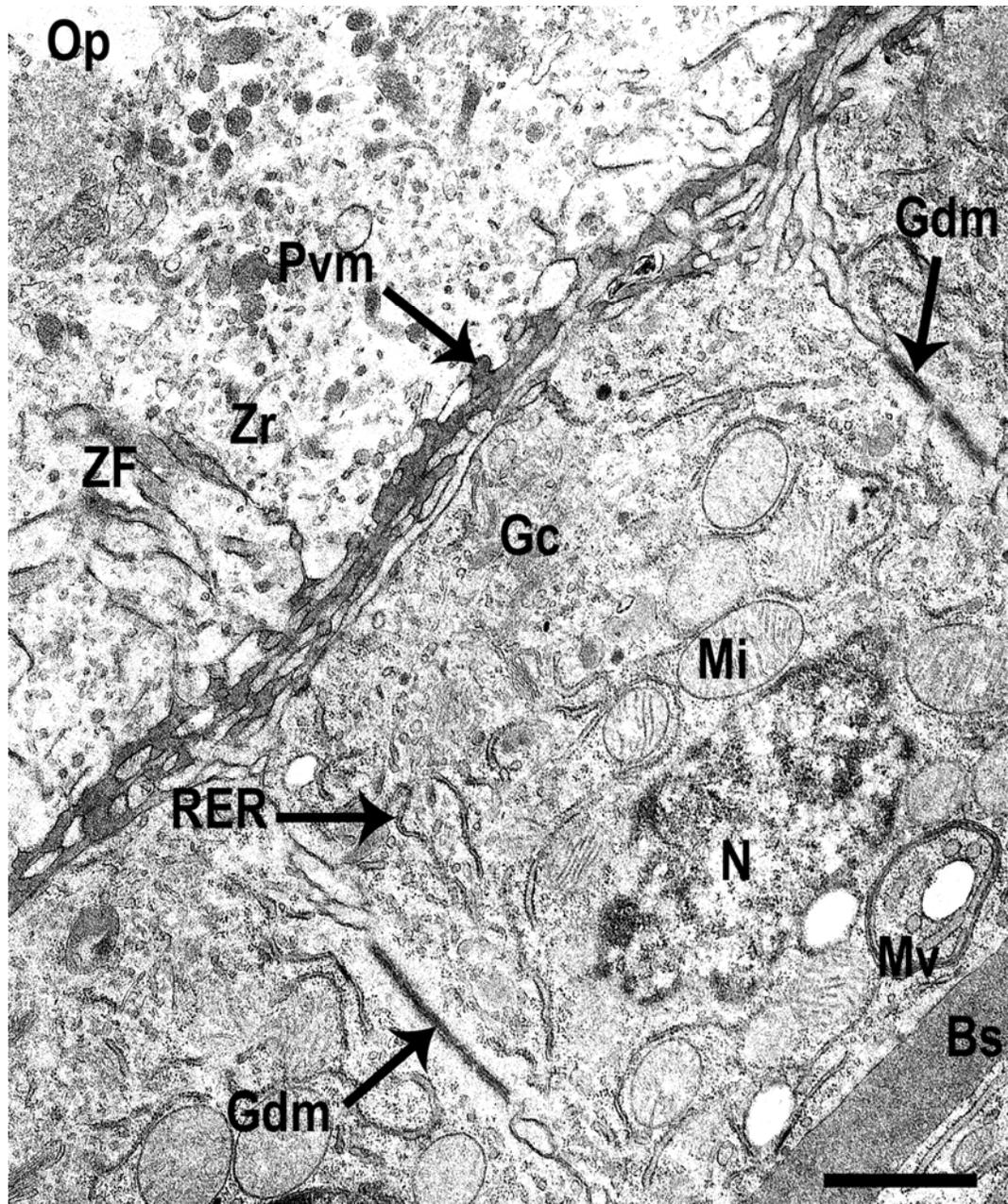


Bild 113 Ovar Wachtel, Granulosazellen mit Perivitellinmembran, TEM

SB = 1 μ m

Die Perivitellinmembran (Pvm) liegt als netzartige Struktur zwischen den zytoplasmatischen Fortsätzen (ZF) der Granulosazellen in der Zona radiata (Zr) ein. Bs = Basalmembran, Gdm = Gürteldesmosom, Gc = Golgi-Cisternae, Mi = Mitochondrium, Mv = Multivesikuläre Vakuole, N = Nucleus, Op = Ooplasm, RER = Raues endoplasmatisches Retikulum

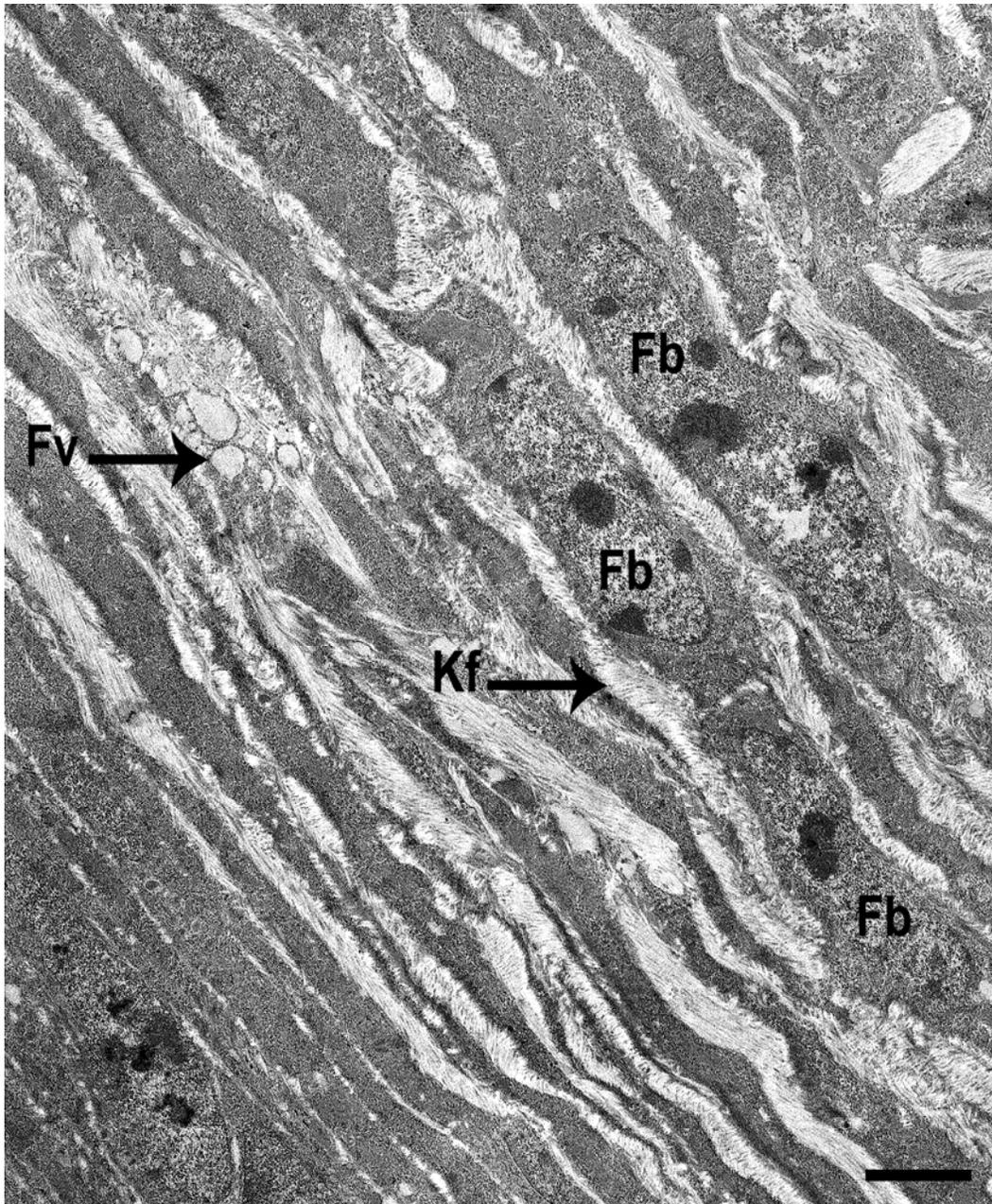


Bild 114 Ovar Wachtel, Theka externa eines atretischen vitellinen Follikels, TEM

SB = 2 μ m

Durch die atretisch bedingte Verbreiterung der Kollagenfaserbündel zwischen den Fibroblasten (Fb) und den Thekazellen lassen sich die einzelnen Kollagenfibrillen (Kf) gut darstellen. Das Zytoplasma der Fibroblasten enthält zudem einige Fettvakuolen (Fv).

4.5.3 Ultrastruktur des Keimdrüsenepithels

Bilder vom Keimdrüsenepithel befinden sich auf den Seiten 135 – 137.

Das Keimdrüsenepithel umgibt als Schicht kubischer Zellen das Ovar von außen. Das Zytoplasma der Keimdrüsenepithelzellen ist im Vergleich zu den benachbarten Thekazellen und Fibroblasten heller (Bild 116). Als laterale Zellverbindungen können Fleck- und Gürteldesmosomen entdeckt werden, sowie zytoplasmatische Interdigitationen (Bild 117). Das Zytoplasma enthält große Mitochondrien, Golgi-Vesikel, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, einige elektron dense bodies und dense core particles, sowie mitunter Fettvakuolen. Die Zellkerne sind oval und besitzen gelegentlich kurze Ausstülpungen. Es treten meist zwei prominente Nucleoli in Erscheinung, oft mit hellem, fibrillärem Zentrum. Ansonsten liegen im Kern weitere heterochromatische Bezirke, die an verschiedenen Stellen lokalisiert sein können. Ein schmaler Heterochromatinsaum liegt direkt unter der Kernmembran.

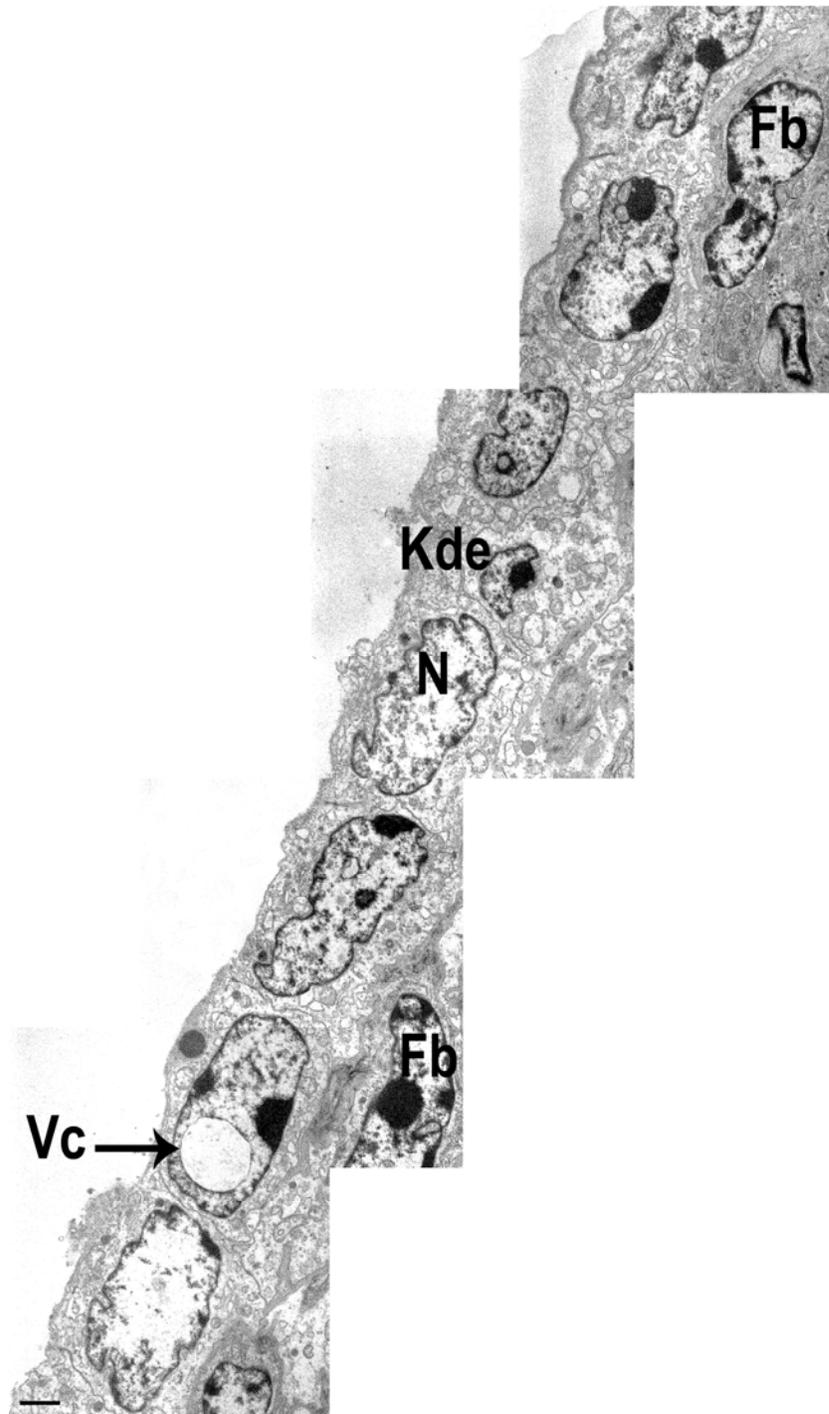


Bild 115 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, TEM

SB = 1 μ m

Die Zellen des Keimdrüsenepithels (Kde) besitzen kubische Form. Ihre Zellkerne (N) sind oval und weisen gelegentlich Ausstülpungen auf. Ein Zellkern enthält eine umschlossene Vakuole (Vc) im Nucleoplasma.
Fb = Fibroblast

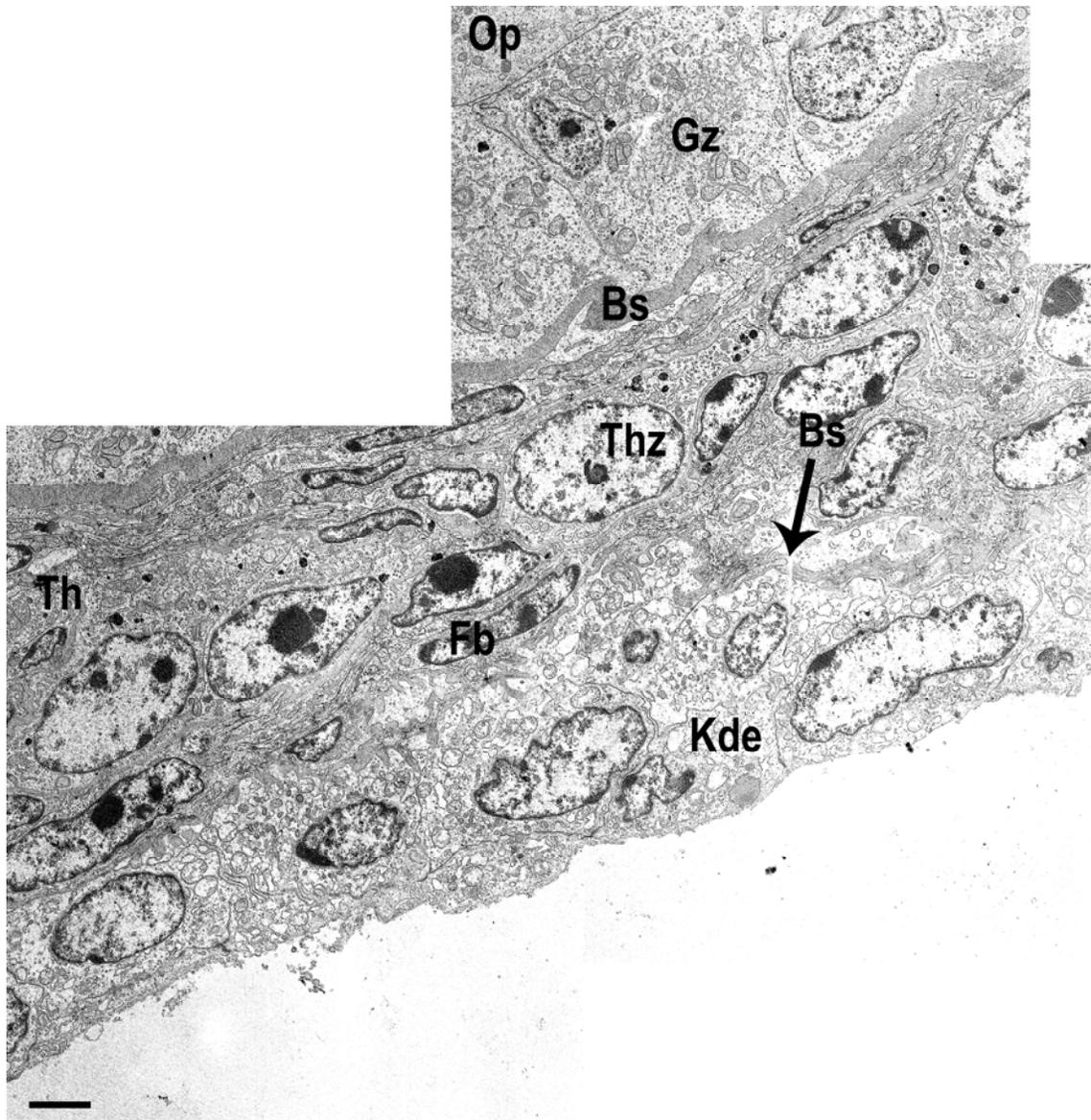


Bild 116 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel und Theka, TEM

SB = 2 μ m

Die Zellen des Keimdrüsenepithels (KDE) weisen im Vergleich zu den Thekazellen (Thz) und Fibroblasten (Fb) ein helleres und organellenreicheres Zytoplasma auf. Bs = Basalmembran, Gz = Granulosazelle, Op = Ooplasma, Th = Thekaschicht

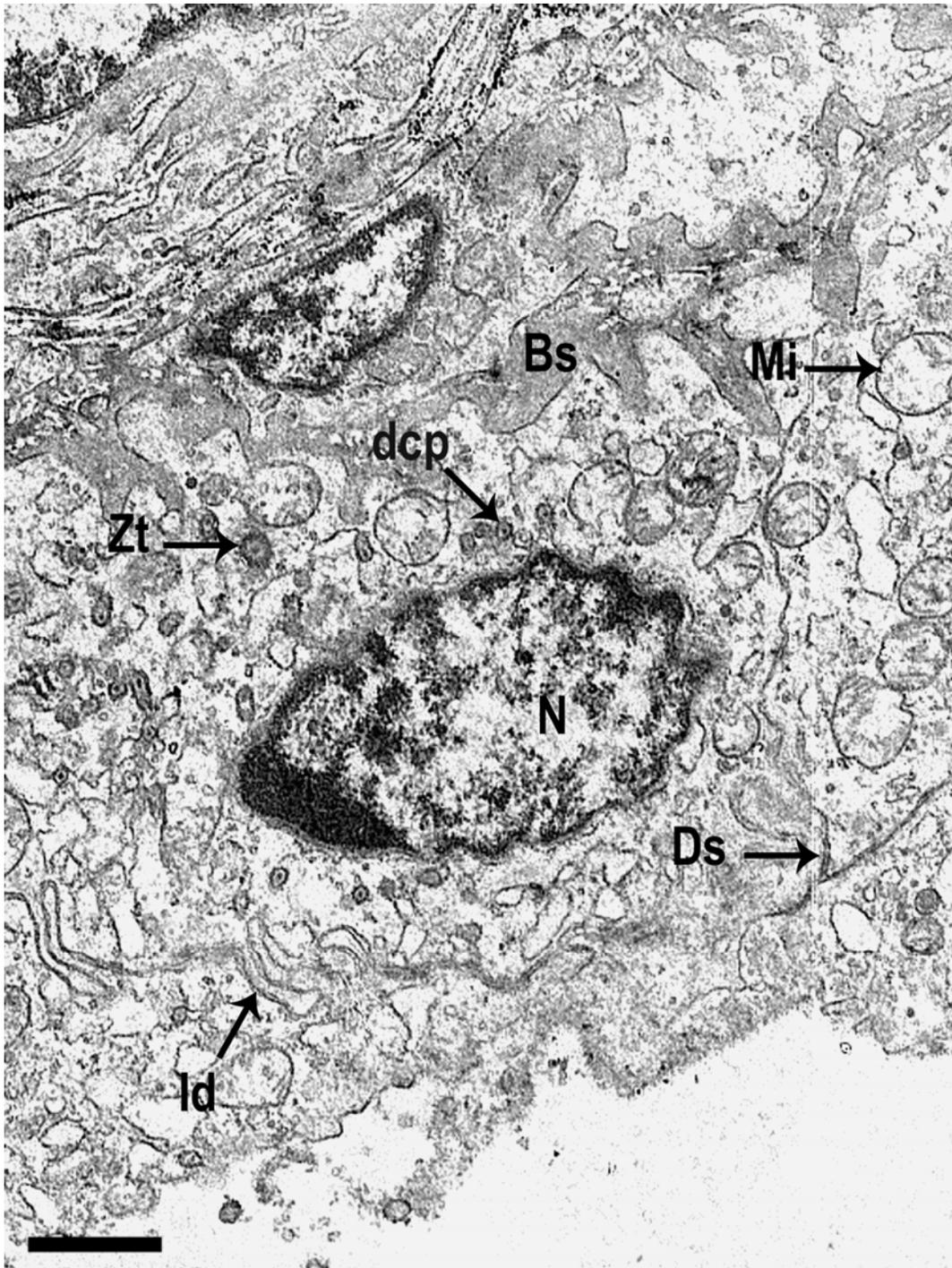


Bild 117 Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithelzelle vergrößert, TEM

SB = 1 μ m

Das Zytoplasma dieser Keimdrüsenzelle weist Interdigitationen (Id) mit den Nachbarzellen auf, desweiteren sind sie durch Desmosomen (Ds) miteinander verbunden. Die Basalmembran (Bs) des Keimdrüsenepithels weist eine homogene Graufärbung auf und stellt sich hier eingefaltet dar. dcp = dense core partikel, Mi = Mitochondrium, N = Nucleus, Zt = Zentriol

4.5.4 Ultrastruktur des weiteren Ovarstromas

Bilder vom Ovarstroma befinden sich auf den Seiten 139 –146.

Im Stroma des Ovars befinden sich undifferenzierte und differenzierte Stromadrüsenzellen, die sich zu Verbänden („Clustern“) zusammenlagern. Die differenzierten Stromadrüsenzellen besitzen im Vergleich zu den undifferenzierten Stadien (Bild 118) größere Zytoplasmabereiche und sind durch die Einlagerung von großen Fettvakuolen und electron dense bodies charakterisiert (Bild 119). Die Zellkerne sind oval und enthalten zwei Nucleoli. Diese zwei „Portionen“ scheinen jedoch kleiner zu sein als jene der Fibroblasten, die sehr groß sind und weite Bereiche des Nucleoplasmas ausfüllen. Als Verbindungen zwischen den Zellmembranen können Gap Junctions identifiziert werden. Die Drüsenverbände werden durch zarte Basallamina vom umgebenden Stroma abgetrennt.

Ultrastrukturell kann zwischen den Fibroblasten des Stromas der Verlauf der Kollagenfibrillen gut verfolgt werden (Bild 120 und Bild 121). Bei Atresie sind sie im Bereich um den untergehenden Follikel zahlreicher, hier besonders in der Theka externa. Gelegentlich enthält das Zytoplasma der Fibroblasten zudem Fettvakuolen (Bild 114).

Blutzellen können in Blutgefäßen unterschiedlichen Kalibers beobachtet werden. Weiterhin können längliche Erythrozyten mit zentralem, dunklem, rund-ovalen Kern und verschiedene Formen der Leukozyten (pseudoeosinophile Granulozyten, Lymphozyten) intravasal identifiziert werden (Bild 122 und Bild 123). Als freie Zellen können im Stroma pseudoeosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen beobachtet werden (Bild 124 und Bild 125).

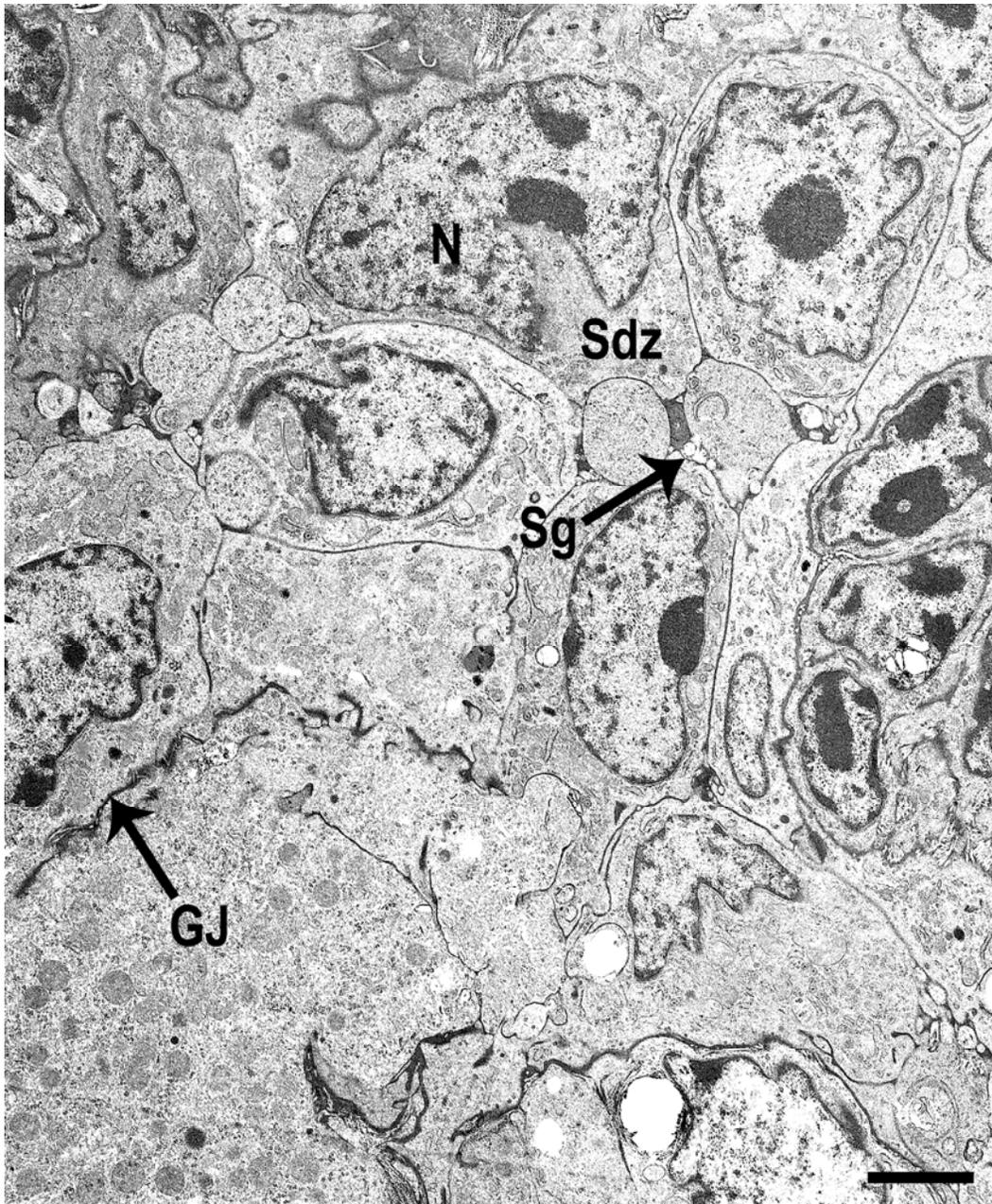


Bild 118 Undifferenzierter Stromadrüsenzellverband, TEM

SB = 2 μ m

Die Stromadrüsenzellen (Sdz) liegen in Clustern vor. Ihre Membranen sind durch Gap Junctions (GJ) verbunden. Das Zytoplasma zeigt einige blasenförmigen Ausstülpungen. In ihrer Mitte sind zudem sekretorische Granula (Sg) zu entdecken. N = Nucleus

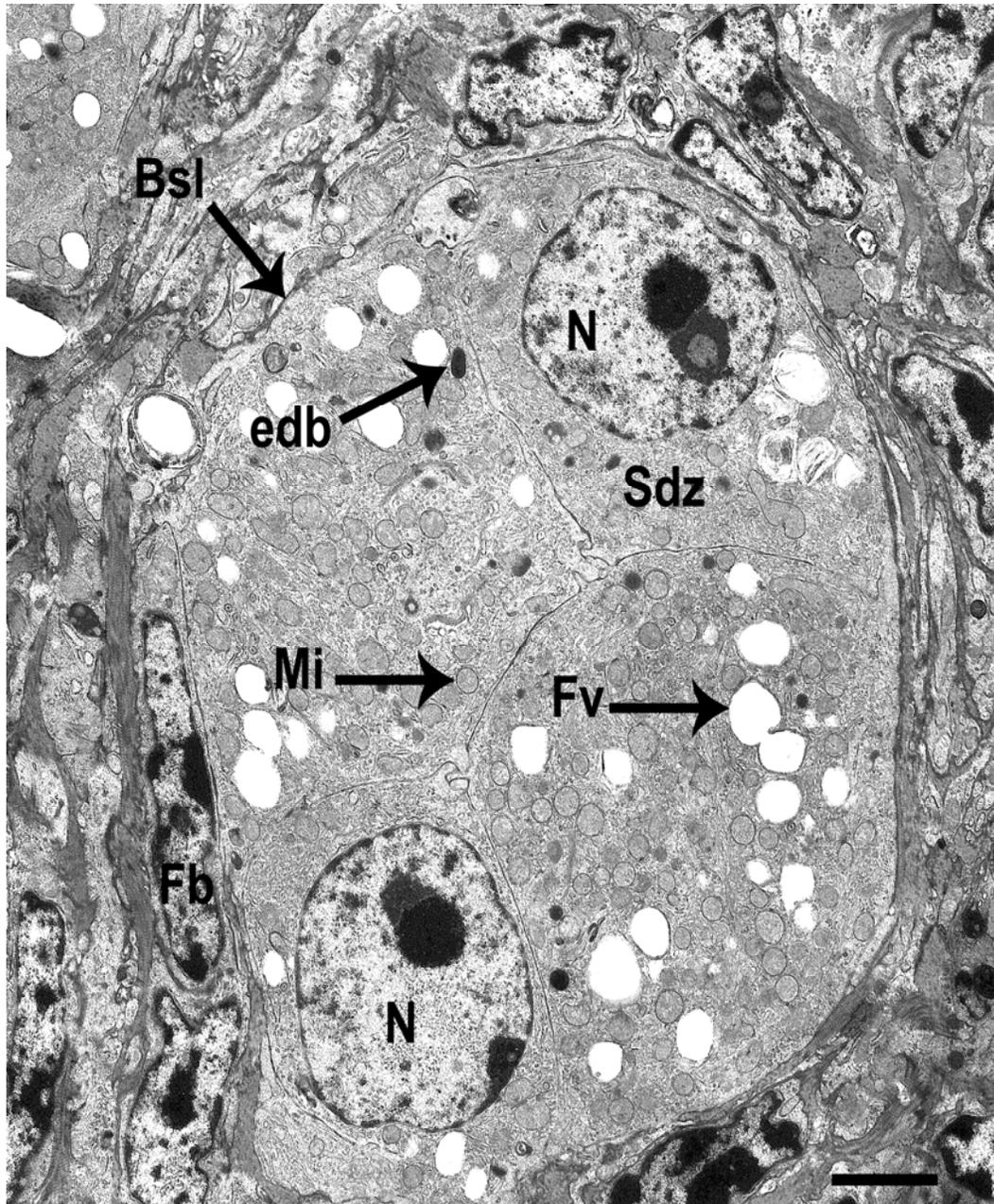


Bild 119 Differenzierter Stromadrüsenzellverband, TEM

SB = 2 μ m

Die Zellmembranen der differenzierten Stromadrüsenzellen (Sdz) zeigen Interdigitationen. Das Zytoplasma weist neben zahlreichen großen Mitochondrien (Mi) Fettvakuolen (Fv) und electron dense bodies (edb) auf. Die zwei Nucleoli der runden Zellkerne (N) zeigen die typischen Unterschiede in ihrer Elektronendichte. Bsl = Basallamina, Fb = Fibroblast

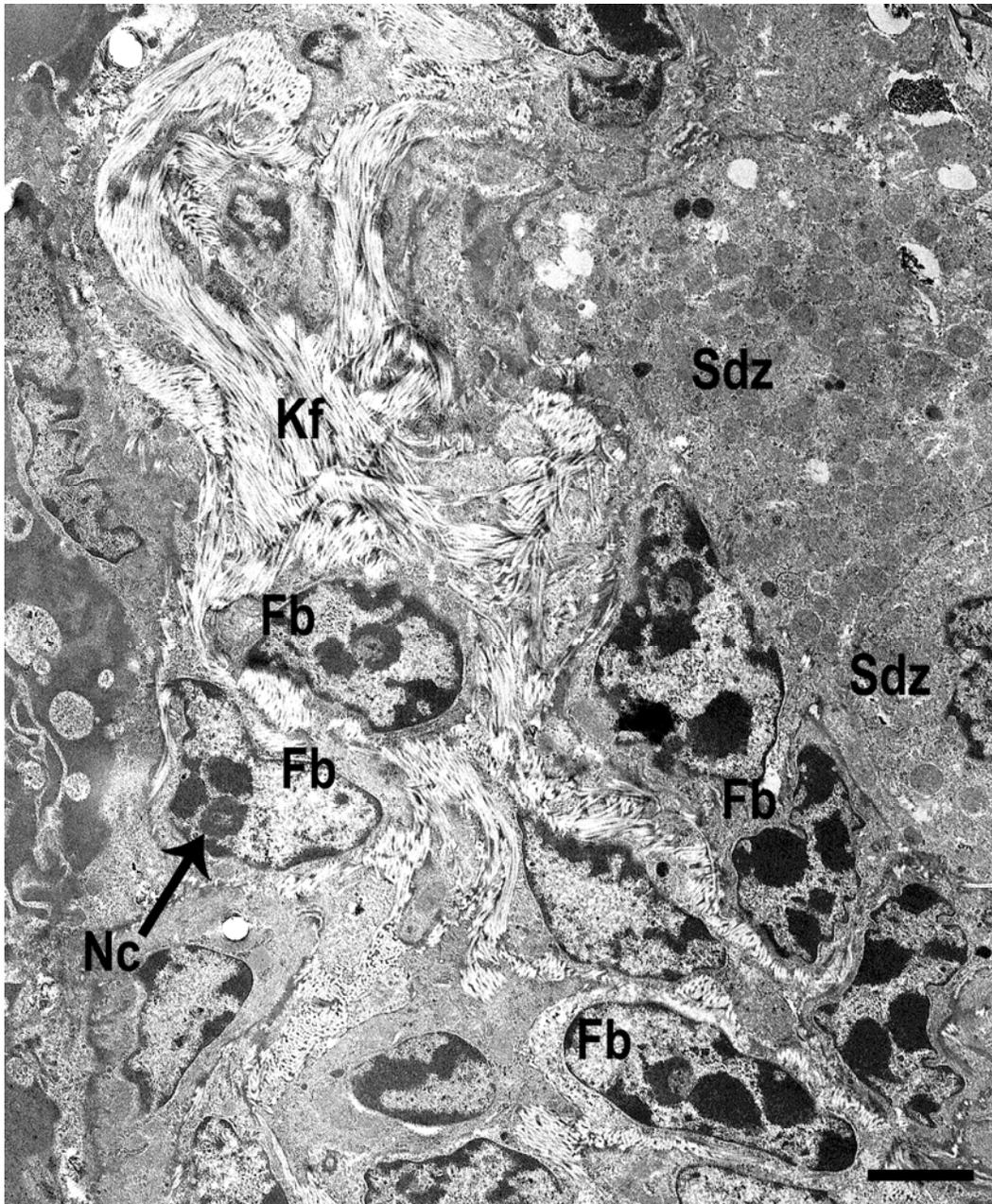


Bild 120 Fibroblasten und Kollagenfibrillen im Stroma, TEM

SB = 2 μ m

Differenzierte Stromadrüsenzellen (Sdz) werden hier von Fibroblasten (Fb) umgeben, die wiederum von Kollagenfibrillen (Kf) umgeben sind. Diese Kollagenfibrillen (Kf) befinden sich interzellulär. Die Heterochromatinportionen der Fibroblastenkerne sind oft sehr groß und füllen weite Bereiche des Nucleoplasmas aus. Nc = Nucleolus

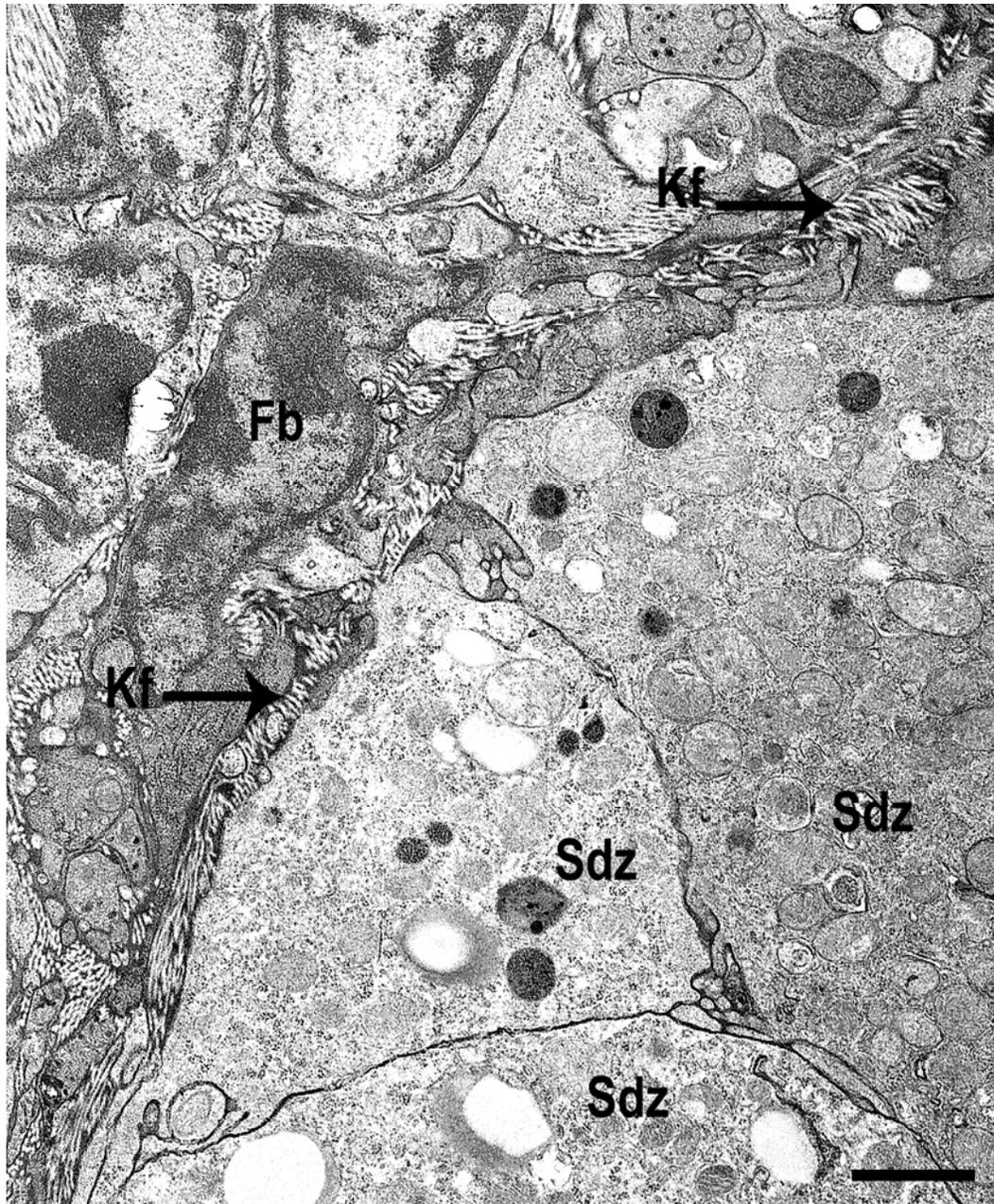


Bild 121 Kollagenfibrillen um einen Stromadrüsenzellverband, TEM

SB = 1 μ m

Die Kollagenfibrillen (Kf), die diese differenzierten Stromadrüsenzellen (Sdz) umgeben, scheinen weitgehend alle Zellzwischenräume des Stromas auszufüllen. Fb = Fibroblast

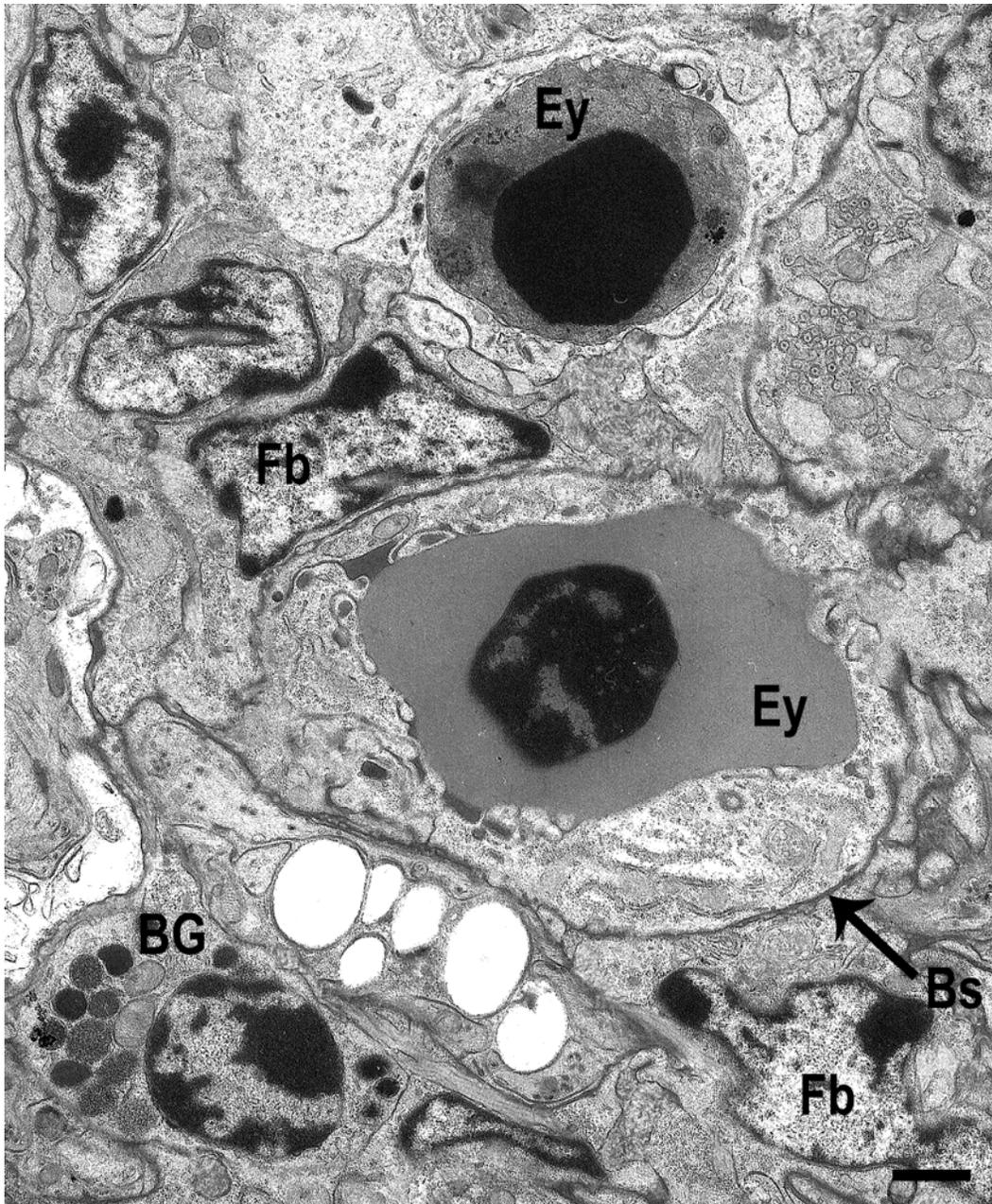


Bild 122 Blutzellen in Kapillaren, TEM

SB = 1 μ m

Die Erythrozyten (Ey) sind an ihrem homogenen Zytoplasma zu erkennen und an ihrem runden, stark elektronendichten Kern, der gelegentlich helle Bereiche aufweist. Der basophile Granulozyt (BG) enthält neben einem großen Zellkern zahlreiche runde Lysosomen. Bs = Basalmembran (Gefäß), Fb = Fibroblast

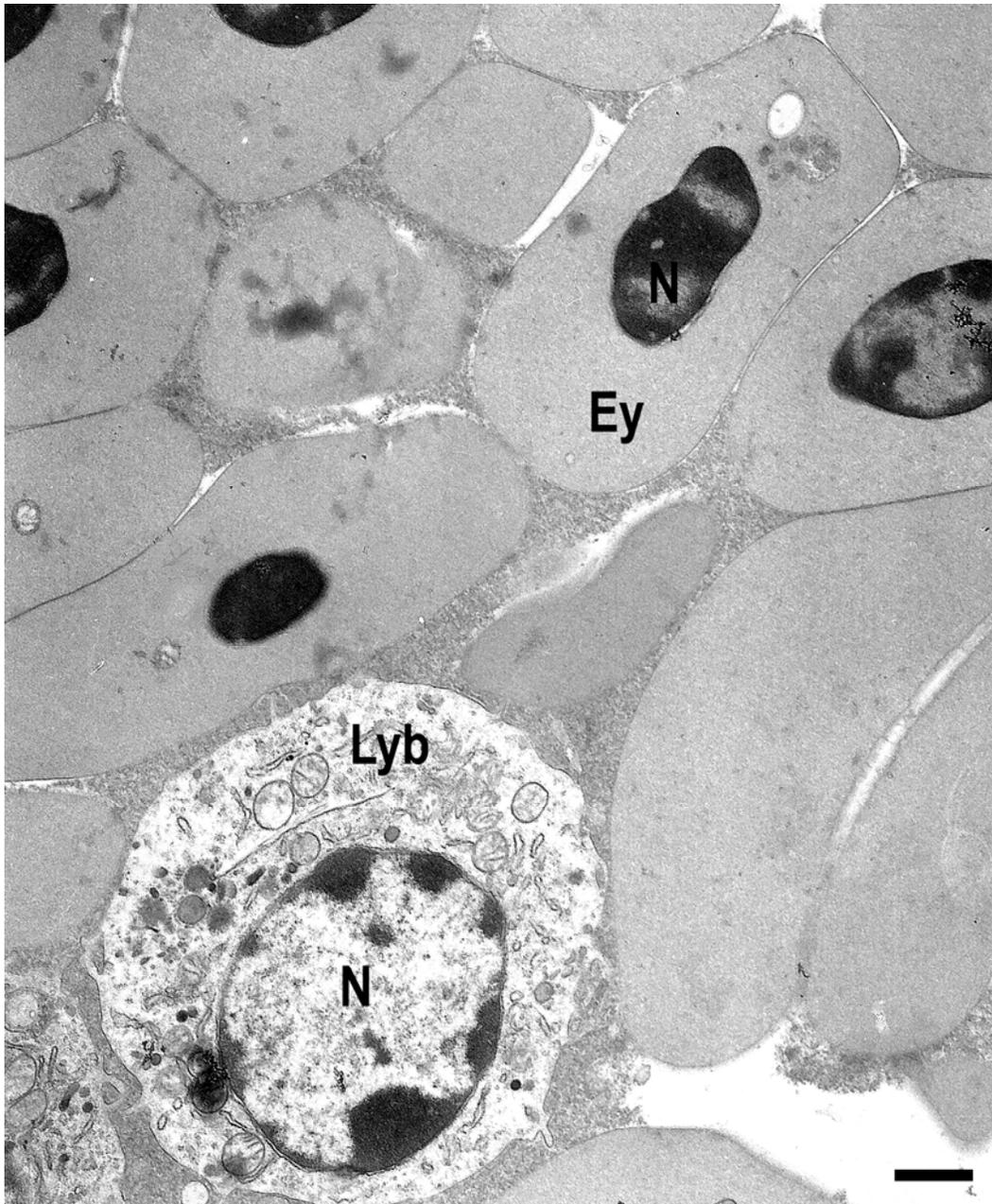


Bild 123 Lymphoblast zwischen Erythrozyten, TEM

SB = 1 μ m

Der Lymphoblast (Lyb), der zwischen zahlreichen Erythrozyten (Ey) liegt, weist einen großen Zellkern (N) und helles Zytoplasma auf, das v.a. Mitochondrien, Golgi-Vesikel, raues endoplasmatisches Retikulum und einige electron dense bodies enthält. Sein Heterochromatin scheint im peripheren Nucleoplasma orientiert zu sein.
N = Nucleus

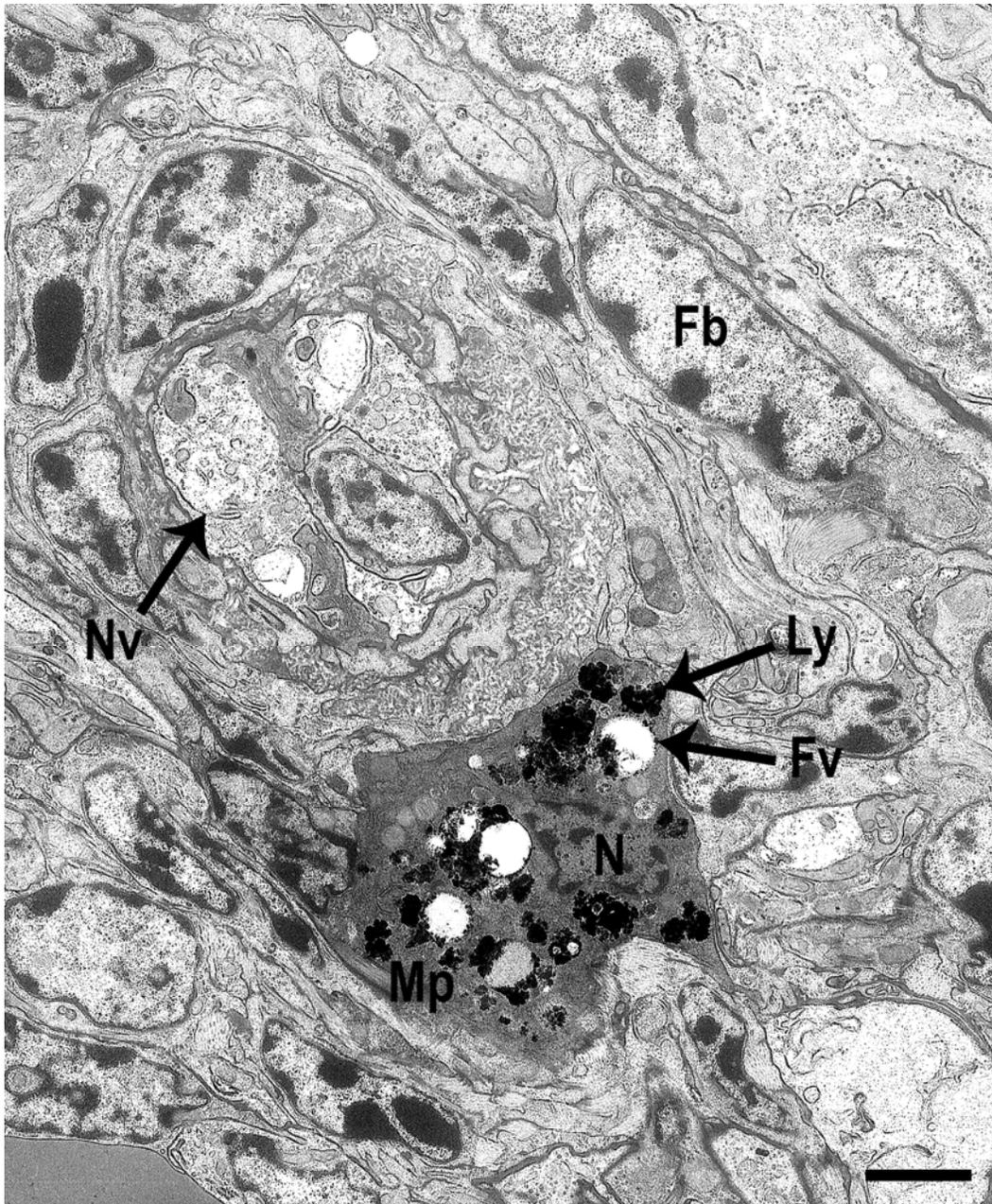


Bild 124 Makrophage im Stroma, TEM

SB = 2 μ m

Die Makrophage (Mp) im Stromagewebe besitzt dunkles Zytoplasma mit einigen Fortsätzen. Um die Fettvakuolen (Fv) ordnen sich sekundäre Lysosomen (Ly) an. Weitere Vakuolen und Granula sind ebenfalls sichtbar. Der Kern (N) ist verhältnismäßig klein und oval. Das Heterochromatin scheint im peripheren Nucleoplasma orientiert zu sein. Fb = Fibroblast, Nv = Nerv

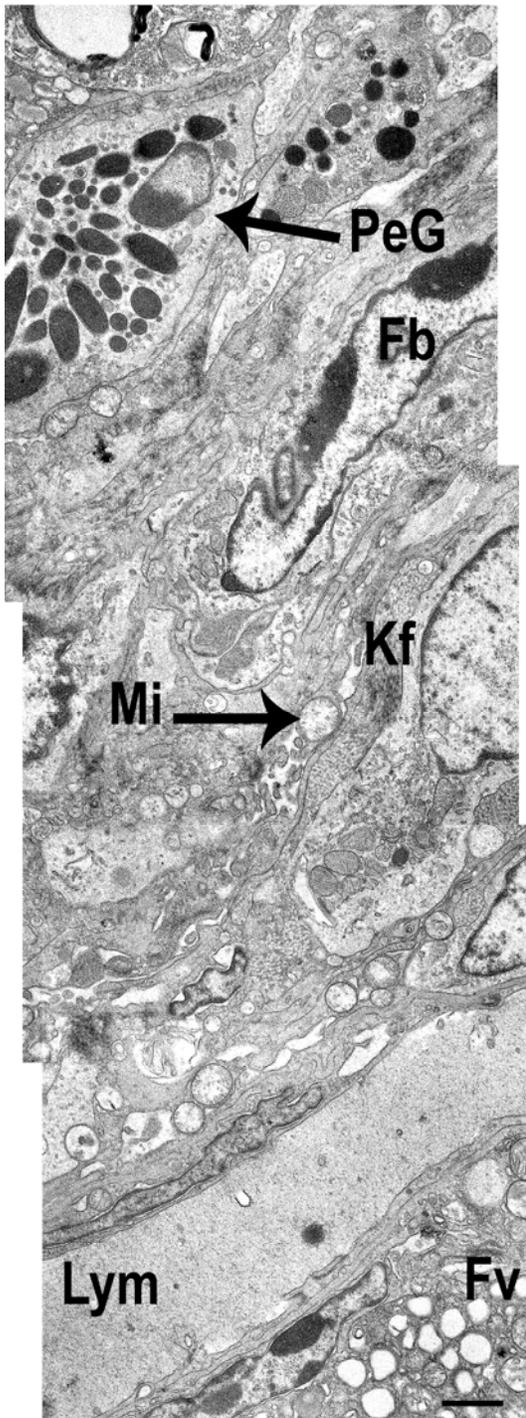


Bild 125 Lymphgefäß im Stroma, TEM
SB = 1 µm

Das Stroma enthält neben einem Lymphgefäß (Lym) hauptsächlich Fibroblasten (Fb) und Kollagenfibrillen (Kf). Ein pseudoeosinophiler Granulozyt (PeG) mit typischen länglichen Lysosomen befindet sich in einem Gefäß. Fv = Fettvakuolen, Mi = Mitochondrium

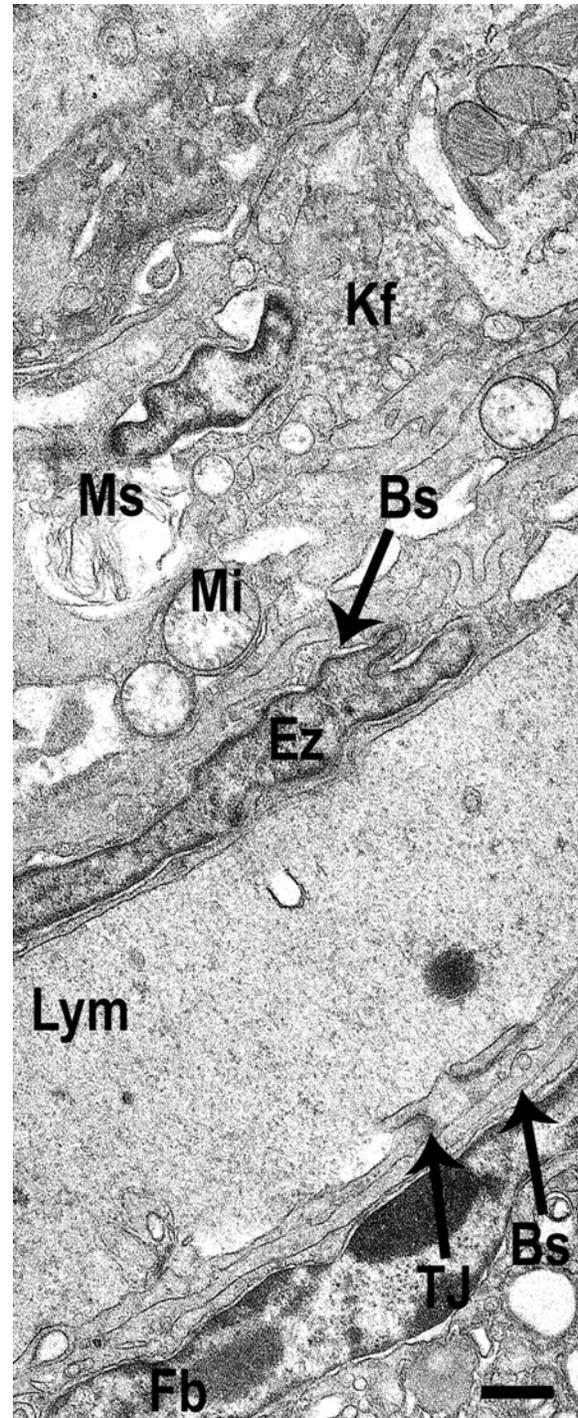


Bild 126 Lymphgefäß vergrößert, TEM
SB = 0,5 µm

Unter der Basalmembran (Bs) des Lymphgefäßes (Lym) befindet sich eine Endothelzelle (Ez) mit länglichem Zellkern. Fb = Fibroblast, Kf = Kollagenfibrillen, Mi = Mitochondrium, Ms = Membranstapel-Vakuole, TJ = Tight Junction

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ovar der Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) licht- und elektronenmikroskopisch untersucht, um Einblicke in die funktionelle Morphologie des Organs zu gewinnen. Um eine histologische Charakterisierung dieses aviären Ovars zu erstellen, wurden dabei konventionelle Färbemethoden, Glyko- und Immunhistochemie, Transmissionselektronenmikroskopie und die RNA-in-situ-Hybridisierungs-Technik verwendet. Als Schwerpunkt wurde in meinen Untersuchungen besonderen Wert auf die Analyse des Zona-pellucida-Äquivalents der Vögel, der aviären Perivitellinmembran, gelegt, die eine wichtige Rolle bei der Fertilisation spielt und über die noch verhältnismäßig wenige Befunde vorlagen. Die Präparate der in dieser Arbeit verwendeten histologischen Schnitte stammen von Japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*), die 6 Monate alt, und damit geschlechts- und legereif waren. Obwohl viele Autoren bei Vögeln nur das linke Ovar finden konnten, besitzen nach Groebbels (1937), van Tyne und Berger (1958), Marshall (1961), van Tienhoven (1961), Welty (1962), Darling und Darling (1963), Thomson (1964), Gilbert (1967, 1971 b) und King (1975) Adler, Habichte und Bussarde (*Accipitridae*), Falken (*Falconiformes*) und Neuweltgeier (*Cathartidae*) regelmäßig zwei Ovarien. Nach King und McLelland (1984) bilden der Braune Kiwi (*Apteryx australis*) und der Habicht (*Accipiter gentilis*) funktionsfähige rechte Ovarien aus. Rechte Ovidukte sind nach Kinsky (1971) sehr selten zu finden, sie wurden jedoch bei Greifvögeln, aber auch bei Hühnern, Storchen, Gänsen, Rallen, Tauben und Papageien vereinzelt entdeckt. Bei der Japanischen Wachtel fand ich in meiner Arbeit, in Übereinstimmung mit der ersten anatomisch-histologischen Gesamtbeschreibung der Wachtel von Fitzgerald (1969), nur das linke Ovar und das linke Ovidukt ausgebildet.

Das Ovar der Wachtel liegt ventral der Aorta descendens und der Vena cava caudalis und kranial des linken Nierenlappens in der Bauchhöhle des Vogels. Lage, Aussehen, Gewicht der Gonade, der Ovarialfollikel und der fertig ausgebildeten Eier entsprachen bei den untersuchten Tieren dem physiologischen Zustand von gesunden, geschlechtsreifen Legewachteln.

Ein Stigma folliculare konnte ich bei der Japanischen Wachtel makroskopisch als hellen, gelben Streifen erkennen. Das Stigma ist bei den meisten anderen Vogelarten ebenfalls beschrieben worden, nach Kern (1972) fehlt es jedoch bei der Dachsammer (*Zonotrichia leucophrys*).

Schon bei einer Übersichtsvergrößerung kann man beim Wachtelovar deutlich Rinde und Mark unterscheiden. Dies stimmt mit der Beschreibung des Haushuhns (*Gallus domesticus*) von Hodges (1974) überein. In der äußeren Rinde des Wachtelovars befinden sich hauptsächlich verstreut liegende Primordialfollikel (und frühe prävitelline Follikel). Dies ist auch von Chalana und Guraya (1979 a) beim Hirtenstar (*Acridotheres tristis*) und von Kimaro (2005) beim Strauß (*Struthio camelus*) beschrieben worden. Im Ovar der Wachtel fand ich hauptsächlich frühe und späte prävitelline Follikel,

Primordialfollikel waren seltener zu identifizieren und vitelline Follikel befanden sich hauptsächlich in Atresie.

Im Unterschied zum Säuger, bei dem die Funktionseinheiten „Follikel“ in Primordial-, Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Graaf-Follikel eingeteilt sind, werden sie nach Guraya (1976), Perry et al. (1978 a) und Gilbert (1979) beim Vogel besser in Primordialfollikel, prävitelline Follikel und vitelline Follikel unterteilt. Die vitellinen Follikel des Haushuhns, die in direkter Reihenfolge zur Ovulation bereit stehen, und die je nach Größe in F5-F1 eingeteilt werden, sind von Bahr et al. (1983) auch als hierarchische Follikel bezeichnet worden. In meiner Arbeit wurden die für Vögel genannten Bezeichnungen der aviären Follikel ebenfalls übernommen. Allgemein sind die Übergänge zwischen den Follikelstadien jedoch nicht so eindeutig abgrenzbar wie beim Säuger. Um Ungenauigkeiten bei der Klassifikation bei der von mir nicht immer follikelmittig getroffenen Schnitte der Proben zu vermeiden, wählte ich zusätzlich zum Parameter „Größe“ den Status der Auflösung des Balbiani-Körpers, die Form der Granulosazellen sowie die Follikelstadium-abhängige Einlagerung von Dotterpartikeln ins Ooplasma zur genauen Bestimmung des Follikelstatus.

Sowohl der Liquor folliculi, als auch das Antrum folliculare der Tertiärfollikel der Säuger fehlen typischerweise beim Vogel. Der aviäre Follikel, wie von Fitzgerald (1969) bei der Japanischen Wachtel beschrieben, ist allein vom Ooplasma, bzw. in späteren Stadien vom Dotter der Oozyte ausgefüllt. Meinen Beobachtungen zufolge wächst die aviäre Oozyte parallel mit der Follikelwand, was ebenfalls von Fitzgerald (1969) beschrieben wurde. Einen Hohlraum im Follikel, einen Cumulus oophorus oder eine Corona radiata konnte ich bei der Wachtel nicht nachweisen. Dies trifft auch für alle anderen bisher untersuchten aviären Spezies zu.

Die Granulosazellen, die die aviäre Oozyte umgeben, sind im Vergleich zum Säuger nur einschichtig ausgebildet (Guraya, 1976; Gilbert 1979). Sie umgeben die Oozyte ein paar Tage nach dem Schlupf des Kükens (Goldsmith 1928). Erst nachdem der Kern das sogenannte Vor-Lampenbürsten-Stadium des Diplotän erreicht hat (D'Hollander, 1904; Guraya 1976; Chalana und Guraya 1979 a), beginnen sich Epithelzellen als Granulosazellen um die Oozyte zu legen (Gilbert, 1979). Die Granulosazellen der Follikel der Wachtel stellen sich in meiner Arbeit in Übereinstimmung mit Guraya (1976) und Gilbert (1979) bei verschiedenen Vogelarten, und mit Kimaro (2005) beim Strauß, flach bis isoprismatisch dar. Sie werden dann vorübergehend hochprismatisch, um sich dann mit weiterem Oozytenwachstum wieder zunehmend abgeflacht zu zeigen. Dies mag an der starken Größenzunahme der Eizelle während der Follikulogenese liegen. Die Granulosazellen zeigen einen runden Kern mit 1 - 2 prominenten Nucleoli. Außerdem konnte ich lichtmikroskopisch die von Chalana und Guraya (1979 a) beschriebenen, stark basophilen und kondensierten Chromosomen der Vor-Lampenbürsten-Konfiguration des meiotischen Diplotänstadiums der Oozyte 1. Ordnung gut nachweisen. Dies war besonders gut an den Primordialfollikeln und den sehr frühen prävitellinen Follikeln zu erkennen. Mit zunehmendem Follikelwachstum zeigt sich der gesamte Nucleus jedoch eher homogen gefärbt.

Nach Rodgers et al. (2000), der Untersuchungen beim Rind durchführte, ist die basale Seite der Granulosazellen stets von einer Basalmembran unterlegt. Dies ist eine spezialisierte Schicht der extrazellulären Matrix, die Epithelzellen (bzw. von Hodges (1974) als Follikelepithel bezeichnet, in meiner Arbeit aber nur als Granulosazellen oder Granulosaschicht benannt) vom umgebenden Stroma abtrennt. Sie beeinflusst Wanderung, Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen. Die Basalmembran spielt weiter eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Polarität der Epithelzellen (Van Wezel und Rodgers, 1996) und außerdem ist sie von Bedeutung für die Passage großer Moleküle, als Barriere für Wachstumsfaktoren, für die Osmoseaktivität oder generell als „Blut-Follikel-Schranke“ (Rodgers et al., 2000; 2003). Die folliculäre Basalmembran enthält, trotz quantitativer Veränderung ihrer Zusammensetzung, in Abhängigkeit der Follikelreife, neben Kollagen IV stets Laminine (Rodgers et al. 2003). Sezerniertes Kollagen IV und Laminin lagern sich zunächst aufgrund ihrer Affinität zu Heterotrimeren zusammen, um sich anschließend mit weiteren Komponenten der Basalmembran zu Netzwerken zusammenzuschließen (Timpl und Brown, 1996), die sich dann über Integrine an die Granulosazellen binden.

Die Struktur der Basalmembran wird durch eine Zytoskelettveränderung der Granulosazellen netzartig (Colognato et al. 1999). Bei der Wachtel konnte ich neben einer positiven Anfärbung der folliculären Basalmembranen mit PAS oder Alcianblau mit einem polyklonalen Antikörper gegen Laminin (aus dem Kaninchen) diese Schicht der extrazellulären Matrix deutlich darstellen. Eine Basalmembran ist in allen Follikelstadien ausgebildet. Sie wird mit zunehmendem Wachstum der Follikel breiter und stärker angefärbt. Dies deutet auf ein vermehrtes Vorkommen von Laminin in späten prävitellinen und vitellinen Follikeln hin und stimmt mit der Annahme von Rodgers et al. (2003), dass Basalmembranen durch die Abnahme von Kollagen IV und die Zunahme von Laminin dehnbarer werden (müssen), überein. Das Vorhandensein von lamininhaltigen folliculären Basalmembranen konnte auch von Asem et al. (2000) beobachtet werden, die die Hauptkomponenten Kollagen IV und Laminin in aviären Follikeln von White Leghorn Hennen bestätigen konnten. Entstehungsort und Regulation des Einbaus der erwähnten Komponenten in die Basalmembranen sind aber noch weitgehend unbekannt (Asem et al., 2000) und eine Übersicht über alle Komponenten in Abhängigkeit des Follikelstadiums, wie Rodgers et al. (2003) sie für das Rind erstellten, steht für die Japanische Wachtel noch aus.

Die Komponenten der Thekaschicht, die sich ab dem Stadium der späten prävitellinen Follikel in eine Theka interna und eine Theka externa unterteilen, sind von Guraya (1976), Perry et al. (1978 a), Gilbert (1979) und Kimaro (2005) beschrieben worden und stimmen mit meinen Beobachtungen bei der Japanischen Wachtel weitgehend überein. Im Unterschied jedoch zu Hodges (1974), der eine Unterteilung in Theka interna und Theka externa beim Huhn erst ab einem Follikeldurchmesser von ca. 2 mm beobachten konnte, zeigt die Japanische Wachtel in meiner Arbeit dies schon bei einem Durchmesser von unter 0,5 mm. Die Theka interna der reifen Follikelstadien enthält neben Vimentin- und SMA-positiven, langen, schmalen Fibroblasten mit länglichem Nucleus, wellenförmige

Kollagenfasern, Gefäße und Thekazellen, die vermutlich Hormone produzieren und morphologisch den Fibroblasten ähneln. Die Theka externa, die breiter und aufgelockerter erscheint, enthält zusätzlich differenzierte Thekazellen - oft mit vakuolisiertem Zytoplasma -, die sich manchmal zu runden Verbänden zusammenlagern und den „Stromadrüsen-Zellverbänden“ ähneln. Im Vergleich zum intraovariellen Stroma liegen die differenzierten Thekazellen in der Theka externa jedoch meist einzeln vor.

Guraya (1976) untersuchte den sogenannten „Balbiani-Körper“ in den Follikeln der Taube (*Columbia livia*), der Lachtaube (*Streptopelia senegalensis*), der Türkentaube (*Streptopelia decaocto*), dem Haushuhn und der Wachtel. Der Balbiani-Körper liegt im Ooplasma der Oozyten kleiner Follikel und besteht hauptsächlich aus einem Kernkörper (s. u.), Mitochondrien, Golgi-Vesikeln, rauem und glattem endoplasmatischem Retikulum und Lipidtröpfchen unterschiedlicher Größe. Gebildet wird er vom juxtanuklearen Zytoplasma der frühen Oozyte. Paranuklear und basophil ist zusätzlich eine kernähnliche Struktur, der sogenannte Kernkörper auszumachen, der primär aus RNA, Proteinen (chromatoid bodies) und Lipoproteinen besteht. Er ist nach Guraya (1976 b) für die Vermehrung und Differenzierung weiterer zytoplasmatischer Elemente des Balbiani-Körpers verantwortlich. Insgesamt scheinen sich die Komponenten des Balbiani-Körpers im Laufe des Oozytenwachstums zu vervielfältigen, um sich dann bei großen Follikeln im Randbereich des Ooplasmas anzusammeln. Die nahe Lage des Balbiani-Körpers zum Oozytenkern lässt darauf schließen, dass der Kern eine Rolle bei seinem Wachstum und seiner Differenzierung spielen könnte. Da sich die zytoplasmatischen Elemente der Oozyte so konzentriert im Balbiani-Körper ansammeln, vermutet Guraya (1976), dass sich dort eine Art „Stoffwechszentrum“ befindet, von dem die Vermehrung und Differenzierung der zytoplasmatischen Organellen und Lipide ausgehen. Die genaue Funktion des Balbiani-Körpers ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Bei der Wachtel wurde in dieser Arbeit ein licht- und fluoreszenzmikroskopisch gut darstellbarer Balbiani-Körper in den Primordialfollikeln und frühen prävitellinen Follikeln gefunden, der sich mit zunehmendem Follikelwachstum im Ooplasma „auflöst“. Einen Kernkörper konnte ich hier nicht eindeutig identifizieren.

Follikel können in jedem Stadium ihrer Entwicklung atretisch werden. Atretische Primordialfollikel und frühe prävitellinen Follikel zeigen in meiner Arbeit eine geschrumpfte und deformierte Oozyte, deren Ooplasmamembran sich meist von den Granulosazellen ablöst, und / oder diese trennt sich auch von der Thekaschicht ab. Der Oozytenkern ist ebenfalls deformiert. Bei etwas größeren prävitellinen Follikeln konnte ich zusätzlich proliferierte Granulosazellen finden, die oft eine vakuolisierte „innerste Lage“ zeigen, die dann in einem weiteren Schritt das Ooplasma infiltrieren. Die in-situ-Resorption dieser kleinen Follikel lässt sie schließlich undeutlich und „verwaschen“ aussehen. Dies stimmt mit der Beschreibung von Gupta et al. (1988) überein, der für die kleineren Follikel eine nicht-bruchhafte Form der Atresie beschrieben hat, d.h. dass die Follikel nicht platzen oder brechen, sondern dass die

atretische Masse in-situ resorbiert wird anstatt sich im Stroma zu verteilen. Bei späten prävitellinen Follikeln habe ich die Beobachtung gemacht, dass das Ooplasma zunächst vakuolisiert und sich die Ooplasmamembran von den Granulosazellen ablöst. Die Granulosazellen proliferieren, vakuolisieren und wandern in das Ooplasma der degenerierenden Oozyte ein. Das den Follikel umgebende Bindegewebe verbreitert sich. Die Resorption des Ooplasmas scheint nur in-situ zu erfolgen und entspricht im Allgemeinen der Beschreibung von Madekurozwa und Kimaro (2006) beim Strauß und der von Madekurozwa (2007) beim Emu. Auch die von Madekurozwa und Kimaro (2006) beobachteten Atresietypen 1 und 2 der vitellinen Follikel konnte ich in meiner Arbeit bei der Wachtel nachweisen. Atresie Typ 1 ist definiert durch die Infiltration der Oozyte durch Granulosazellen, Makrophagen, Gefäße, fibroblastenartige Zellen und Bindegewebsfasern ins Ooplasma, das dann im Laufe der Atresie vollständig mit hyalinisiertem Bindegewebe durchsetzt wird. Diese hyalinisierten Follikel konnte ich in meiner Arbeit beobachten, jedoch waren manche eher von der Größe eines prävitellinen Follikels. Dies könnte bedeuten, dass die atresierten vitellinen Follikel geschrumpft sind oder dass auch prävitelline Follikel hyalinisieren. Atresie Typ 2 ist dadurch charakterisiert, dass die Theka-interna-Zellen und die Granulosazellen proliferieren, vakuolisieren und das Ooplasma infiltrieren, um sich dann zu Stromadrüsenzellen zu differenzieren. Diese bilden anschließend Zellcluster, die nach vollständigem Untergang des Follikels im Stroma weiterexistieren. Insgesamt gesehen stimmen diese Beobachtungen überein mit den Beschreibungen der Atresie von Guraya (1976 b) bei Taube, Lachtaube, Türkentaube, Haushuhn und Wachtel, Perry et al. (1978 a), Gilbert (1979) und Gilbert et al. (1983) beim Haushuhn, Madekurozwa und Kimaro (2006) beim Strauß und Madekurozwa (2007) beim Emu. Bei letzterer Autorin gibt es den Unterschied, dass beim Emu keine fibroblastenartigen Zellen in atretischen Follikeln zu finden waren. Meine Beobachtungen der Atresie bei der Wachtel weichen von den Beobachtungen von Gupta (1988) ab, der beim Haushuhn ab einer Follikelgröße von 1 mm eine bruchhafte Form der Atresie beobachtet hat, initiiert von einer Ruptur der Follikelwand und einem darauf folgenden „Auslaufen“ der Ooplasmahalte.

Marshall und Coombs (1957) und Erpino (1969), die das Ovar bei Saatkrähe und Elster untersuchten, beschrieben eine histologische Ähnlichkeit eines „lipoglandulären“ atretischen Follikels mit dem Gelbkörper der Säuger. Eine weitere Untersuchung der lipoglandulären Follikel auf eine mögliche hormonelle Aktivität, könnte die Frage klären, warum es bei Vögeln morphologisch unterschiedliche Atresieformen gibt, bzw. welche Hormone in den atretischen oder differenzierten Zellen der lipoglandulären Follikel produziert werden. Damit könnte auch geklärt werden, ob und in welchem Maße die Atresie das Wachstum der gesunden Follikel beeinflusst.

Gleiches gilt für die sogenannten Stromadrüsen-Zellverbände, die in meiner Arbeit beobachtet wurden. Sie sind schon bei verschiedenen Vogelarten von Dahl (1970 a), Chalana und Guraya (1976), Guraya (1976), Gilbert (1979) und Kimaro (2005) als Lipid-vakuolenhaltige Stromadrüsen, Stromadrüsenzellen, Thekadrüsen, Thekadrüsenzellen bzw. Epithelzell-Inseln beschrieben worden, die

sich in der Theka interna, der Theka externa, zwischen den Thekaschichten oder im intraovariellem Stroma befinden. Sie können einzeln vorliegen oder nach Dahl (1970 a) sphärische, ovale oder längliche Drüsencluster formen. Dahl (1970 a; 1971 b) beschrieb diese Thekadrüsen beim Haushuhn in der Nähe der kleinen Follikel als von einer bindegewebigen Kapsel und einer Basallamina umschlossene Strukturen. Perry et al. (1978 a) konnten diese Eigenschaften jedoch nicht bei Thekadrüsen der größeren Follikel nachweisen, dort erschienen sie irregulär und unzusammenhängend geformt. Marshall und Coombs (1957) postulierten eine Umwandlung atretischer Follikel in Stromadrüsenzellen bei der Krähe. Erpino (1973) ist der Ansicht, dass die ehemaligen Thekadrüsenzellen atretischer Follikel beim Tölpel (*Aphelocoma coerulescens*) den Ausgangspunkt für die Bildung der Stromadrüsen darstellen. Madekurozwa und Kimaro (2006) beschreiben beim Strauß auch Stromadrüsen-Zellverbände als Resultat des vitellinen Atresiestadiums Typ 2.

Meinen Beobachtungen an der Japanischen Wachtel zufolge kommen diese Stromadrüsen-Zellverbände in der Theka externa bzw. im Stroma vor, dort eher in den äußeren Rindengebieten neben den Primordialfollikeln und den frühen prävitellinen Follikeln. Um die kleinen Follikel herum liegen die Drüsenzellen in sphärischen Verbänden („Clustern“) vor. Bei späteren prävitellinen Follikeln sind sie eher länglich, bzw. liegen die Thekadrüsenzellen (oder „Thekazellen“) in der Theka externa der großen Follikel meist einzeln vor. Die Zellen der Cluster ähneln undifferenzierten Thekazellen, haben einen runden Nucleus mit 1 - 2 Nucleoli, sind aber meist vakuolisiert. Bei atretischen Follikeln nehmen sie einen größeren Raum ein und erscheinen dann hochgradig vakuolisiert. Vermutlich besteht zwischen atretischen Follikeln und den veränderten Stromadrüsen ein Zusammenhang. Einen gravierenden morphologischen Unterschied zwischen „Stromadrüsenzellen“ und „Thekadrüsenzellen“ konnte ich bei meinen Untersuchungen nicht erkennen, manchmal gab es jedoch leichte Unterschiede in der Anfärbung ihres Zytoplasmas. Auch konnte ich um alle Stromadrüsen-Zellverbände schwach PAS-positive, Laminin-positive und PNA-positive zarte Basallamina beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von Dahl (1970 a; 1971 b), der diese Basallamina an gleicher Stelle im Ovar des Haushuhns identifizieren konnte und mit Kimaro (2005), der sie beim Strauß beschrieb. Auch stimmen meine Beobachtungen hinsichtlich des Vorkommens von differenzierten Theka- bzw. Granulosazellen im Ooplasm eines atretischen Follikels des Typs 2 mit der anschließenden Umwandlung zu Stromadrüsen-Zellverbänden mit der Beschreibung von Madekurozwa und Kimaro (2006) beim Strauß überein. Gleiches gilt auch für die spätere Trennung der Cluster im Stroma durch Bindegewebssepten und Blutgefäße. Dennoch scheinen noch einige Unklarheiten über die genaue Funktion dieser Drüsen zu bestehen. Als nächster Schritt sollte die Fähigkeit dieser Zellen zur Bildung von Steroidhormonen eingehend untersucht werden. Untersuchungen zur Apoptose der Theka- und der Granulosazellen mittels TUNEL-Reaktion (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) wären eine weitere interessante Option, um die Bildung und Funktion der Stromadrüsen näher zu studieren.

Insgesamt gesehen stimmen meine Beobachtungen zur Histologie am Ovar der Wachtel in vielen Punkten mit den Befunden von Fitzgerald (1969) bei der Japanischen Wachtel, von Perry et al. (1978 a) beim Haushuhn, von Chalana und Guraya (1979 b) bei der Krähe und dem Hirtenstar, von Guraya (1976) bei der Taube, Lachtaube, Türkentaube, dem Haushuhn und der Wachtel, von Kimaro (2005) und Madekurozwa und Kimaro (2006) beim Strauß und von Madekurozwa (2007) beim Emu überein. Der auffälligste Unterschied zu anderen Vögeln besteht vor allem in den wachteltypischen dunklen, großen Nucleoli, die besonders in den Fibroblasten der frühen prävitellinen Follikel auffallen. Weiterhin sprechen die gemachten Untersuchungen dafür, dass die Stromadrüsen-Zellverbände, die aus differenzierten Theka- und Granulosazellen bestehen und sich durch untergegangene vitelline Follikel des Atresie-Typs 2 hervorbilden, dass es sich hier um das aviäre Äquivalent der Wachtel zum Gelbkörper der Säuger handeln könnte.

Die Perivitellinmembran stellt bei Vögeln und Reptilien das morphologische Äquivalent der Zona pellucida der Säugetiere, des Chorions der Knochenfische und der Vitellinmembran der Amphibien und Knorpelfische dar (King, 1975; Stewart et al., 2004; Menkhorst und Selwood, 2008). Sie besteht wie die Zona pellucida aus einem dreidimensionalen, azellulären Netzwerk von Filamenten, die hauptsächlich aus Glykoproteinen aufgebaut sind (Wyburn et al., 1965 a). Diese Eihülle spielt eine wichtige Rolle im Fertilisationsprozess, u.a. in der speziesspezifischen Spermium-Ei-Bindung, der Induktion der Akrosomenreaktion und beim Polyspermieblock (McLeskey et al., 1998, Sinowatz et al., 2001). Außerdem dient sie bei verschiedenen oviparen und viviparen Spezies zusätzlich als Immunbarriere, als physikalische Barriere, bei der Ernährung des Konzeptus und zur Verhinderung von zu früher Implantation (Menkhorst und Selwood, 2008). Die Glykoproteine der Perivitellinmembran werden von verschiedenen, stark konservierten Mitgliedern der Zona-pellucida-Genfamilie kodiert (Spargo und Hope, 2003; Smith et al., 2005). Die Zona pellucida der Säugetiere weist bei den verschiedenen Spezies deutliche Unterschiede auf. Ein erstes auffälliges Unterscheidungskriterium ist zunächst die Dicke der Zonae. Sie beträgt 1 - 2 μm beim Opossum, 5 μm bei der Maus, 13 - 16 μm beim Menschen und beim Schwein und 27 μm beim Rind (Dunbar et al., 1994). Die Perivitellinmembran der Japanischen Wachtel zeigt in meinen Beobachtungen bei gesunden Follikeln eine durchschnittliche Dicke von 1 - 3 μm , abhängig vom Reifestadium des Follikels. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen beim Haushuhn, bei dem Bellairs et al. (1963), Wyburn et al. (1965 a) und Perry et al. (1978 a) ebenfalls eine Dicke von 1 - 3 μm gemessen haben.

Nach Spargo und Hope (2003) und Smith et al. (2005) besteht die Zona pellucida vieler Säuger aus mindestens drei Glykoproteinen, ZP1, ZP2 und ZP3, auch bekannt als ZPB1, ZPA und ZPC. Der Mensch besitzt in der Zona pellucida ZPB1, ZPB2, ZPA und ZPC (Lefievre et al., 2004), der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) dagegen besitzt ZPB, ZPA, ZPC, ZPD, ZPAX1 und ZPAX2 (Lindsay et al., 2001; 2002). Beim Huhn haben Waclawek et al. (1998), Bausek et al. (2000), Okumura et al. (2004) und Smith et al. (2005) die Glykoproteine ZP1 (ZPB1), ZPB (ZPB2), ZPA, ZPC und ZPD

beschrieben. Bei der Japanischen Wachtel identifizierten Mori und Masuda (1993), Pan et al. (2001) und Sasanami et al. (2003 a) die Glykoproteine ZP1 und ZPC. In jüngster Zeit wurde zusätzlich ein mit vermutlich vier N-gebundenen Oligosacchariden ausgestattetes ZPD von Sato et al. (2009) und ein ZPA von Kinoshita et al. (2009) bei der Japanischen Wachtel nachgewiesen. Auch gibt es von letzteren Autoren bereits Hinweise auf ein Vorkommen von ZP4 in der Perivitellinmembran der Wachtel.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es sich trotz des Terminus „Perivitellinmembran“ (Wyburn, 1965 a) nicht um eine Membran im klassischen, zellbiologischen Sinne handelt, sondern um eine vogelspezifische, sekundäre Membran (Schnorr und Kressin, 2006), die hauptsächlich aus langen, wasserunlöslichen Glykoproteinfasern besteht.

Der immunhistochemische Nachweis von ZP1 in der Perivitellinmembran der Wachtel wurde in dieser Arbeit mit einem wachtelspezifischen ZP-Antikörper (polyklonaler anti-quail-ZP1-Antikörper aus dem Kaninchen) durchgeführt. ZP1-Aggregate stellen sich in den Granulosazellen der prävitellinen Follikel als kugelförmige Strukturen neben dem Zellkern deutlich positiv dar. Die beobachtete Lokalisation entspricht der Verteilung der Golgi-Felder in den Granulosazellen. Erst in größeren vitellinen Follikeln stellt sich ZP1 in der Perivitellinmembran als stark positive und durchgehende Linie dar, was übereinstimmt mit der SDS-PAGE Untersuchung von ZP1 von Mori und Masuda (1993) bei der Japanischen Wachtel, außerdem mit der von Pan et al. (2001) und Sasanami et al. (2003 a). Bei hierarchischen Follikeln (F2-Follikel, hier ca. 15mm) baut sich die Perivitellinmembran zudem noch zwischen die Granulosazellen ein. Dies könnte evtl. zu einer stabileren Konstruktion der Perivitellinmembran führen. Die deutlich ZP1-positiven Golgi-Felder in den Granulosazellen bei Primordialfollikeln und sehr frühen prävitellinen Follikeln stehen jedoch im Widerspruch zu Ergebnissen von Sasanami et al. (2004), die mittels Western Blot eine Präsenz von ZP1 in den Granulosazellen erst ab einer Follikelgröße von F4 (ab ca. 4 mm) nachweisen konnten. Eine unspezifische Anfärbung schließe ich aufgrund der deutlich abgegrenzten spezifischen Immunfärbung für ZP1 in den Golgi-Feldern jedoch aus, da sie sich sogar bei ins Ooplasm eingewanderten Granulosazellen von atretischen Follikeln noch deutlich positiv darstellten. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wäre die Annahme einer Kreuzreaktion des ZP1-Antikörpers mit ZP3 oder ZP4, da vor allem ZP4 strukturelle Ähnlichkeiten mit dem ZP1 haben dürfte (Sasanami, 2009, persönliche Kommunikation) und früher als ZP3 in die Perivitellinmembran eingebaut wird.

Mit dem polyklonalen anti-quail-ZPA-Antikörper aus dem Kaninchen konnte ich erstmals die Anwesenheit von ZPA (ZP2) in der Perivitellinmembran der Wachtel nachweisen. Die Reaktion zeigte sich zunächst im Zytoplasma der Granulosazellen von prävitellinen Follikeln, danach konnte ich ebenfalls eine durchgehend starke Anfärbung der Perivitellinmembran bereits bei frühen vitellinen Follikeln beobachten. Eine erste positive Reaktion der Perivitellinmembran konnte in Form einer schmalen Linie bei Follikeln von 1 mm Größe entdeckt werden. Ein Reaktionsmaximum in Form

einer durchgehend starken, gleichmäßigen Schicht war bei einer Follikelgröße von 2 mm zu beobachten. Im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Glykoproteinen der Perivitellinmembran wird die Reaktion mit zunehmender Follikelreife schwächer. Desweiteren entdeckte ich ZPA-positive Strukturen im Balbiani-Körper von kleinen Follikeln, sowie im Ooplasma von kleineren vitellinen Follikeln. Meine Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Sasanami (2009, persönliche Kommunikation) überein, dass dieses durch Western Blot identifizierte 80 kDa Protein ZPA (Kinoshita et al., 2009) eher bei kleinen vitellinen Follikeln vorkommt und Ähnlichkeit mit ZP4 zu haben scheint. Die Oozyte als Expressionsort wurde in jüngster Zeit durch in-situ-Hybridisierung und weiteren molekularbiologischen Methoden bei der Japanischen Wachtel von obigen Autoren bestätigt und ist durch meinen immunhistochemischen Nachweis von ZPA im Ooplasma kleinerer vitelliner Follikel belegt worden.

Das Glykoprotein ZPC (ZP3) konnte ich in meiner Arbeit mit einem polyklonalen anti-quail-ZPC-Antikörper aus dem Kaninchen in der Perivitellinmembran der Wachtel nachweisen. Die Präsenz von ZPC bei der Japanischen Wachtel ist früher schon von Mori und Masuda (1991), Pan et al. (2001) und Sasanami et al. (2003 a) beschrieben worden. Nach meinen Beobachtungen befindet sich bereits ZPC-positives Material in den Granulosazellen der prävitellinen Follikel. Dies stützt die Hypothese von Pan et al. (2001), dass ZPC bei der Wachtel von den Granulosazellen synthetisiert wird. Die Anfärbung der Granulosazellkerne in meinen Ergebnissen scheint unspezifisch gewesen zu sein. Ab dem vitellinen Stadium konnte ich eine Zunahme der positiven Reaktion auf ZPC in der Perivitellinmembran beobachten, die mit dem Erreichen des hierarchischen Stadiums (Stadien kurz vor der Ovation) noch weiter zunahm. Die Perivitellinmembran stellt sich stark positiv, regelmäßig und durchgehend gleich breit dar. Die späte Zunahme der positiven Reaktion des ZPC in der Perivitellinmembran der Wachtel bestätigt die Beobachtung von Sasanami et al. (2004), die mittels Western Blot eine zunehmende Akkumulation von ZPC in den Granulosazellen ab einer Follikelgröße von 1 - 2 mm (kleine gelbe Follikel) feststellen konnten. Abweichend von den Befunden von Sasanami et al. (2004) konnte ich ZPC in den Granulosazellen bereits bei prävitellinen Follikeln nachweisen, wobei die Immunreaktion jedoch noch schwach und unregelmäßig war. Ich stimme daher der Annahme von Sasanami, (2009, persönliche Kommunikation) zu, dass das Expressionsmuster des ZPC ähnlich dem des ZPD zu sein scheint, sowie die Expression von ZPA mit ZP4 Gemeinsamkeiten besitzen dürfte.

ZPD konnte ich mit einem polyklonalen Antikörper (anti-quail-ZPD) aus dem Kaninchen, der gleichfalls von Dr. Sasanami zur Verfügung gestellt worden war, im Ovar der Wachtel immunhistochemisch nachweisen. Eine positive Reaktion war in den Granulosazellen von Primordialfollikeln und prävitellinen Follikeln erkennbar, wobei letztere etwas stärker reagierten. Erst im Stadium von 1 - 2 mm Größe der vitellinen Follikel ("Kleine gelbe Follikel") konnte ich eine leichte, unregelmäßige und punktförmige Ansammlung von ZPD-positivem Material im Bereich zwischen Granulosazellmembranen und Oozytenmembran beobachten. In späteren vitellinen Stadien

bis in die hierarchischen Stufen hinein ist die Antikörperreaktion an der Perivitellinmembran dann stark, gleichmäßig und mit wachsender Follikelgröße an Intensität zunehmend. Das im Vergleich zu den anderen Glykoproteinen erst relativ spät als durchgehend positive Linie auftretende ZPD ist in den immunhistochemischen Untersuchungen von Sato et al. (2009) bei der Japanischen Wachtel beschrieben worden. Die positive Immunreaktion im Zytoplasma der Granulosazellen der prävitellinen Follikel kann als Indiz dafür gewertet werden, dass ZPD in den Granulosazellen synthetisiert wird, was bereits von Okumura et al. (2004) beim Huhn und von Sato et al. (2009) bei der Wachtel bestätigt wurde. Beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) dagegen ist der Syntheseort des ZPD die Oozyte selbst (Lindsay et al., 2002). Beim Säuger wurde bisher noch kein ZPD-Äquivalent identifiziert (Sato et al., 2009).

Insgesamt gesehen stimme ich mit der Hypothese von Sasanami et al. (2009, persönliche Kommunikation) überein, dass die früh in der Perivitellinmembran auftretenden Glykoproteine ZPA (ZP2) und ZP4 eine Art Prämatrix oder Grundgerüst bilden, in welches sich dann später ZP1, ZPC (ZP3) und ZPD einlagern, um das Netzwerk zu vervollständigen. Basierend auf der annähernd zur gleichen Zeit stattfindenden Einlagerung von ZP1 und ZPD in die Perivitellinmembran, erscheint es möglich, dass letztere Bindungspartner sind. Möglicherweise gibt es auch einen speziellen Faktor, ein „ZP-Bindungsprotein“, das die spezifische Bindung der Glykoproteine in der Perivitellinmembran vermittelt (Sasanami, 2009, persönliche Kommunikation).

Insgesamt gesehen erlaubt die Aufklärung von Vorkommen und Struktur der Eihüllen-Glykoproteine bei Vertebraten und vor allem von den sie kodierenden Genen wichtige Einblicke in die Evolution der Eihüllen. Gemäß Goudet et al. (2008) haben Säuger nach der evolutionären Vogel-Säuger-Trennung vor ca. 300 Mio. Jahren die ZPD- und ZPAX-Gene verloren, bei Vögeln blieben sie aber weiterhin erhalten. Der Verlust der ZPAX-Gene bei Säugern erfolgte wohl noch vor der Mensch-Affe-Trennung, deshalb kann man bei Mensch und Schimpanse noch ähnliche Mutationen in ihren ZPAX-Pseudogenen entdecken.

Mittels biotinmarkierter Oligonucleotid-Sonden habe ich weiter versucht, die mRNA der Perivitellinmembran-Komponenten ZP1 und ZPC im Ovar zu lokalisieren, um damit nähere Rückschlüsse über ihren Syntheseort zu gewinnen. ZP1-mRNA konnte ich mit dieser Methode in den Hepatozyten der Leber identifizieren, während die mRNA für ZPC ausschließlich in den Granulosazellen exprimiert wird. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Sasanami et al. (2003 a) für ZP1 und von Pan et al. (2001) für ZPC. Durch Klonierung der cDNA, die das jeweilige Glykoprotein kodiert, identifizierten die Autoren Wachtel-ZP1 und -ZPC zunächst als Homologen von Säuger-ZP1 bzw. -ZPC. Die gleichen Autoren konnten mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden (Northern Blot, in-situ-Hybridisierung, Realtime-PCR) die Leber als Syntheseort für ZP1 und die Granulosazellen als Syntheseort für ZPC im Wachtelovar bestimmen. Bausek et al. (2000) konnten beim Huhn ebenfalls die Leber als Ort der Expression für ZP1 ermitteln,

gleiches beschrieben Hamazaki et al. (1989) beim Japankarpfling (*Oryzias latipes*), bei dem jedoch das ZP3 in der Leber gebildet wird. Beim Säuger werden keine ZP-Glykoproteine von der Leber synthetisiert (Sasanami et al., 2003 a). Waclawek et al. (1998) konnten, übereinstimmend mit meinen Ergebnissen, beim Huhn als Syntheseort des ZPC die Granulosazellen ermitteln. Ähnliche Befunde wurden von Lee und Dunbar (1993) für das Kaninchen und von Martinez et al. (1996) für den Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) mitgeteilt. Erstaunlicherweise werden beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), der als Amphibie eigentlich größere Verwandtschaft zu Vögeln besitzt als der Säuger, die ZP-Glykoproteine weder in der Leber noch in den Granulosazellen gebildet, sondern es werden bei dieser Spezies alle Proteine von der Oozyte selbst synthetisiert (Yamaguchi et al., 1989). Gleiches gilt für die Regenbogenforelle (Hyllner et al., 2001) und die Goldbrasse (Modig et al., 2006).

Da voraussichtlich in naher Zukunft die Gen-Sequenz aller Perivitellinmembran-Komponenten der Japanischen Wachtel bekannt sein werden, wäre es nachfolgend interessant, mittels in-situ-Hybridisierung die Lokalisation der mRNAs aller Perivitellinmembranproteine im Ovar der Wachtel zur Klärung ihres zellulären Bildungsortes zu bestimmen.

Mit immunhistochemischen Methoden konnte ich in meiner Arbeit die Histotopographie verschiedener Intermediärfilamente im Ovar der Japanischen Wachtel darstellen. Intermediärfilamente sind neben Mikrotubuli und Mikrofilamenten wichtige Komponenten des Zytoskeletts. Sie liegen vor allem im perinuklearen Zellbereich, wobei sie den Kern geflechtartig umspannen und ihn so in seiner Position halten. Außerdem scheinen einzelne Intermediärfilamente Kontakt zur äußeren Kernmembran oder zu den Kernporen zu haben (Skalli und Goldman, 1991). Intermediärfilamente nehmen wichtige Funktionen bei der Zelldifferenzierung, Proliferation, der zellulären Morphogenese und bei der Ausbildung von Zell-zu-Zell-Kontakten wahr (Helfand et al., 2003). Alle Intermediärfilamente gehören einer Familie von strukturell homologen Zytoskelettproteinen an (Steinert et al., 1984).

Zu den Intermediärfilamenten zählt auch das Vimentin (Lazarides, 1980), ein Phosphoprotein, das im Zytoskelett eukaryotischer Zellen vorhanden ist. Es findet sich nahezu ausschließlich in Zellen, die mesenchymalen Ursprungs sind (Cabral und Gottesman, 1979; Gard und Lazarides, 1982). Zur Identifizierung von Vimentin im Ovar der Wachtel verwendete ich einen monoklonalen Antikörper gegen Vimentin aus der Maus. Die Vimentinreaktion zeigt sich hauptsächlich stark positiv in den Granulosazellen der Primordialfollikel und der prävitellinen Follikel (schwächer in atretischen Follikeln). In vitellinen Follikeln ist die positive Immunfärbung auf der basalen Seite der Granulosazellen konzentriert. Die Fibroblasten der Thekaschichten der vitellinen Follikel zeigen ebenfalls eine stark positive Reaktion (im Stroma eher schwach), ebenso die Endothelien der Gefäße, die Granulozyten, das Perineurium der Nerven, der Balbiani-Körper, gelegentlich das Bindegewebe und das Zytoplasma der Stromadrüsenzellen. Das Keimdrüsenepithel zeigt sich stark und gleichmäßig Vimentin-positiv. Marettóva und Marettá (2002) haben Vimentin in den Granulosazellen der Primär-,

Sekundär-, und Tertiärfollikel beim Schaf nachgewiesen, beim Baboon dagegen beschränkte sich die Reaktion auf die Tertiärfollikel.

Die Vimentinverteilung im Ovar entspricht ansonsten weitgehend der Beschreibung von Madekurozwa und Kimaro (2006) beim Strauß und Madekurozwa (2007) beim Emu. Ein Unterschied ergibt sich im Hinblick auf das Keimdrüsenepithel, welches bei der Wachtel stark Vimentin-positiv reagiert, beim Strauß (Kimaro, 2005) aber nur eine schwache Immunfärbung zeigt. Bei Atresie ist die Reaktion der Granulosazellen mit dem Vimentin-Antikörper im Allgemeinen schwächer als bei gesunden Follikeln. Außerdem sind die fibroblastenartigen Zellen, die in das Zytoplasma von untergehenden Oozyten einwandern, Vimentin- positiv. Die Abnahme der Immunreaktion bei den Granulosazellen könnte darauf hinweisen, dass das Vimentin-Gerüst, das ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts ist, bei Follikelatresie bald abgebaut wird.

Vimentin dient in der histopathologischen Diagnostik als Marker für epitheloide Sarkome, da diese im Allgemeinen stark Vimentin exprimieren. Eine Koexpression von Vimentin und Zytokeratin ist diagnostisch besonders verwertbar, da beide den „Immunphänotypen“ der Tumore charakterisieren (Arber et al., 1993). Studien beim Vogel existieren darüber meines Wissens jedoch noch nicht.

Zytokeratine stellen eine große Familie verschiedener Polypeptide dar und sind ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts von Epithelzellen. Sie werden von verschiedenen Epithelien in unterschiedlicher Kombination exprimiert. Dies macht sie zu einem wertvollen Marker für Epithelzelltumoren oder bei Blutuntersuchungen als Marker für Tumoren epithelialen Ursprungs. Immunhistochemisch werden dafür Antikörper gegen spezifische Zytokeratine eingesetzt (Galus und Wlodarski, 2007). In meiner Arbeit verwendete ich monoklonale Antikörper gegen Panzytokeratin (PanCK), Zytokeratin 15 (CK 15) und Zytokeratin 18 (CK 18) aus der Maus und einen polyklonalen Antikörper gegen Zytokeratin 5 (CK 5) aus dem Meerschweinchen. Die Keimdrüsenepithelzellen der Wachtel zeigen eine stark positive, perinukleare Reaktion mit den Antikörpern gegen PanCK und CK 5. Etwas schwächer reagieren einige Zellen der Theka externa. Es könnte sich hier um Fibroblasten handeln, denn nach den Beobachtungen von Zackroff et al. (1984) besitzen auch einige Fibroblasten-Zelllinien keratinartige Intermediärfilament-Proteine, die mit der Kernoberfläche verbunden sind. Die Reaktion mit dem Antikörper gegen CK 15 ist durchgehend negativ, die unregelmäßige Anfärbung des Keimdrüsenepithels mit dem CK-18-Antikörper in meinen Ergebnissen beruht möglicherweise auf Differenzierungsunterschieden der Epithelzellen. Insgesamt gewähren diese Versuche einen ersten Einblick in die Zytokeratin-Ausstattung der aviären Keimdrüsenepithelzellen. Dies könnte von Bedeutung für weiter führende Untersuchungen sein, da das Keimdrüsenepithel des Huhns und der Wachtel als Modell für humane ovariale Adenokarzinome eingesetzt werden kann (Giles et al., 2006).

Neben den Intermediärfilamenten untersuchte ich in meiner Arbeit immunhistochemisch auch die zelluläre Lokalisation eines kontraktiven Mikrofilaments des Zytoskeletts der glatten Muskelzellen,

das "smooth muscle actin". Dahl (1970 a) beobachtete in der Theka externa und im Ovarialstroma vom Huhn einige Zellen, die Mikrofilamente besaßen und klassifizierte diese Zellen als glatte Muskelzellen. Perry et al. (1978 a) und Gilbert (1979) beschrieben „smooth-muscle-like cells“ in der Theka externa und beobachteten im Zytoplasma dieser Zellen eine periphere Zone von Mikrofilamenten mit kontraktile Funktion. Diese mit kontraktile Elementen ausgestatteten Thekazellen sind beim Haushuhn schließlich ultrastrukturell als Fibroblasten identifiziert worden (Rothwell und Solomon, 1977; Perry et al., 1978 a). Van Nassauw et al. (1992) entdeckte bei diesen länglichen, thekalen Fibroblasten elektronenmikroskopisch ebenfalls Eigenschaften glatter Muskelzellen. Diese in ihrer Gesamtheit zusammengefaßten kontraktile Zellen wurden als „thekales kontraktiles System“ bezeichnet und spielt eine Rolle bei der Ovulation. Es scheint außer bei Vögeln auch bei allen Knochenfischen vorhanden zu sein (Schroeder und Talbot, 1985). Bei meinen immunhistochemischen Untersuchungen über die Verteilung von SMA im Ovar der Wachtel war eine positive Reaktion in der Thekaschicht der prävitellinen Follikel zu erkennen. Bei vitellinen Follikeln reagiert sowohl die Theka interna als auch die Theka externa positiv. Dieses Reaktionsmuster spricht für SMA-positive Fibroblasten (Myofibroblasten), die im Laufe des Follikelwachstums an Zahl zunehmen. Einige positive Fibroblasten konnte ich zusätzlich im intraovariellen Stroma entdecken. Bei atretischen Follikeln stellen sich fibroblastenartige Zellen, die ins Ooplasma eingewandert sind, ebenfalls positiv dar. Einen schmalen SMA-negativen Bereich konnte ich im Bereich zwischen den Granulosazellen und der positiven Theka interna beobachten.

Weiterhin sind die Chordae (Bündel glatter Muskelzellen in den äußeren Wänden um große, präovulatorische Follikel), sowie die Tunica albuginea stark SMA-positiv. Sie enthalten demnach glatte Muskelzellen oder Myofibroblasten. Eine positive Reaktion mit dem SMA-Antikörper zeigen auch die Tunica media der Gefäße und das Perineurium der Nerven. Die glatten Muskelzellen der Gefäße spielen wahrscheinlich eine Rolle bei deren Kontraktionsregelung. Meine Beobachtungen dieses "kontraktile Systems" und der Verteilung der glatten Muskelzellen stimmen weitgehend überein mit den Ergebnissen von Begovac und Wallace (1987) bei der Seenadel, von Van Nassauw et al. (1991) bei der Rotwangen-Schmuckschildkröte, von Van Nassauw und Callebaut (1991) und Van Nassauw et al. (1989; 1992) bei der Japanischen Wachtel von Madekurozwa und Kimaro (2006) beim Strauß, von Madekurozwa (2007) beim Emu und von Marettóva und Marettá (2002) beim Schaf.

Die Zunahme von SMA-positiven thekalen Fibroblasten während des Follikelwachstums bestätigt die Annahme von Van Nassauw et al. (1992), dass die Japanische Wachtel um ihren größten hierarchischen Follikel (F1, über 15 mm) ein „thekale kontraktile System“ besitzt, das hauptsächlich aus gut entwickelten glatten Muskelzellen der Theka externa besteht, unterstützt durch extrathekale glatte Muskelzellen der äußeren Follikelwände (Chordae) und der Tunica albuginea, die miteinander verbunden sind und so die Ovulation unterstützen können. Dieses System ist durchaus vergleichbar mit dem anderer Vertebraten. Es wäre interessant, die thekalen Fibroblasten kleiner Follikel mit denen

der reiferen Stadien zu vergleichen, da erstere weniger Aktinfilamente zu besitzen scheinen und sie deshalb nach Van Nassauw et al. (1992) bei der Wachtel als mögliche Vorläuferzellen der glatten Muskelzellen angesehen werden.

Konnexine sind Kanalproteine, die als Bestandteile der Gap Junctions als Zell-zu-Zell-Kanäle den schnellen Austausch von Ionen und hydrophilen Metaboliten bis zu einer molekularen Masse von 1 kD gewährleisten (Hervé, 2005). Gap Junctions spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Luteinisierung von Granulosazellen (Kidder und Mhawi, 2002). Konnexin 43 ist ein prominentes Gap-Junction-Protein, das von den Granulosazellen exprimiert wird und einen großen Teil zur Kopplung der Zellen beiträgt (Dekel, 1987; Grazul-Bilska et al., 1997; Farioli-Vecchioli et al., 2000; Sommersberg et al., 2000; Rosenfeld et al., 2001; Gittens et al., 2003). In meiner Arbeit inkubierte ich die Schnitte aus dem Ovar der Wachtel mit einem monoklonalem Antikörper gegen Konnexin 43 aus der Maus. Obwohl die Inkubationsbedingungen (Antikörperkonzentration, Inkubationszeiten, Inkubationstemperatur) und die Vorbehandlung der Schnitte variiert wurden, war das Ergebnis immer weitgehend negativ. Lediglich die Stromadrüsen-Zellverbände zeigen eine Konnexin 43-positive Reaktion an ihren lateralen Zellmembranen, was für das Vorkommen von Gap Junctions in dieser Lokalisation spricht.

Bei den Säugetieren spielt bei der Befruchtung die Zona pellucida eine bedeutende Rolle, da angenommen wird, dass sie speziesspezifische Rezeptoren besitzt, die die Akrosomenreaktion einleiten und durch strukturelle Veränderung der Zona eine Polyspermie verhindern (Florman und Ducibella, 2006). Die Proteinkomponenten der Zona pellucida (ZP1 bis ZP3) sind bei verschiedenen Spezies hochgradig homolog, es sind jedoch deutliche Unterschiede in ihrer Ausstattung mit N- und O-gebundenen Oligosacchariden vorhanden (Shalgi et al., 1986; Cornwall et al., 1991; Tulsiani et al., 1997). Beim Vogel erfolgt die Bindung des Spermiums mit dem Zona-pellucida-Äquivalent Perivitellinmembran (Stewart et al., 2004). Da jedoch öfter Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Vogelspezies möglich sind, kann man Einblicke in die phylogenetische Verwandtschaft unter den aviären Ordnungen gewinnen. Momentan gibt es ca. 1000 bekannte Beispiele aviärer Hybriden (Gray, 1958; Sibley, 1994).

Für die Spermienbindung scheinen insbesondere die Oligosaccharidseitenketten der Glykoproteine der Perivitellinmembran wichtig zu sein. Die positive Hemmung der Spermium-Ei-Bindung mit verschiedenen Zuckern und Polysacchariden oder auch durch Lektine unterstützt diese Hypothese (Shalgi et al., 1986; Cornwall et al., 1991; Mori et al., 1993; Tulsiani et al., 1997). Beim Menschen ist D-Mannose und bei der Ratte sind D-Mannose und α -Methyl-Mannoside als Hemmzucker für die Spermienbindung beschrieben worden (Mori et al., 1989).

Mittels Lektin histochemie konnten bestimmte Glykane und ihre Verteilung in den Zonae pellucidae verschiedener eukaryotischer Spezies identifiziert werden (Skutelsky et al., 1994) Dazu wurden vor

allem markierte Pflanzenlektine eingesetzt (Rüdiger und Gabius, 2001). Damit wurden die Zuckerstrukturen der *Zonae pellucidae* verschiedener Haussäugetiere (Parillo et al., 1996; 1998), von Maus, Ratte und Hamster (Nicholson et al., 1975; Wu et al., 1984; Avilés et al., 1994) sowie von verschiedenen weiteren Nutztieren (Skutelski et al., 1994) näher charakterisiert.

Florman und Wassarman (1985) und Chen et al. (1998) nahmen an, dass O-gebundene Oligosaccharide des Zona-Glykoproteins ZP3 bei der Maus verantwortlich für die Spermienbindung sind. Möglicherweise spielen aber auch N-gebundene Oligosaccharide dabei eine Rolle (Noguchi und Nakano, 1993). Yurewicz et al. (1992) zeigten, dass vor allem O-gebundene Kohlenhydrate von ZPB beim Schwein als Spermienrezeptoren dienen. Drei Monosaccharide dürften für die primäre Spermienbindung besonders wichtig sein: β -N-Acetylglukosamin (GlcNAc), α -Galaktose (Gal) und L-Fukose (Miller et al., 1992; Litscher et al., 1995; Johnston et al., 1998). Bei der aviären Perivitellinmembran nimmt man an, dass das Glykoprotein ZP1 besonders wichtig für die Bindung der Spermien ist (Okumura et al., 2004; Sasanami et al., 2004). Beim Huhn scheint ZPD eine Rolle bei der Spermienaktivierung zu spielen (Okumura, 2004). Ein direkter Nachweis, dass Kohlenhydrate der Perivitellinmembran eine wichtige Rolle bei der Spermienerkennung und Bindung spielen, liegt jedoch meines Wissens beim Vogel noch nicht vor.

In meiner Arbeit untersuchte ich daher mit lektinhistochemischen Methoden die Perivitellinmembran der Japanischen Wachtel (unter Verwendung der Pflanzenlektine Con A, LCA, PNA, RCA, SBA, DBA, WGA, WGA succinyliert, UEA I, MAL I, SNA und VAA), um erste Einblicke in das Glykosylierungsmuster dieses aviären Zona-pellucida-Äquivalents zu bekommen. Nach meinem Wissen sind bisher noch keine größeren lektin- oder glykohistochemischen Untersuchungen an der aviären Perivitellinmembran durchgeführt worden. Am Vogelovar wurden Lektine bisher nur eingesetzt, um Zuckerbindungsstellen von Primordialkeimzellen von Hühner- und Wachtelebryonen analysieren zu können, v.a. um deren Migration und Differenzierung näher zu studieren (Yoshinaga et al., 1992; Gheri et al., 2000; Armengol et al., 2007).

Die Ergebnisse der Lektinuntersuchungen sind von der Art der Fixierung abhängig (Allison, 1987). In meiner Arbeit wurden die Proben mit Bouin-Lösung bzw. 4% gepuffertem Formalin fixiert. Es zeigen sich jedoch nur geringfügige Unterschiede in der Intensität der Lektinbindung. Die Reaktion ist bei den Bouin-fixierten Proben in der Regel etwas stärker ausgeprägt. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Sonderstrom et al. (1984) überein.

Eine deutliche Bindung an der Perivitellinmembran der Wachtel konnte ich bei den FITC-markierten Lektinen LCA (α -D-Man), PNA (β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc), RCA (β -D-Gal), SBA (α -D-GalNAc, α -D-Gal), WGA und WGA succinyliert ((D-GlcNAc)²NeuNAc), sowie den biotinylierten Lektinen MAL I und SNA (NeuNAc) beobachten. In Klammern ist die jeweilige Zuckerstruktur angegeben, an die die einzelnen Lektine bevorzugt binden. Die am stärksten ausgeprägten Reaktionen zeigen WGA

und WGA succinyliert. Eine „Schichtung“ von Fluoreszenzintensitäten, von der einige Autoren bei Säuger-Zonae berichten, konnte ich aufgrund der geringen Breite der Perivitellinmembran nicht erkennen. Die Intensität der Lektinbindung an die Perivitellinmembran verstärkt sich jedoch für die meisten der untersuchten Lektine mit zunehmendem Follikelwachstum. Dies ist wohl dem vermehrten Einbau von glykanbesetzten ZP-Proteinen in die Perivitellinmembran während des Follikelwachstums zuzuschreiben. Im Zytoplasma der Granulosazellen ist bei den meisten Lektinfärbungen schon vorher das FITC-positive Glykoproteinmaterial im Golgi-Feld zu erkennen, ähnlich den Reaktionen der ZP-Antikörper in der Immunhistochemie. LCA und SBA zeigen zusätzlich sehr deutliche Reaktionen an den Basalmembranen (extrazelluläre Matrix) aller Follikelstadien, jedoch mit abnehmender Tendenz im Verhältnis zur Follikelgröße. Weiterhin reagieren LCA, PNA, WGA und WGA succinyliert stark mit dem Ooplasma der Primordialfollikel und der frühen prävitellinen Follikel. Eines der auffälligsten Ergebnisse, die stark positive Reaktion der Perivitellinmembran mit WGA, hat die Japanische Wachtel u.a. gemein mit der Zona pellucida des Schweins (Pastor et al., 2008), des Wildschweins (Parillo et al., 2001), des Schafs (Bollwein, 1998) und der einiger Beuteltiere (Chapman et al., 2000). Weiterhin stimmt die Bindung der Lektine WGA (N-Acetyl-Glukosamin- und Neuraminsäure-bindend) und LCA (D-Mannose-bindend) in der Perivitellinmembran mit den Beobachtungen von Geyer und Geyer (1998) zumindest dahingehend überein, dass die Zuckerreste Mannose und N-Acetyl-Glukosamin in den Zonae aller (von ihnen untersuchten) Spezies vorkommen. Sie identifizierten diese Glykane als Teile der Kernregion der N-gebundenen Oligosaccharide.

Um bei der Wachtel weitere Einsichten hinsichtlich der Mechanismen der Spermienbindung an die Perivitellinmembran zu erhalten, wären Knock-out-Studien angebracht, in denen bestimmte Glykoproteine aus der Perivitellinmembran selektiv ausgeschaltet werden könnten.

Insgesamt liefert die Glykohistochemie mit ihren Ergebnissen bei der Japanischen Wachtel einen ersten Einblick in die Glykanverteilung der aviären Perivitellinmembran. Ein weiterer, zukünftiger Schritt zur Identifizierung der Glykoproteine mit ihren sehr heterogenen Glykanketten und Glykosylierungsstellen wäre eine Isolation der Perivitellinmembran, eine Auftrennung der Glykoproteine und Ermittlung ihres Molekulargewichts mittels Gelelektrophorese, eine anschließende Abtrennung der Zucker mittels Glykosidasen (z.B. PNGase) und eine abschließende Analyse der Protein- und Zuckerkomponenten im Massenspektrometer. Hier wäre dann zumindest eine quantitative Messung einzelner Zuckerkomponenten möglich.

Bei ultrastrukturellen Untersuchungen am Ovar der Wachtel zeigt sich die einzelne Oozyte oberflächlich betrachtet und wie bereits für die Lichtmikroskopie beschrieben, zunächst von einer Granulosazellschicht und einer Theka interna und -externa (bzw. einer einheitlichen Thekaschicht bei kleinen Follikeln) umgeben. Bei reifem Follikelstadium ist zudem eine deutliche Zona radiata und die aviäre Perivitellinmembran zu erkennen.

Thekaschichten werden hauptsächlich von langen, spindelförmigen Zellen, den Fibroblasten gebildet, die meist zwei große Nucleoli in ihrem relativ heterochromatinreichen Kern enthalten. Mit zunehmender Follikelgröße scheinen die Fibroblasten länger gestreckt und flacher zu sein, als es bei kleinen Follikeln der Fall ist. Zwischen den Fibroblasten liegen gut ausgebildete Bündel von Kollagenfibrillen. Die zwischen den Fibroblasten lokalisierten Thekadrüsenzellen, sowie auch die Stromadrüsenzellen, enthalten Fettvakuolen, große Mitochondrien, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Vesikel und einige "electron dense bodies" (elektronendichte Körperchen). Die Thekazellen der vitellinen Follikelstadien werden von Rothwell und Solomon (1977) auch als „Theka-Lutein-Zellen“ bezeichnet.

Desweiteren finden sich in der Theka Blut- und Lymphgefäße, die von flachen Endothelzellen ausgekleidet werden, sowie Axone von marklosen Nerven, die von Schwann-Zellen umgeben sind. Meine Beobachtungen über die Ultrastruktur der Theka bei der Wachtel entsprechen weitgehend den Befunden, die von Perry et al. (1978 a) beim Haushuhn ermittelt wurden.

Die Granulosazellen enthalten Mitochondrien vom Cristae-Typ, Lysosomen, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Zisternen und lining bodies in ihrem Zytoplasma. Bei Atresie zeigen sich zusätzlich Fett-Vakuolen und „electron dense bodies“. Die Fettvakuolen enthalten nach Guraya (1989) beim Haushuhn Cholesterolester, was für eine Steroidhormonsynthese sprechen könnte. Dies könnte nach der vorliegenden Organellenausstattung auch für die Wachtel zutreffen.

Zwischen benachbarten Granulosazellen waren Gap Junctions, Tight Junctions und Desmosomen zu erkennen. Zwischen der Oozyte und den Granulosazellen, aber auch zwischen benachbarten Granulosazellen sind gut ausgebildete Interdigitationen erkennbar. Die apikalen, fingerförmigen Fortsätze der Granulosazellen bilden bei späten prävitellinen und vitellinen Follikeln die Zona radiata. Als Verbindungen der divertikelreichen Zellfortsätze zur Ooplasmamembran sind an den Spitzen vereinzelt Gap Junctions nachgewiesen worden. Andere Autoren, wie z.B. Wyburn et al. (1965 a), die ultrastrukturelle Untersuchungen beim Haushuhn durchführten, halten diese Zellkontakte dagegen eher für Desmosomen.

In meiner Arbeit habe ich „helle“ und „dunkle“ Granulosazellen bei prävitellinen Follikeln beobachten können. Die dunklen Formen besitzen lange, tentakelförmige Zellfortsätze, die sich sowohl in der Nähe der Basalmembran befinden, als auch tiefer in das Ooplasma hineinreichende Ausläufer, als die

der hellen Nachbarzellen aufweisen. Lipidvakuolen kommen im dunklen Zytoplasma ebenfalls vor. Obwohl die dunklen Granulosazellen, die sich nur vereinzelt zwischen den „normalen“ hellen Nachbarzellen befinden, von Guraya (1989) als degenerative Zellformen beschrieben worden sind, stimme ich aufgrund ihrer besonderen Morphologie eher mit der Annahme von Callebaut (1991) überein, dass es sich hier um Zellen handelt, die eine Transport- oder Rückhaltefunktion für den Oozytenstoffwechsel besitzen.

In meiner Arbeit sind desweiteren zahlreiche lining bodies (Transosomen) sowohl im Zytoplasma der Granulosazellen, als auch in ihren zytoplasmatischen Invaginationen, sowie auch im Ooplasma zu erkennen. Sie haben eine ovale Struktur und weisen mindestens zwei Membranen auf, wobei die innerste mit Ribosomen besetzt ist. Lining bodies sind bisher bei verschiedenen anderen Vogelarten (Press, 1964; Wyburn et al., 1965 a) und bei Schildkröten (Rahil und Narbaitz, 1973) beschrieben worden. Aufgrund des Transports der lining bodies von den Granulosazellen ins Ooplasma und ihrem gehäuften Vorkommen in eher jüngeren Follikeln, stimme ich mit der Annahme von Guraya (1976) überein, dass sie eine Rolle bei der Endozytose, Transport und Einlagerung des Dottermaterials in die Oozyte spielen könnten.

Die ovalen Zellkerne der Granulosazellen (sowie auch der anderen somatischen Zellen) der Wachtel besitzen zwei prominente Nucleoli und meist einige weitere, größere Heterochromatin-Aggregate. Gelegentlich ist auch im äußeren Bereich des Nucleoplasmas ein Heterochromatin-Saum sichtbar. In den Nucleoli stellt sich meist ein heller innerer und ein dunkler äußerer Bereich dar. Von Mirre und Stahl (1978) ist diese innere Region als „fibrilläres Zentrum“ bezeichnet worden, das ein Netzwerk von rDNA-Fibrillen und Proteinen enthält. Um diesen Bereich herum ist von den Autoren eine elektronendichtere fibrilläre Region beschrieben worden, in dem die Transkription stattfindet. Der äußerste dunkle Bereich wurde schließlich als fibrillo-granuläre Region (Heterochromatin) bezeichnet. Eine genaue Abgrenzung zwischen letzteren beiden Regionen konnte ich in meiner Arbeit meist auch im Elektronenmikroskop nicht erkennen. Möglicherweise könnten diese beiden Regionen mit weiterführenden, enzymatischen und autoradiographischen Techniken unterschieden werden. Die Nucleoli der Wachtel dienen jedoch aufgrund ihrer Größe und speziellen Morphologie als zelluläre Marker und wurden deshalb u.a. von Le Dourin (2008) für die Zellidentifikation bei Studien an Huhn-Wachtel-Chimären eingesetzt.

Die aviäre Perivitellinmembran der Wachtel stellt sich in meinen ultrastrukturellen Untersuchungen als grob vernetzte Schicht im extrazellulären Raum zwischen Granulosazellen und Oozyte dar, die sich zwischen die Fortsätze der Granulosazellen in die Zona radiata einlagert. Bei prävitellinen Follikeln ist das Material, durch das die Perivitellinmembran aufgebaut wird, teilweise noch im apikalen Bereich der Granulosazellen sichtbar. In meiner Arbeit ist ähnlich strukturiertes Material, das gleichfalls an der Bildung der Perivitellinmembran beteiligt sein könnte, zusätzlich im äußeren Bereich des Ooplasmas

zu finden, was darauf schließen lässt, dass die noch nicht näher charakterisierten Glykoproteine der Perivitellinmembran ganz oder teilweise von der Oozyte synthetisiert werden könnten.

Elektronendichte Stäbchen („electron dense rods“), wie sie Wyburn et al. (1965 a) und Perry et al. (1978 a) in der Perivitellinmembran des Haushuhns beschrieben haben, konnte ich bei meinen Untersuchungen dagegen nicht nachweisen. Eventuell zeigen sich solche Strukturen erst in sehr großen hierarchischen Follikelstadien.

Das Ooplasma der prävitellinen und vitellinen Follikel ist durch eine schmale Schicht von Filamenten im unteren Bereich der zytoplasmatischen Fortsätze der Granulosazellen charakterisiert. Callebaut (1991) vermutete, dass es sich hier um Aktinfilament-Bündel handelt, die das Ooplasma in ein Exoplasma und ein Endoplasma aufteilen. Im Exoplasma konnte ich abgeschnürte Vakuolen der Granulosazellen, einige kleine, helle Fettvesikel und lining bodies beobachten, jedoch war das vollkommene Fehlen von Mitochondrien auffällig. Diese waren ausschließlich im Endoplasma lokalisiert. Die Befunde stimmen mit den Ergebnissen von Callebaut (1991) überein, der zudem durch eine lipidkonservierende Fixationsmethode lipoidale Elemente im Exoplasma finden konnte. Gleicher Autor konnte bei der Japanischen Wachtel weiterhin „interzelluläre Brücken“ zwischen Granulosazellen und den Oozyten nachweisen, und nahm daher an, dass Lipidmaterial von den Granulosazellen in das Exoplasma der Oozyten transportiert wird.

Im Ooplasma - in Kontakt mit der Kernmembran - konnte ich in meiner Arbeit den Balbiani-Körper auffinden, der sich zunächst grob als dunkle, dicht gepackte Ansammlung von Organellen darstellte. Er enthält zahlreiche Mitochondrien, Golgi-Vesikel, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, Fettvakuolen, elektronendichte und verschiedene, unterschiedlich geformte Granula. Das Vorkommen von "chromatoid bodies" lässt auf das Vorkommen von RNA-Proteinkomplexen im Bereich des Balbiani-Körpers schließen und deutet auf den Balbiani-"Kernkörper" hin. Der Aufbau des Balbiani-Körpers ist bereits von Guraya (1976) bei verschiedenen anderen Vogelspezies beschrieben worden und seine Zusammensetzung lässt darauf schließen, dass er eine aktive Rolle bei der Synthese von Dottervorläufermaterial spielt.

Von De Somer (1905) sind bei frühen Follikeln des Haushuhns erstmals Fettvakuolen im Ooplasma beschrieben worden, die sich um den Balbiani-Körper herum anlagern. Diese sind auch von mir mit ultrastruktureller Methodik bei der Japanischen Wachtel nachgewiesen worden. Basierend auf obiger Beschreibung des Transports von Lipidmaterial von Callebaut (1991) vermute ich, dass diese Lipide von den Granulosazellen gebildet und von dort ins Ooplasma (Exoplasma) transportiert werden.

Das Ovar der Japanischen Wachtel wurde in meiner Arbeit mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden morphologisch eingehend charakterisiert. Aufbau und Lage der Follikel entspricht weitgehend der Beschreibung, die Guraya (1976) Perry et al. (1978 a) und Gilbert (1979) bei verschiedenen anderen Vogelarten gegeben haben. Besonders interessant ist das von Stewart et al. (2004) bezeichnete Zona-pellucida-Äquivalent der Vögel, die Perivitellinmembran, weil sie bei der Befruchtung eine entscheidende Rolle spielt. Sie ist wesentlich dünner als die Zona pellucida der Säuger und besteht nach Wyburn (1965 a) wie diese aus einem Netzwerk von Glykoproteinfibrillen.

Meine Arbeit bestätigt immunhistochemisch die Ergebnisse von Sato et al. (2009), die erstmals die Anwesenheit des (beim Säuger nicht vorkommenden) ZPD bei der Japanischen Wachtel nachweisen konnten. Weiterhin konnte ich erstmals immunhistochemisch ZPA in kleinen vitellinen Follikeln nachweisen. Obwohl die Syntheseorte Leber und Granulosazellen für ZP1, ZPC und ZPD von Sasanami et al. (2003 a), Pan et al. (2001) und in meiner Arbeit durch RNA-in-situ-Hybridisierung bestätigt worden sind, zeigen die von mir gemachten immunhistochemischen und ultrastrukturellen Beobachtungen am Ooplasma der Wachtel die Möglichkeit auf, dass evtl. noch nicht näher beschriebene Glykoproteine ganz oder teilweise auch in der Oozyte synthetisiert werden, wie dies nach jüngsten Ergebnissen von Kinoshita et al. (2009) bei ZPA zu sein scheint. Dies würde mit Befunden an zahlreichen Säugetierarten übereinstimmen, bei denen die Zona pellucida sowohl von der Oozyte als auch von den umgebenden Granulosazellen gebildet wird (Sinowatz et al., 2001).

Die Glykoproteine, deren Fasern die Matrix der Perivitellinmembran bilden, werden nach meinen Beobachtungen zu verschiedenen Zeitpunkten in diese eingebaut bzw. kann sich ihre Präsenz auch reduzieren. Eine Kooperation von „früh“ (ZPA) oder „spät“ (ZP1 und ZPD) eingelagerter Glykoproteine bei der Netzbildung der Perivitellinmembran erscheint möglich. Dies lässt insgesamt auf eine dynamische Veränderung der Matrix schließen - sie scheint keine „starre“ Struktur zu sein.

In meiner Arbeit wird erstmals mittels Lektinhistochemie ein Überblick über die Glykanverteilung in der Perivitellinmembran gewährt. Die Saccharidketten der Glykoproteine spielen nach Florman und Ducibella (2006) eine entscheidende Rolle u.a. als speziesspezifische Spermienrezeptoren. In Fortsetzung meiner Arbeit wäre es sinnvoll, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie die genaue Charakterisierung der sehr heterogen glykosylierten Zona-Proteine weiter voranzutreiben, um so die Funktionen der verschiedenen Proteine und ihrer Kohlehydratanteile besser verstehen zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Wachteln gelten als wichtige Modelltiere für Infektionsstudien am Huhn und weiterhin für embryologische Fragestellungen. Sie sind aufgrund ihres kurzen Generationsintervalls, ihrer relativ hohen Krankheitsresistenz und Legefrequenz sowie ihres im Vergleich zum Säugetier leichten Zugriffs auf alle Embryonalstadien für die Entwicklungsbiologie von besonderer Bedeutung. Auch könnten zukünftig an Wachteln, wie bereits beim Haushuhn beschrieben, verschiedene Ovarialkarzinome des Menschen studiert werden.

Das Verständnis über Aufbau und Funktion des aviären Ovars als Reproduktionsorgan kann weiterhin wichtige Grundlagen für das Verständnis des Fortpflanzungsvorgangs oder die künstliche Befruchtung gefährdeter Vogelspezies liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ovar der Japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurde das Organ mit Hilfe von konventionellen Färbungstechniken, Transmissionselektronenmikroskopie, Glyko- und Immunhistochemie sowie RNA-in-situ-Hybridisierung in seiner Gesamtheit eingehend morphologisch charakterisiert.

Der makroskopische und mikroskopische Aufbau des gesunden Ovars der Japanischen Wachtel weicht morphologisch deutlich von dem des Säugers ab, weist aber natürlich große Ähnlichkeiten mit dem anderer Vögel auf.

Die aviäre Oozyte mit ihrer Ooplasmamembran ist von der Perivitellinmembran und den Granulosazellen umgeben. Letztere werden durch eine Basalmembran von den Thekaschichten und dem Stroma abgetrennt. Oozyte und Granulosazellen bilden eine Funktionseinheit. Diese wird aufgrund unterschiedlicher Morphologie entweder als Primordialfollikel, früher bzw. später prävitelliner Follikel oder vitelliner Follikel bezeichnet. Hauptkriterium der vitellinen Follikel ist die Dottereinlagerung. Im Vergleich zum Säuger nimmt die Größe und der Dottergehalt der Oozyte während der Follikelentwicklung wesentlich stärker zu.

Die Granulosazellen zeigen, wie für Zellen mesenchymalen Ursprungs typisch, das phosphoprotein-haltige Intermediärfilament Vimentin in ihrem Zytoskelett. Bei allen Follikelstadien konnte immunhistochemisch eine Basalmembran nachgewiesen werden, deren Laminagehalt mit dem Oozytenwachstum deutlich zunahm. Weiterhin konnten in den Wänden größerer Follikel kontraktile Myofibroblasten identifiziert werden, die vermutlich die Ovulation des sprungreifen Follikels unterstützen. Nach außen ist das Ovar von isoprismatischen Keimdrüsenepithelzellen umgeben, welche die Intermediärfilamente CK 5 und PanCK sowie Vimentin enthalten.

Wie bei Säugern und anderen Vogelspezies zeigte sich auch im Ovar der Wachtel Atresie in allen Follikelstadien. Die ins Ooplasma der atretischen vitellinen Follikel eingewanderten Theka- und Granulosazellen differenzieren sich zu sogenannten Stromadrüsenzellen. Diese lagern sich zu Clustern zusammen und existieren nach vollständigem Untergang des Follikels im Stroma weiter.

Ultrastrukturell weisen sie u.a. größere Fettvakuolen in ihrem Zytoplasma auf, was auf die Produktion von Steroidhormonen schließen lassen könnte. Meine Untersuchungen lassen weiterhin vermuten, dass es sich hier um das aviäre Äquivalent des Gelbkörpers der Säuger handelt.

Bei der Fortpflanzung der Vögel spielt die Perivitellinmembran, die als Zona-pellucida-Äquivalent der Säugetiere gesehen werden kann, eine wichtige Rolle. Über ihre Struktur und Zusammensetzung lagen bei der Wachtel bisher nur bruchstückhafte Ergebnisse vor. Mit Antikörpern gegen verschiedene Glykoproteine der Perivitellinmembran der Wachtel konnte ich in meiner Arbeit den Aufbau und das zeitliche Muster der Bildung der Perivitellinmembran näher charakterisieren. Dabei konnten ZP1 und ZPC, ihre Syntheseorte, sowie ZPA und das beim Säuger nicht vorhandene Glykoprotein ZPD lokalisiert werden. Interessant ist, dass die ZP-Glykoproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Eizellentwicklung in die Perivitellinmembran eingebaut werden bzw. ihr Anteil sich auch wieder verringert, wie es bei ZPA zu sein scheint. Dies lässt auf eine „dynamische Umstrukturierung“ der Matrix während der Follikulogenese schließen.

Durch die RNA-in-situ-Hybridisierung wurde die Expression von ZP1 in der Leber und von ZPC in den Granulosazellen nachgewiesen. Die immun- und elektronenmikroskopischen Beobachtungen von ZP-Glykoproteinmaterial im äußeren Bereich des Ooplasmas lassen hier ebenfalls einen Syntheseort vermuten. Es könnte sich dabei um jenen von ZPA handeln.

Für Rezeptorenfunktion, Spermiadhäsion und als selektive Barriere am aviären Zona-pellucida-Äquivalent spielen weiterhin die heterogenen Saccharidketten der ZP-Glykoproteine eine wesentliche Rolle. Durch erstmaliges „Glykan-Mapping“ an der Perivitellinmembran konnten hier mit Hilfe von Pflanzenlektinen die Zuckerketten α -D-Man, β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc, β -D-Gal, α -D-GalNAc + α -D-Gal, (D-GlcNAc)²NeuNAc, und NeuNAc identifiziert werden. Durch ergänzende Studien mit biochemischen oder molekularbiologischen Techniken könnten zukünftig Einblicke in die Einzelfunktionen der Zuckerketten beim aviären Fertilisationsprozess und damit in die Gesamtfunktion der Perivitellinmembran gewonnen werden.

7 SUMMARY

Histological, histochemical and ultrastructural studies of the ovary of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)

Quails are important models for studying infectious diseases of birds and for basic developmental problems. Recently they have also proposed as a model system for human ovary carcinomas.

Additionally, studies on the reproductive tract of quails can provide important information on reproduction in birds and contribute to save avian species in danger of extinction.

The knowledge about structure and function of the avian ovary as reproduction organ can further deliver important fundamentals for insights in reproductional processes or in vitro fertilization of endangered avian species.

In my study, I analysed the ovary of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) using light- and electron microscopic techniques. Thereby the ovaries of adult quails have been examined by means of conventional staining techniques, ultrastructural analysis via transmission electron microscope, glyco- and immunohistochemical analysis as well as RNA in situ hybridisation.

The morphology of the healthy Japanese quail ovary shows many of the features found in other bird species but deviates clearly from the mammalian ovary. Using morphological criteria, primordial follicles, early and late previtellogenic follicles or vitellogenic follicles can be discerned. The avian oocyte of a vitellogenic follicle is surrounded by the perivitelline membrane and the granulosa cell layer. The latter is separated from the theca layers and the ovarian stroma by a basement membrane. A main feature of vitellogenic follicles is the accumulation of yolk. In comparison to mammals, size and yolk content of the oocyte are considerably increased during follicular development. Oocyte and granulosa cells act as a functional unit.

Like other cells of mesenchymal origin, the granulosa cells show intermediate filaments consisting of vimentin in their cytoskeleton. At all stages of follicular development a basement membrane was found beneath the granulosa cell layer. Its amount of laminin increases noticeably during follicular growth. Furthermore contractile myofibroblasts have been found within the walls of larger follicles. Their contractions probably support ovulation of the mature follicle. The ovary is covered by a layer of isoprismatic ovarian surface epithelial cells which contain the intermediate filaments CK 5 and PanCK as well as vimentin.

Like in mammals and other bird species the ovary of the quail shows atresia of follicles at all stages of their development. Thecal and granulosa cells infiltrate the remnants of the ooplasm of atretic vitellogenic follicles and differentiate to so called interstitial gland cells. These cells form clusters within the stroma after complete degeneration of the follicle. Their cytoplasm contains large lipid vacuoles which may be involved in the production of steroid hormones. Moreover, these results clearly suggest that these glands could be the avian equivalent to the mammal corpus luteum.

The perivitelline membrane, which may be considered as the homologue of the mammalian zona pellucida, plays an important role in the avian fertilisation process. My data shows a characteristic pattern of expression of each of the four studied zona pellucida glycoproteins during the formation of the perivitelline membrane. The glycoproteins (ZP1, ZPA, ZPC and ZPD) were incorporated into the perivitelline membrane at different times. Thereby, the amount of ZPA decreases during late folliculogenesis.

RNA in situ hybridisation technique demonstrates the expression of ZP1 in the liver and of ZPC in the granulosa cells. Immunohistochemical and ultrastructural observations of ZP-glycoprotein material in the ooplasm supports the idea, that ZPA may be synthesized by the oocyte during certain periods of follicle growth.

The heterogeneous sugar residues of the zona pellucida glycoproteins, which form the perivitelline membrane, may play an important role as sperm receptors and act as barrier for sperm penetration. By "glycan mapping", which has been done for the first time on an avian perivitelline membrane, the sugar residues α -D-Man, β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc, β -D-Gal, α -D-GalNAc + α -D-Gal, (D-GlcNAc)²NeuNAc, and NeuNAc could be identified using the corresponding plant lectins. Additional studies are needed using biochemical and molecular biological techniques to fully clarify the roles of these glycans in the fertilisation process of birds.

8 VERZEICHNISSE

8.1 Literaturverzeichnis

Adashi, E. Y. (1992)

The potential relevance of cytokines to ovarian physiology
J Steroid Biochem Mol Biol 43: 439-444

Adashi, E. Y., C. E. Resnick, A. Hurwitz, E. Ricciarelli, E. R. Hernandez (1991)

Insulin-like growth factors: the ovarian connection
Hum Reprod 6: 1213-1219

Ahne, W., H.-G. Liebich, M. Stohrer, E. Wolf (2000)

Zoologie
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York: 268-276

Aitken, R. N. C. (1966)

Postovulatory development of ovarian follicles in the domestic fowl
Res Vet Sci 7: 138-142

Allison, R. T. (1987)

The effects of various fixatives on subsequent lectin binding to tissue sections
Histochem J 19: 65-74

Arber, D. A., P. L. Kandalaf, P. Mehta, H. Battifora (1993)

Vimentin-negative epithelioid sarcoma. The value of an immunohistochemical panel that includes CD34
Am J Surg Pathol 17: 302-307

Armengol, C., A. Carretero, V. Nacher, J. Ruberte, M. Navarro (2007)

Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation
J Anat 210: 98-111

Asem, E. K., B. L. Marrone, F. Hertelendy (1985)

Steroidogenesis in ovarian cells of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)
Gen Comp Endocrinol 60: 353-360

Asem, E. K., S. R. Stingley-Salazar, J. P. Robinson, J. J. Turek (2000)

Identification of some components of basal lamina of avian ovarian follicle
Poult Sci 79: 589-601

Ashizawa, K., G. J. Wishart, A. R. Katayama, Y. Tsuzuki (2004)

Protein phosphatase type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa
J Reprod Fertil 128: 783-787

Avilés, M., J. A. Martínez-Menárguez, M. T. Castells, J. F. Madrid, J. Ballesta (1994)

Cytochemical characterization of oligosaccharide side chains of the glycoproteins of rat zona pellucida: an ultrastructural study
Anat Rec 239: 137-149

Bahr, J. M., S.-C. Wang, M. Y. Huang, F. O. Calvo (1983)

Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen
Biol Reprod 29: 326-334

Bain, J. M., J. M. Hall (1969)

Observations on the development and structure of the vitelline membrane of the hen's egg: an electron microscope study
Aust J Biol Sci 22: 653-665

Bakst, M. R., B. Howarth Jr. (1977)

Hydrolysis of hen's perivitelline layer by cock sperm in vitro
Biol Reprod 17: 370-379

Barondes, S. H. (1988)

Bifunctional properties of lectins: lectins redefined
Trends Biochem Sci 13: 480-482

Bausek, N., M. Waclawek, W. J. Schneider, F. Wohrab (2000)

The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver
J Biol Chem 275: 28866-28872

Beck, K., I. Hunter, J. Engel (1990)

Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein
FASEB J 4: 148-160

Begovac, P. C., R. A. Wallace (1987)

Ovary of the pipefish, *Syngnathus scovelli*

J Morphol 193: 117-133

Bellairs, R., M. Harkness, R. D. Harkness (1963)

The vitelline membrane of the hen's ovum: a chemical and electron microscopical study

J Ultrastruct Res 8: 339-359

Bhujle, B. V., V. B. Nadkarni, M. A. Rao (1979)

Steroid synthesizing cellular sites in the ovary of the domestic pigeon, *Columbia livia* (Gmelin): a histochemical study

Histochemical J 11: 253-265

Birkhead, T. R., F. Fletcher (1994)

Numbers of spermatozoa attached to and penetrating perivitelline layers of Japanese quail eggs

The Auk 111: 997-1000

Bleil, J. D., P. M. Wassarman (1980)

Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida

Dev Biol 76: 185-202

Bollwein, T. (1998)

Histologische und histochemische Untersuchungen am Ovar des Hausschafes

Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Bork, P., C. Sander (1992)

A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor

FEBS Lett 300: 237-240

Bramwell, R. K., B. Howarth (1992)

Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum

Biol Reprod 47: 1113-1117

Bruzzone, R., T. W. White, D. A. Goodenough (1996)

The cellular internet: on-line with connexins

Bioessays 18: 709-718

Burgeson, R. E., M. Chiquet, R. Deutzmann, P. Ekblom, J. Engel, H. Kleinman, G. R. Martin, G. Meneguzzi, M. Paulsson, J. Sanes, et al. (1994)

A new nomenclature for the laminins

Matrix Biol 14: 209-211

Burley, R. W., D. V. Vadehra (1989)

The avian egg: chemistry and biology

John Wiley & Sons, New York

Cabral, F., M. M. Gottesman (1979)

Phosphorylation of the 10-nm filament protein from Chinese hamster ovary cells

J Biol Chem 254: 6203-6206

Callebaut, M. (1979)

The avian ovary is an open organ. A study of the lacunar system

Anat Embryol 158: 103-119

Callebaut, M. (1988)

The ovarian chordolacunar system in birds

Arch Biol (Bruxelles) 99: 1-15

Callebaut, M. (1991)

Light- and electron-microscopic observations on the relationship between prelampbrush oocytes and surrounding granulosa cells in the laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)

Reprod Nutr Dev 31: 461-471

Callebaut, M., R. - J. Sijens, L. Van Nassauw (1990)

Evolution of the avian ovarian follicle wall during its expansion

Eur Arch Biol 101: 77-87

Callebaut, M., L. Van Nassauw (1986)

Immunocytochemical demonstration of desmin by monoclonal antibodies in the holding apparatus of the quail ovarian follicle walls

IRCS Med Sci 14: 916-917

Chalana, R. K., S. S. Guraya (1979 a)

Correlative morphological and cytochemical observations on the nucleoli and nuclear bodies during avian oogenesis

Z Mikrosk Anat Forsch 93: 449-457

Chalana, R. K., S. S. Guraya (1979 b)

Morphological and histochemical observations on the primordial and early growing oocytes of crow (*Corpus splendens*) and myna (*Acridotheres tristis*)

Poult Sci 58: 225-231

Chapman, J. A., O. W. Wiebkin, W. G. Breed (2000)

Interspecific variation of zona pellucida glycoconjugates in several species of marsupial

J Reprod Fertil 119: 111-120

Chen, J., E. S. Litscher, P. M. Wassarman (1998)

Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm

Proc Natl Acad Sci USA 95: 6193-6197

Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, J. M. Hardwick (1997)

Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases

Science 278: 1966-1968

Chowdhury, V. S., Y. Yoshimura (2002)

Cell proliferation and apoptosis in the anterior pituitary of chicken during inhibition and resumption of laying

Gen Comp Endocrinol 125: 132-141

Cohen, G. M. (1997)

Caspases: the executioners of apoptosis

Biochem J 326: 1-16

Colognato, H., D. A. Winkelmann, P. D. Yurchenko (1999)

Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network

J Cell Biol 145: 619-631

Cornwall, G. A., D. R. Tulsiani, M. C. Orgebin-Crist (1991)

Inhibition of the mouse sperm surface alpha-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro

Biol Reprod 44: 913-921

Dahl, E. (1970 a)

Studies on the fine structure of ovarian interstitial tissue. 2. The ultrastructure of the thecal gland of the domestic fowl

Z Zellforsch Mikrosk Anat 109: 195-211

Dahl, E. (1971 b)

Studies on the fine structure of ovarian interstitial tissue. 1. A comparative of the fine structure of the ovarian interstitial tissue in the rat and the domestic fowl

J Anat 108: 275-290

Darie, C. C., M. L. Biniossek, L. Jovine, E. S. Litscher, P. M. Wassarman (2004)

Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry

Biochemistry 43: 7459-7478

Darling, L., L. Darling (1963)

"Birds"

John Dickinson, Northampton

Dekel, N. (1987)

Interaction between the oocyte and the granulosa cells in the preovulatory follicle

In: Endocrinology and physiology of reproduction (Eds.: Armstrong, D. T., H. G. Freisen, P. C. K. Leung, W. Moger, K. B. Ruf)

Plenum Publishing, New York: 197-209

De Somer, E. (1905)

Les premiers stades de la vitellogenèse dans l'ovule de la poule

Ann Soc Med Gand 85: 55-63

Dominic, C. J. (1961)

A study of the atretic follicles in the ovary of the domestic pigeon

Proc Nat Acad Sci India-B: XXXI

Dunbar, B. S., S. Avery, V. Lee, S. Prasad, D. Schwahn, E. Schwoebel, S. Skinner, B. Wilkins (1994)

The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and development expression

Reprod Fertil Dev 6: 331-347

Dunbar, B. S., S. V. Prasad, T. M. Timmons (1991)

Comparative structure and function of mammalian zona pellucida

In: A comparative overview of mammalian fertilization (Eds.: Dunbar B. S., M. G. O'Rand)

Plenum Press, New York, London

Elkin, R. G., M. B. Freed, S. A. H. Danetz, C. A. Bidwell (1995)

Proteolysis of Japanese quail and chicken plasma apolipoprotein B and vitellogenin by cathepsin D: similarity of the resulting protein fragment with egg yolk polypeptides

Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 112: 191-196

Epifano, O., L. Liang, M. Familiari, M. C. Moos, J. Dean (1995)

Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis

Development 121: 1947-1956

Erpino, M. J. (1969)

Seasonal cycle of reproductive physiology in black-billed magpie

Condor 71: 267-279

Erpino, M. J. (1973)

Histogenesis of atretic ovarian follicles in a seasonally breeding bird

J Morphol 139: 239-249

Etches, R. J., F. Croze, C. E. Duke (1981)

Plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, testosterone and estradiol in follicular and peripheral venous plasma during the ovulation cycle of the hen

In: Adv Physiol Sci, Vol. 33: Recent advances of avian endocrinology (Eds.: Pethes, G., P. Peczely, P. Rudas)

Pergamon and Akademiai Kiado, New York, Budapest: 89-98

Farioli-Vecchioli, S., S. Raes, M. Espeel, F. Roels, K. D'Herde (2000)

Inverse expression of peroxisomes and connexin-43 in the granulosa cells of the quail follicle

J Histochem Cytochem 48: 167-178

Fessler, J. H., L. I. Fessler (1989)

Drosophila extracellular matrix

A Rev Cell Biol 5: 309-339

Fitzgerald, T. C. (1969)

Female reproductive system

In: The Coturnix quail: Anatomy and histology

The Iowa State University Press, Ames, Iowa: 258-260

Florman, H. M., T. Ducibella (2006)

In: Physiology of reproduction, 3rd edition, Vol. 1 (Ed.: Neill, J. D.)

Elsevier Academic Press, St. Louis, MO, USA: 55-112

Florman, H. M., P. M. Wassarman (1985)

O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity

Cell 41: 313-324

Folkman, J., M. Klagsbrun, J. Sasse, M. Wadzinski, D. Ingber, I. Vlodavsky (1988)

A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane

Am J Pathol 130: 393-400

Fredrickson T. N. (1987)

Ovarian tumors of the hen

Environ Health Perspect 73: 35-51

Fukuda, M. (2000)

Roles of cell surface carbohydrates in cell adhesion; in particular those for sialyl Lewis x and polysialic acid

Seikagaku 72: 269-283

Gabius, H.-J. (2001)

Glycohistochemistry: The why and how of detection and localization of endogenous lectins

Anat Histol Embryol 30: 3-31

Gabius, H.-J., S. Gabius (1993)

Detection of tumor-associated expression of carbohydrate-binding proteins (lectins). The use of neoglycoproteins and neoglycoenzymes in glycohistochemical and glyco cytological studies

Methods Mol Biol 14: 263-275

Gabius, H.-J., S. Gabius (1997)

Glycosciences

Chapman & Hall, Germany

Galus, R., K. Wlodarski (2007)

Cytokeratin detection as a diagnostic tool in oncology

Pol Merkur Lekarski 23: 209-211

Gard, D. L., E. Lazarides (1982)

Cyclic AMP-modulated phosphorylation of intermediate filament proteins in cultured avian myogenic cells

Mol Cell Biol

Geiger, B. (1987)

Intermediate filaments. Looking for a function

Nature 329: 392-393

Georgatos, S. D., G. Blodel (1987 a)

Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments

J Cell Biol 105: 105-115

Georgatos, S. D., G. Blodel (1987 b)

Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope

J Cell Biol 105: 117-127

Geyer, H., R. Geyer (1998)

Strategies for glycoconjugate analysis

Acta Anat 161: 135-148

Gheri, G., E. Sgambati, S. Gheri Bryk (2000)

Lectin binding in the ovary of the chick embryo and newborn

Eur J Morphol 38: 51-62

Gilbert, A. B. (1967)

The formation of the egg in the domestic chicken

In: Advances in reproductive physiology, Vol. 1 (Ed.: McLaren, A.)

Logos Press, London: 111-180

Gilbert, A. B. (1971 b)

The ovary

In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl, Vol. 3 (Eds.: Bell, D. J., B. M. Freeman)

Academic Press, London, New York: 1163-1208

Gilbert, A. B. (1979)

Female genital organs

In: Form and function in birds, Vol. 1 (Eds.: King, A. S., J. McLelland)

Academic Press, London

Gilbert, A. B., M. M. Perry, D. Waddington, M. A. Hardie (1983)

Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*)

J Reprod Fertil 69: 221-227

Giles, J. R., L. M. Olson, P. A. Johnson (2006)

Characterization of ovarian surface epithelial cells from the hen: a unique model for ovarian cancer

Exp Biol Med (Maywood) 231: 1718-1725

Gittens, J. E., A. A. Mhawi, D. Lidington, Y. Quелlette, G. M. Kidder (2003)

Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis

Am J Physiol Cell Physiol 284: 880-887

Goldsmith, J. B. (1928)

The history of the germ cells in the domestic fowl

J Morphol 46: 275-315

Goldstein I. J., R. D. Poretz (1986)

Isolation, physiochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins

In: The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine (Ed.: Liener, I. E., N. Sharon, I. J. Goldstein)

Academic Press, New York, London

González-Morán, G. (1998)

Effect of follicle-stimulating hormone on different cell sub-populations in the ovary of newly hatched chicks treated during embryonic development

Br Poult Sci 39: 128-132

Gonzalez del Pliego, M., G. Gonzalez-Moran, E. Pedernera (1988)

Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin

Cell Tissue Res 253: 665-670

Goudet, G., S. Mugnier, I. Callebaut, P. Monget (2008)

Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates

Biol Reprod 78: 796-806

Gray, A. P. (1958)

Bird hybrids: a check list with bibliography

Tech. Comm. 13 of Commonwealth Bureau Anim. Breed. Genet. Commonwealth Agricultural Bureau, Bucks, UK

Grazul-Bilska A. T., L. P. Reynolds, D. A. Redmer (1997)

Gap junctions in the ovaries

Biol Reprod 57: 947-957

Greenwald, G. S. (1978)

Follicular activity in the mammalian ovary

In: The vertebrate ovary (Ed.: Jones, R. E.)

Plenum Press, New York: 639-689

Groebbels, F. (1937)

Der Vogel

Gebrüder Borntraeger, Berlin

Grzimek, B. (1969)

Grzimeks Tierleben, Band 8, Vögel II

Verlag Helmut Kindler, Zürich

Gupta, S. K., A. B. Gilbert, M. A. Walker (1988)

Histological study of follicular atresia in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*)

J Reprod Fertil 82: 219-225

Guraya, S. S. (1959)

Histochemical studies of lipids in oocytes IV. Lipids in the oogenesis of *Gallus domesticus*, *Streptopelia senegalensis* and *Streptopelia decaocto*

Res Bull Punjab Univ 10: 119-130

Guraya, S. S. (1976)

Correlative cytological and histochemical studies on the avian oogenesis

Z Mikrosk Anat Forsch 90: 91-150

Guraya, S. S. (1976 a)

Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid synthesizing cellular sites in the non-mammalian vertebrate ovary

Int Rev Cytol 44: 365-409

Guraya, S. S. (1976 b)

Morphological and histochemical observations on follicular atresia and interstitial gland tissue in the columbid ovary

Gen Comp Endocrinol 30: 534-538

Guraya, S. S. (1989)

Ovarian follicles in reptiles and birds

In: Zoophysiology, Vol. 24

Springer Verlag, Berlin

Guraya, S. S., R. Chalana (1976)

Histochemical observations on the seasonal fluctuations in the follicular atresia and interstitial gland tissue in the house sparrow

Poult Sci 55: 1881-1885

Hamazaki, T. S., Y. Nagahama, I. Iuchi, K. A. Yamagami (1989)

A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*

Dev Biol 133:101-110

Hammond, R. W., W. H. Burke, F. Hertelendy (1981 a)

Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotropins

Biol Reprod 24: 1048-1055

Harris, J. D., D. W. Hibler, G. K. Fontenot, K. T. Hsu, E. C. Yurewicz, A. G. Sacco (1994)

Cloning and characterization of the zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families

DNA Seq 4: 361-393

Hartung, M., A. Stahl (1976)

Incorporation of tritiated uridine during pachytene and diplotene stages in the oocyte of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)

Experientia 32: 96-98

Hashimoto, Y., B. Vollmerhaus, H. Roos, H. Waibl, H. E. König (1986)

Development of the ovarian and oviduct arteries of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) after hatching

Anat Histol Embryol 15: 337-343

Helfand, B. T., L. Chang, R. D. Goldman (2003)

The dynamic and motile properties of intermediate filaments

Annu Rev Cell Dev Biol 19: 445-467

Hervé, J. C. (2005)

The connexins

Biochim Biophys Acta 1711: 97-98

Hodges, R. D. (1974)

In: The history of the fowl

Academic Press, London, New York

D'Hollander, F. (1904)

Recherches sur l'oogénèse et sur la structure et la signification du noyau, vitellin de Balbiani chez les oiseaux

Archs Anat Microsc 7: 117-180

Howarth, B., S. T. Digby (1973)

Evidence for the penetration of the hen's ovum by a trypsin-like acrosomal enzyme

J Reprod Fertil 33: 123-125

Hummel, G. (2000)

Anatomie und Physiologie der Vögel

Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart: 176-191

Hummel, S., A. Osanger, T. M. Bajari, M. Balasubramani, W. Halfter, J. Nimpf, W. J. Schneider (2004)

Extracellular matrices of the avian ovarian follicle. Molecular characterization of chicken perlecan

J Biol Chem 279: 23486-23494

Hutt, F. B. (1949)

Genetics of the fowl

McGraw-Hill, New York

Hyllner, S. J., L. Westerlund, P. E. Olsson, A. Schopen (2001)

Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins

Biol Reprod 64: 805-811

Imai, K., A. V. Nalbandov (1971)

Changes in the FSH activity of the anterior pituitary gland and of the blood plasma during the laying cycle of the hen

Endocrinology 88: 1465-1470

Inoue, S., C. P. Leblond (1988)

Three-dimensional network of cords: the main component of basement membranes

Am J Anat 181: 341-358

Ito, Y., M. Kihara, E. Nakamura, S. Yonezawa, N. Yoshizaki (2003)

Vitellogenin transport and yolk formation in the quail ovary

Zoolog Sci 20: 717-726

Johnson, A. L. (1986)

Reproduction in the female

In: Avian physiology, 4th edition (Ed.: Sturkie, P. D.)

Springer Verlag, New York: 403-431

Johnston, D.S., W. W. Wright, J. H. Shaper, C. H. Hokke, D. H. Van den Eijnden, D. H. Joziasse (1998)

Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide

J Biol Chem 273: 1888-1895

Jones, R. E. (1978)

Ovarian cycles in non-mammalian vertebrates

In: The vertebrate ovary (Ed.: Jones, R. E.)

Plenum Press, New York: 731-762

Jovine, L., C. C. Darie, E. S. Litscher, P. M. Wassarman (2005)

Zona pellucida domain proteins

Annu Rev Biochem 74: 83-114

Jovine, L., H. Qi, Z. Williams, E. Litscher, P. M. Wassarman (2002)

The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins

Nat Cell Biol 4: 457-461

Kanamori, A., K. Naruse, H. Mitani, A. Shima, H. Hori (2003)Genomic organization of ZP domain containing egg envelope genes in medaka (*Oryzias latipes*)

Gene 305: 35-45

Kannankeril, J. V., L. V. Domm (1964)The development of the ovary in the Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*

Anat Rec 148: 277-293

Kannankeril, J. V., L. V. Domm (1968)

Development of the gonads in the female Japanese quail

Am J Anat 123: 131-146

Kefalides, N. A., R. Alper, C. C. Clark (1979)

Biochemistry and metabolism of basement membranes

Int Rev Cytol 61: 167-228

Kern, M. D. (1972)Seasonal changes in the reproductive system of female white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelli* in captivity and in the field I. The ovary

Z Zellforsch Mikrosk Anat 126: 297-319

Kidder, G. M., A. A. Mhawi (2002)

Gap junctions and ovarian folliculogenesis

Reproduction 123: 613-620

Kimaro, W. H. (2005)An immunohistochemical and ultrastructural study of the ovary of the immature ostrich (*Struthio camelus*)

Dissertation, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria

King, A. S. (1975)

Aves urogenital system

In: Sisson and Grossman's "The anatomy of domestic animals", Vol. 2, 5th edition (Ed.: Getty, R.)

W. B. Saunders, Philadelphia

King, A. S., J. McLelland (1984)

Birds - Their structure and function (2. Auflage)

Baillière Tindall, London, Philadelphia, Toronto: 145-165

Kinoshita, M., D. Rodler, K. Sugiura, K. Matsushima, N. Kansaku, K. Tahara, A. Tsukada, H. Ono, T. Yoshimura, N. Yoshizaki, R. Tanaka, T. Sasanami (2009)

Zona pellucida protein ZP2 is expressed in the oocyte of Japanese quail (*Coturnix japonica*)

Manuskript, eingereicht für J Mol Biol

Kinsky, F. C. (1971)

The consistent presence of paired ovaries in the kiwi (*Apteryx*) with some discussion of this condition in other birds

J Orn (Leipzig) 112: 334-357

Klein-Szanto A. J. P. (1997)

Neoplastic and preneoplastic lesions of the mouse skin

In: Pathology of neoplasia and preneoplasia in rodents (Eds.: Bannasch P., W. Gössner)

Schattauer Verlag, New York: 6-7

Kocourek J., V. Hořejší (1983)

A note on the recent discussion on the definition of the term "lectin"

In: Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol. 3 (Eds.: Bøg - Hansen, T. C., G. A. Spengler)

De Gruyter Verlag, Berlin: 3-6

König, H. E., R. Korbel, H.-G. Liebich (2009)

Anatomie der Vögel - Klinische Aspekte und Propädeutik - (2. Auflage)

Schattauer Verlag, Stuttgart, New York: 157-168

Krysko, D. V., S. Mussche, L. Leybaert, K. D'Herde (2004)

Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells

J Histochem Cytochem 52: 1199-1207

Kubo, H., T. Kawano, S. Tsubuki, S. Kawashima, C. Katagiri, A. Suzuki (1997)

A major glycoprotein of *Xenopus* egg vitelline envelope, gp41, is a frog homologue of mammalian ZP3

Dev Growth Differ 39: 405-417

Kubo, H., T. Kawano, S. Tsubuki, M. Kotani, H. Kawasaki, S. Kawashima (2000)

Egg envelope glycoprotein gp37 as a *Xenopus* homologue of mammalian ZP1, based on cDNA cloning

Dev Growth Differ 42: 419-427

Kumagai, S., K. Homma (1974)

High estrogen production of the medium-sized follicles during follicular growth and ovulation in the laying quail

Endocrinol Jpn 21:349-354

Kumar, N. M., N. B. Gilula (1996)

The gap junction communication channel

Cell 84: 381-388

Laurie G. W., C. P. Leblond (1985)

Basement membrane nomenclature

Nature 313: 272

Lazarides, E. (1980)

Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space

Nature 283: 249-256

Leco K. J., R. Khokha, N. Pavloff, S. P. Hawkes, D. R. Edwards (1994)

Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues

J Biol Chem 269: 9352-9360

Le Douarin, N. M. (2008)

Developmental patterning deciphered in avian chimeras

Develop Growth Differ 50: 11-28

Le Douarin, N. M., M. Catala, C. Batini (1997)

Embryonic neural chimeras in the study of vertebrate brain and head development

Int Rev Cytol 175: 241-309

Lee, V. H., B. S. Dunbar (1993)

Developmental expression for the rabbit 55kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles

Dev Biol 155: 371-382

Lefievre, L., S. J. Conner, A. Salpekar, O. Olufowobi, P. Ashton, B. Pavlovic, W. Lenton, M. Afnan, I. A. Brewis, M. Monk, D. C. Hughes, C. L. R. Barratt (2004)

Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human

Hum Reprod 19: 1580-1586

Lehmann, F., E. Tiralongo, J. Tiralongo (2006)

Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function

Cell Mol Life Sci 63: 1331-1354

Liebich, H.-G. (2004)

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere (4. Auflage)

Schattauer Verlag, Stuttgart, New York: 293-310

Lindsay, L. L., M. A. Wallace, J. L. Hedrick (2001)

A hatching enzyme substrate in the *Xenopus laevis* egg envelope is a high molecular weight ZPA homolog

Dev Growth Differ 43: 305-313

Lindsay, L. L., J. C. Yang, J. L. Hedrick (2002)

Identification and characterization of a unique *Xenopus laevis* egg envelope component, ZPD

Dev Growth Differ 44:205-212

Lis, H., N. Sharon (1986)

Lectins as molecules and as tools

Ann Rev Biochem 55: 35-67

Litscher, E. S., K. Juntunen, A. Seppo, L. Penttilä, R. Niemelä, O. Renkonen, P. M. Wassarman (1995)

Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro

Biochemistry 34: 4662-4669

Llewelyn, C. A. (1981)

Conversion of progesterone to 20-hydroxy-4-pregnene-3-one by the preovulatory follicle in the hen (*Gallus domesticus*)

IRCS Med Sci 9: 859

Mackay, A. R., D. E. Gomez, D. W. Cottam, R. C. Rees, A. M. Nason, U. B. Thorgeirsson (1993)

Identification of the 72-kDa (MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase/type IV collagenase in preparations of laminin and matrigel

Biotechniques 15: 1048-1050

Madekurozwa, M.-C. (2007)

An immunohistochemical study of the distribution of intermediate filaments in the ovary of the emu (*Dromaius novaehollandiae*)

Anat Histol Embryol 36: 336-342

Madekurozwa, M.-C., W. H. Kimaro (2006)

A morphological and immunohistochemical study of healthy and atretic follicles in the ovary of the sexually immature ostrich (*Struthio camelus*)

Anat Histol Embryol 35: 253-258

Maravei, D. V., A. M. Trbovich, G. I. Perez, K. I. Tilly, D. Banach, R. V. Talanian, W. W. Wong, J. L. Tilly (1997)

Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells

Cell Death Differ 4: 707-712

Marettóva, E., M. Marettá (2002)

Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary

Acta Histochem 104: 431-434

Marrone, B. L., F. Hertelendy (1985)

Decreased androstenedione production with increased follicular maturation in theca cells from the domestic hen (*Gallus domesticus*)

J Reprod Fertil 74: 543-550

Marrone B. L., J. P. Wiebe, K. D. Buckingham, F. Hertelendy (1985)

Analysis of steroid metabolites produced by theca cells from the adult domestic hen

J Steroid Biochem 23: 375-378

Marshall, A. J. (1961)

Reproduction

In: Biology and comparative physiology of birds, Vol. 2 (Ed.: Marshall, A. J.)

Academic Press, London, New York: 169-213

Marshall, A. J., C. J. F. Coombs (1957)The interaction of environmental, internal, and behavioural factors in the rook, *Corvus f. frugilegus*
Linnaeus

Proc Zool Soc (London) 128: 545-589

Martin, G. R., R. Timpl (1987)

Laminin and other basement membrane components

Annu Rev Cell Biol 3: 57-85

Martinez, M. L., G. K. Fontenot, J. D. Harris (1996)The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys
(*Macaca fascicularis*)

J Reprod Fertil 50: 35-41

McCoy Jr., J. P. (1987)

The application of lectins to the characterization and isolation of mammalian cell populations

Cancer Metastasis Rev 6: 595-613

McLeskey, S. B., C. R. Dowds, R. Carballada, R. R. White, P. M. Saling (1998)

Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction

Int Rev Cytol 177: 57-113

Menkhorst, E., L. Selwood (2008)

Vertebrate extracellular preovulatory and postovulatory egg coats

Biol Reprod 79: 790-797

Miller, D. J., M. B. Macek, B. D. Shur (1992)Complementary between sperm surface β -1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding

Nature 357: 589-593

Mirre, C., A. Stahl (1978)

Peripheral RNA synthesis of fibrillar center in nucleoli of Japanese quail oocytes and somatic cells

J Ultrastruct Res 64: 377-387

Modig, C., T. Modesto, A. Canario, J. Cerda, J. von Hofsten, P. E. Olsson (2006)

Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in gilthead seabream (*Sparus aurata*)

Biol Reprod 75: 717-725

Mori, M., T. Daitoh, M. Irahara, M. Kamada, T. Aono (1989)

Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization

Am J Obstet Gynecol 161: 207-221

Mori, M., N. Masuda (1993)

Proteins of the vitelline membrane of quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs

Poult Sci 72: 1566-1572

Munari-Silem Y., B. Rousset (1996)

Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands. Molecular and functional aspects: a review

Eur J Endocrinol 135: 251-264

Nicholson, G. L., R. Yanagimachi, H. Yanagimachi (1975)

Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs

J Cell Biol 66:263-274

Nickel, Schummer, Seiferle (2004)

Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere Band V (3. Auflage)

Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg: 224-264

Noguchi, S., M. Nakano (1993)

Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3

Biochim Biophys Acta 1158: 217-226

Ohtsuki, M., A. M. Hanafy, M. Mori, T. Sasanami (2004)

Involvement of interaction of ZP1 and ZPC in the formation of quail perivitelline membrane

Cell Tissue Res 318: 565-570

Okumura, H., Y. Kohno, Y. Iwata, H. Mori, N. Aoki, C. Sato, K. Kitajima, D. Nadano, T. Matsuda (2004)

A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction

Biochem J 384: 191-199

Opel, H. (1967)

The time of release of ovulating hormone in the *Coturnix* quail as assessed by hypophysectomy

Poult Sci 46: 1302

Oudega, M., E. Marani (1991)

Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system

J Anat 179: 97-114

Pan, J., T. Sasanami, Y. Kono, T. Matsuda, M. Mori (2001)

Effects of testosterone on production of perivitelline membrane glycoprotein ZPC by granulosa cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*)

Biol Reprod 64: 310-316

Pan, J., T. Sasanami, M. Mori (2003)

Stimulation of ZPC production by follicle-stimulating hormone in the granulosa cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*)

J Poult Sci 40: 202-211

Parillo, F., G. Stradaoli, C. Dall'Aglio, A. Verini-Supplizi (1996)

Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry

Vet Res Commun 20: 225-236

Parillo, F., G. Stradaoli, A. Verini-Supplizi (1998)

Glycoconjugates in small antral ovarian follicles of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.)

Acta Histochem 100: 229-243

Parillo, F., S. Diverio, L. Todini, O. Fagioli (2001)

Histochemical detection of the lectin-binding carbohydrates in the zona pellucida during oocyte growth in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*)

Vet Res 32: 581-590

Pastor, L. M., X. Lucas, J. Pallares, C. M. Bernal-Manas, E. A. Martinez, J. Roca, J. M. Vasquez, E. Morales, E. Beltran, A. Zuasti, C Ferrer (2008)

Characterization of glycoside residues of porcine zona pellucida and ooplasm during follicular development and atresia

Mol Reprod Dev 75: 1473-1483

Paulson, J. L., M. D. Rosenberg (1972)

The function and transposition of lining bodies in developing avian oocytes

J Ultrastruct Res 10: 23-43

Pearl, R., W. F. Schoppe (1921)

Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl

J Exp Zool 34: 101-118

Pérez-Martinez, C., R. A. García-Fernández, A. Escudero, M. C. Ferreras, M. J. García-Iglesias (2001)

Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract

J Comp Path 124: 70-78

Perry, M. M., A. B. Gilbert, A. J. Evans (1978 a)

Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase

J Anat 125: 481-497

Press, N. (1964)

An unusual organelle in avian ovaries

J Ultrastruct Res 10: 528-546

Rabbani, M. G., T. Sasanami, M. Mori, N. Yoshizaki (2006)

Sperm-egg interaction is mediated by sperm-associated body in quail

Develop Growth Differ 48: 33-40

Rabbani, M. G., T. Sasanami, M. Mori, N. Yoshizaki (2007)

Characterization of the sperm-associated body and its role in the fertilization of the chicken *Gallus domesticus*

Develop Growth Differ 49: 39-48

Rahil, K., R. Narbaitz (1973)

Ultrastructural studies on the relationship between follicular cells and growing oocytes in the turtle *Pseudemys scripta elegans*

J Anat 115: 175-186

Repin, V. S., I. M. Akimova (1976)

A study of the protein composition of the zona pellucida of mammalian oocytes and zygotes by a method of microelectrophoresis in polyacrylamide gel

Biokhimiia 41: 50-57

Retzek, H., E. Steyrer, E. J. Sanders, J. Nimpf, W. J. Schneider (1992)

Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation

DNA Cell Biol 11: 661-672

Robertson, L., H. Brown, H. Staines, G. J. Wishart (1997)

Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs

J Reprod Fertil 110: 205-211

Robertson, L., G. J. Wishart, A. J. Horrocks (2000)

Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interaction in chickens

J Reprod Fertil 120: 397-403

Rodgers, R. J., H. F. Irving-Rodgers, D. L. Russell (2003)

Extracellular matrix of the developing ovarian follicle

Reproduction 126: 415-424

Rodgers, R. J., H. F. Irving-Rodgers, I. L. Van Wezel (2000)

Extracellular matrix in ovarian follicles

Mol Cell Endocrinol 163: 73-79

Romeis, B. (1989)

Mikroskopische Technik (17. Auflage)

Urban und Schwarzenberg, München

Rosenfeld, C. S., J. S. Wagner, R. M. Roberts, D. B. Lubahn (2001)

Intraovarian actions of oestrogen

Reproduction 122: 215-226

Rothwell, B., S. E. Solomon (1977)

The ultrastructure of the follicle wall of the domestic fowl during the phase of rapid growth
Br Poult Sci 18: 605-610

Rüdiger, H., H.-J. Gabius (1993)

Lectinologie: Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung
Dtsch Apoth Ztg 133: 2371-2381

Rüdiger, H., H.-J. Gabius (2001)

Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications
Glycoconj J 18: 589-613

Rüsse, I., F. Sinowatz (2008)

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere (3. Auflage)
Eigenverlag, München

Salomon, E.-V. (1993)

Lehrbuch der Geflügelanatomie
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York: 210-226

Sasanami, T., E. Atsumi, M. Toriyama, M. Mori (2003 b)

Asparagine-linked oligosaccharide-independent secretion of egg envelope glycoprotein ZPC of the Japanese quail (*Coturnix japonica*)
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 134: 631-638

Sasanami T., T. Murata, M. Ohtsuki, K. Matsushima, G. Hiyama, N. Kansaku, M. Mori (2007)

Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*)
Reproduction 133: 41-49

Sasanami, T., M. Ohtsuki, A. M. Hanafy, M. Mori (2004)

Accumulation of ZP1 and ZPC in quail perivitelline membrane during follicular development
J Poult Sci 41: 289-297

Sasanami, T., M. Ohtsuki, T. Ishiguro, K. Matsushima, G. Hiyama, N. Kansaku, Y. Doi, M. Mori (2006)

Zona pellucida domain of ZPB1 controls specific binding of ZPB1 and ZPC in Japanese quail (*Coturnix japonica*)
Cells Tissues Organs 183: 41-52

Sasanami, T., J. Pan, Y. Doi, M. Hisada, T. Kohsaka, M. Toriyama, M. Mori (2002)

Secretion of egg envelope protein ZPC after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells
Eur J Biochem 269: 2223-2231

Sasanami, T., J. Pan, M. Mori (1999)

FSH enhanced production of ZPC homologue of inner perivitelline membrane by quail granulosa cells
Nippon Kakin Gakkaishi 36: 343-353

Sasanami, T., J. Pan, M. Mori (2003 a)

Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in vivo treatment with diethylstilbestrol
J Steroid Biochem Mol Biol 84: 109-116

Sato, T., M. Kinoshita, N. Kansaku, K. Tahara, A. Tsukada, H. Ono, T. Yoshimura, H. Dohra, T. Sasanami (2009)

Molecular characterization of egg envelope glycoprotein ZPD in the ovary of Japanese quail (*Coturnix japonica*).
Reproduction 137: 333-343

Scanes, C. G., P. M. Godden, P. J. Sharp (1977)

A homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone: Observations of the ovulatory cycle
J Endocrinol 73: 473-481

Schnorr, B., M. Kressin (2006)

Entwicklung und Bau der Eizellen
In: Embryologie der Haustiere
Enke Verlag, Stuttgart: 16-22

Schroeder, P. C., P. Talbot (1985)

Ovulation in the animal kingdom: a review with an emphasis on the role of contractile processes
Gamete Res 11: 191-221

Schwarze, E., L. Schröder (1985)

Kompendium der Geflügelanatomie (4. überarbeitete Auflage)
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York: 145-160

Shalgi, R., A. Mityahu, L. Nebel (1986)

The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats

Biol Reprod 34: 446-452

Shanbhag, B. A., M. S. Nayak, A. B. Shanbhag, V. B. Nadkarni (1985)

Follicular atresia in the ovary of two species of quails, *Coturnix coromendalica* and *Perdicula argoondah*

Folia Morphol (Praha) 33: 280-283

Shannon, L. M., C. N. Hankins, A. D. Strosberg (1981)

Enzymatic phytohemagglutinins: Their relation to "classic" legume phytohemagglutinins

In: Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol. 1 (Ed.: Bøg - Hansen, T. C.)

De Gruyter Verlag, Berlin: 81-91

Shivers, C. A., B. S. Dunbar (1997)

Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause of infertility in women

Science 197: 1082-1084

Sibley, D. (1994)

A guide to finding and identifying bird hybrids

Birding 26: 162-177

Silverin, B. (1980)

Seasonal development of reproductive organs in the female pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca* and experimental studies on duration of her re-nesting ability

J Zool (London) 190: 241-257

Sinowatz, F., E. Töpfer-Petersen, S. Kölle, G. Palma (2001)

Functional morphology of the zona pellucida

Anat Histol Embryol 30: 257-263

Skalli, O., R. D. Goldman (1991)

Recent insights into the assembly, dynamics, and function of intermediate filament networks

Cell Motil Cytoskeleton 19: 67-79

Skutelsky, E., E. Ranen, R. Shalgi (1994)

Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes

J Reprod Fertil 100: 35-41

Smith, J., I. R. Paton, D. C. Hughes, D. W. Burt (2005)

Isolation and mapping the chicken zona pellucida genes: an insight into the evolution of orthologous genes in different species

Mol Reprod Dev 70:133-145

Sommersberg B., A. Bulling, U. Salzer, U. Fröhlich, R. E. Garfield, A. Amsterdam, A. Mayerhofer (2000)

Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone.

Biol Reprod 63: 1661-1668

Sonderstrom, K. O., R. Malmi, K. Karjalainen (1984)

Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid

Histochemistry 80: 575-579

Spargo, S. C., R. M. Hope (2003)

Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family

Biol Reprod 68: 358-362

Stahl, A., J. M. Luciani, M. Devictor, A. M. Copadano, M. Hartung (1975)

Heterochromatin and nucleolar organizers during first prophase of quail oocytes

Exp Cell Res 91: 365-371

Steinert, P. M., J. C. Jones, R. D. Goldman (1984)

Intermediate filaments

J Cell Biol 99: 22-27

Stewart, S. G., N. Bausek, F. Wohlrab, W. J. Schneider, A. J. Horrocks, G. J. Wishart (2004)

Species specificity in avian sperm:perivitelline interaction

Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 137: 657-663

Stryer, L. (1995)

Biochemie (4. Auflage)

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford: 357-359

Sugiyama, H., K. Murata, I. Iuchi, K. Nomura, K. Yamagami (1999)

Formation of mature egg envelope subunit proteins from their precursors (choriogenins) in the fish, *Oryzias latipes*: loss of partial C-terminal sequences of the choriogenins

J Biochem 125: 469-475

Sultana, F., K. M. Mao, N. Yoshizaki (2004)

Possible involvement of a sperm-associated body in the process of fertilization in quail
Zoolog Sci 21: 851-858

Sumner, J. B. (1919)

The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*
J Biol Chem 37: 137-142

Sumner, J., S. F. Howell (1936)

The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A
J Bacteriol 32: 227-237

Takeuchi, Y., K. Nishimura, N. Aoki, T. Adachi, C. Sato, K. Kitajima, T. Matsuda (1999)

A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression
Eur J Biochem 260: 736-742

Tian, J., H. Gong, W. J. Lennarz (1999)

Xenopus laevis sperm receptor gp69/64 glycoprotein is a homologue of the mammalian sperm receptor ZP2
Proc Natl Acad Sci U S A 96: 829-834

Timpl, R. (1989)

Structure and biological activity of basement membrane proteins
Eur J Biochem 180: 487-502

Timpl, R., J. C. Brown (1996)

Supramolecular assembly of basement membranes
Bioessays 18: 123-132

Thomson A. L. (1964)

In: A new dictionary of birds
Thomas Nelson and Sons, London

Traub, P. (1985)

Intermediate filaments: A review
Springer Verlag, Heidelberg

Trosko, J. E., R. J. Runch (1998)

Cell-cell communication in carcinogenesis

Front Biosci 15: 208-236

Tulsiani, D. R., H. Yoshida-Komiya, Y. Araki (1997)

Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event

Biol Reprod 57: 487-494

Van Nassauw, L., M. Callebaut (1991)

Structural and immunohistochemical aspects of the postovulatory follicle in Japanese quail

Anat Rec 229: 27-30

Van Nassauw, L., M. Callebaut, F. Harrisson, G. Daneels, M. Moeremans (1989)

Immunohistochemical localization of desmin in the quail ovary. Demonstration of a suspensory apparatus

Histochemistry 90: 371-377

Van Nassauw, L., M. Callebaut, F. Harrisson, D. W. Scheuermann (1992)

Smooth muscle cells in the walls of ovarian follicles in the Japanese quail

Cell Tissue Res 269: 49-56

Van Nassauw, L., F. Harrison, M. Callebaut (1990)

Localization of smooth muscle markers in the quail ovary

In: Advances in analytical cellular pathology (Eds.: Burger G., M. Oberholzer, G. P. Vooijs)

Excerpta Medica, Amsterdam: 101-102

Van Nassauw, L., F. Harrison, M. Callebaut (1991)

Localisation of smooth-muscle markers in the ovaries of some ectothermic vertebrates

Anat Rec 229: 439-446

Van Nassauw, L., F. Harrison, M. Callebaut (1992)

Immunolocalization of smooth muscle-like cells in the quail ovary

Eur J Morphol 30: 275-288

Van Nassauw, L., L. Tao, F. Harrisson (1999)

Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32

Acta Histochem 101: 103-112

Van Tienhoven, A. (1961)

Endocrinology of reproduction in birds

In: Sex and internal secretion, 3rd edition (Ed.: Young, W. C.)

Williams and Wilkins, Baltimore

Van Tyne, J., A. J. Berger (1958)

Fundamentals of ornithology

John Wiley, New York

Van Wezel, I. L., R. J. Rodgers (1996)

Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo

Biol Reprod 55: 1003-1011

Van Wezel, I. L., H. F. Rodgers, R. J. Rodgers (1998)

Differential localization of laminin chains in bovine follicles

J Reprod Fertil 112: 267-278

Vigny M., M. P. Ollier-Hartmann MP, M. Lavigne M, N. Fayein N, J. C. Jeanny JC, M. Laurent M, Y. Courtois Y (1988)

Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane-like structures and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor

J Cell Physiol 137: 321-328

Vo, L. H., J. L. Hedrick (2000)

Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein in *Xenopus laevis*

Biol Reprod 62: 766-774

Waclawek, M., R. Foisner, J. Nimpf, W. J. Schneider (1998)

The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells

Biol Reprod 59:1230-1239

Wallace, R. A. (1985)

Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates

In: Developmental biology: A comprehensive synthesis, Vol. 1 (Ed.: Browder, W. L.)

Plenum Press, New York: 127-166

Wassarman, P. M., S. Mortillo (1991)

Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida
Int Rev Cytol 130: 85-110

Watt, F. M. (1986)

The extracellular matrix and cell shape
Trends Biochem Sci 11: 482-485

Welty, J. C. (1962)

The life of birds
W. B. Saunders, Philadelphia

Wilson, W. O., R. H. Huang (1962)

A comparison of the time of ovipositing for chickens and quail (*Coturnix coturnix japonica*)
Poult Sci 41: 1843-1845

Wishart, G. J. (1997)

Quantitative aspects of sperm: egg interaction in chickens and turkeys
Anim Reprod Sci 48: 81-92

Wishart, G. J., A. J. Horrocks (2000)

Fertilization in birds
In: Fertilization in protozoa and metazoa animals (Eds.: Tarin, J. J., A. Cano)
Springer Verlag, Heidelberg: 193-222

Wright, C. S. (1977)

The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å resolution
J Mol Biol 111: 439-457

Wu, T. C., M. C. Lee, Y. J. Wan, I. Damjanov I. (1984)

Lectin binding sites of the mouse ovary, intraovarian and ovulated ova
Histochemistry 80: 527-533

Wyburn, G. M., R. N. C. Aitken, H. S. Johnston (1965 a)

The ultrastructure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl
J Anat 99: 469-484

Yamaguchi, S., J. L. Hedrick, C. Katagiri (1989)

The synthesis and localization of envelope glycoproteins on oocytes of *Xenopus laevis* using immunocytochemical methods

Dev Growth Differ 31: 85-94

Yang, J. C., J. L. Hedrick (1997)

cDNA cloning and sequence analysis of the *Xenopus laevis* egg envelope glycoprotein gp43

Dev Growth Differ 39: 457-467

Yoshimura, Y., M. Nishikori (2004)

Identification of apoptotic oocytes in the developing ovary of embryonic and post-hatched chicks in Japanese quail (*Coturnix japonica*)

J Poult Sci 41: 64-68

Yoshimura, Y., T. Okamoto, T. Tamura (1985)

Immunohistochemical observations on the distribution of fibronectin in hen's ovarian follicles

Jpn Poult Sci 22: 274-278

Yoshinaga, K., T. Fujimoto, M. Nakamura, H. Terakura (1992)

Selective lectin-binding sites of primordial germ cells in chick and quail embryos

Anat Rec 233: 625-632

Yoshizaki, N. (1992)

In vivo study of vitellogenin-gold transport in the ovarian follicle and oocyte of *Xenopus laevis*

Dev Growth Differ 34: 517-527

Yoshizaki, N., S. Yonezawa (1994)

Cathepsin D activity in the vitellogenesis of *Xenopus laevis*

Dev Growth Differ 36: 299-306

Yoshizaki, N., S. Yonezawa (1996)

Salt concentration-dependency of vitellogenin processing by cathepsin D in *Xenopus laevis*

Dev Growth Differ 38: 549-556

Yurchenko, P. D., J. C. Schittny (1990)

Molecular architecture of basement membranes

FASEB J 4: 1577-1590

Yurewicz, E. C., B. A. Pack, A. G. Sacco (1992)

Porcine oocyte zona pellucida M(r) 55,000 glycoproteins: identification of O-glycosylated domains
Mol Reprod Dev 33: 82-88

Zackroff, R. V., A. E. Goldman, J. C. R. Jones, P. M. Steinert, R. D. Goldman (1984)

The isolation and characterization of keratin-like proteins from cultured fibroblasts
J Cell Biol 98: 1231-1237

8.2 Verzeichnis der Abkürzungen

Aa	Arterie
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Aqua dest.	Aqua destillata
At	Arteriole
AtF	Atretischer Follikel
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bdg	Bindegewebe
Bdgz	Bindegewebszellen
BG	Basophiler Granulozyt
biot.	biotinyliert
Bk	Balbiani-Körper
BPA	Bauhinia purpurea Agglutinin
Br	Brustmuskulatur
Bs	Basalmembran
Bsl	Basallamina
Bt	Blutzellen
Ca	Kalzium
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
chk	chicken
CK	Cytokeratin
Con A	Canavalia ensiformis Agglutinin
CPP32	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
D	Darm
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
dcp	dense core particle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	Drüsenmagen
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dot	Dotterpartikel
Ds	Desmosom

DTh	Differenzierte Thekazelle
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
edb	electron dense body
EM	Elektronenmikroskop
End	Endothel
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ey	Erythrozyt
Ez	Endothelzelle
F1, F2, F3, F4, F5	Follikelgröße 1, 2, 3, 4, 5
Fa	Fettanhäufung
Fa.	Firma
Fb	Fibroblast
Fc	Fibrilläres Zentrum
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Ft	Fett-Tröpfchen
Fv	Fettvakuole
Gal	Galaktose
Gc	Golgi-Cisternae
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosaminsäure
Gdm	Gürteldesmosom
Gef	Gefäß(e)
GJ	Gap Junction
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosaminsäure
Gr	Granula
GSA	Griffonia simplicifolia Agglutinin
Gz	Granulosazellen
Gv	Golgi-Vesikel
H	Herz
Hc	Heterochromatin
Hcs	Heterochromatinsaum
H.E.	Hämalaun-Eosin
HPA	Helix pomatia Agglutinin
Id	Interdigitation
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java
kDa	Kilodalton

Kde	Keimdrüsenepithel
Kf	Kollagenfibrille
LAA	Laburnum alpium Agglutinin
lb	lining body (Transosom)
LBA	Lima Bean Agglutinin
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LFA	Limax flavus Agglutinin
LH	Luteinisierungshormon
LPA	Limulus polyphemus Agglutinin
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
Lu	Lumen
Ly	Lysosom
Lyb	Lymphoblast
Lym	Lymphgefäß
M, N	Molar, Normal
MAL	Maacia amurensis Agglutinin
Mm	Muskelmagen
Man	Mannose
Mi	Mitochondrium
Mp	Makrophage
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
mRNA	messenger ribonucleic acid
Mv	Multivesikuläre Vakuole
N	Nucleus
Nc	Nucleolus
Nm	Kernmembran
Np	Kernpore
N-gebunden	an Stickstoff gebunden
N-Terminus	Stickstoff-Ende
Neu5Ac	5-Acetyl-Neuraminsäure
nm	Nanometer
Nv	Nerv(en)
O-gebunden	an Sauerstoff gebunden
Oom	Ooplasmamembran
Op	Ooplasma
Ov	Ovar
PanCK	Pancytokeratin

PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii
PHA E	Phaeseolus vulgaris Agglutinin (Erythrozyten)
PHA L	Phaeseolus vulgaris Agglutinin (Leukozyten)
PNA	Peanut Agglutinin
PNGase	Peptide-N4-(acetyl- β -glucosaminy)- asparagine amidase
PvF	Prävitelliner Follikel
PoF	Primordialfollikel
PSA	Pisum sativum Agglutinin
Pvm	Perivitellinmembran
QRR	Glutamin-rich Repeat Region (Sequence)
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonucleic Acid
SAB	Sperm Associated Bodies
SB	Scalebar
SBA	Soybean Agglutinin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sdz	Stromadrüsen-Zellverband
Sg	Sekretorische Granula
SMA	Smooth Muscle Actin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SSC	Saline Sodium Citrate
St	Stroma
STA	Solanum tuberosum Agglutinin
SWF	Small White Follicles
SYF	Small Yellow Follicles
Te	Theka externa
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Th	Thekaschicht
Ti	Theka interna
Tr	Transosom
Tris	Trizma® Hydrochloride Buffer Solution
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling TdT = Terminal deoxynucleotidyl transferase

	dUTP = deoxyuridin-triphosphate
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
USB	Universal Serial Bus
VAA	Viscum album Agglutinin
Vc	Vakuole
VLDL	very low density lipoprotein
VF	Vitelliner Follikel
Vn	Venole
Vv	Vene
VVA	Visea villosa Agglutinin
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WGAs	Wheat Germ Agglutinin succinyliert
ZF	Zytoplasmatischer Fortsatz
ZP	Zona pellucida
Zr	Zona radiata
Zt	Zentriol

8.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Hormonverteilung in vitellinen Follikeln (Huhn) vor der Ovulation (nach Bahr et al., 1983).....	16
Abb. 2:	Schema der aviären Zona radiata (nach King, 1975).....	20
Abb. 3:	Höhe der Granulosazellen (Follikelepithel) im Vergleich zum Follikelstadium.....	52

8.4 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Einteilung der vitellinen Follikel (Wachtel) nach Sasanami et al. (2004).....	14
Tabelle 2:	Atresiestadien beim Strauß (Mdekurozwa und Kimaro, 2006).	18
Tabelle 3:	Zuckerspezifität der Lektine, Einteilung nach Goldstein und Poretz (1986).....	28
Tabelle 4:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lektine	38
Tabelle 5:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper	42
Tabelle 6:	Arbeitsschritte für die verwendeten Antikörper (X = notwendiger Schritt).....	43
Tabelle 7:	Bindungsstellen der verwendeten Lektine im Ovar der Wachtel	64
Tabelle 8:	Immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	75
Tabelle 9:	Immunhistochemischer Nachweis von Konnexin 43	77
Tabelle 10:	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	81
Tabelle 11:	Immunhistochemischer Nachweis von SMA	84
Tabelle 12:	Immunhistochemischer Nachweis von PCK	87
Tabelle 13:	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 5	90
Tabelle 14:	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18.	92
Tabelle 15:	Immunhistochemischer Nachweis von ZP1	96
Tabelle 16:	Immunhistochemischer Nachweis von ZPA (ZP2)	100

Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis von ZPC (ZP3)103

Tabelle 18: Immunhistochemischer Nachweis von ZPD.....107

8.5 Verzeichnis der Bilder

Bild 1 Freipräpariertes Ovar der Wachtel.....8

Bild 2 Freipräpariertes Ovar der Wachtel.....10

Bild 3 Übersicht über das gesamte Ovar, HE-Färbung54

Bild 4 Ovar Wachtel, Primordialfollikel, HE-Färbung.....54

Bild 5 Ovar Wachtel, frühe prävitelline Follikel, HE-Färbung54

Bild 6 Ovar Wachtel, frühe prävitelline Follikel, HE-Färbung54

Bild 7 Ovar Wachtel, prävitelliner Follikel, HE-Färbung55

Bild 8 Ovar Wachtel, prävitelliner Follikel, PAS-Färbung nach Amylase-Verdau55

Bild 9 Ovar Wachtel, später prävitelliner Follikel, HE-Färbung.....55

Bild 10 Ovar Wachtel, vitelliner Follikel, HE-Färbung55

Bild 11 Ovar Wachtel, großer vitelliner Follikel, HE-Färbung56

Bild 12 Ovar Wachtel, großer vitelliner Follikel, Alcianblau-Färbung, pH-Wert 2,5.....56

Bild 13 Ovar Wachtel, atretischer früher prävitelliner Follikel, HE-Färbung.....56

Bild 14 Ovar Wachtel, atretische Follikel, HE-Färbung56

Bild 15 Ovar Wachtel, atretischer später prävitelliner Follikel, HE-Färbung57

Bild 16 Ovar Wachtel, atretischer später prävitelliner Follikel, HE-Färbung57

Bild 17 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, HE-Färbung57

Bild 18 Ovar Wachtel, atretischer vitelliner Follikel, HE-Färbung.....57

Bild 19 Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Goldner-Färbung58

Bild 20	Ovar Wachtel, atretischer vitelliner Follikel, Goldner-Färbung	58
Bild 21	Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Goldner-Färbung	58
Bild 22	Ovar Wachtel, Stroma, Goldner-Färbung	58
Bild 23	Ovar Wachtel, Wand später prävitelliner Follikel und Primordialfollikel, Bindung mit WGA suc.	65
Bild 24	Ovar Wachtel, Wand atretischer vitelliner Follikel, Bindung mit WGA suc.	65
Bild 25	Ovar Wachtel, prävitelline und vitelline Follikelwand, Bindung mit WGA	66
Bild 26	Ovar Wachtel, atretischer später prävitelliner Follikel, Bindung mit WGA.....	66
Bild 27	Ovar Wachtel, prävitelline Follikel verschiedener Reife, Bindung mit WGA	67
Bild 28	Ovar Wachtel, späte prävitelline Follikel, Bindung mit WGA.....	67
Bild 29	Ovar Wachtel, sehr frühe prävitelline Follikel, Bindung mit LCA	68
Bild 30	Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Bindung mit LCA.....	68
Bild 31	Ovar Wachtel, Dotterpartikel im vitellinen Follikel, Bindung mit RCA.....	69
Bild 32	Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Bindung mit Con A	69
Bild 33	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel des Ovars, Bindung mit PNA.....	70
Bild 34	Ovar Wachtel, sehr früher prävitelliner Follikel, Bindung mit PNA.....	70
Bild 35	Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Bindung mit PNA.....	71
Bild 36	Ovar Wachtel, Interstitium (Stroma), Bindung mit PNA	71
Bild 37	Ovar Wachtel, Wand prävitelliner Follikel, Bindung mit SBA	72
Bild 38	Ovar Wachtel, Kern prävitelliner Follikel, Bindung mit DBA.....	72
Bild 39	Ovar Wachtel, prävitelline Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Laminin	74
Bild 40	Ovar Wachtel, später prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Laminin.....	74
Bild 41	Ovar Wachtel, Gefäß im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von Laminin.....	74
Bild 42	Ovar Wachtel, Nerven im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von Laminin.....	74

Bild 43	Ovar Wachtel, Stromadrüsen, Immunhistochem. Nachweis von Konnexin 43.....	76
Bild 44	Ovar Wachtel, Drüsen-Lumen, Immunhistochem. Nachweis von Konnexin 43.....	76
Bild 45	Ovar Wachtel, früher. prävit. Follikel. Immunhistochem. Nachweis von Vimentin.....	79
Bild 46	Ovar Wachtel, Wand spät. prävit. Follikel. Immunhistochem. Nachweis v. Vimentin.....	79
Bild 47	Ovar Wachtel, Rindenstroma, Immunhistochem. Nachweis von Vimentin.....	79
Bild 48	Ovar Wachtel, Gefäße im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von Vimentin.....	79
Bild 49	Ovar Wachtel, atret. prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Vimentin.....	80
Bild 50	Ovar Wachtel, atret. vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von Vimentin.....	80
Bild 51	Ovar Wachtel, Übersicht Stroma, Immunhistochem. Nachweis von SMA.....	83
Bild 52	Ovar Wachtel, Follikel und. Arterie, Immunhistochem. Nachweis von SMA.....	83
Bild 53	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von SMA.....	83
Bild 54	Ovar Wachtel, atret. Follikel und Vene, Immunhistochem. Nachweis von SMA.....	83
Bild 55	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von PCK.....	86
Bild 56	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von PCK.....	86
Bild 57	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von PCK.....	86
Bild 58	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von PCK.....	86
Bild 59	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel schräg, Immunhistochem. Nachweis von CK 5.....	89
Bild 60	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel groß, Immunhistochem. Nachweis von CK 5.....	89
Bild 61	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von CK 5.....	89
Bild 62	Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von CK 5.....	89
Bild 63	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von CK 18.....	91
Bild 64	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, Immunhistochem. Nachweis von CK 18.....	91
Bild 65	Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1.....	94

Bild 66	Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1.....	94
Bild 67	Ovar Wachtel, Wand vitelliner Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1.....	94
Bild 68	Ovar Wachtel, Follikel im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von ZP1.....	94
Bild 69	Ovar Wachtel, Wand F2-Follikel (15mm), Immunhistochem. Nachweis von ZP1.....	95
Bild 70	Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZP1.....	95
Bild 71	Ovar Wachtel, Wände prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	98
Bild 72	Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	98
Bild 73	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	98
Bild 74	Ovar Wachtel, kleiner Follikel im Stroma, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	98
Bild 75	Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	99
Bild 76	Ovar Wachtel, atretischer Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	99
Bild 77	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	99
Bild 78	Ovar Wachtel, hyalinisierter Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPA.....	99
Bild 79	Ovar Wachtel, Wand prävit. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPC.....	102
Bild 80	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPC.....	102
Bild 81	Ovar Wachtel, atret. vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPC.....	102
Bild 82	Ovar Wachtel, Stromadrüsenzellen, Immunhistochem. Nachweis von ZPC.....	102
Bild 83	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD.....	105
Bild 84	Ovar Wachtel, Wand vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD.....	105
Bild 85	Ovar Wachtel, Wand großer vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD.....	105
Bild 86	Ovar Wachtel, Wand F2-Follikel (ca 15mm), Immunhistochem. Nachweis von ZPD.....	105
Bild 87	Ovar Wachtel, atretischer vitell. Follikel, Immunhistochem. Nachweis von ZPD.....	106
Bild 88	Ovar Wachtel, Stromadrüsen-Zellverbände, Immunhistochem. Nachweis von ZPD.....	106

Bild 89	Ovar Wachtel, Nachweis von ZPC-mRNA, Antisense-Sonde	108
Bild 90	Leber Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Hepatozyten, Antisense-Sonde	109
Bild 91	Leber Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Hepatozyten, Sense-Sonde	109
Bild 92	Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Granulosazellen, Antisense-Sonde	110
Bild 93	Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZP1-mRNA in den Granulosazellen, Sense-Sonde.....	110
Bild 94	Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZPC-mRNA in den Granulosazellen, Antisense-Sonde	111
Bild 95	Ovar Wachtel, in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von ZPC-mRNA in den Granulosazellen, Sense-Sonde.....	111
Bild 96	Ovar Wachtel, Primordialfollikel, TEM	113
Bild 97	Ovar Wachtel, früher prävitelliner Follikel, TEM	114
Bild 98	Ovar Wachtel, prävitelline Follikelwand, TEM	115
Bild 99	Ovar Wachtel, Granulosazellen im Detail, TEM.....	116
Bild 100	Ovar Wachtel, Übersicht sehr früher prävitelliner Follikel, TEM.....	117
Bild 101	Ovar Wachtel, Balbiani-Körper, TEM.....	118
Bild 102	Ovar Wachtel, differenzierte Thekazelle, TEM.....	119
Bild 103	Ovar Wachtel, Übersicht prävitelliner Follikel, TEM	120
Bild 104	Ovar Wachtel, Ooplasmahalt prävitelliner Follikel, TEM.....	121
Bild 105	Ovar Wachtel, lining bodies an lateralen Zellmembranen, TEM	122
Bild 106	Ovar Wachtel, Übersicht früher prävitelliner Follikel, TEM.....	123
Bild 107	Ovar Wachtel, Kerne der Granulosazellen, TEM.....	124

Bild 108	Ovar Wachtel, Filamente im Ooplasma, TEM	127
Bild 109	Ovar Wachtel, Granulosazelle mit dunklem Zytoplasma, TEM.....	128
Bild 110	Ovar Wachtel, Wand eines prävitellinen Follikels, TEM.....	129
Bild 111	Ovar Wachtel, fortgeschrittene Atresie eines prävitellinen Follikels, TEM.....	130
Bild 112	Ovar Wachtel, vitelline Follikelwand mit Perivitellinmembran, TEM	131
Bild 113	Ovar Wachtel, Granulosazellen mit Perivitellinmembran, TEM.....	132
Bild 114	Ovar Wachtel, Theka externa eines atretischen vitellinen Follikels, TEM.....	133
Bild 115	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel, TEM	135
Bild 116	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithel und Theka, TEM	136
Bild 117	Ovar Wachtel, Keimdrüsenepithelzelle vergrößert, TEM	137
Bild 118	Undifferenzierter Stromadrüsenzellverband, TEM	139
Bild 119	Differenzierter Stromadrüsenzellverband, TEM	140
Bild 120	Fibroblasten und Kollagenfibrillen im Stroma, TEM.....	141
Bild 121	Kollagenfibrillen um einen Stromadrüsenzellverband, TEM.....	142
Bild 122	Blutzellen in Kapillaren, TEM.....	143
Bild 123	Lymphoblast zwischen Erythrozyten, TEM	144
Bild 124	Makrophage im Stroma, TEM.....	145
Bild 125	Lymphgefäß im Stroma, TEM.....	146
Bild 126	Lymphgefäß vergrößert, TEM.....	146

9 ANHANG (Methodik)

9.1 Lichtmikroskopie

9.1.1 Fixierung

Bouin'sche Lösung:	Gesättigte Pikrinsäure	1500 ml
	35% Formalin	500 ml
	Eisessig	100 ml
Formalin:	Verdünntes 35 % Formalin	1:10

9.1.2 Puffer

PBS-Puffer (pH 7,2-7,6):	NaCl	42,5 g
	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	6,35 g
	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,95 g
	Aqua dest.	ad 5 l
<u>TRIS-Puffer</u> (pH 7,4-7,6):	NaCl	43,9 g
	TRIZMA-Hydrochlorid	34,25 g
	TRIZMA-Base	4,5 g
	Aqua dest.	ad 5 l
<u>Citrat-Puffer</u> (pH 6,0):	Stammlösung A:	
	Citrat C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O	21,01 g
	Aqua dest.	ad 1 l
	Stammlösung B:	
	Natriumcitrat Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O	29,41 g
	Aqua dest.	ad 1 l
Gebrauchslösung:	Lösung A:	9 ml
	Lösung B:	41 ml
	Aqua dest.	ad 500 ml
<u>20 x SSC-Puffer</u> (pH 7,0):	NaCl	175,3 g
	Natriumcitrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	88,2 g
	Aqua dest.	ad 800 ml
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat C ₆ H ₁₀ O ₅	1,5 ml
	Aqua dest.	ad 2 l, danach autoklavieren

9.1.3 Lösungen

Hämalaun:	Hämatoxylin $C_{16}H_{14}O_6$	2 g
	Natriumiodat $INaO_3$	100 g
	Kalialaun $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	100 g
	Chloralhydrat $C_2H_3Cl_3O_2$	100 g
	Kristalline Zitronensäure	2 g
	Aqua dest.	2000 ml
Eosin:	Stammlösung: Eosin ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$)	2 g
	Aqua dest.	198 ml
	Gebrauchslösung : Eosin-Stammlösung	60 ml
	Eisessig Aqua dest.	8 Tropfen 600 ml
Wässrige Perjodsäure:	Perjodsäure $HIO_4 \cdot 2 H_2O$	0,5 g
	Aqua dest.	100 ml
Schwefeldioxid-Wasser:	10% Kaliumpyrosulfid	10 ml
	N Salzsäure	10 ml
	Leitungswasser	200 ml
Eisenhämatoxylin nach Weigert:	Lösung A: Hämatoxylin $C_{16}H_{14}O_6$ 96 % Ethanol	1 g 100 ml
	Lösung B: Eisen(III)chlorid $FeCl_3$ Aqua dest.	1,16 g 98 ml
Azophloxin:	Azophloxin $C_{18}H_{15}N_3O_8S_2$	0,5 g
	Eisessig	0,2 ml
	Aqua dest.	100 ml
Phosphormolybdänsäure-Orange:	Phosphorwolframsäure $H_3PW_{12}O_{40}$	3-5 g
	Orange G $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	2 g
	Aqua dest.	100 ml
Alcianblau (pH 1,0 / pH 2,5):	Alcianblau 8 GX	1 g
	Kernechtrot ($Al_2(SO_4)_3 \cdot x18H_2O$) ₃	2,5 g
	3% Essigsäure	100 ml
Lichtgrün:	Lichtgrün $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	0,1-0,2 g
	Eisessig	0,2 ml
	Aqua dest.	100 ml
DAB:	Stammlösung: PBS-Puffer (s. o.)	5 ml
	30 % H_2O_2	15 μ l
	Gebrauchslösung: Aqua dest.	60 ml
	Stammlösung DAB-Tabletten	0,4 ml 6 Stck
DAB (RNA-in-situ-Hybridisierung):	DAB+Chromogen	10 μ l
	DAB+Substrate Buffer	500 μ l
ABC-Lösung:	PBS-Puffer (s. o.)	5 ml
	StreptABCComplex-Lsg. A	1 Tropfen
	StreptABCComplex-Lsg. B	1 Tropfen

9.2 Elektronenmikroskopie

9.2.1 Lösungen

Lösung nach Karnovsky:	Stammlösung: 10% Paraformaldehydlösung (s. o.) 0,2 M Natriumcacodylat-Puffer (s. u.) Kalziumchlorid CaCl_2 , wasserfrei	20 ml 50 ml 0.05 g
	Gebrauchslösung: Stammlösung 25% Glutaraldehyd $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	10 ml 1,37 ml
Kontrastierungslösung:	2% Osmiumtetroxid-Lösung: 4% Osmiumtetroxid OsO_4 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (s. u.)	2 ml 2 ml
	3% Kaliumferrocyanid-Lösung: Kaliumferrocyanid $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (s. u.)	0,3 g ad 10 ml
	Osmiumtetroxid(1%)-Kaliumferrocyanid(1,5%) in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer: 2% Osmiumtetroxid-Lösung (s. o.) 3% Kaliumferrocyanid-Lösung (s. o.)	4 ml 4 ml
Bleicitratlösung nach Reynolds: (pH~12)	Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0,266 g
	Natriumcitrat $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,352 g
	Aqua dest.	6 ml
	1 N NaOH	ca. 1,6 ml, für pH-Wert
Uranylacetat:	Uranylacetat $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
	Aqua dest.	→ gesättigte Lösung
Methylenblau nach Richardson:	1% Methylenblau $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}$ in	
	1% Borax $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	1% Azur II	→ mischen 1:1

9.2.2 Puffer

Natriumcacodylat-Puffer:	Stammlösung:	
	Natriumcacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	8,56 g
	Aqua dest.	ad 200 ml
	0,2 M HCl	für pH-Wert
0,2 M Natriumcacodylat-Puffer: (pH 7,2)	Stammlösung	50 ml
	0,2 M HCl	tropfenweise
0,1 M Natriumcacodylat-Puffer: (pH 7,2)	0,2 M Natriumcacodylat-Puffer	50 ml
	Aqua dest.	ad 100 ml

9.2.3 Einbettung

Polyembed 812 BDMA:	Poly/Bed 812	20 ml
	DDSA	16 ml
	NMA	10 ml
	BDMA	1,4 ml

9.2.4 Ergänzung

Alcianblau 8GX	Fa. Merck, Darmstadt
Azur	Fa. Grübler, Stuttgart
Bleinitrat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borax	Fa. Serva, Heidelberg
Citrat	Fa. Merck, Darmstadt
DAB+Substrate Chromogen System	Fa. Dako, Hamburg
DAPI	Fa. Merck, Darmstadt
Einbettungsgießformen für EM	Fa. PLANO, Wetzlar
Grids-Hexagonal-Mesh®	Fa. Polysciences, Eppelheim
Glutaraldehyd	Fa. PLANO, Wetzlar
30% H ₂ O ₂	Fa. Merck, Darmstadt
Kernechtrot	Apothekenherstellung
Messer für Ultradünnschnitte	Fa. Reichert-Labtec, Wolfratshausen
Methylenblau	Fa. Grübler, Stuttgart
Natriumcitrat	Fa. Agar Aids, Stansted, UK
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
Orthochromatischer s/w-Film	Fa. PLANO, Wetzlar
Osmiumtetroxid	Fa. Polysciences, Eppelheim
Paraformaldehyd	Fa. PLANO, Wetzlar
PBS-Puffer	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Poly/bed 812	Fa. Polysciences, Eppelheim
Propylenoxid	Fa. Polysciences, Eppelheim
Pronase E®	Fa. VWR, Ismaning
Schiff'sches Reagenz	Fa. Merck, Darmstadt
Sonden für RNA-in-situ-Hybridisierung	Fa. Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
SSC-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Puffer	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Uranylacetat	Fa. Scientific LTD., Standsted, UK

10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, im Besonderen für die wissenschaftliche Beratung und die engagierte, geduldige und freundliche Betreuung als Doktorvater sehr herzlich bedanken.

Herrn Dr. F. Habermann danke ich sehr für seinen stets gewährten fachkundigen Rat, für seine Bereitstellung von wissenschaftlichem Material und für seine wertvolle Hilfe bei der Formatierung und Datenverarbeitung.

Frau C. Neumüller danke ich für die Einweisung in die Fluoreszenzmikroskopie und die Elektronenmikroskopie sowie für die jederzeit gewährte Hilfe bei EDV-Problemen aller Art. Ihre freundliche Begleitung meiner Arbeit und ihr Optimismus wird mir in Erinnerung bleiben.

Frau W. Scholz möchte ich für ihren engagierten Einsatz und ihre Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Aufnahmen danken.

Frau C. Zahn, Frau G. Rußmeier und Frau M. Vermehren danke ich für ihre gründliche Einarbeitung in die licht-, immun- und glykohistochemischen Techniken.

Frau Dr. R. Kenngott, Frau Dr. B. Schick, Frau K. Ebach und Frau S. Leidenfrost danke ich für ihre freundliche Hilfe bei Korrekturen, EDV, Organisation, für fachlichen Rat und auch für die Aufmunterung in schwierigen Phasen.

Frau M. Kazior danke ich für die zuverlässige Bearbeitung aller organisatorischen Angelegenheiten.

Herrn S. Baidl danke ich recht herzlich für das Ausdrucken meiner ersten Exemplare und für die EDV-Betreuung.

Many special thanks to Dr. T. Sasanami, University of Shizuoka, Japan, who provided me with antibodies and whose precious scientific advice, support and friendly communication is gratefully appreciated.

Frau P.-M. Kirsche möchte ich sehr herzlich für ihren engagierten Einsatz bei den Korrekturen danken, sowie für ihre hilfreichen Verbesserungsvorschläge und Beratungen im Layout.

Herrn D. Absolon danke ich für seine Unterstützung bei Grafik-Problemen und für die Photoshop-Unterweisung.

Dem Institut für Tierernährung, Oberwiesefeld, möchte ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Wachteln danken.