

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
Institut für Morphologie (Leiter: Univ.-Prof. Michal Kyllar)

## **Immunhistochemischer Nachweis der ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin im Ovar verschiedener Spezies**

Bachelorarbeit  
Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von Ismi Simsek  
Wien, im Juni 2023

Betreuerin: A.Univ. Prof.Dr. rer. nat Ingrid Walter

Gutachterin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Sabine Schäfer-Somi

### **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, am 02.06.2023

Ismi Simsek

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei der AG Histologie & Embryologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien für das großartige Bachelorpraktikum bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau A.Univ. Prof. Dr. rer. nat Ingrid Walter für die umfangreiche Betreuung, die hilfreichen Anregungen sowie konstruktive Kritik beim Erstellen dieser Bachelorarbeit. Außerdem möchte ich mich bei Herr Juraj Hlavaty, PhD. für die fachliche Unterstützung während der Durchführung der Methoden und für das Beantworten offener Fragen herzlichst bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. (FH) Claudia Höchsmann und Frau Mag. Olga Olszanska bedanken, welche mich mit großer Geduld und Hilfsbereitschaft in die Methoden eingeschult haben. Dem ganzen Team der AG Histologie & Embryologie gebührt mein Dank und meine Wertschätzung. Ich hatte eine echt großartige Zeit und bin morgens immer glücklich zum Bachelorpraktikum erschienen.

Abschließend gilt mein Dank vor allem meinen Eltern. Ich möchte Ihnen meinen Dank für Ihre finanzielle Unterstützung sowie für Ihre Motivation während meines gesamten Studiums aussprechen.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	ERM-Proteinfamilie .....	1
1.1.1.	Proteinstruktur der ERM-Proteine .....	1
1.1.2.	Aktivierung der ERM-Proteine .....	2
1.1.3.	Vorkommen der ERM-Proteine.....	3
1.2.	Histologie des Ovars.....	4
1.2.1.	Follikelreifung.....	4
1.2.2.	Primordialfollikel .....	5
1.2.3.	Primärfollikel .....	5
1.2.4.	Sekundärfollikel (präantraler Follikel).....	6
1.2.5.	Tertiärfollikel (Antralfollikel).....	6
1.2.6.	Follikelatresie .....	7
1.2.7.	Gelbkörper.....	7
1.3.	Fragestellung und Hypothese .....	8
2.	Material und Methoden.....	9
2.1.	Material.....	9
2.2.	Immunhistochemie .....	9
2.3.	Western Blot .....	11
2.3.1.	Homogenisieren von Gewebe/Zellen.....	12
2.3.2.	Proteinbestimmung.....	12
2.3.3.	Elektrophorese und Blotten .....	13
2.3.4.	Primär- und Sekundärantikörper .....	14
2.3.5.	GAPDH-Bestimmung .....	16
3.	Ergebnisse .....	18
3.1.	Immunhistochemie .....	18
3.1.1.	Moesin.....	18
3.1.2.	Ezrin.....	20
3.1.3.	Radixin .....	22
3.1.4.	Phospho-Ezrin.....	24
3.2.	Western-Blot .....	27
3.2.1.	Proteinbestimmung.....	27

3.2.2. Qualitative Auswertung.....	28
4. Diskussion.....	29
Zusammenfassung.....	32
Summary .....	33
Literaturverzeichnis.....	34
Abbildungsverzeichnis.....	36
Tabellenverzeichnis.....	37
Anhang .....	38

## 1. Einleitung

ERM-Proteine (Ezrin-Radixin-Moesin) spielen eine große Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung. In humanen Ovarialkarzinomen wurden ERM-Proteine nachgewiesen und wurden auch als Prognosemarker für verschiedene Tumorarten erkannt. Ovar-Tumore (zB. Granulosazelltumore) kommen auch in veterinärmedizinisch relevanten Spezies vor. Die Beurteilung dieser Proteine an durch Krebs veränderten Zellarten/Zellgruppen (Funktionsgebilde, Theca, Keimdrüsenepithel, Stroma, Eizellen) in Ovarien ist nicht möglich, ohne die Kenntnis der physiologischen Expressionsmuster dieser Proteine. Daten über das Vorhandensein und die Verteilung dieser Proteine im normalen Ovar liegen aber nicht vor.

### 1.1. ERM-Proteinfamilie

Das Aktin-Zytoskelett besteht aus Aktinpolymeren und vielen assoziierten Proteinen. Es spielt eine Rolle in der Zellteilung, der kortikalen Organisation und der Zellmotilität in Säugetierzellen. Das kortikale Aktin-Zytoskelett befindet sich direkt unter der inneren Oberfläche der Plasmamembran und dient sowohl der Struktur als auch der Signalübertragung von der Oberfläche in die Zelle (1). Mitglieder der ERM-Proteinfamilie spielen eine Vielzahl von Rollen in der Zellmigration, darunter die Vernetzung zwischen der Membran, den Rezeptoren und dem Aktin-Zytoskelett sowie der Regulierung von Signalmolekülen, die an der Adhäsion, Polarität und Migration von Zellen beteiligt sind (2).

#### 1.1.1. Proteinstruktur der ERM-Proteine

Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) sind drei hochgradig homologe Proteine der FERM (4.1-Band ERM) Superfamilie (3).

ERM-Proteine sind im Laufe der Evolution stark konserviert und weisen über 75 % Aminosäurehomologie innerhalb der FERM-Domäne und der F-Aktin-Bindungsstelle auf (4). ERM-Proteine bestehen aus einer FERM-Domäne (~ 300 aa) am N-Terminus, einer C-Terminus-Region (~ 100 aa) und einer  $\alpha$ -Helikalregion (~ 200 aa), die den C-Terminus und die FERM-Domäne verbindet (5). (Abb.1)

Die FERM-Domäne besteht aus drei kleeblattförmig angeordneten Lappen (F1, F2 und F3) und vermittelt die Verbindung zwischen ERM-Proteinen und bestimmten membrangebundenen Proteinen, die in Aktin-reichen Regionen lokalisiert sind. Die C-terminale Domäne, die auch als C-terminale ERM-assoziierte Domäne (C-ERMAD) bezeichnet wird, enthält die F-Aktin-Bindungsstelle, die die Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Plasmamembran vermittelt (6).

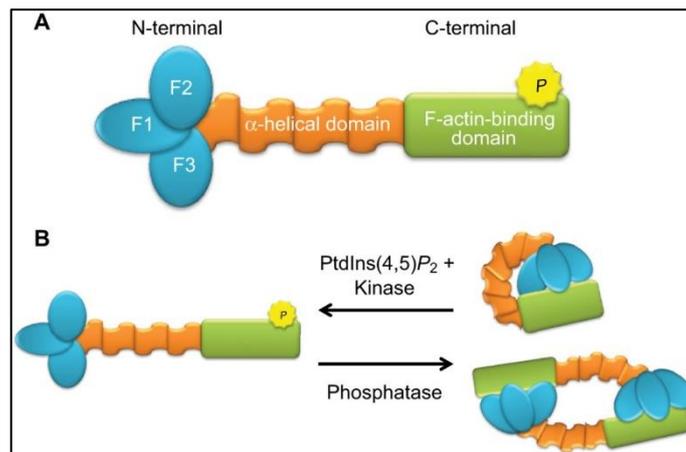


Abb. 1 Struktur der ERM-Proteine sowie ihr aktiver und inaktiver Zustand (2) aktiv(A) inaktiv(B)

### 1.1.2. Aktivierung der ERM-Proteine

Es wurde festgestellt, dass die C-terminale Domäne von ERM-Proteinen in der Lage ist, sich durch Selbstassoziation an die FERM-Domäne desselben Moleküls zu binden, um ein ringförmiges Monomer oder ein Homo- oder Heterodimer mit einem anderen ERM-Molekül zu bilden, wie es bei Ezrin und Moesin der Fall sein kann (4). (Abb.1.)

Aufgrund einer intramolekularen und/oder intermolekularen Wechselwirkung zwischen dem N-Terminus ('Kopf') und dem C-ERMAD ('Schwanz'), welche die Stellen für Interaktionen mit dem F-Aktin oder mit Membranproteinen bereitstellen, bleibt Ezrin im Zytosol in einer inaktiven Form (geschlossene Konformation). Die vollständige Aktivierung (offene Konformation) von Ezrin wird auf ein bestimmtes Signal oder einen Wachstumsfaktor durch einen zweistufigen Prozess durchgeführt (7).

Nachdem Ezrin an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-reiche Bereiche der Plasmamembran gebracht wurde, bindet PIP<sub>2</sub> an die FERM-Domäne von Ezrin, wodurch der konservierte Threonin-Rest (T567) freigelegt wird. Mehrere Kinasen phosphorylieren den exponierten T567 im zweiten Aktivierungsschritt. Dadurch kann das phosphorylierte Ezrin

sowohl das Aktin-Zytoskelett als auch die mit der Membran verbundenen Proteine direkt oder über Adaptoren erreichen (7). (Abb. 2)

Dann wirkt das voll funktionsfähige Ezrin an der Schnittstelle zwischen Membran und Zytoskelett, um eine Vielzahl physiologischer Prozesse zu regulieren. Ezrin ist als Aktin-bindendes Protein (ABP) für die Verteilung von Zelloberflächenrezeptoren und die Modulation von Membran-Zytoplasma-Schnittstellen (MCIs) von entscheidender Bedeutung (8).

Ezrin kann viele wichtige, mit der Signalübertragung verbundene Proteine, rekrutieren und das Signal in und aus der Zelle übertragen, da es ein Modulator von MCIs ist. Tatsächlich kontrolliert Ezrin eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, einschließlich dem PI3K/AKT-Signalweg, der HGF/Met-Signalübertragung und der RhoA-Signalübertragung, um zahlreiche physiologische Funktionen zu regulieren (9).

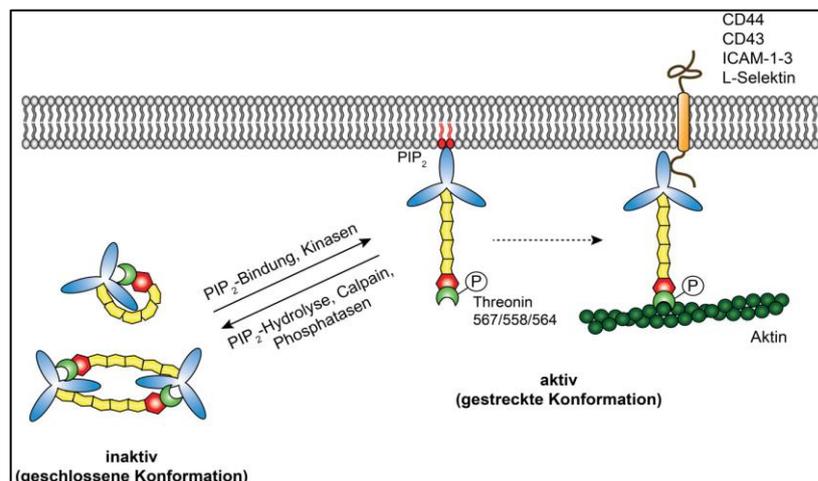


Abb. 2 Schematische Darstellung der ERM-Aktivitätsregulation (20) ERM-Proteine befinden sich im Zytosol der Zelle in der geschlossenen Form als inaktive Proteine. Sie werden aktiviert, indem sie sich an PIP<sub>2</sub> binden und durch Kinasen phosphoryliert werden.

### 1.1.3. Vorkommen der ERM-Proteine

ERM-Proteine sind im gesamten Organismus weit verbreitet und in vielen Zelltypen exprimiert. Ihre relative Expression variiert jedoch zwischen den verschiedenen Geweben, was auf bestimmte Funktionen hinweist (10).

Ezrin findet sich im Darm, Magen, Lunge und Nieren, während Moesin in der Lunge und der Milz und Radixin in der Leber und dem Darm nachgewiesen wurde. Ezrin wird in Epithel- und Mesothelialzellen exprimiert, Moesin hingegen in endothelialen Zellen (1). Der Bürstensaum von Epithelzellen im Darm synthetisiert nur Ezrin, während Hepatozyten nur Radixin bilden. Auf subzellulärer Ebene konzentrieren sich die drei ERM-Proteine auf Aktin-reiche

Oberflächenstrukturen wie Membranausstülpungen, Filopodien und Mikrovilli (1). Ezrin und Moesin wurden auch in Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten des Menschen gefunden. Das dominierende ERM-Protein in diesen Zellarten und das einzige, das in Blutplättchen nachgewiesen wurde, ist Moesin (10).

### 1.2. Histologie des Ovars

Im Folgenden werden der Prozess der Follikelreifung, die Histologie der verschiedenen Follikelstadien und des Gelbkörpers beschrieben. In diesem Unterkapitel bezieht sich die Beschreibung auf das menschliche Ovar. Aufgrund von Unterschieden im Zyklus und im Aufbau des Ovars zwischen den untersuchten Tierarten, wurde das menschliche Ovar als allgemeines Beispiel herangezogen.

Das Oberflächenepithel des Eierstocks ist ein einschichtig plattes bis kubisches Peritonealepithel, welches sich aus dem Mesoderm entwickelt. Die keratinreiche Oberflächenepithelschicht der Eierstöcke dehnt sich aus und zieht sich dynamisch mit den zyklischen Veränderungen der Eierstöcke zusammen, was die Heilung nach dem Eisprung unterstützt (11).

Die *Tunica albuginea*, der zelluläre Kortex, die Primordialfollikel und die Medulla sind die vier verschiedenen Komponenten, aus denen das Ovarialparenchym besteht. Die Albuginea, eine hypoepitheliale Schicht aus straffem Bindegewebe, ist der am stärksten exponierte Bereich des Ovars. Unterhalb der Albuginea befindet sich der Kortex mit dichtem, spinozellulärem Bindegewebe und den Follikeln (12). Unter dem zellulären Kortex befindet sich das Mark mit lockerem Bindegewebe, zahlreichen Gefäßen und Nerven und keinen Follikeln. Die Primordialfollikel befinden sich in der Zellrinde oder an der Schnittstelle zwischen der Zellrinde und der Albuginea (12).

#### 1.2.1. Follikelreifung

Die Follikulogenese beginnt mit der Aufnahme eines Primordialfollikels in den Pool der wachsenden Follikel und endet entweder mit dem Eisprung oder der Rückbildung durch Atresie (13). In jedem Menstruationszyklus geht der dominante Follikel, der den Eisprung auslöst, auf einen Primordialfollikel zurück, der fast ein Jahr zuvor rekrutiert wurde. Die präantrale Phase wird in drei Hauptstadien unterteilt: das Primordial-, Primär- und Sekundärfollikelstadium. Die Antralphase wird typischerweise in vier Stadien eingeteilt: das kleine, mittlere, große und präovulatorische Graafsche Follikelstadium (13).

Die Follikulogenese findet in der Eierstockrinde statt. Die Follikulogenese ist ein Prozess, bei dem höhere Organisationsstufen durch Zellproliferation und Zytodifferenzierung erreicht werden. Es enthält vier bedeutende Entwicklungsereignisse: Die Rekrutierung des Primordialfollikels, die Entwicklung des präantralen Follikels, die Selektion und Entwicklung des Antralfollikels und die Follikelatresie (13).

#### 1.2.2. Primordialfollikel

Schon bei der Geburt verfügen weibliche Individuen über etwa 400 000 „Urfollikel“, welche die Eierstockrinde ausfüllen. Nach der Pubertät nimmt diese Zahl durch die Prozesse der Atresie oder Follikulogenese ab, bis sie schließlich verschwinden (Menopause) (14).

Sie bestehen aus einer primären Eizelle (Durchmesser: 40-70  $\mu\text{m}$ ), welche von einer einzigen Schicht abgeflachter, mitotisch inaktiver Follikelepithelzellen umgeben ist, die auf einer dünnen Basallamina ruhen (14). Primordialfollikel verfügen nicht über eine unabhängige Blutversorgung und haben daher nur begrenzten Zugang zum endokrinen System (13).

Einige Primordialfollikel werden bald nach ihrer Bildung im Fötus rekrutiert. Die Formveränderung der Follikelepithelzellen von platt zu isoprismatisch und der Erwerb des mitotischen Potenzials sind histologische Merkmale der Rekrutierung. Das Wachstum der Eizelle folgt diesen Veränderungen (13). Die Rekrutierung der Primordialfollikel wird durch die parakrine Kommunikation zwischen der Eizelle, den Granulosazellen, den angrenzenden Theca-/Interstitialzellen und den umliegenden Follikeln reguliert (13).

#### 1.2.3. Primärfollikel

Das Vorhandensein von isoprismatischen Follikelepithelzellen, die in einer einzigen Schicht um die Eizelle angeordnet sind, ist charakteristisch für einen Primärfollikel. Die Expression des FSH-Rezeptors sowie das Wachstum und die Differenzierung der Eizelle gehören zu den wichtigsten Entwicklungsereignissen im Primärfollikel (13).

Die Entwicklung enger inter-zellulärer Verbindungen zwischen der Eizelle und den Follikelepithelzellen ist ein wichtiges Ereignis in der Entwicklung des Primärfollikels. Sowohl die Eizelle als auch die Granulosazellen bilden viele zytoplasmatische Auswüchse und Mikrovilli, die ineinandergreifen, um eine sehr große Diffusionsfläche zu schaffen. Außerdem dringen einige der Mikrovilli und zytoplasmatischen Auswüchse der Follikelzellen physisch tief in die Eizelle ein, indem sie in die Plasmamembran der Eizelle eindringen und manchmal bis in die Nähe der Kernmembran reichen. In diesen Bereichen bestehen Zell-Zell-Kontakte aus adhäsiven Kontaktstellen und Gap Junctions (13).

#### 1.2.4. Sekundärfollikel (präantraler Follikel)

Die mitotische Aktivität in den Granulosazellen führt zu einer Zellvermehrung, die drei bis fünf konzentrische Schichten um die Eizelle herum erzeugt. In diesem Stadium erscheint eine eosinophile, homogene und azelluläre Schicht, welche die Eizelle umgibt, die *Zona pellucida*. Am Ende ihrer Entwicklung ist die *Zona pellucida* eine 20 – 25 µm dicke Membran, die reich an sauren Mucopolysacchariden und Glykoproteinen ist (14).

Die Sekundärfollikel haben einen ungefähren Durchmesser von 50 – 400 µm und gehen mit zunehmender Größe in die tiefere Rinde und das Mark über. Gleichzeitig spezialisieren sich die umgebenden Stromazellen des Ovars in mehrere Schichten von *Theca-interna* Zellen und einer äußeren Schicht von *Theca-externa* Zellen (14).

Die Bildung vieler kleiner Blutgefäße, durch Angiogenese, ist auch ein Teil der Entwicklung der Theca. Folglich zirkuliert das Blut nun um den Follikel herum und bringt Nährstoffe und Gonadotropine in den sich entwickelnden Follikel sowie Abfallstoffe und Sekretionsprodukte aus ihm heraus. Ein ausgewachsener Sekundärfollikel enthält am Ende der präantralen Phase der Follikulogenese fünf verschiedene, aber miteinander verbundene Struktureinheiten: eine große Eizelle, die von einer Zona pellucida und etwa fünf Schichten von Granulosazellen umgeben ist, eine Basallamina, eine *Theca interna*, eine *Theca externa* und ein Kapillarnetzwerk im Theca-Gewebe (13).

#### 1.2.5. Tertiärfollikel (Antralfollikel)

Die Sekretion von mucopolysaccharidreicher Flüssigkeit durch die Granulosazellen führt zu ihrer Trennung durch flüssigkeitsgefüllte Spalten. Letztere verschmelzen schließlich zu einem einzigen, großen Hohlraum oder Antrum, der von mehreren Schichten von Granulosazellen

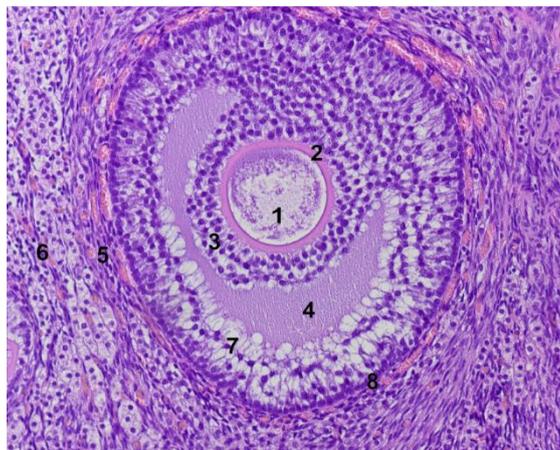


Abb. 3 Tertiärfollikel aus dem Ovar einer Katze (20x Vergrößerung) HE-Färbung. Eizelle (1), Zona pellucida (2), Cumulus oophorus (3), Antrum (4), Theca interna (5), Theca externa (6), Granulosazellschicht (7), Basalmembran (8)

ausgekleidet ist. Die ersten Anzeichen für die Bildung des Antrums treten bei Follikeln mit einem Durchmesser von 200 – 400 µm auf, die sich dann infolge der fortschreitenden Flüssigkeitsabsonderung in das Antrum immer weiter vergrößern (14).

Gleichzeitig vergrößert sich die Eizelle auf ihre endgültige Größe und nimmt eine exzentrische Position an einem Pol des Follikels ein (Abb. 3). An dieser Stelle proliferieren die Granulosazellen und bilden den *Cumulus oophorus*, der in seinem Zentrum die Eizelle enthält und in das Antrum übergeht (Graaf-Follikel) (14). Die Größe des Antrums eines Tertiärfollikels bestimmt seine Gesamtgröße, die wiederum durch das Volumen der Follikelflüssigkeit bestimmt wird. Das Volumen der Follikelflüssigkeit variiert von 0,02 bis 7 ml, je nach Größe des Follikels (13).

#### 1.2.6. Follikelatresie

Von den ursprünglichen 400 000 Follikeln, die bei der Geburt vorhanden sind, reifen ungefähr 400 bis zur Ovulation heran. Die restlichen 99,9 % durchlaufen eine Atresie. Der Prozess der Follikelatresie hängt vom Stadium der Follikelreifung ab: bei den frühen Follikeln (Primordial- bis Sekundärfollikel) führt die Degeneration der Eizelle und der Granulosazellen zum vollständigen Verschwinden des Follikels. Bei Tertiärfollikeln ist dieser Prozess komplexer (14).

Erste Anzeichen dieses Prozesses sind mitotische Inaktivität und eine Abnahme der Anzahl der Granulosazellen. Follikel können in diesem Stadium für eine unbestimmte Zeit als atretische, zystische Follikel bestehen bleiben (Follikelzysten). Schließlich werden die atretischen Follikel von vaskulärem Bindegewebe durchdrungen, was den zentralen Hohlraum ausfüllt. Gleichzeitig verwandelt sich die Basalmembran zwischen der Granulosazellschicht und der *Theca interna* in ein dickes, gewelltes, eosinophiles, hyalinisiertes Band (*Corpus atreticum* oder *Corpus fibrosum*). Die meisten *Corpora fibrosa* werden wahrscheinlich vom Stroma der Eierstöcke resorbiert (14).

#### 1.2.7. Gelbkörper

Die Follikelwand wird nach dem Eisprung zu einem Gelbkörper (*Corpus luteum*). In der ersten Woche der Lutealphase des Zyklus produziert der Gelbkörper eine große Menge an Progesteron und Östradiol. Es bildet sich ein Fibrinpfropf am Ort des Antrums und der Liquorfollikel, in den loses Bindegewebe und Blutzellen eindringen können. Die *Membrana granulosa*, die *Theca interna*, die *Theca externa* und die einwachsenden Blutgefäße bilden die Strukturen, aus denen der Gelbkörper entsteht (13).

Die Granulosazellen vergrößern sich nach der Ovulation und haben einen ungefähren Durchmesser von 35 µm. Diese Zellen, die nun Granulosa-Lutein-Zellen genannt werden, haben eine sehr ähnliche Ultrastruktur wie die der differenzierten steroidogenen Zellen. Sie enthalten viel glattes endoplasmatisches Retikulum, röhrenförmige Cristae in den Mitochondrien und große Anhäufungen von Lipidtröpfchen mit Cholesterinestern im Zytoplasma. Die Theca-Lutein-Zellen werden aus Theca-Interstitialzellen gebildet, die auch in die Gelbkörper integriert sind. Da sie kleiner (~ 15 µm Durchmesser) sind und sich dunkler färben, können sie von den Granulosa-Lutein-Zellen unterschieden werden. Die Ultrastruktur aktiver steroidsezernierender Zellen ist auch in Theca-Lutein-Zellen zu finden (13).

Der Gelbkörper degeneriert in einem Prozess, der Luteolyse genannt wird, wenn es nicht zur Einnistung kommt. Acht Tage nach dem Eisprung ist das Absterben des menschlichen Gelbkörpers histologisch sichtbar. Die Schrumpfung der Granulosa-Lutein-Zellen ist das erste Zeichen dafür. Im Gegensatz dazu werden während der frühen Luteolyse die Theca-Lutein-Zellen außergewöhnlich stark stimuliert. Der *Corpus luteum* enthält nach dem 23. Tag des Menstruationszyklus apoptotische Zellen. Alle Zellen des Gelbkörpers werden schließlich durch die Luteolyse abgebaut. Nur ein *Corpus albicans* aus dichtem Bindegewebe bleibt histologisch zurück (13).

### 1.3. Fragestellung und Hypothese

Ziel dieser Arbeit ist die immunhistochemische Darstellung der ERM-Proteine an physiologischen Ovarien verschiedener Spezies (Hund, Katze, Maus, Schwein, Schaf, Affe (*Macaca fascicularis*), Pferd).

Die Forschungsfrage lautet:

- Wie stellen sich die physiologischen Expressionsmuster der ERM-Proteine in Ovarien verschiedener Spezies dar?

Hypothese:

- Da im Ovar im Rahmen der Follikulogenese und Gelbkörperbildung zahlreiche Prozesse wie Zellteilung, Zellmigration und Angiogenese zyklisch stattfinden, postulieren wir, dass ERM-Proteine exprimiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Für die Immunhistochemie wurden histologische Schnitte aus FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) Archivmaterial verwendet oder im Zuge von Kastrationen gewonnen und Formalin-fixiert und Paraffin eingebettet. Pro Tierart (Affe, Katze, Hund, Maus, Schaf, Schwein und Pferd) wurden Ovarien aus drei Tieren verwendet ( $n=3*7$ ), um eventuell vorhandene inter-individuelle Unterschiede festzustellen. Unsere Positivkontrollen für die Immunhistochemie waren Nierengewebschnitte pro untersuchter Tierart.

Für den Western Blot wurden sechs Proben verwendet. Eine Probe beinhaltete Osteosarkomzellen des Hundes, die restlichen fünf Proben waren Nierengewebe der Spezies Schaf, Pferd, Schwein, Maus und Katze (Archivgewebe von VetBiobank). Da uns leider kein unfixiertes Nierengewebe der Spezies Affe zur Verfügung stand, musste im Western Blot darauf verzichtet werden.

### 2.2. Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie wurde verwendet, um die ERM-Proteine sowie Phospho-Ezrin in histologischen Schnitten von Ovarien verschiedener Spezies darzustellen. Folgende Primär- und Sekundärantikörper wurden verwendet:

*Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie*

	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>			
Rabbit Polyclonal-anti-Ezrin	HPA021616	Sigma Prestige	1: 500
Rabbit Polyclonal-anti-Radixin	R3653	Sigma Aldrich	1: 1000
Rabbit Monoclonal-anti-Moesin	ab52490	Abcam	1: 800
Rabbit Monoclonal- anti-pEzrin(pThr567/Radixin/Moesin)	Clone 48G2	Cell Signaling	1: 800
<b>Sekundärantikörper</b>			
BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit	DPVO110HRP	ImmunoLogic	gebrauchsfertig

Der folgende Arbeitsablauf lief pro Primärantikörper ab (Unterschiede wurden explizit angegeben, falls vorhanden):

Bevor mit der Färbung gestartet wurde, wurden die histologischen Schnitte aus Archivmaterial bzw. im Zuge von Kastrationen gewonnene Schnitte beschriftet. Die Beschriftung beinhaltete das Datum der Färbung, den Antikörper sowie den Hersteller des Antikörpers. Zusätzlich zu den Ovar-Schnitten wurden auch sieben Objektträger als Positivkontrollen (eine Niere jeder untersuchten Spezies) sowie eine Negativkontrolle gefärbt. Da bekannt ist, dass ERM-Proteine im Nierengewebe in hohen Mengen exprimiert werden, fiel die Entscheidung auf das Nierengewebe als Positivkontrolle (7).

Anschließend wurden im Zuge der Entparaffinierung und Rehydrierung die Objektträger in eine Objektträgerhaltung einsortiert und unter dem Abzug in Küvetten inkubiert: 2 x 8 Minuten in Xylol; 2 x 3 Minuten in 100%-igen Ethanol; 1 x 3 Minuten in 96%-igen Ethanol und zuletzt 1 x 3 Minuten in 70%-igen Ethanol.

Um eine Reaktion mit endogen vorhandenen Peroxidasen zu vermeiden, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen würden, wurden die endogenen Peroxidasen vor der Inkubation mit dem primären Antikörper blockiert. Dazu wurden 200 ml Methanol mit fünf Milliliter 30%-igen Wasserstoffperoxid gemischt und mit Aqua dest auf 250 ml aufgefüllt. Die Schnitte wurden für 15 Minuten in einer Küvette mit der Blockierlösung inkubiert. Daraufhin wurden sie für 10 Minuten mit Aqua fontis gespült.

Der nächste Schritt war die Antigendemaskierung, welche nötig ist, um die durch Fixierung entstandenen Proteinvernetzungen wieder aufzubrechen und die Epitope dem Primärantikörper zugänglich zu machen. Die Demaskierung erfolgt durch Erhitzen in einem 0,01M Citratpuffer mit pH 6,0. Die einzige Ausnahme stellt hier Moesin dar, da es in Tris-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) mit pH 9,0 demaskiert wurde. Die Schnitte kamen hierfür in kleine Küvetten (je 50 ml) mit dem schon im Dampfgarer vorgewärmten Puffer und wurden im Dampfgarer für 30 Minuten bei 80 °C erhitzt. Nach der Demaskierung wurden die Schnitte für mindestens 20 Minuten zum Auskühlen stehen gelassen, bevor sie 2 x 5 Minuten mit PBS (1 M) gewaschen wurden. Der Waschschriff mit PBS diente dazu, den physiologischen pH-Wert wiederherzustellen, damit der Primärantikörper binden kann.

Anschließend wurde eine Feuchtkammer vorbereitet, in welcher die Schnitte im Rahmen des Proteinblockings inkubiert wurden. Dazu wurden alle Schnitte einzeln aus der Küvette entnommen und mit einem Pap-Pen wurde das Gewebe als Flüssigkeitsbarriere umrandet. Jeder Schnitt wurde mit einem Tropfen 1,5%-igen Goat Serum beschichtet und für 30 Minuten inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu verhindern und eine

mögliche Hintergrundfärbung zu reduzieren. Danach wurden die jeweiligen Primärantikörper mit ihren zugehörigen Verdünnungen (siehe Tabelle 1) jeweils 100 µl pro Schnitt aufpipettiert. Auf die Negativkontrolle wurden 100 µl PBS pipettiert. Dieser Inkubationsschritt lief über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer im Kühlschrank ab.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zuerst 2 x 5 Minuten in PBS (1 M) gewaschen. Danach wurden 100 µl Sekundärantikörper (siehe Tabelle 1) wieder einzeln auf jeden Schnitt pipettiert. Die Auswahl des Sekundärantikörpers richtete sich nach der Spezies in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde. Folglich fiel unsere Wahl auf den mit HRP (Meerrettichperoxidase) konjugierten Sekundärantikörper BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit. Dieser Inkubationsschritt verlief 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Darauf folgte ein erneuter Waschschrift für 2 x 5 Minuten in PBS (1 M).

Für die Detektion der HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurde das Chromogen DAB (Diaminobenzidin) benutzt. Die DAB-Färbelösung (Quanto, Richard Allan Scientific, TA-125-QHDX) wurde entsprechend der Anleitung des Färbekits vorbereitet, d.h. 1 ml Puffer mit einem Tropfen DAB Chromogen gemischt und gevortext. Pro Schnitt wurden 100 µl der DAB Färbelösung aufgetragen und für fünf Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 Minuten mit Aqua dest. gespült.

Zur besseren Veranschaulichung der Morphologie und Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit dem Kontrast-Farbstoff Hämalaun für drei Minuten gegengefärbt und danach mit fließendem Leitungswasser 10 Minuten lang gespült. Als letzter Schritt mussten die Schnitte noch entwässert und eingedeckt werden. Die Entwässerung fand in einer aufsteigenden Alkoholreihe statt: zuerst 1 x 3 Minuten im 96%-igen Ethanol, danach 2 x 3 Minuten im 100%-igen Ethanol und schließlich 2 x 3 Minuten im Xylol. Das Eindecken mit Deckgläsern und Consul Mounting Medium fand automatisiert mit dem Eindeckautomat Microm CTM6 statt.

### *2.3. Western Blot*

Um die Spezifität der Antikörper für die untersuchten Spezies zu bestätigen, wurden Western Blots mit Nierengewebe bzw. Tumorzellen (Positivkontrolle) der entsprechenden Tierarten durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine aus Geweben oder Zellen isoliert und auf einem Gel durch Anlegen einer Strom-Spannung aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran transferiert und der Reihe nach mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Bei der darauffolgenden Entwicklung werden die Banden sichtbar gemacht.

### *2.3.1. Homogenisieren von Gewebe/Zellen*

Für den Western Blot wurden sechs Proben lysiert. Eine Probe bestand aus D17-Zellen der Passage 31 (Osteosarkom-Zellen des Hundes), die restlichen fünf Proben waren Nierengewebe der Spezies Schaf, Pferd, Schwein, Maus und Katze (Archivgewebe von VetBiobank).

Um die Proteine von Interesse freizulegen, wurden unsere Zellen bzw. Gewebe zerstört. Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis statt. Zuerst wurden die Reaktionsgefäße mit den Probenbezeichnungen beschriftet und die Instrumente zum Homogenisieren bereitgelegt.

Das Zellpellet wurde zuerst mit 500 µl des Lysepuffers Tris-Triton X (inkl. Protease- und Phosphataseinhibitoren) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Alle 10 Minuten wurde gevortext. Die Gewebeprobe wurde zuerst auf einer Glas-Petrischale mit einer Skalpellklinge zerkleinert. Die zerkleinerten Proben wurden in eine Glasröhre gegeben und mit 500 µl des gleichen Lysepuffers versetzt. Indem der Stößel in der Glasröhre auf und ab bewegt wurde, wurde das Gewebe mechanisch weiter zerstört. Wenn keine Gewebestückchen mehr sichtbar waren, wurden die Proben mit einer 1 ml-Spritze und einer langen, gelben 20G-Kanüle aufgenommen und in das vorbereitete Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Probennummer transferiert. Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch alle 10 Minuten gevortext.

Ab dem nächsten Schritt war das Prozedere für das Zellpellet und die Gewebeprobe gleich. Nach den 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben mit der gelben Kanüle zerkleinert, indem die Proben mit der Spritze 10x auf und ab pipettiert wurden, bis diese dünnflüssig waren. Dieser Vorgang wurde danach mit der blauen 23G-Kanüle wiederholt. Zwischendurch wurde immer wieder gut gevortext. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten wurden die Proben nochmal geprüft und 2 x 10 Sekunden gevortext.

Anschließend wurden die Proben mit der schon vorgekühlten Kältezentrifuge 15 Minuten lang bei 10 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### *2.3.2. Proteinbestimmung*

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte durch das „DC Protein Assay System“ Kit von BioRad und wurde laut Hersteller-Anleitung durchgeführt. Die Messung erfolgte direkt nach der Lyse der Zellen bzw. des Gewebes, da alle Spuren des Gels für den Western Blot mit denselben Proteinkonzentrationen beladen werden müssen.

Als erster Schritt wurde mittels BSA-Lösung inklusive Tris-Triton X Puffer eine geometrische Verdünnungsreihe mit fünf Proben für eine Standardkurve erstellt. Anschließend wurde die Lösung A` laut Anleitung hergestellt. Nun wurden die Proben der Standardkurve und unsere zuvor lysierten Proben auf eine 96-Well Mikrotiterplatte zusammengebracht. In jedes Well kam fünf Mikroliter der jeweiligen Probe bzw. des jeweiligen Standards. Aufgrund der Doppelbestimmung wurden pro Probe/Standard zwei Wells verwendet. Danach wurden 25 µl der Lösung A` und 200 µl der Lösung B pro Well hinzugefügt. Die Proben wurden zuvor gut gevortext. Nun wurde die Platte mit Parafilm bedeckt und im Dunkeln für ungefähr eine Stunde inkubiert.

Mit dem Plattenleser Tecan wurden die Absorptionen (y) der Proben/Standards bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Mithilfe der Standardkurve  $y=k*x+d$  wurden die Konzentrationen x der Proben berechnet. Die für den Western Blot benötigte Probenmengen (µl/20µg) wurden ebenfalls berechnet. Standardkurve:  $y = 0,1385x + 0,0985$

$$\text{Berechnung der Konzentration: } x = (y - d) / k \quad x = (y - 0,0985) / 0,1385$$

### 2.3.3. Elektrophorese und Blotten

Zuerst wurden die Proben mit dem Tris-Triton X Puffer verdünnt und anschließend wurde der Loading Dye (6 x SDS-Probenpuffer) hinzugefügt (Tabelle 2).

**Tabelle 2 Pipettierschema für das Beladen der Gele beim Western Blot.** Die Probe und der Lysepuffer ergaben insgesamt 20 µl. Dazu wurden vier Mikroliter des Loading Dye pipettiert. Wir haben ein finales Volumen von 24 µl pro Gelspur.

	1	2	3	4	5	6	7
Probe	Magic marker	#2193 D-17	#2234 Niere Schaf, Tris-Triton-X + PIC + PHIC	#2235 Niere Pferd, Tris-Triton-X + PIC + PHIC	#2236 Niere Schwein, Tris-Triton-X + PIC + PHIC	#2237 Niere Maus BL6N, Tris- Triton-X + PIC + PHIC	#2238 Niere Katze, Tris-Triton-X + PIC + PHIC
Probe (in µl)	2	4	11	11	4	3	4
Lysepuffer (in µl)		16	9	9	16	17	16
Loading Dye (in µl)		4	4	4	4	4	4

Die verdünnten Proben wurden nun für acht Minuten bei 95 °C auf dem vorgewärmten Heizblock denaturiert. Danach wurden diese auf Eis gestellt, kurz abgekühlt und runterzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf zuvor gegossene 10%-ige SDS-Polyacrylamid Gele aufgetragen. In die Elektrophorese-Kammer und zwischen die Gele wurde 1 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer eingefüllt. Jeweils 20 µl Probe wurde pro Spur in die Geltaschen pipettiert. Nur in die erste Spur wurden zwei Mikroliter Molekulargewichtsmarker (Magic Marker) pipettiert (siehe Tabelle 2). Daraufhin wurde der Deckel auf die Elektrophorese-Einheit aufgesetzt, Power Supply eingeschaltet und die Elektrophorese bei 200 V laufen gelassen. Die Elektrophorese wurde dann gestoppt, wenn die Bromphenolblaulinie im Laufpuffer das Ende des Gels erreicht hat, was ungefähr eine Stunde dauerte. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen, das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel in Transferpuffer gelegt.

Während die Gele im Transferpuffer lagen, wurde die Membranaktivierung durchgeführt. Es handelte sich um PVDF-Membranen, welche zuerst für 30 Sekunden in Methanol gelegt wurden, dann für fünf Minuten in Aqua bidest. und zum Schluss für 10-15 Minuten in Transferpuffer. Nun wurde das Blotting Sandwich aufgebaut. Folgende Reihenfolge wurde eingehalten: Blottingkassette schwarze Seite unten – Schwamm – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Schwamm – Oberseite der Kassette. Zwischendurch wurden Luftblasen mit einem Roller beseitigt. Die Schwämme und Filterpapiere wurden zuvor auch in Transferpuffer gelegt und befeuchtet. Nach dem Zusammenbau des Sandwiches wurde dieses in die Rot-Schwarze Kammer gestellt und im Puffertank platziert. Außerdem wurde auch ein Coolpad in den Puffertank gelegt. Zuletzt wurde der Tank noch bis zur Markierung mit Transferpuffer befüllt und der Deckel aufgesetzt (schwarz auf schwarz, rot auf rot). Das Blotten lief bei 350 mA für eine Stunde ab.

Nach dieser einen Stunde wurde das Gerät ausgeschaltet und das Blotting Sandwich zerlegt. Die Gele kamen in Küvetten mit Coomassie-Blue-Färbelösung und wurden über Nacht auf dem Schüttler gefärbt. Die Membranen jedoch kamen in Küvetten mit je 10 ml TBST-Blocking Solution und wurden für zwei Stunden geblockt. Dieser Vorgang diente dem Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen.

#### *2.3.4. Primär- und Sekundärantikörper*

Für den Western Blot wurden die gleichen Primär- und Sekundärantikörper verwendet wie für die Immunhistochemie, allerdings sind die Verdünnungen unterschiedlich (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3 Übersicht der Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot.** Die Antikörper wurden jeweils mit 4/5 ml TBST-Blocking Solution verdünnt. Das finale Volumen wurde in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen pipettiert.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Primärantikörper</b>	
Rabbit Polyclonal-anti-Ezrin	1: 2000 (4 ml TBST Blocking Solution + 2 µl AK)
Rabbit Polyclonal-anti-Radixin	1: 1600 (4 ml TBST Blocking Solution + 2,5 µl AK)
Rabbit Monoclonal-anti-Moesin	1: 500 (4 ml TBST Blocking Solution + 8 µl AK)
Rabbit Monoclonal- anti-pEzrin (pThr567/Radixin/Moesin)	1: 500 (4 ml TBST Blocking Solution + 8 µl AK)
<b>Sekundärantikörper</b>	
BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit	1:5000 (5 ml TBST Blocking Solution + 1 µl AK)

Die Primärantikörper wurden gemäß Tabelle 3 mit 4 oder 5 ml TBST-Blocking Solution verdünnt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Membranen mithilfe einer Pinzette in das jeweilige Falcon eingerollt und auf den Rotator platziert. Der Rotator wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die Membran, welche als Negativkontrolle diente, wurde nicht mit einem Primärantikörper, sondern nur mit 5 ml TBST-Blocking Solution versetzt.

Am darauffolgenden Tag wurde der Rotator zuerst für 30 Minuten bis eine Stunde bei Raumtemperatur hingestellt. Danach wurden die Membranen für 5 x 8 Minuten mit TBST-Waschpuffer am Schüttler gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper gemäß Tabelle 3 mit TBST- Blocking Solution verdünnt und in jeweils fünf (vier Primärantikörper und eine Negativkontrolle) 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Membranen wurden anschließend in die Falcon-Röhrchen eingerollt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur am Rotator inkubiert. Nun wurde die Entwicklerlösung, welche zur Detektion notwendig ist, aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur hingestellt.

Nach diesen 30 Minuten Inkubationszeit folgten wieder 4 x 8 Minuten Waschschriffe mit TBST und 1 x 8 Minuten mit TBS. Auf den letzten Waschschriff folgte die Detektion der Proteine

mittels ChemiDoc. Die Detektion geschah in der Dunkelkammer. Zuerst wurde das Substrat der Entwicklerlösung in ein Becherglas pipettiert (pro Membran 1 ml Lösung 1 und 1 ml Lösung 2). Die Membranen wurden einzeln aus den Falcons entnommen, auf einem Papiertuch abgetropft und auf eine Plastikfolie gelegt. Die 2 ml Entwicklerlösung wurde pro Membran aufgetropft, gleichmäßig verteilt und für eine Minute inkubiert. Die Membranen wurden anschließend abgetropft und so mittig wie möglich auf das Tray des ChemiDoc Imaging System (BioRad) gelegt. Daraufhin wurde ein Foto aufgenommen.

Als letzten Schritt des Prozederes wurden die Gele und Membranen gefärbt. Die Gele wurden über Nacht bei Raumtemperatur in Küvetten mit Coomassie-Blau-Färbelösung belassen. Am folgenden Tag wurden diese am Schüttler bei Raumtemperatur so lange entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren und der Hintergrund nicht mehr intensiv blau schien. Die Entfärbelösung wurde hierfür mehrmals gewechselt. Anschließend wurden die Gele in Glycerin-Alkohol gelegt und mit zwei Glycerin-Alkohol befeuchteten Cellophanblättern in einem Trocknungsrahmen (mit Klammern) getrocknet. Die Membranen wurden mit einer Ausnahme (eine Membran wurde für die spätere Qualitätssicherung verwendet) alle für 30 Minuten in Küvetten mit Coomassie-Färbelösung gelegt und danach so lange entfärbt bis der Hintergrund nur hellblau war. Zuletzt wurden die Membranen mit Aqua dest. gespült und zum Trocknen gelegt.

#### *2.3.5. GAPDH-Bestimmung*

GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist die Ladekontrolle, ob alle Proteine in derselben Konzentration vorliegen. Die Annahme dabei ist, dass GAPDH ein „Housekeeping Protein“ ist, das in allen Zellen circa in derselben Konzentration vorliegt. Zur Sicherung der Proteinkonzentrationen der Western Blots wurde auch eine GAPDH-Bestimmung durchgeführt. Hierfür wurde die eine Membran, welche noch nicht gefärbt wurde, zuerst 5 x 5 Minuten mit TBST gewaschen und danach für eine Stunde mit dem Primärantikörper in einem 50 ml Falcon am Rotator inkubiert (1: 5000 Verdünnung, 5 ml TBST-Blocking Solution + 1 µl AK). Darauf folgten wieder 5 x 8 Minuten Waschschrte mit TBST-Waschpuffer. Nun wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (anti-mouse, 1:5000 Verdünnung) in einem 50 ml Falcon am Rotator inkubiert und danach folgten wieder 4 x 8 Minuten Waschschrte mit TBST und 1 x 8 Minuten mit TBS. Die Proteindetektion erfolgte auch hier wie zuvor bei den ERM-Proteinen mittels ChemiDoc Imaging System.

*Tabelle 4 Primärantikörper und Sekundärantikörper für die GAPDH-Bestimmung*

<b>Antikörper</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
(Primär) Mouse anti-GAPDH GT239	GTX627408	Gene Tex	1: 5000
(Sekundär) Amersham ECL Anti-mouse IgG	NA931	cytiva	1: 5000

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Immunhistochemie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in mikroskopischen Aufnahmen von Tertiärfollikeln und Gelbkörpern für jeden verwendeten Primärantikörper (Moesin, Radixin, Ezrin, Phospho-Ezrin) dargestellt. Die Auswertung der Immunhistochemie in den weiteren zellulären Strukturen des Ovars (Stroma, Primordial-, Primär-, und Sekundärfollikel) sind in Tabelle 5 - 8 (Anhang) zusammengefasst. In den Abbildungen werden jeweils Tertiärfollikel und Gelbkörper im Ovar aller untersuchten Spezies vergleichend nebeneinander dargestellt. Bei den Abbildungen der Tertiärfollikel fehlt das Pferd, da in unseren histologischen Schnitten keine Tertiärfollikel erfasst wurden. Die Abbildungen wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen (4X, 10X, 20X und 40X), was durch die unterschiedlichen Größen der Ovarien der verschiedenen Spezies begründet ist.

##### 3.1.1. Moesin

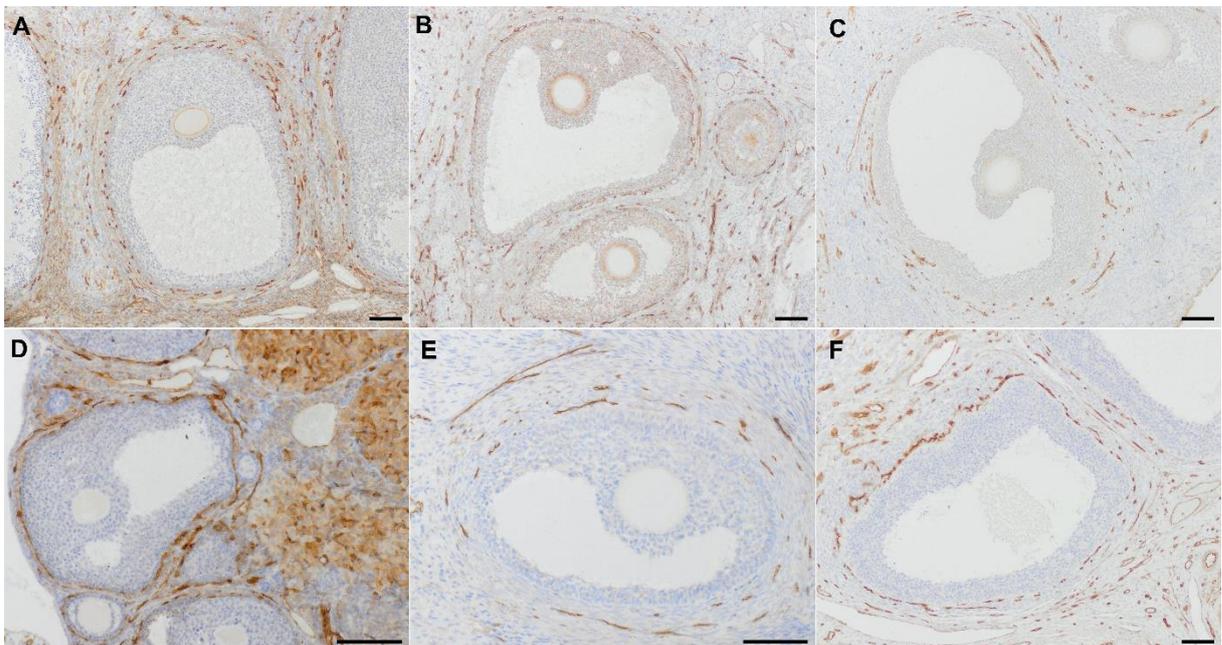


Abb. 4 Verteilung von Moesin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein). Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Die Tertiärfollikel der untersuchten Spezies zeigten mit dem Primärantikörper Moesin eine überwiegend membranständige Färbung. Die *Zona pellucida* der Eizelle (Affe, Katze und Hund) und Granulosazellen (Affe und Katze) gaben deutlich positive Signale. Außerdem wurde

Moesin im Stroma und in den Endothelzellen der Blutgefäße auch in der *Theca interna* und *externa* deutlich nachgewiesen (Abbildung 4).

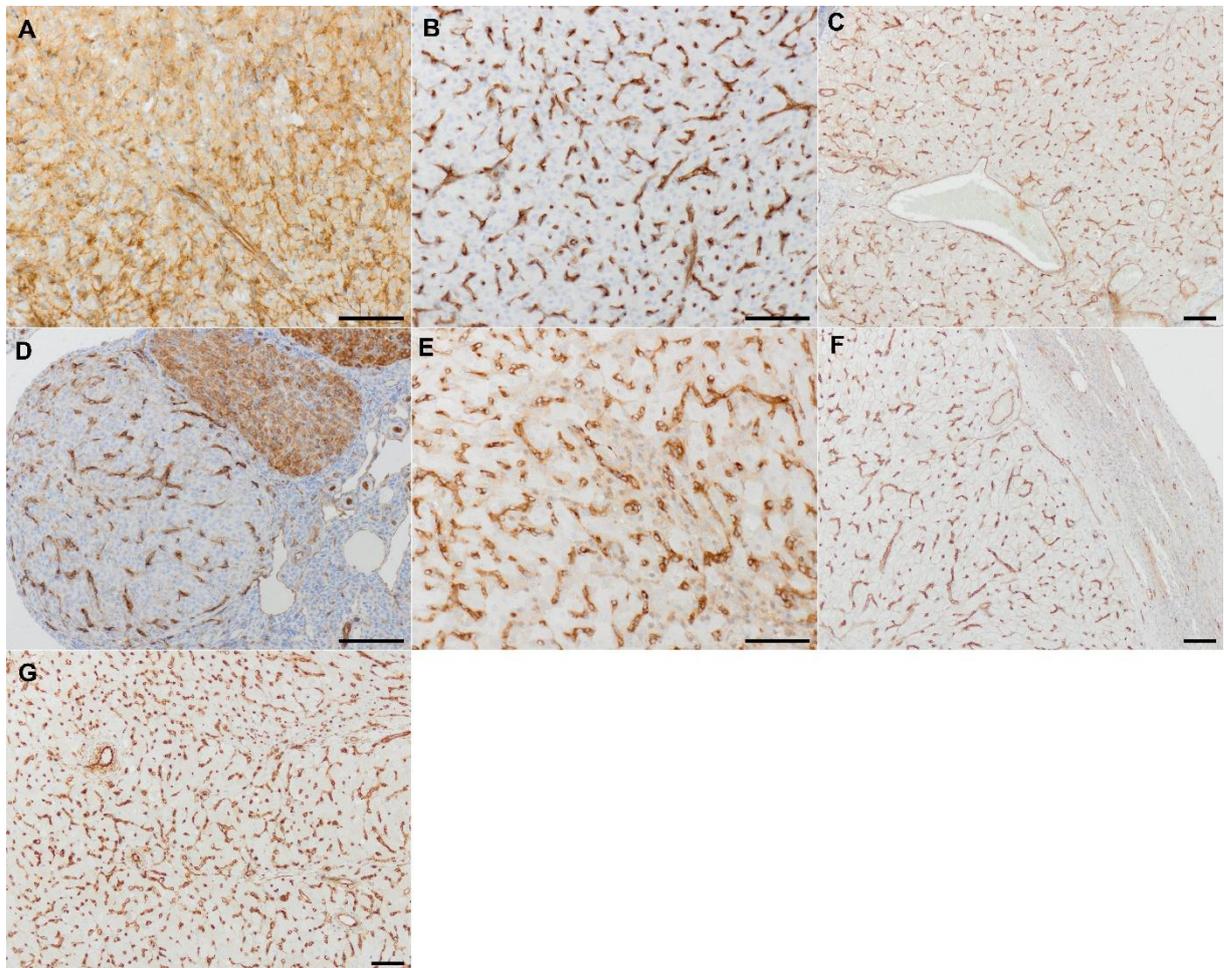


Abb. 5 Verteilung von Moesin im Gelbkörper verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

In Abbildung 5 sind die Gelbkörper der untersuchten Spezies dargestellt, welche mit dem Primärantikörper Moesin inkubiert wurden. Eine membranständige Färbung war erneut erkennbar. Die Blutgefäße, welche im Gelbkörper ein dichtes Netz bilden, waren wieder eindeutig positiv markiert.

## 3.1.2. Ezrin

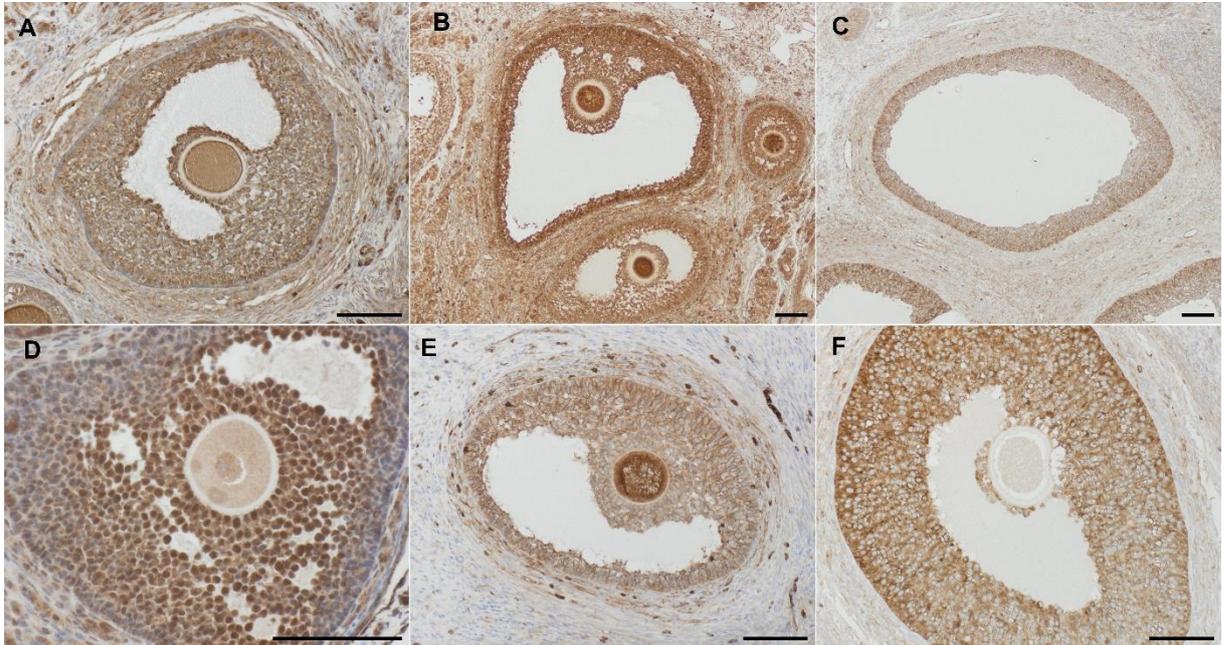


Abb. 6 Verteilung von Ezrin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein). Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

In Abbildung 6 werden die Tertiärfollikel der untersuchten Spezies dargestellt, welche mit dem Primärantikörper Ezrin inkubiert wurden. Eine nukleäre und teilweise zytoplasmatische Färbung war erkennbar. Die Eizelle und die Granulosazellen zeigten stark positive Signale. In den Granulosazellen ergab die immunhistochemische Färbung von Ezrin eine teilweise zytoplasmatische oder membranständige Färbung. Zellen von *Theca interna* und *Theca externa* waren positiv.

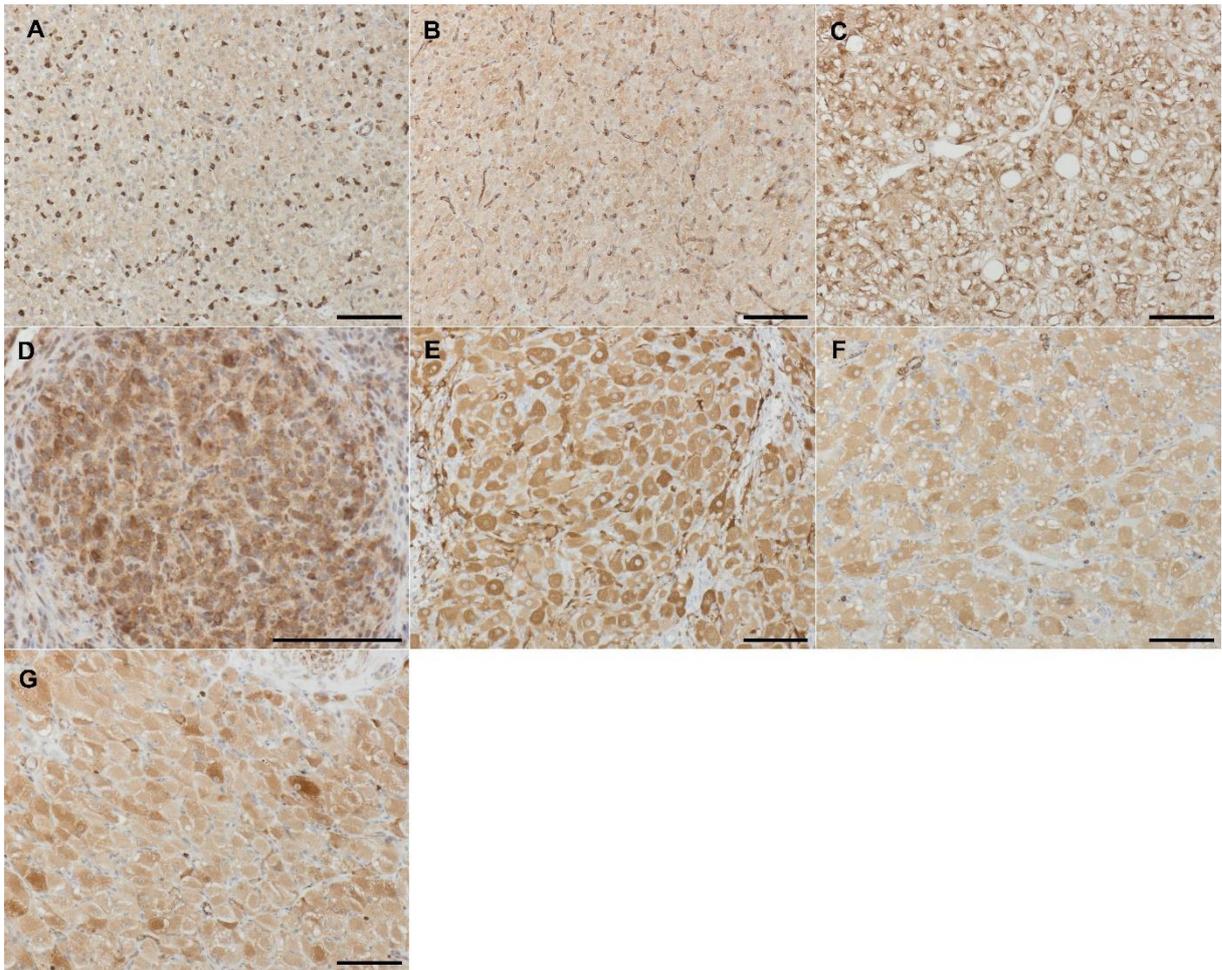


Abb. 7 Verteilung von Ezrin im Gelbkörper verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

In den Gelbkörpern der untersuchten Spezies zeigte sich mit dem immunhistochemischen Nachweis von Ezrin eine überwiegend zytoplasmatische Färbung der Lutealzellen. Die zahlreich vorhandenen Blutgefäße im Gelbkörper sind erneut oft positiv (Abbildung 7).

### 3.1.3. Radixin

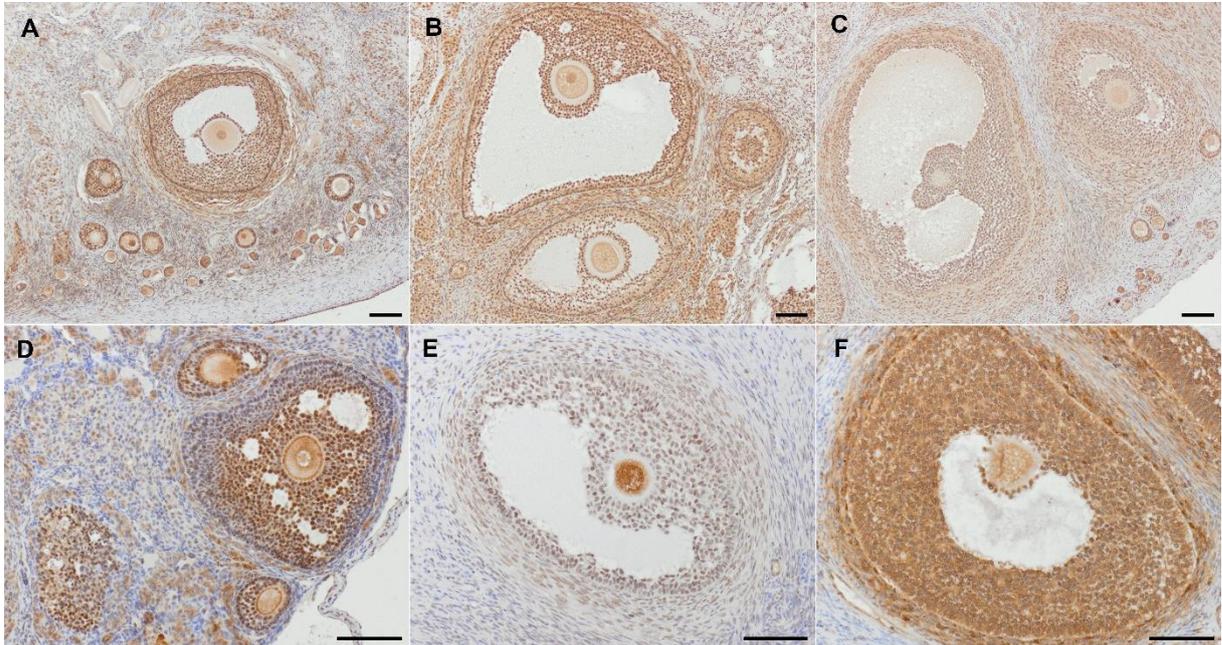


Abb. 8 Verteilung von Radixin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein). Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Die Tertiärfollikel der untersuchten Spezies nach der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Radixin zeigten überwiegend eine nukleäre Immunreaktion. Die Eizellen, die Granulosazellen und die Thecazellen waren stark positiv (Abbildung 8).

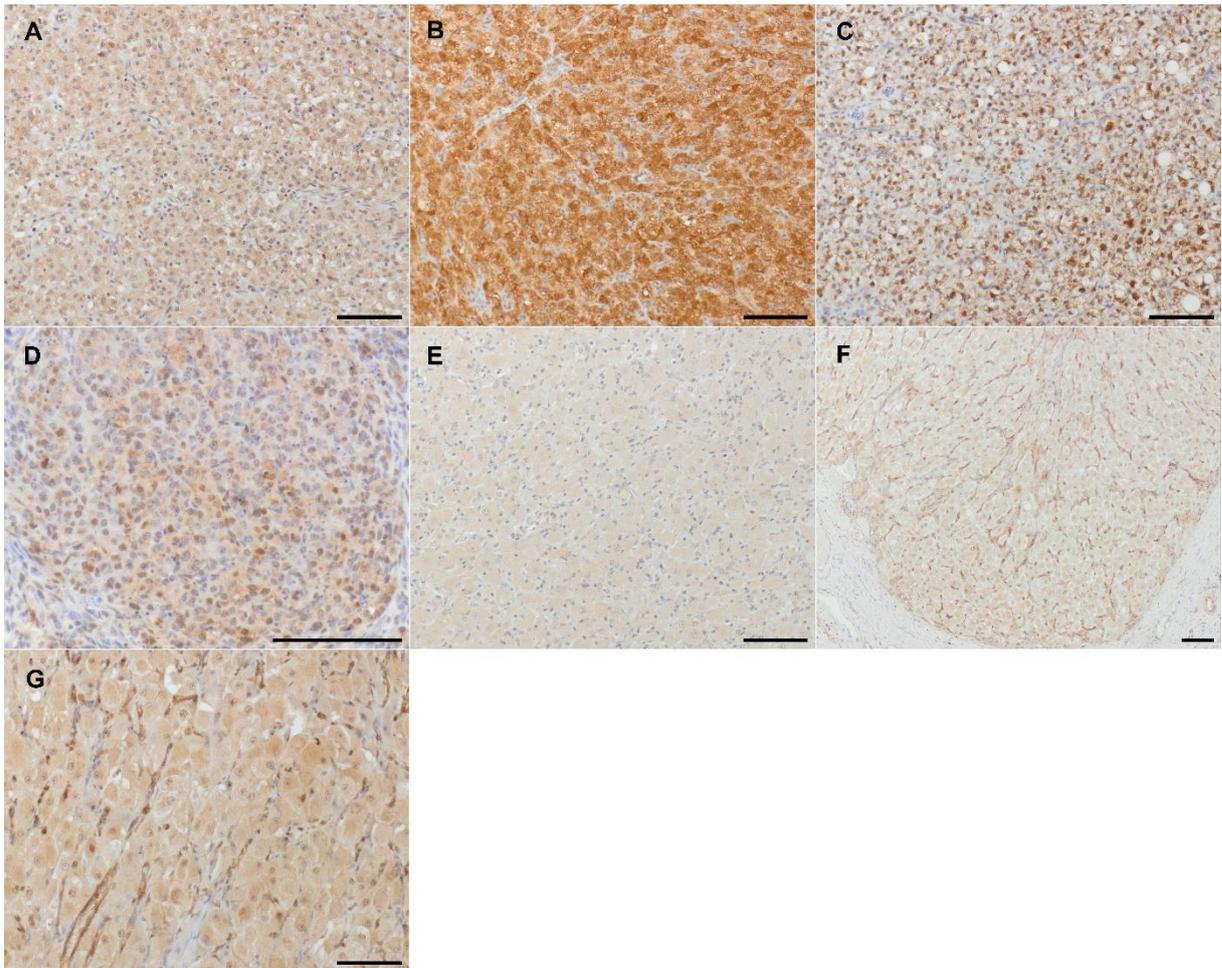


Abb. 9 Verteilung von Radixin im Gelbkörper verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 9 sind die Gelbkörper der untersuchten Spezies dargestellt, welche mit dem Primärantikörper Radixin inkubiert wurden. Eine zyttoplasmatische Färbung der Zellen im Gelbkörper war in allen Spezies erkennbar. In den Lutealzellen von Affe, Maus und Pferd war zusätzlich eine nukleäre Immunreaktion erkennbar. Nur die Endothelzellen vom Pferd und Schwein zeigen ein positives Ergebnis nach immunhistochemischer Färbung mit Radixin.

## 3.1.4. Phospho-Ezrin

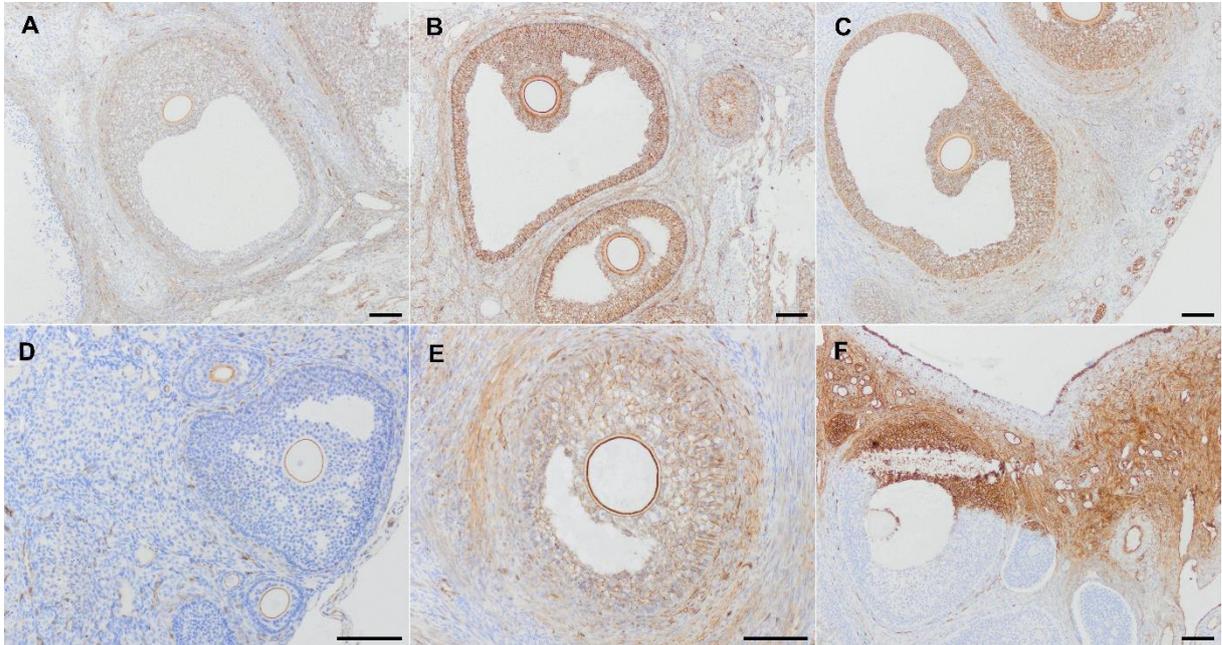


Abb. 10 Verteilung von Phospho-Ezrin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein). Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

In Abbildung 10 werden die Tertiärfollikel der untersuchten Spezies dargestellt, welche mit dem Primärantikörper für die aktivierte Form von Ezrin (Phospho-Ezrin) inkubiert wurden. Eine deutliche membranständige Färbung der Granulosazellen in Affe, Katze, Hund und Schwein war erkennbar. Beim Präparat des Schweines waren deutliche, scharf abgegrenzte Fixierungsartefakte im Gewebeschnitt sichtbar. Die äußeren Regionen waren gut anfärbbar, die weiter innen gelegenen Regionen zeigten keine Färbung. Die Granulosazellen, die *Zona pellucida* und die Thecazellen zeigten positive Signale. Die Eizelle war diesmal negativ. Im Tertiärfollikel der Maus beschränkte sich die Immunreaktion für anti-Phospho-Ezrin auf die *Zona pellucida*.

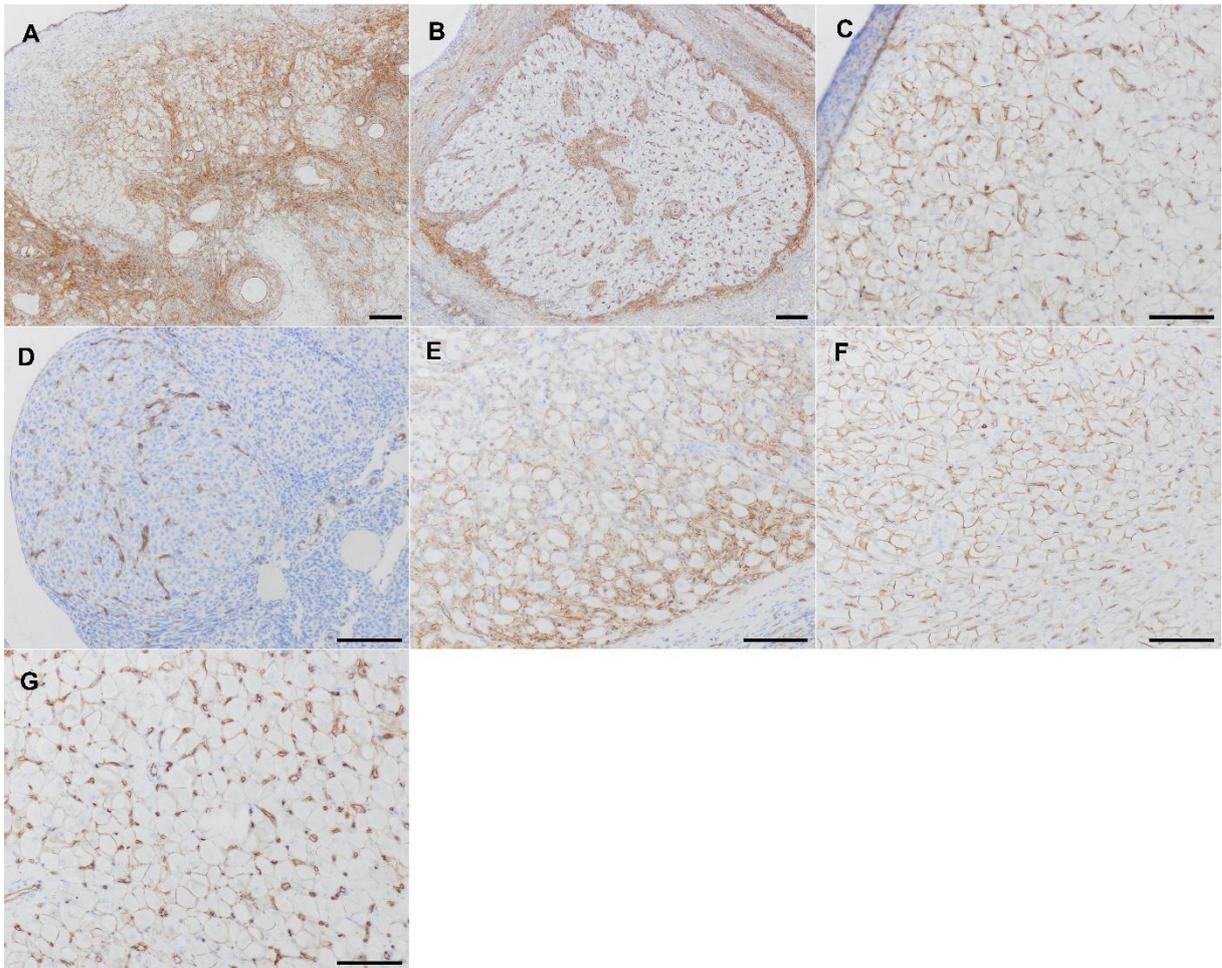
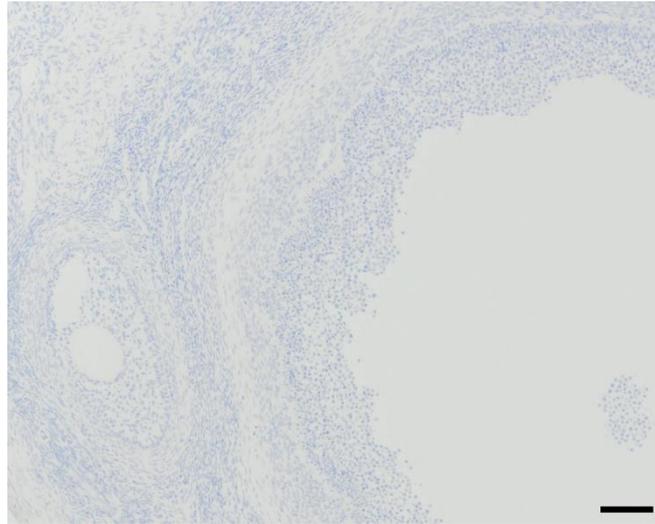


Abb. 11 Verteilung von Phospho-Ezrin im Gelbkörper verschiedener Spezies. A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

In histologischen Schnitten von Gelbkörpern der untersuchten Spezies zeigte nach der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Phospho-Ezrin eine deutliche membranständige Färbung in den Lutealzellen bei Affe, Hund, Schaf, Schwein und Pferd. Die Blutgefäße waren bei allen Tierarten stark positiv. Der Gelbkörper der Maus stellte sich hier sehr schwach positiv dar (Abbildung 11).



*Abb. 12 Negativkontrolle (unter Weglassen der Inkubation des Primärantikörpers) Ovar Schaf*

Als Negativkontrollen wurden Ovar-Schnitte ohne Inkubation mit dem Primärantikörper verwendet (Abbildung 12). Da für alle vier Antikörper der gleiche Sekundärantikörper verwendet wurde, wurde hier nur ein Beispiel-Foto ausgewählt. Die Negativkontrollen zeigten in keiner Tierart eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers.

### *3.2. Western-Blot*

Die Western Blots wurden mit den Nierengeweben der untersuchten Spezies durchgeführt und dienten zur Spezifikationskontrolle der verwendeten Antikörper, um die Ergebnisse der Immunhistochemie zu bestätigen. Es wurden die gleichen Antikörper verwendet wie für die Immunhistochemie. Für die Spezies Hund wurden D17-Zellen (Osteosarkom-Zellen) verwendet. Da uns kein frisches Nierengewebe vom Affen zur Verfügung stand, musste auf diese Spezies beim Western Blot verzichtet werden. Die Proteine der Proben wurden zuerst elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, anschließend auf eine Membran transferiert und der Reihe nach mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Bei der darauffolgenden Entwicklung wurden die Banden sichtbar gemacht. Der Magic Marker (Molekulargewichts-Marker) diente dazu, die unterschiedlichen Bandgrößen festzustellen. Bei den Antikörpern für Ezrin, Phospho-Ezrin und Radixin wurde die Größe der Bande bei 80 kDa erwartet und bei Moesin wurde die Größe der Bande bei 75 kDa erwartet.

#### *3.2.1. Proteinbestimmung*

Mithilfe der Absorptionen der Standardkurve und der Proben wurden die Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und  $\mu\text{l}/20\mu\text{g}$  berechnet. Da Doppelmessungen durchgeführt wurden, waren Duplikate vorhanden und der Mittelwert wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung herangezogen. Zum Schluss wurde die Konzentration in  $\mu\text{l}/20\mu\text{g}$  umgerechnet, um die Menge zu berechnen, welche in die Gelspuren pipettiert wurde. Die Proteinkonzentrationen der Proben lagen im Bereich von 1,8 – 6,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 3.2.2. Qualitative Auswertung

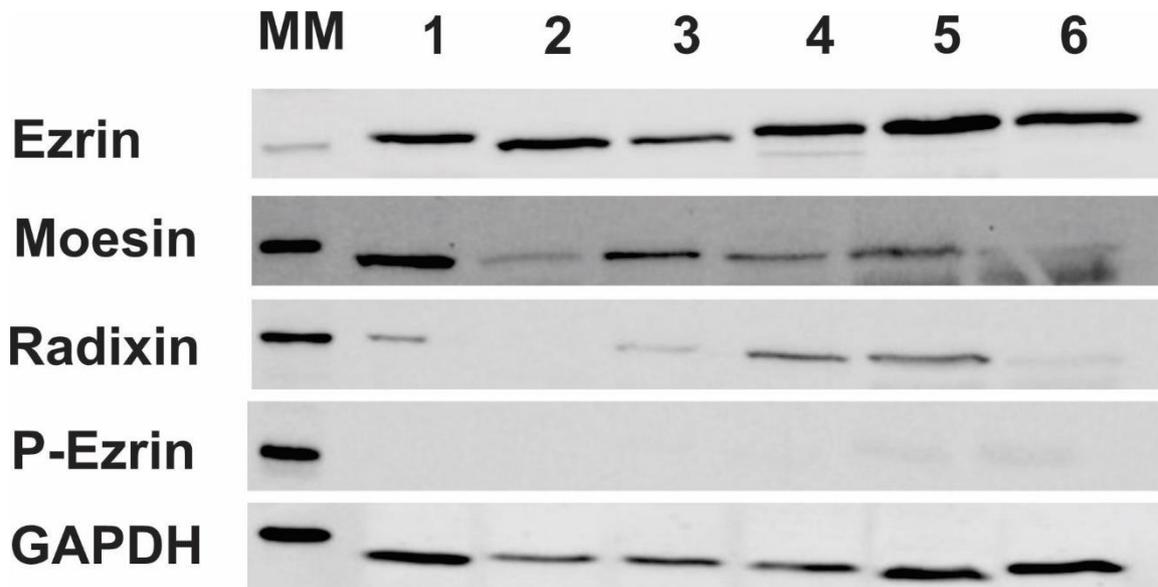


Abb. 13 Western-Blot der ERM-Proteine inkl. Phospho-Ezrin (P-Ezrin) und GAPDH. 1 (D17-Zellen Hund), 2 (Niere Schaf), 3 (Niere Pferd), 4 (Niere Schwein), 5 (Niere Maus) und 6 (Niere Katze). MM (Magic Marker)

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Western Blots aller vier ERM-Proteine inkl. GAPDH dargestellt. Es ist erkennbar, dass Ezrin und Moesin in allen Spezies vorhanden war, Radixin konnte nur in der Niere der Spezies Schaf nicht nachgewiesen werden. Bei Phospho-Ezrin zeigten sich bei allen Spezies im Western Blot keine oder nur sehr schwache Banden. Allerdings muss hinzugefügt werden, dass beide Primärantikörper für Radixin und Phospho-Ezrin bei der Immunhistochemie positive Signale gegeben haben. Die sichtbaren Banden bei Ezrin, Moesin und Radixin entsprechen dem erwarteten Molekulargewicht (Moesin bei ungefähr 75 kDa und Ezrin/Radixin bei ungefähr 80 kDa).

Zur Qualitätssicherung wurde eine GAPDH-Bestimmung durchgeführt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ist ein Haushaltsgen/Protein, welches immer exprimiert wird. GAPDH konnte ebenfalls in allen Spezies nachgewiesen werden, dementsprechend kann die pro Spur beladene Proteinmenge abgeschätzt werden. Die unterschiedliche Stärke der Banden des Western Blots kann dadurch begründet werden, dass die Proteine möglicherweise nicht alle gleich stark exprimiert werden oder die aufgetragene Proteinmenge geringfügig unterschiedlich war.

## 4. Diskussion

Anhand der Ergebnisse der Immunhistochemie ist erkenntlich, dass die Strukturen des Ovars (Granulosazellen, Eizellen, Thecazellen, Gelbkörper, Blutgefäße, Follikelepithel) bei fast allen untersuchten Spezies und Proteinen überwiegend positive Signale zeigten. Dieses Vorkommen deckt sich auch mit den bekannten Funktionen der ERM-Proteine, da während der Follikulogenese und Bildung des Gelbkörpers Zellproliferation, Adhäsion und Migration stattfindet. Es wird vermutet, dass Angiogenese, wie sie bei der Gelbkörperbildung vorhanden ist, ein Grund für die starke Expression der ERM-Proteine in den Endothelzellen der Blutgefäße sein kann. Außerdem haben die positiven Ergebnisse der Western Blots die Spezifität der Antikörper bestätigt. Die Proteine wurden bei den untersuchten Spezies zum Teil unterschiedlich stark exprimiert, was an unterschiedlichen Zyklusstadien der Tiere liegen kann.

Der Grund für die fehlende Bande beim Western Blot von Radixin in Nierengewebe bei der Spezies Schaf könnte eventuell sein, dass in der Probe zu wenig von dem Protein enthalten war bzw. dass die Menge an Protein unter der Nachweisgrenze von Radixin lag, da auch die immunhistochemische Färbung mit diesem Antikörper beim Schaf sehr schwach ausgefallen ist. Außerdem könnte auch beim Beladen des Gels was verloren gegangen sein.

Auffällig waren ebenso die fallweise beobachteten Fixierungsartefakte bei der Immunhistochemie von Phospho-Ezrin. Die Immunfärbung hat nur im Randbereich der Organe gut funktioniert, welche bei Immersionsfixierungsmethode (Einlegen der Gewebestücke in Fixierlösung) als erstes fixieren. Mit zunehmender Fixierung erfolgt das Eindringen der vernetzenden Fixierlösung immer langsamer, bei voranschreitendem Abbau der Zellstrukturen und der Proteine. Die mangelhafte Stabilität der Zellstrukturen/Proteine bzw. des Zielproteins könnte ausschlaggebend für die schlechte Immunfärbung sein. Phosphorylierte Formen von Proteinen sind diesbezüglich am empfindlichsten. Ein weiterer Grund für die Fixierungsartefakte könnte der Fixierungszeitpunkt sein, da das Gewebe, welches nach der Entnahme zu spät fixiert wurde, aufgrund des natürlichen Abbauprozesses zu Artefakten führen kann. Eine standardisierte, unmittelbare Fixierung der Organe nach der Entnahme ist wichtig für vergleichbare Ergebnisse.

Bei der Immunhistochemie konnten unterschiedliche Reaktionsmuster der verschiedenen ERM-Proteine festgestellt werden, was auf unterschiedliche Funktionen der Proteine deuten kann. Ezrin und Radixin zeigten beispielsweise eine überwiegend nukleäre Färbung, was darauf deutet, dass die Proteine im Zellkern lokalisiert sind und eine Funktion in nukleären

Prozessen wie Replikation, Transkription oder Regulation der Genexpression haben könnten. Bei Moesin und Phospho-Ezrin war eine überwiegend membranständige Färbung erkennbar, was bedeutet, dass diese Proteine in der aktivierten Form an der Zellmembran lokalisiert und an der Zelladhäsion, der Zell-Zell-Kommunikation oder der Signaltransduktion beteiligt sind. Bei Ezrin und Radixin konnte bei einigen Spezies/Strukturen auch eine zytoplasmatische Färbung nachgewiesen werden, was auf eine Funktion in intrazellulären Signalwegen, dem Zytoskelett oder dem Proteintransport hinweist (15).

In humanen Ovarialkarzinomen wurden ERM-Proteine bereits nachgewiesen und wurden auch als Prognosemarker für verschiedene Tumorarten erkannt. Im Rahmen einer Publikation von Chen et al., für welche der Western Blot ebenfalls als Methode verwendet wurde, wurde schlussgefolgert, dass Ezrin in Kulturen normaler Ovarialepithelzellen im Vergleich zu Ovarialkarzinomen viel geringer bzw. schwächer exprimiert wird. Die Studie zeigte, dass Ezrin in stark metastasierenden Zelllinien überexprimiert wird (16). Diese Annahme wird in einer Studie von Köbel et al. bestätigt (17). Ihre Untersuchungen haben gezeigt, dass Ezrin für die Invasion von metastasierenden Zellen erforderlich ist. Es ist wahrscheinlich, dass die physiologische Rolle von Ezrin darin besteht, die Migrationsfähigkeit zu ermöglichen, da die Invasion mit der Zellmigration einhergeht. Offensichtlich wird die Fähigkeit zur Invasion durch den Erhalt von Ezrin in der bösartigen Zelle gewährleistet, was erklärt, warum Patientinnen mit Ezrin-positiven Tumoren eine wesentlich schlechtere Prognose haben (17). In früheren Forschungsarbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen der Ezrin-Expression und der Invasivität von Endometriumkrebszellen nachgewiesen (18). In unserer Studie wurde deutlich gezeigt, dass auch im normalen Ovar verschiedener Spezies alle ERM-Proteine exprimiert werden. Daten oder Literatur über das Vorhandensein und die Verteilung der ERM-Proteine im normalen/physiologischen Ovar liegen aber kaum vor. Die Ergebnisse einer Studie über das Vorkommen von Ezrin im Ovar vom Pavian decken sich mit unseren Resultaten. Ezrin wurde dort in allen Follikelstadien an der Oberfläche der Eizelle und in den Granulosazellen nachgewiesen (19).

In unserer immunhistochemischen Studie wurden alle ERM-Proteine in allen Spezies in diversen Strukturen (z.B. Follikelepithel) detektiert. Signifikante inter-individuelle Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Aufgrund der Größe und des spezifischen Aufbaus des

Pferde-Ovars wurden in unseren Schnitten keine bzw. wenig Follikelstadien erfasst, daher ist die Auswertung bei dieser Tierart unvollständig.

Die Schlussfolgerung der Arbeit ist, dass die ERM-Proteine durchaus auch im gesunden Ovar exprimiert werden. Die Immunhistochemie hat gezeigt, dass ERM-Proteine in den Follikelepithelzellen (in antralen und prä-antralen Follikeln), Thecazellen, Granulosazellen und Lutealzellen exprimiert werden und daher eine wichtige biologische Funktion bei der Follikulogenese und Gelbkörperbildung spielen werden. Weitere Untersuchungen, um die Funktionen und Rollen dieser Proteine in den verschiedenen Zelltypen und -kompartimenten aufzuklären, sind notwendig. Die Erforschung der Expression und Funktion der ERM-Proteine im Ovar und Ovarialkarzinom kann in der Zukunft wichtige Erkenntnisse für die Diagnose, Prognose und Therapie liefern.

## Zusammenfassung

Mitglieder der ERM-Proteinfamilie spielen eine Vielzahl von Rollen in der Zellmigration, darunter die Vernetzung zwischen der Membran, den Rezeptoren und dem Aktinzytoskelett sowie die Regulierung von Signalmolekülen, die an der Adhäsion, Polarität und Migration von Zellen beteiligt sind. ERM-Proteine spielen eine große Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung. In humanen Ovarialkarzinomen wurden ERM-Proteine nachgewiesen und wurden auch als Prognosemarker für verschiedene Tumorarten erkannt. Ovar-Tumore (zB. Granulosazelltumore) kommen auch in veterinärmedizinisch relevanten Spezies vor. Die Beurteilung dieser Proteine an durch Krebs veränderten Zellarten/Zellgruppen (Funktionsgebilde, Theca, Keimdrüsenepithel, Stroma, Eizellen) in Ovarien ist nicht möglich, ohne die Kenntnis der physiologischen Expressionsmuster dieser Proteine. Daten über das Vorhandensein und die Verteilung dieser Proteine im normalen Ovar liegen aber nicht vor.

Ziel dieser Arbeit war die immunhistochemische Darstellung der ERM-Proteine an physiologischen Ovarien verschiedener Spezies (Hund, Katze, Maus, Schwein, Schaf, Makake, Pferd). Hierfür wurden histologische Schnitte aus FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) Archivmaterial verwendet (bzw. im Zuge von Kastrationen gewonnen und Formalin-fixiert und Paraffin eingebettet). Pro Tierart wurden Ovarien aus drei Tieren verwendet. Außerdem wurde auch ein Antikörper für die aktivierte, phosphorylierte Form Phospho-Ezrin verwendet.

Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass die Immunhistochemie bei allen Antikörpern und allen Spezies ein positives Signal in diversen Strukturen (z.B. Follikelepithel) der Ovarien gegeben hat. Inter-individuelle Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Aufgrund der Größe und des spezifischen Aufbaus des Pferde-Ovars wurden in unseren Schnitten keine bzw. wenig Follikelstadien erfasst, daher ist die Auswertung bei dieser Tierart unvollständig.

Die Schlussfolgerung der Arbeit ist, dass die ERM-Proteine durchaus auch im physiologischen Ovar exprimiert werden. Die Immunhistochemie hat gezeigt, dass ERM-Proteine in den Follikelepithelzellen (in antralen und prä-antralen Follikeln), Thecazellen, Granulosazellen und Lutealzellen exprimiert werden. Diese Information kann dazu beitragen, die Lokalisierung und die funktionellen Rollen dieser Proteine in den verschiedenen Zelltypen und -kompartimenten zu verstehen. Die Erforschung der Expression und Funktion der ERM-Proteine im Ovar und Ovarialkarzinom kann in der Zukunft wichtige Erkenntnisse für die Forschung und Medizin liefern.

## Summary

Members of the ERM (ezrin, radixin, moesin) protein family play a variety of roles in cell migration, including cross-linking between the membrane, receptors, the actin cytoskeleton, and regulating signalling molecules involved in cell adhesion, polarity, and migration. ERM proteins play a major role in tumour progression and metastasis. In human ovarian carcinomas, ERM proteins have been detected and have also been recognized as prognostic markers for various tumour types. Ovarian tumours (e.g., granulosa cell tumours) also occur in species relevant to veterinary medicine. Assessment of these proteins on cell types/cell groups altered by cancer (functional structures, theca, ovarian surface epithelium, stroma, oocytes) in ovaries is not possible without knowledge of the physiological expression patterns of these proteins. However, data on the presence and distribution of these proteins in the normal ovary are not available.

The aim of this work was the immunohistochemical visualization of ERM proteins in physiological ovaries of different species (dog, cat, mouse, pig, sheep, macaque, horse). Histological sections from FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) archive material were used for this purpose (or obtained during castration and formalin-fixed and paraffin-embedded). Ovaries from three animals were used per species. In addition, an antibody for the activated phosphorylated form phospho-ezrin was also used.

The result of this study was that immunohistochemistry gave a positive signal in diverse structures (e.g. follicular epithelium) of the ovaries for all antibodies and all species. Inter-individual differences could not be detected. Due to the size and specific structure of the equine ovary, no or few follicular stages were detected in our sections; therefore, the evaluation is incomplete in this species.

The conclusion of this work is that the ERM proteins are indeed expressed in the physiological ovary. Immunohistochemistry has shown that ERM proteins are expressed in follicular epithelial cells (in antral and pre-antral follicles), theca cells, granulosa cells, and luteal cells. This information may help to understand the localization and functional roles of these proteins in different cell types and compartments. Studying the expression and function of ERM proteins in the ovary and ovarian cancer may provide important insights for research and medicine in the future.

## Literaturverzeichnis

1. Louvet-Vallée S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell* 2000, 92, 305-316.
2. Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci* 2014;127(2):267–75. doi.org/10.1242/jcs.133108
3. Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* 1992;103(1):131–43. doi.org/10.1242/jcs.103.1.131
4. Gary R, Bretscher A. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 1995;6(8):1061–75. doi.org/10.1091/mbc.6.8.1061
5. Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol* 1993;120(1):129–39. doi.org/10.1083/jcb.120.1.129
6. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM Protein Moesin Reveals the FERM Domain Fold Masked by an Extended Actin Binding Tail Domain. *Cell*. 2000;101(3):259–70.
7. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* April 2010;11(4):276–87.
8. McClatchey AI, Fehon RG. Merlin and the ERM proteins – regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends Cell Biol* 2009;19(5):198–206.
9. Barik GK, Sahay O, Paul D, Santra MK. Ezrin gone rogue in cancer progression and metastasis: An enticing therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2022;1877(4):188753.
10. Charrin S, Alcover A. Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. Bd. 11, *Front Biosci* 1987.
11. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction* 2020;160(3):R25–39.
12. Silva EG, Kim G, Bakkar R, Bozdog Z, Shaye-Brown A, Loghavi S. Histology of the normal ovary in premenopausal patients. *Ann Diagn Pathol* 2020;46:151475.
13. Williams CJ, Erickson GF. *Morphology and Physiology of the Ovary*. Endotext 2012. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. PMID: 25905186
14. Clement PB. *Histology of the Ovary*. *Am J Surg Pathol* 1987;11(4).
15. Tuffaha MSA, Guski H, Kristiansen G. *Immunohistochemistry in Tumor Diagnostics*. Cham: Springer International Publishing; 2018. S. 1–9. doi.org/10.1007/978-3-319-53577-7\_1

16. Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Ohtani K, Rutherford T, Naftolin F. Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and ezrin translocation are stimulated by interleukin 1 $\alpha$  and epidermal growth factor. *Cancer* 2001;92(12):3068–75. doi: 10.1002/1097-0142(20011215)92:12<3068::aid-cnrcr10149>3.0.co;2-5.
17. Köbel M, Gradhand E, Zeng K, Schmitt WD, Kriese K, Lantusch T. Ezrin Promotes Ovarian Carcinoma Cell Invasion and Its Retained Expression Predicts Poor Prognosis in Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2006;25(2).
18. Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, Chen Z, Satoh K, Naftolin F. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. *Cancer Lett* 1999;147(1):31–8.
19. Zachos NC, Burch MG, Billiar RB, Li C, Albrecht ED, Pepe GJ. Regulation of Expression of Microvillus Membrane Proteins by Estrogen in Baboon Fetal Ovarian Oocytes. *Biol Reprod* 2008;79(6):1160–8. doi.org/10.1095/biolreprod.108.067900
20. (Abbildung 2): Fehlner K. Die Aktivitätsregulation von ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) – Proteine und ihre Bedeutung für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration [Dissertation]. [München]: Technische Universität München; 2013.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Struktur der ERM-Proteine sowie ihr aktiver und inaktiver Zustand (2) .....	2
Abb. 2 Schematische Darstellung der ERM-Aktivitätsregulation (20).....	3
Abb. 3 Tertiärfollikel aus dem Ovar einer Katze (20x Vergrößerung) HE-Färbung .....	6
Abb. 4 Verteilung von Moesin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies .....	18
Abb. 5 Verteilung von Moesin im Gelbkörper verschiedener Spezies .....	19
Abb. 6 Verteilung von Ezrin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies.....	20
Abb. 7 Verteilung von Ezrin im Gelbkörper verschiedener Spezies .....	21
Abb. 8 Verteilung von Radixin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies .....	22
Abb. 9 Verteilung von Radixin im Gelbkörper verschiedener Spezies.....	23
Abb. 10 Verteilung von Phospho-Ezrin im Tertiärfollikel verschiedener Spezies .....	24
Abb. 11 Verteilung von Phospho-Ezrin im Gelbkörper verschiedener Spezies.....	25
Abb. 12 Negativkontrolle (unter Weglassen der Inkubation des Primärantikörpers) Ovar Schaf .....	26
Abb. 13 Western-Blot der ERM-Proteine inkl. Phospho-Ezrin (P-Ezrin) und GAPDH.....	28
Abb. 14 Verteilung von Moesin in Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen).....	38
Abb. 15 Verteilung von Ezrin im Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen) .....	39
Abb. 16 Verteilung von Radixin im Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen) .....	40
Abb. 17 Verteilung von Phospho-Ezrin im Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen).	41

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie .....	9
Tabelle 2 Pipettierschema für das Beladen der Gele beim Western Blot .....	13
Tabelle 3 Übersicht der Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot....	15
Tabelle 4 Primärantikörper und Sekundärantikörper für die GAPDH-Bestimmung .....	17
Tabelle 5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Ezrin .....	42
Tabelle 6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Radixin .....	43
Tabelle 7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Moesin.....	44
Tabelle 8 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Phospho-Ezrin .....	45

## Anhang

### Resultate der Positivkontrollen

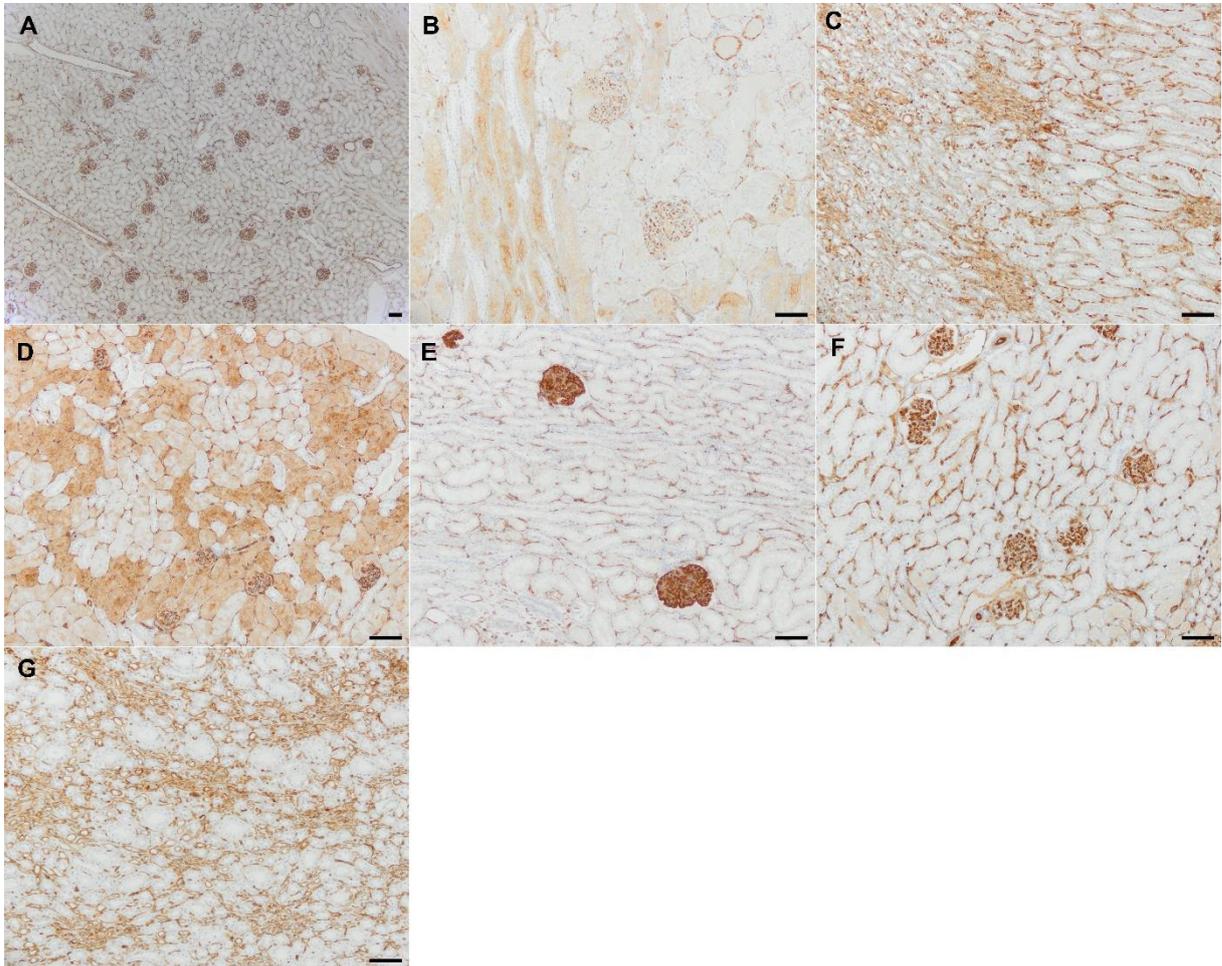


Abb. 14 Verteilung von Moesin in Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen). A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Die immunhistochemische Färbung von Nierenschnitten als Positivkontrollen der untersuchten Spezies mit dem Primärantikörper Moesin zeigte in allen Tierarten eine Färbung der Glomeruli und der peritubulären Blutgefäße. Eine membranständige und teilweise auch zytoplasmatische Färbung war erkennbar. Die Tubuli der Nieren waren zum Teil ebenfalls positiv (Abbildung 14).

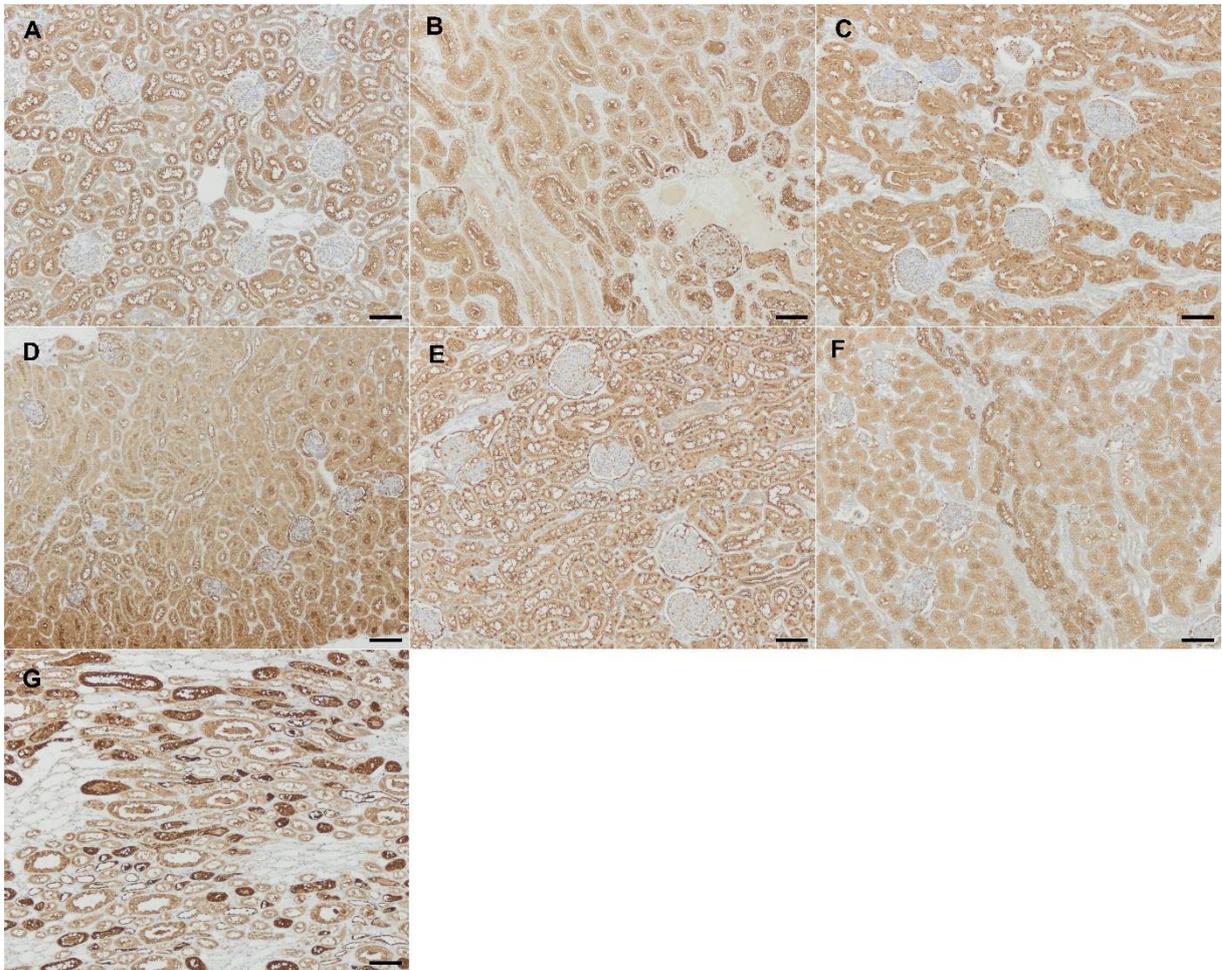


Abb. 15 Verteilung von Ezrin im Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen). A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Der immunhistochemische Nachweis von Ezrin im Nierengewebe der untersuchten Spezies zeigte eine zytoplasmatische Färbung der verschiedenen Tubulusabschnitte. Die Glomeruli wurden nur bei der Katze nennenswert angefärbt (Abbildung 15).

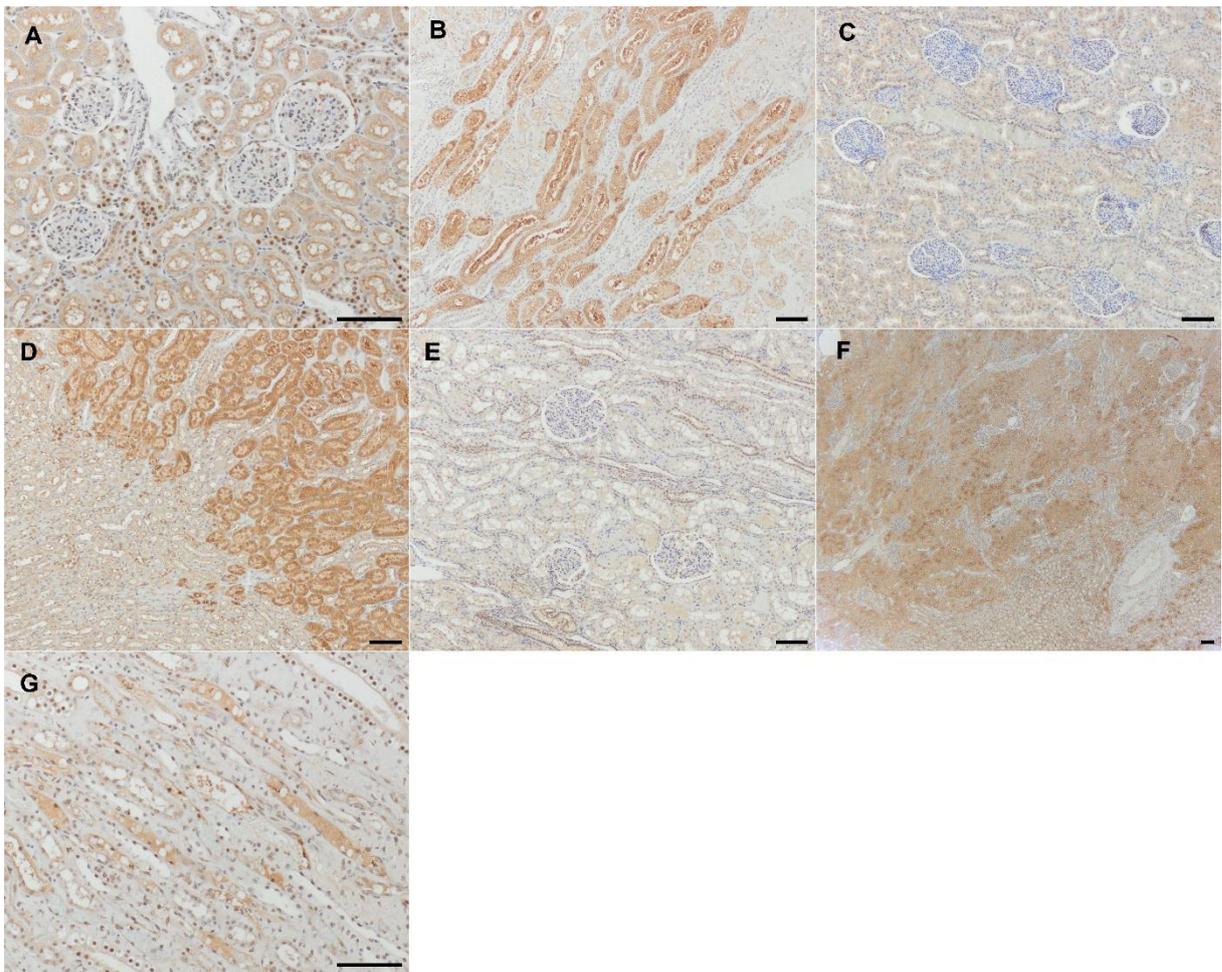


Abb. 16 Verteilung von Radixin im Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen). A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 16 sind die Nierenschnitte der untersuchten Spezies dargestellt, welche mit dem Primärantikörper Radixin inkubiert wurden. Eine zytoplasmatische und teilweise nukleäre Färbung (Affe, Schaf, Pferd), insbesondere in den distalen Nierentubuli, ist erkennbar. Die Glomeruli wurden kaum angefärbt.

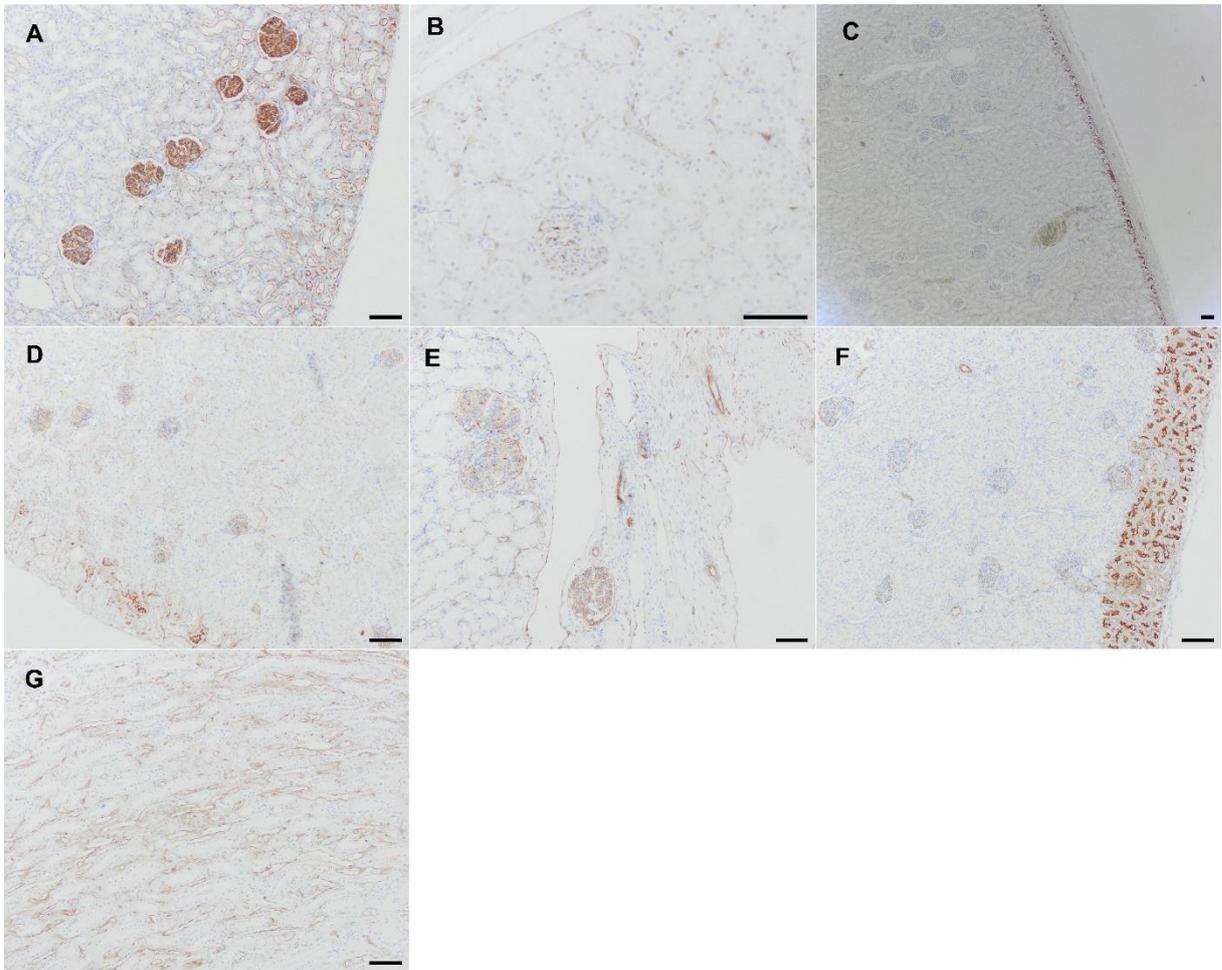


Abb. 17 Verteilung von Phospho-Ezrin im Nierengewebe verschiedener Spezies (Positivkontrollen). A (Affe), B (Katze), C (Hund), D (Maus), E (Schaf), F (Schwein), G (Pferd). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 17 sind die Nierengewebe der untersuchten Spezies dargestellt, welche mit dem Primärantikörper Phospho-Ezrin inkubiert wurden. Eine membranständige Färbung war erkennbar. In einigen Präparaten waren starke Fixierungsartefakte sichtbar. Der Rand zeigte sich gut anfärbbar, während weiter innen liegende Gewebereiche nicht mehr reaktiv waren (C, F). Die Glomeruli und die Tubuli waren stark positiv. Das Nierengewebe der Katze (B) war schwach positiv.

## Auswertung der Immunhistochemie

Tabelle 5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Ezrin

Ezrin	Anteil positiver Zellen	Stärke der Färbung	Score	Was ist gefärbt?
				<b>m= membranständig / n= nukleär / c= cytoplasmatisch</b>
Ovarien				
Affe1	+++	+++	9	Granulosazellen, Eizelle, Blutgefäße, Theca Primordialfollikel (PRF): n/c Primärfollikel (PF): n/c Sekundärfollikel (SF): n Tertiärfollikel (TF): n
Affe2	+++	+++	9	Stroma, Eizelle, Granulosazellen, Blutgefäß, Theca PRF: n/c PF: n/c SF: n TF: n
Affe3	+++	+++	9	Stroma, Eizelle, Gelbkörper (n/c), Granulosazellen, Blutgefäß, Theca PRF: n/c PF: n/c SF: n/c TF: n
Maus1	+++	+++	9	Stroma, Eizelle, Gelbkörper (c), Blutgefäß, Theca, Granulosazellen PRF: n/c PF: n/c SF: n/c TF: n/c
Maus2	+++	+++	9	Eizelle, Gelbkörper (c/n), Stroma, Theca, Granulosazellen PRF: n/c PF: n/c SF: n/c TF: n/c
Maus3	+++	+++	9	Eizelle, Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (c), Blutgefäß PRF: c PF: c SF: c TF: c
Schwein1	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Granulosazellen PRF: c PF: c SF: c TF: c
Schwein2	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Granulosazellen PRF: c PF: c SF: c TF: c
Schwein3	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Granulosazellen, Stroma PRF: c PF: c SF: c TF: c
Schaf1	+++	+++	9	Eizelle, Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca PRF: c PF: c SF: c TF: c
Schaf2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Gelbkörper (n), Eizelle, Granulosazellen PRF: c PF: c SF: n/c TF: n/c
Schaf3	+++	+++	9	Eizelle, Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Granulosazellen PRF: c PF: c SF: c TF: c
Hund1	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Zona pellucida, Eizelle PRF: c PF: c SF: c TF: c
Hund2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Zona pellucida, Eizelle PRF: c PF: c SF: c TF: c
Hund3	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m/c), Theca, Zona pellucida PRF: c PF: c SF: c TF: c
Katze1	+++	+++	9	Eizelle, Blutgefäße, Theca, Zona pellucida PRF: c PF: c SF: c TF: c
Katze2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Gelbkörper (c), Zona pellucida, Eizelle PRF: n/c PF: n/c SF: n/c TF: n/c
Katze3	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Gelbkörper (c), Zona pellucida, Eizelle PRF: c PF: c SF: n/c TF: n/c

Tabelle 6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Radixin

Radixin	Anteil positiver Zellen	Stärke der Färbung	Score	Was ist gefärbt? m= membranständig / n= nukleär / c= cytoplasmatisch
Ovarien				
Affe1	+++	++	6	Gelbkörper (c/n), Eizelle, Blutgefäße, Theca Primordialfollikel (PRF): n Primärfollikel (PF): n Sekundärfollikel (SF): n Tertiärfollikel (TF): n
Affe2	+++	+++	9	Stroma, Eizelle, Gelbkörper (n/c), Blutgefäß, Theca PRF: n PF: n SF: n TF: n
Affe3	+++	+++	9	Stroma, Eizelle, Gelbkörper(c), Granulosazellen, Blutgefäß, Theca PRF: n PF: n SF: n TF: n
Maus1	+++	+++	9	Stroma, Eizelle, Gelbkörper (c), Blutgefäß, Theca, Granulosazellen PRF:n PF: n SF: n TF: n
Maus2	+++	+++	9	Eizelle, Gelbkörper (c/n), Stroma, Theca, Granulosazellen PRF:n PF: n SF: n TF: n
Maus3	+++	+++	9	Eizelle, Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (n), Blutgefäß PRF:n PF: n SF: n TF: n
Schwein1	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (n/c), Theca, Granulosazellen PRF: n PF: n SF: n TF: n
Schwein2	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Granulosazellen PRF:n PF: n SF: n TF: n
Schwein3	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca, Granulosazellen, Stroma PRF: n PF: n SF: n TF: n
Schaf1	+++	++	6	Eizelle, Blutgefäße, Gelbkörper (c), Theca PRF: n/c PF: n/c SF: n TF: n
Schaf2	+++	++	6	Blutgefäße, Theca, Eizelle, Granulosazellen PRF: n PF: n SF: n TF: n
Schaf3	+++	++	6	Eizelle, Blutgefäße, Theca, Granulosazellen PRF: n/c PF: n/c SF: n TF: n
Hund1	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (n), Theca, Zona pellucida, Eizelle PRF: n/c PF: n/c SF: n TF: n
Hund2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Zona pellucida, Eizelle PRF: n/c PF: n/c SF: n TF: n
Hund3	+	++	2	Blutgefäße, Gelbkörper (m/c), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Katze1	+++	++	6	Eizelle, Blutgefäße, Theca, Gelbkörper (c/n), Zona pellucida PRF: n/c PF: n/c SF: n TF: n
Katze2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Gelbkörper (c/n), Zona pellucida, Eizelle PRF: n/c PF: n/c SF: n/c TF: n
Katze3	+++	++	6	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Zona pellucida, Eizelle PRF:c PF: c SF: n TF: n

Tabelle 7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Moesin

Moesin	Anteil positiver Zellen	Stärke der Färbung	Score	Was ist gefärbt?
				m= membranständig / n= nukleär / c= cytoplasmatisch
Ovarien				
Affe1	+++	++	6	Stroma, Zona pellucida, Blutgefäße Primordialfollikel (PRF): m Primärfollikel (PF): m Sekundärfollikel (SF): m Tertiärfollikel (TF): m
Affe2	+++	+++	9	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (m), Blutgefäß, Theca PRF: m PF: m SF: m TF: m
Affe3	+++	+++	9	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (c), Blutgefäß, Theca PRF: m PF: m SF: m TF: m
Maus1	+++	+++	9	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (c), Blutgefäß, Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Maus2	++	+++	6	Gelbkörper (c), Stroma PRF:m PF: m SF: m TF: m
Maus3	+++	+++	9	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (c), Blutgefäß PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schwein1	++	+	2	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schwein2	++	+	2	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schwein3	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schaf1	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schaf2	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schaf3	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Hund1	++	++	4	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Hund2	++	++	4	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Hund3	++	++	4	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Katze1	++	+++	6	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Eizelle PRF:m PF: m SF: m TF: m
Katze2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Katze3	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m

Tabelle 8 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Phospho-Ezrin

P-Ezrin	Anteil positiver Zellen	Stärke der Färbung	Score	Was ist gefärbt?
				m= membranständig / n= nukleär / c= cytoplasmatisch
Ovarien				
Affe1	+++	++	6	Stroma, Zona pellucida, Blutgefäße Primordialfollikel (PRF): m Primärfollikel (PF): m Sekundärfollikel (SF): m Tertiärfollikel (TF): m
Affe2	+++	++	6	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (m), Blutgefäß, Theca PRF: m PF: m SF: m TF: m
Affe3	+++	++	6	Stroma, Zona pellucida, Blutgefäß, Theca PRF: m PF: m SF: m TF: m
Maus1	++	++	4	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (m), Blutgefäß, Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Maus2	+	++	2	Gelbkörper (m), Stroma, Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Maus3	++	++	4	Stroma, Zona pellucida, Gelbkörper (m), Blutgefäß PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schwein1	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: c TF: c
Schwein2	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: c TF: c
Schwein3	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schaf1	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca PRF:m PF: m SF: m TF: m
Schaf2	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m/c
Schaf3	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m/c
Hund1	+++	++	6	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Hund2	+++	+++	9	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Hund3	++	++	4	Blutgefäße, Gelbkörper (m), Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Katze1	++	+	2	Blutgefäße, Theca, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m
Katze2	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m/c
Katze3	+++	+++	9	Blutgefäße, Theca, Granulosazellen, Zona pellucida PRF:m PF: m SF: m TF: m (Eizelle)

**Auflistung der Reagenzien und Verbrauchsmaterialien:**

<b>Immunhistochemie</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, Staat</b>
1,5%-iges Goat Serum	Sigma Aldrich	St. Louis, Vereinigte Staaten
100%-iger Alkohol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
96%-iger Ethanol	AustrAlco	Spillern, Österreich
30%-iges Wasserstoffperoxid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Objektträger (Histofrost)	Stölzle	Köflach, Österreich
Xylol PHQ	Brenntag	Essen, Deutschland
DAB Quanto	Thermo Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Consul Mounting Medium	Thermo Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Deckgläser 24x50mm Stärke 1 (violett)	Epredia Menzel	Portsmouth, Vereinigte Staaten
<b>Western Blot</b>		
Sterican 20G Einmal-Kanüle	B.Braun	Melsungen, Deutschland
Sterican 23G Einmal-Kanüle	B.Braun	Melsungen, Deutschland
Omnifix-F 1 ml Feindosierungsspritzen	B.Braun	Melsungen, Deutschland
50 ml Zentrifugen-Röhre	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Bemis Curwood Parafilm	Thermo Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Peha-soft Nitrilhandschuhe	Hartmann	Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagents (Entwicklerlösung)	cytiva	Amersham, Vereinigtes Königreich
Immun-Blot LF PVDF Membran	Bio-Rad	Hercules, Vereinigte Staaten
Gel Blot Paper Whatman GB003 (Filterpapier)	cytiva	Amersham, Vereinigtes Königreich
Phosphatase Inhibitor	Sigma Aldrich	St. Louis, Vereinigte Staaten

Protease Inhibitor	Sigma Aldrich	St. Louis, Vereinigte Staaten
Magic Marker XP	invitrogen	Waltham, Vereinigte Staaten
Rotiphorese-Gel 30 (Acrylamidstammlösung)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

### Auflistung der Geräte

<b>Immunhistochemie</b>		
<b>Gerät, Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, Staat</b>
CTM6 Glas-Eindeckautomat	Epredia	Portsmouth, Vereinigte Staaten
Lichtmikroskop, Olympus BX53	Olympus Life Science	Waltham, Vereinigte Staaten
Mikroskop-Digitalkamera, Olympus UC90	Olympus Life Science	Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Western Blot</b>		
Heizblock, Dri-Block D3	Techne	Waltham, Vereinigte Staaten
Mikrozentrifuge 5430R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Messgerät, Infinite M200 Pro	Tecan	Männedorf, Schweiz
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad	Hercules, Vereinigte Staaten
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad	Hercules, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN Short Plates	Bio-Rad	Hercules, Vereinigte Staaten
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad	Hercules, Vereinigte Staaten
Vortexer, MS1 Minishaker	IKA	Staufen, Deutschland
MiniSpin plus - Minizentrifuge	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Messwaage, PB303	Mettler-Toledo	Columbus, Vereinigte Staaten
Magnetrührer, RH basic 2	IKA	Staufen, Deutschland
Wippschüttler ST 5	CAT M. Zipperer	Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Kühlschrank	BOSCH	Stuttgart, Deutschland
Tube Revolver Rotator	Thermo Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Research plus - mechanische Pipette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Pipetman G P5000G	Gilson	Madison, Vereinigte Staaten
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad	Hercules, Vereinigte Staaten
Intellisteam Dampfgarrer	Morphy Richards	Swinton, Vereinigtes Königreich

## Hergestellte Lösungen

### Immunhistochemie

#### **10x PBS**

90 g Natriumchlorid 99,5% (Carl Roth)

2,8 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat 98% (Carl Roth)

11,4 g Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei 99% (Carl Roth)

In 1000 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert überprüfen

#### **0,01 M Citratpuffer pH 6,0**

2,1 g Citronensäure Monohydrat ACS (Merck) in 900 ml Aqua dest. lösen

Mit ca. 13 ml 2M Natronlauge auf pH 6,0 einstellen (tropfenweise)

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

#### **Tris-EDTA Puffer pH 9,0**

10 mM (1,21 g) Tris Base (Sigma Aldrich)

1 mM (0,37 g) EDTA 99% (Carl Roth)

In 900 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert sollte bei 9,0 liegen

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

#### **Hämalaun nach Mayer**

2 g Hämatoxilin (Carl Roth) in 2000 ml Aqua dest. mischen

400 mg Natriumiodat 99% (Carl Roth) und 100 g Aluminiumkaliumsulfat ACS (Merck) zugeben

100 g Chloralhydrat 99,5% (Carl Roth) zugeben

2 g Citronensäure Monohydrat ACS (Merck) zugeben

## **Western Blot**

### **5x SDS/Elektrophorese-Laufpuffer**

15,1 g Tris Base (Carl Roth)  
72,0 g Glycin (Carl Roth)  
5,0 g SDS-pellets (Carl Roth)  
auf 1000 ml auffüllen (mit Aqua bidest.)

### **1 M Tris-HCl**

12,11 g Tris Base (Carl Roth) auf 100 ml Aqua dest.  
Mit 6 mol/l Salzsäure auf pH 6,8/7,5 einstellen

### **4x Tris-HCl/SDS pH 8,8 (Trenngelpuffer)**

91 g Tris-Base (Carl Roth) in 400 ml Aqua dest. lösen  
Mit 6 mol/l Salzsäure den pH auf 8,8 einstellen  
2 g SDS-pellets (Carl Roth) hinzufügen  
auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen

### **4x Tris-Cl/SDS pH 6,8 (Sammelgelpuffer)**

6,06 g Tris Base (Carl Roth) + 40 ml Aqua bidest.  
Mit 6 mol/l Salzsäure den pH auf 6,8 einstellen  
auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen  
Durch einen Filter mit 0,45 µl lassen  
0,4 g SDS-pellets (Carl Roth) hinzufügen

### **Blotting Transfer-Puffer**

4,84 g Tris Base (Carl Roth) + 22,52 g Glycin (Carl Roth)  
in ca. 1000 ml Aqua bidest. lösen  
auf 1600 ml mit Aqua bidest. auffüllen  
400 ml Methanol (Carl Roth) hinzufügen

**5 M NaCl**

146,1 g NaCl (Carl Roth) auf 500 ml Aqua dest. auffüllen

**TBS-T (Waschpuffer)**

40 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5

66,6 ml 5 M NaCl

auf 2000 ml Aqua bidest. auffüllen

1 ml Tween20 (Carl Roth) hinzufügen

**TBS-Lösung**

20 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5

33,3 ml 5 M NaCl

auf 1000 ml Aqua bidest. auffüllen

**Glycerin (3 %) - Ethanol (20 %) Lösung**

100 ml 96% Ethanol (Carl Roth)

380 ml Aqua bidest.

15 ml Glycerol (Serva)

**Coomassie Entfärber**

100 ml Essigsäure (Carl Roth)

400 ml Methanol (Carl Roth)

500 ml Aqua bidest.

**Coomassie Färbelösung**

0,5 g Coomassie R250

100 ml Essigsäure (Carl Roth)

400 ml Methanol (Carl Roth)

500 ml Aqua bidest.

**6x SDS/ sample buffer (Loading dye)**

7 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 6,8

3,6 ml Glycerol (Serva)

1 g SDS (Carl Roth)

0,93 g DTT (Carl Roth)

1,2 mg BFB (Carl Roth)

**Lysepuffer****TRIS-Triton X**

7960 µl Aqua bidest.

100 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5

200 µl 100 mM NaCl

20 µl 1 mM EDTA (Carl Roth)

20 µl 1 mM EGTA (Carl Roth)

100 µl 1 % Triton X-100 (Carl Roth)

1 ml 10% Glycerol (Serva)

100 µl 0,1 % SDS

500 µl 0,5% Na-deoxycholate (Carl Roth)